



(72) ZITVOGEL, LAURENCE, FR

(72) FERNANDEZ, NADINE, FR

(71) INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, FR

(51) Int.Cl.⁶ C12N 5/06, G01N 33/50, A61K 38/18, A61K 35/12, C12N 5/08

(30) 1998/03/03 (98/02558) FR

(30) 1998/08/21 (98/10636) FR

(54) **METHODES D'ACTIVATION DE CELLULES TUEUSES
NATURELLES (NK)**

(54) **METHOD FOR ACTIVATING NATURAL KILLER (NK) CELLS**

(57) La présente invention concerne un procédé d'activation de cellules tueuses naturelles comprenant la mise en contact de cellules NK avec des cellules dendritiques in vitro, ex vivo ou in vivo. L'invention concerne également des compositions cellulaires, comprenant notamment des cellules NK activées, des cocultures cellules NK-cellules dendritiques ou des cellules dendritique, et leur utilisation pour la stimulation de l'activité cytolytique des cellules NK ou de l'immunité naturelle in vivo. L'invention concerne également un facteur de stimulation des cellules NK présent dans la membrane des cellules dendritiques, ainsi que des milieux et facteur(s) de déclenchement des cellules dendritiques et leur utilisation, séparée ou en association, pour stimuler l'activité NK, notamment in vivo. L'invention est utilisable pour contrôler l'activité des cellules NK in vitro, ex vivo ou in vivo, en particulier dans des situations pathologiques.

(57) The invention concerns a method for activating natural killer cells which consists in contacting NK cells with dendritic cells in vitro, ex vivo or in vivo. The invention also concerns cell compositions, comprising in particular activated NK cells, NK cells-dendritic cells cocultures or dendritic cells, and their use for stimulating cytolytic activity of NK cells or natural immunity in vivo. The invention further concerns a factor stimulating the NK cells present in the membrane of dendritic cells, and media and factor(s) triggering dendritic cells and their use, whether separate or combined, stimulating NK activity, particularly in vivo. The invention can be used to control the activity of NK cells in vitro, ex vivo or in vivo, particularly in pathological conditions.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 5/06, 5/08, A61K 35/12, 38/18, G01N 33/50	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/45102 (43) Date de publication internationale: 10 septembre 1999 (10.09.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00482 (22) Date de dépôt international: 3 mars 1999 (03.03.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/02558 3 mars 1998 (03.03.98) FR 98/10636 21 août 1998 (21.08.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT GUSTAVE ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif Cedex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ZITVOGEL, Laurence [FR/FR]; 28, rue du Faubourg Saint-Jacques, F-75014 Paris (FR). FERNANDEZ, Nadine [FR/FR]; 225, rue de la Croix-Nivert, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR ACTIVATING NATURAL KILLER (NK) CELLS (54) Titre: METHODES D'ACTIVATION DE CELLULES TUEUSES NATURELLES (NK) (57) Abstract The invention concerns a method for activating natural killer cells which consists in contacting NK cells with dendritic cells in vitro, ex vivo or in vivo. The invention also concerns cell compositions, comprising in particular activated NK cells, NK cells-dendritic cells cocultures or dendritic cells, and their use for stimulating cytolytic activity of NK cells or natural immunity in vivo. The invention further concerns a factor stimulating the NK cells present in the membrane of dendritic cells, and media and factor(s) triggering dendritic cells and their use, whether separate or combined, stimulating NK activity, particularly in vivo. The invention can be used to control the activity of NK cells in vitro, ex vivo or in vivo, particularly in pathological conditions. (57) Abrégé La présente invention concerne un procédé d'activation de cellules tueuses naturelles comprenant la mise en contact de cellules NK avec des cellules dendritiques in vitro, ex vivo ou in vivo. L'invention concerne également des compositions cellulaires, comprenant notamment des cellules NK activées, des cocultures cellules NK-cellules dendritiques ou des cellules dendritique, et leur utilisation pour la stimulation de l'activité cytolytique des cellules NK ou de l'immunité naturelle in vivo. L'invention concerne également un facteur de stimulation des cellules NK présent dans la membrane des cellules dendritiques, ainsi que des milieux et facteur(s) de déclenchement des cellules dendritiques et leur utilisation, séparée ou en association, pour stimuler l'activité NK, notamment in vivo. L'invention est utilisable pour contrôler l'activité des cellules NK in vitro, ex vivo ou in vivo, en particulier dans des situations pathologiques.		

MÉTHODES D'ACTIVATION DE CELLULES TUEUSES NATURELLES (NK)

La présente invention concerne le domaine de la biologie et de l'immunologie. Elle concerne plus particulièrement de nouvelles méthodes de préparation de cellules tueuses naturelles activées et les moyens de mise en œuvre de ces nouvelles méthodes, notamment de nouvelles populations de cellules dendritiques et des produits dérivés. Elle concerne également l'utilisation des cellules activées obtenues par les méthodes de l'invention, dans les domaines de l'immunologie, l'immunothérapie ou plus généralement de la Biotechnologie médicale.

10 Les cellules tueuses naturelles (« cellules NK ») sont une population de lymphocytes qui représentent une ligne de défense très précoce contre les virus et les cellules tumorales. Les cellules NK peuvent être caractérisées par la présence des marqueurs CD56 et CD16, et par l'absence du marqueur CD3. Les cellules NK ont notamment été impliquées dans l'immunité antitumorale non spécifique d'antigènes, 15 pour la prévention d'établissement de tumeurs primitives ou métastatiques chez l'hôte immunocompétent ou immunosupprimé. En particulier, le rôle des cellules NK dans l'immunosurveillance antitumorale (tumeur primitive ou métastases) a été suggéré chez les souris porteuses de tumeurs et traitées par IL-2 et/ou IL-12/IL-15, avec ou sans cellules LAK (« cellules tueuses activées par les lymphokines »), cellules NK 20 adhérentes (« A-NK ») ou non-adhérentes (« NA-NK ») - obtenues ex vivo en stimulant les cellules NK par de fortes doses d'IL-2. Les cellules NK semblent en particulier avoir un rôle clef contre les cellules tumorales ou les variants CMH classe I négatifs.

En raison de leurs propriétés cytotoxiques non-spécifiques d'antigène et de leur efficacité, les cellules NK constituent donc une population de cellules effectrices 25 particulièrement intéressante pour le développement d'approches immunoadoptives de traitement de cancers ou maladies infectieuses. A cet égard, des approches d'immunothérapie adoptive antitumorales ont été décrites dans l'art antérieur. Ainsi, dans certaines indications comme les patients porteurs de lymphomes malins intensifiés, l'administration de A-NK avec faibles doses d'IL-2 a donné des résultats 30 prometteurs en situation adjuvante. Les cellules NK ont également été utilisées pour le traitement expérimental de différents types de tumeurs et certaines études cliniques ont été initiées (Kuppen et al., Int. J. Cancer. 56 (1994) 574 ; Lister et al., Clin. Cancer Res. 1 (1995) 607 ; Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 316 (1987) 889).

En outre, ces cellules peuvent également être utilisées in vitro pour la lyse non-spécifique de cellules n'exprimant pas de molécules du CMH de classe-I, et plus généralement de toute cellule sensible aux cellules NK.

Toutefois, la thérapie adoptive utilisant les cellules NK (pour le traitement de
5 tumeurs murines ou humaines ou d'autres pathologies telles que les maladies infectieuses) ou toute autre utilisation in vitro ou in vivo de ces cellules impliquent l'expansion et l'activation ex vivo des cellules NK. A cet égard, les techniques actuelles d'activation des cellules NK reposent toutes sur l'utilisation de cytokines, généralement à fortes doses mal tolérées par l'hôte. En effet, les données disponibles semblent
10 indiquer que les cellules NK ex vivo ne survivent pas et ne peuvent être activées sans support nourricier ni cytokines.

Ainsi, les méthodes actuelles d'activation des cellules NK in vitro impliquent la culture de ces cellules en présence de différentes cytokines (telles que par exemple IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IFN α , IFN γ , IL-6, IL-4, IL-18 dans certaines circonstances), seules
15 ou en combinaison, activation qui peut être considérablement augmentée par des facteurs d'adhésion ou de costimulation tels que ICAM, LFA ou CD70. De manière similaire, in vivo, l'efficacité des cellules NK dans l'immunité antitumorale n'est pas dissociable de la co-administration de cytokines telles que IL-2/IL-15 ou IL-12, IL-18, et IL-10. Les IFN ont aussi un rôle activateur en association à l'IL-2. Les méthodologies
20 d'activation décrites dans l'art antérieur sont donc toutes dépendantes de l'utilisation de cytokines. Or, ces méthodes présentent certains inconvénients, liés notamment aux coûts de préparation des cytokines, au caractère toxique de nombreuses cytokines, qui ne peuvent être utilisées dans des applications in vivo, ou encore au caractère non-spécifique de nombreuses cytokines, dont l'emploi in vivo risque de s'accompagner de
25 nombreux effets indésirables. En outre, la fonction "natural killing" étant souvent altérée chez les patients porteurs de tumeurs, la possibilité de prélever ces cellules en vue de leur activation ex vivo peut être considérablement réduite.

Il existe donc un besoin réel de disposer de nouvelles méthodes d'activation de cellules NK. La présente demande apporte une solution à ce problème en proposant
30 des nouvelles approches originales pour l'activation des cellules NK. La présente demande démontre en particulier, pour la première fois, la possibilité d'activer les cellules NK au repos avec une autre population de cellules. La présente demande décrit également, pour la première fois, une méthode d'activation des cellules NK non-dépendante de la présence de cytokines, et donc permettant de pallier aux

inconvenients décrits dans l'art antérieur. La présente invention décrit donc de nouvelles méthodes de préparation de cellules tueuses naturelles activées et les moyens de mise en œuvre de ces nouvelles méthodes.

Un premier aspect de l'invention réside donc dans une méthode d'activation des
5 cellules NK comprenant la mise en contact de cellules NK avec des cellules dendritiques. Comme indiqué ci-après, la mise en contact peut être réalisée in vitro, ex vivo ou in vivo. Elle peut comprendre soit la coculture de cellules NK et de cellules dendritiques in vitro, soit l'incubation de cellules NK in vitro ou in vivo avec une préparation dérivée de cellules dendritiques, notamment des vésicules membranaires
10 (exosomes) ou un facteur de stimulation des cellules NK provenant des cellules dendritiques, soit encore le transfert passif in vivo de cellules dendritiques, soit également l'administration in vivo d'un ou plusieurs facteurs de croissance des cellules dendritiques.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de cellules dendritiques ou
15 d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, pour l'activation de cellules tueuses naturelles in vitro, ex vivo ou in vivo.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de cellules dendritiques ou d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules tueuses naturelles in vivo.

20 Un autre aspect de l'invention concerne également une coculture de cellules dendritiques et de cellules NK.

Un aspect supplémentaire de l'invention est relatif à une composition comprenant un facteur de stimulation des cellules NK provenant des cellules dendritiques.

25 Un autre aspect de l'invention concerne une méthode de déclenchement ("triggering") des cellules dendritiques pour améliorer (ou provoquer) leur capacité de stimulation des cellules NK, ainsi qu'un milieu ou un facteur de déclenchement des cellules dendritiques et toute composition le comprenant. L'invention concerne aussi une nouvelle population de cellules dendritiques, dites "déclenchées" (ou "triggered
30 Dendritic cells"), ainsi que toute composition les contenant et leurs utilisations.

D'autres aspects de l'invention sont notamment une sous-population de cellules NK activées par le procédé de l'invention et l'utilisation de ces cellules ou de co-cultures NK/DC pour stimuler in vivo ou in vitro une activité cytotoxique contre des cellules cibles sensibles aux cellules NK. Selon un autre aspect, l'invention est également relative à

des méthodes permettant l'augmentation majeure de l'activité cytolytique et sécrétrice d'IFN γ des cellules NK au repos.

L'invention concerne également des approches thérapeutiques nouvelles, notamment pour le traitement de pathologie infectieuses, tumorales, autoimmunes, 5 congénitales ou liées à la transplantation, par exemple. Les méthodes de l'invention impliquent en particulier le transfert passif (i) de cellules NK activées par des cellules dendritiques ex vivo, ou bien (ii) de cellules dendritiques (en particulier de cellules dendritiques déclenchées) ou d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, pour activer directement les cellules NK in situ, ou bien (iii) des deux populations cellulaires 10 co-incubées ex vivo, ou encore (iv) l'administration du facteur de "déclenchement" des cellules dendritiques pour déclencher les cellules dendritiques in vivo de telle manière qu'elles deviennent capables d'activer efficacement les cellules NK, facteur administré seul ou en association avec des chemokines ou des cytokines ou des facteurs de croissance des cellules dendritiques, par exemple, ou bien l'administration du facteur 15 de stimulation des cellules NK ou d'un facteur de croissance des cellules dendritiques, seuls ou en combinaisons.

Comme indiqué ci-avant, un premier objet de l'invention concerne donc un procédé pour l'activation de cellules NK au moyen de cellules dendritiques. Ce procédé comprend notamment la mise en présence de cellules NK avec des cellules 20 dendritiques ou une préparation dérivée de cellules dendritiques. La présente invention découle en particulier de la démonstration par la demanderesse de la capacité des cellules dendritiques à activer les cellules NK au repos.

Les résultats présentés dans la présente demande démontrent notamment que les cellules NK au repos, co-cultivées en présence de cellules dendritiques, survivent et 25 sont très fortement activées pour leur capacité lytique et de production d'IFN γ . En outre, les cellules activées ainsi obtenues lysent des cibles NK sensibles mais pas les cibles LAK sensibles, ce qui différencie ce phénomène d'activation du phénomène LAK classique, IL-2 dépendant. La présente demande démontre également que les cellules dendritiques allogéniques aussi bien qu'autologues sont capables d'activer les cellules 30 NK in vitro, et que les mécanismes d'activation des cellules NK en présence des cellules dendritiques ou d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, n'impliquent pas l'IL-12 ni l'IL-2, ni l'IL-15 ni l'IFN α . D'autre part, les résultats présentés montrent également l'implication d'une interaction entre les cellules NK et les membranes des cellules dendritiques dans le processus d'activation, démontrant l'existence d'un facteur

membranaire des cellules dendritiques intervenant dans cette activation. Les résultats obtenus montrent aussi que des vésicules membranaires produites par les cellules dendritiques sont également capables d'activer les cellules NK, ce qui indique que le facteur de stimulation des cellules NK exprimé par les cellules dendritiques est présent
5 dans lesdites vésicules.

La pertinence de cette activation des cellules NK par les cellules dendritiques a de plus été démontrée in vivo, dans un modèle de tumeur CMH classe I négatif. Dans les souris porteuses de cette tumeur, la seule expansion de cellules dendritiques permet l'élimination de la tumeur de façon NK-dépendante. De plus, le transfert adoptif
10 passif de cellules dendritiques à l'animal immunosupprimé déficient en cellules T et B, porteur de la tumeur, permet également un ralentissement significatif de la croissance tumorale.

Ces résultats démontrent donc que les cellules dendritiques ou des préparations dérivées de cellules dendritiques, possèdent la capacité d'induire l'activation des
15 cellules NK, in vitro, ex vivo ou in vivo, que cette activation permet de stimuler in vitro la lyse de cellules NK-sensibles et in vivo l'immunité naturelle d'un organisme hôte, et peut ainsi conduire à l'élimination in vivo de tumeurs, de cellules infectées, ou impliquées dans d'autres processus pathologiques (maladies autoimmunes, rejet de greffe, réaction du greffon contre l'hôte, etc.).

Les résultats obtenus dans la présente invention sont d'autant plus surprenants que, jusqu'à présent, peu ou pas d'études avaient suggéré que les cellules NK
20 pouvaient être activables, in vitro, par un autre type cellulaire, excepté des transfectants codant pour l'IL-2 et/ou l'IL-12, IL-15 et CD70. Au contraire, certains travaux semblaient plutôt suggérer un rôle inhibiteur des macrophages sur l'activation IL-2 dépendante des
25 cellules NK, par l'intermédiaire des PGE2.

La présente invention constitue, à notre connaissance, la première mise en évidence d'une activation des cellules NK, non dépendante de cytokines, et utilisant une autre population cellulaire ou une préparation ou un facteur dérivés de celle-ci.

Le terme "activation" de cellules NK au sens de l'invention désigne plus
30 particulièrement l'augmentation de la production d'IFN γ et/ou de l'activité cytotoxique des cellules NK. Ces deux paramètres peuvent être aisément mesurés selon les techniques connues de l'homme du métier et illustrées dans les exemples. Généralement, l'activation selon l'invention ne s'accompagne pas d'une augmentation importante de la prolifération des cellules NK, toute population confondue, mais pourrait

induire la prolifération d'une sous-population de celles-ci. En revanche, cette activation s'accompagne d'une augmentation significative de la survie des cellules NK in vitro. Plus particulièrement, l'activation de cellules NK au sens de l'invention est indépendante de l'utilisation de cytokines classiques. Le terme cellules NK "activées" désigne au sens de l'invention des cellules NK présentant au moins l'une des propriétés mentionnées ci-dessus.

Le procédé d'activation des cellules NK selon la présente invention peut être mis en oeuvre in vitro, ex vivo ou directement in vivo.

10 Activation de NK en présence de cellules dendritiques

Dans un premier mode particulier de réalisation, le procédé de l'invention comprend l'activation des cellules NK in vitro ou ex vivo par coculture des cellules NK avec des cellules dendritiques matures ou immatures, autologues ou allogéniques, de préférence déclenchées.

15 Selon ce premier mode de mise en oeuvre du procédé de l'invention, les cellules NK sont donc co-cultivées avec des cellules dendritiques. Dans ce mode de mise en oeuvre, les cellules dendritiques utilisées peuvent être soit autologues (c'est-à-dire provenir du même sujet que les cellules NK), soit allogéniques (c'est-à-dire provenir d'un autre sujet de la même espèce). En effet, les résultats présentés dans les
20 exemples montrent que l'activation des cellules NK n'est pas affectée significativement par le caractère allogénique des cellules dendritiques. Ceci permet de manière particulièrement avantageuse d'utiliser, pour l'activation des cellules NK, des banques « universelles » de cellules dendritiques. De telles banques peuvent être constituées, comme décrit ci-après, par exemple par modification des cellules dendritiques de
25 manière à les rendre immortelles. A cet égard, différentes lignées de cellules dendritiques peuvent être utilisées pour la mise en oeuvre de la présente invention, établies préférentiellement à partir de cellules dendritiques humaines immatures.

Préalablement à leur utilisation, il est par ailleurs possible de soumettre les cellules dendritiques à des pré-traitements en vue d'améliorer leurs propriétés ou de les
30 rendre compatibles avec un usage pharmacologique. Ainsi, les cellules dendritiques peuvent être soumises à une irradiation, préalablement à leur utilisation pour l'activation des cellules NK. Une telle irradiation permet notamment d'éliminer tout risque cancérigène associé à certaines populations de cellules dendritiques telles les cellules dendritiques immortalisées. Le prétraitement par irradiation peut être particulièrement

souhaitable lorsque les cellules dendritiques ou les co-cultures sont utilisées in vivo. Un autre prétraitement des cellules dendritiques peut consister en une incubation en présence de facteurs de stimulation des cellules dendritiques (cytokines, chemokines, heat shock protein par exemple), de manière à améliorer leur activité de stimulation des cellules NK ou de manière à déclencher la production de dexosomes.

Préparation et utilisation de cellules dendritiques déclenchées

Un traitement particulièrement avantageux des cellules dendritiques comprend le traitement de ces cellules en présence d'un milieu de déclenchement. La présente invention décrit en effet la production et la caractérisation d'une nouvelle population de cellules dendritiques ayant des capacités de stimulation de NK fortement améliorées. Ces cellules dendritiques, dites "déclenchées", leur préparation et leurs utilisations constituent un autre objet de la présente demande.

Le terme "déclenchement" désigne au sens de la présente invention la mise en présence d'un signal, différent de la modulation de leur stade de différenciation, qui induit chez les cellules dendritiques une forte capacité de stimulation des cellules NK. Le "milieu de déclenchement" peut donc comprendre toute substance, généralement biologique, capable de fournir aux cellules dendritiques un signal induisant une capacité élevée à stimuler les cellules NK. Les cellules dendritiques ainsi traitées sont aussi désignées dans la présente demande par cellules dendritiques "déclenchées" (ou "tDC" pour "triggered dendritic cells").

Un objet particulier de l'invention concerne donc une méthode de traitement des cellules dendritiques comprenant la mise en contact des cellules dendritiques avec un milieu de déclenchement, permettant d'améliorer (ou de provoquer) leur capacité de stimulation des cellules NK.

Un autre objet de l'invention réside également dans un milieu de déclenchement de cellules dendritiques, c'est à dire un milieu permettant d'améliorer (ou de provoquer) la capacité des cellules dendritiques à stimuler les cellules NK.

Un milieu de déclenchement approprié à la présente invention peut comprendre, par exemple, des cellules capables de fournir le signal approprié aux cellules dendritiques, une préparation dérivée de telles cellules, un facteur dérivé de telles cellules ou toute substance, de préférence biologique, susceptible de déclencher les cellules dendritiques. Le milieu de déclenchement comprend en outre avantageusement des facteurs de croissance et/ou des cytokines, notamment du GM-

CSF et/ou de l'interleukine-4, ainsi que, le cas échéant, des constituants d'un milieu de culture de cellules mammifère (sérum, vitamines, acides aminés, etc.).

Parmi les cellules susceptibles d'être utilisées pour le déclenchement des cellules dendritiques, on peut mentionner plus particulièrement la matrice
5 extracellulaire, et notamment les cellules stromales, endothéliales ou fibroblastiques. Ces cellules, plus particulièrement lorsqu'elles sont en phase de division, permettent de déclencher les cellules dendritiques. Il en est de même de certaines cellules tumorales, comme par exemple les cellules de mastocytome. Un mode de réalisation particulier de l'invention comprend l'utilisation de fibroblastes pour le déclenchement. La
10 demanderesse a en effet montré que les fibroblastes permettaient aux cellules dendritiques de stimuler avec beaucoup plus d'efficacité les cellules NK. A cet égard, il peut s'agir de fibroblastes immortalisés, de lignées transformées, de cultures primaires, activées ou non, préparées à l'avance ou extemporanément, etc. De préférence, les cellules utilisées pour la coculture DC-cellule de déclenchement sont en division ou
15 susceptibles de se diviser. Parmi les lignées de fibroblastes utilisables on peut citer à titre d'exemple les lignées NIH 3T3, L-929, MRC5 ou TIB80, par exemple.

Pour la mise en oeuvre de cette méthode, les fibroblastes (ou autres cellules) utilisés peuvent être autologues, allogéniques ou xénogéniques vis-à-vis des cellules dendritiques. En effet, de manière surprenante, les résultats présentés dans les
20 exemples montrent que les cellules dendritiques humaines peuvent être déclenchées par des fibroblastes d'une espèce différente, notamment par des fibroblastes murins. Dans ce mode de mise en oeuvre (coculture in vitro), le déclenchement (traitement) peut être réalisé dans un rapport DC/cellules variant de 0,1 à 100 environ, de préférence de 0,5 à 10, en particulier de 1 à 5. Il est entendu que ce rapport peut être
25 adapté par l'homme du métier. En outre, dans ce mode de réalisation, on utilise préférentiellement des cellules irradiées (par exemple entre 2000 et 8000 rad).

Comme milieu de déclenchement, il est également possible d'utiliser, au lieu des cellules intactes, une préparation ou un facteur qui en est dérivé. Ainsi, il est possible d'utiliser par exemple un surnageant, un lysat, une préparation acellulaire, un facteur
30 isolé et/ou purifié, etc. Les résultats présentés dans les exemple montrent en particulier qu'un surnageant de culture de fibroblastes permet de déclencher les cellules dendritiques, c'est-à-dire de les rendre capables d'activer des cellules NK au repos de manière très efficace (notamment plus rapide). Dans ce mode de mise en oeuvre, on utilise par exemple de 1 à 20 ml environ d'un surnageant de cellules (par exemple de

fibroblastes) pour 10^6 cellules dendritiques, dans un volume final de 30 ml environ. Il est donc possible d'utiliser un surnageant dilué 1,5 à 30 fois, de préférence 2 à 5 fois. Ces conditions peuvent bien entendu être adaptées par l'homme du métier en fonction des populations cellulaires utilisées. Par ailleurs, l'activité décrite ci-dessus pour le surnageant de culture démontre l'existence d'un facteur soluble responsable de ou suffisant pour réaliser le déclenchement, sécrété par les cellules, notamment les fibroblastes. Un autre milieu de déclenchement comprend donc par exemple un concentrat/filtrat de surnageant, plus particulièrement un facteur soluble mentionné ci-dessus, sous une forme isolée et/ou purifiée et/ou recombinante. Ainsi, comme milieu de déclenchement, il est possible d'utiliser le facteur soluble décrit ci-dessus ou un cellule recombinante exprimant ce facteur. Il est également possible d'utiliser toute autre substance, notamment biologique, permettant de déclencher les cellules dendritiques pour l'activation des cellules NK.

Généralement, le déclenchement est réalisé par incubation des cellules dendritiques en présence du milieu de déclenchement, pendant une période pouvant aller de 15 à 72 heures, plus habituellement de 20 à 48 heures environ. L'état "déclenché" des cellules dendritiques n'entraîne pas de modification de leur phénotype immunologique. Ainsi, des cellules dendritiques immatures restent immatures après déclenchement (expression de HLA-DR, CD40, CD80, CD86, CD83, CD1a). Le stade "déclenché" peut être mis en évidence de différentes façons, et généralement en testant la capacité des cellules à activer les cellules NK in vitro, comme décrit dans les exemples, ou en dosant le facteur de déclenchement soluble dans le surnageant de culture.

Par ailleurs, dans le cadre de l'activation des cellules NK, le déclenchement des cellules dendritiques peut être réalisé préalablement à l'incubation en présence des cellules NK, ou de manière concomitante à celle-ci.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne également une population de cellules dendritiques dites déclenchées. A cet égard, un objet de l'invention réside donc également dans une composition comprenant des cellules dendritiques déclenchées, notamment humaines, matures ou immatures, c'est-à-dire des cellules dendritiques ayant une capacité accrue de stimulation des cellules NK, en particulier d'un facteur 2 au moins par rapport aux cellules dendritiques non déclenchées.

Les cellules dendritiques déclenchées selon l'invention sont plus particulièrement définies en ce qu'elles activent les cellules NK au repos et en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par traitement de cellules dendritiques matures ou immatures en présence d'un milieu ou d'un facteur de déclenchement tel que défini ci-avant, comprenant de préférence une culture de cellules de la matrice extracellulaire ou un surnageant de telles cellules.

Co-cultures CD-NK

Pour la mise en œuvre du procédé d'activation des NK de l'invention, les cellules dendritiques utilisées peuvent être des cellules dendritiques matures (en particulier dans un système murin) ou préférentiellement immatures (dans les systèmes humain et murin). Comme le montrent les exemples, les cellules dendritiques possèdent la propriété d'activer les cellules NK quel que soit leur stade de maturité, en particulier après déclenchement comme décrit ci-dessus.

Pour que l'activation soit plus efficace, il convient avantageusement de respecter certains paramètres tels que le rapport de cellules NK sur cellules dendritiques et/ou le temps de la cocubation. Ainsi, les expériences réalisées par la demanderesse ont mis en évidence que les meilleures performances du procédé d'activation in vitro ou ex vivo sont obtenues lorsque le rapport initial cellules NK sur cellules dendritiques est compris entre 0,01 et 10, de préférence entre 0,05 et 5. Il est entendu que l'homme du métier est en mesure d'adapter ce rapport en fonction des populations cellulaires utilisées, en tenant compte de l'effet d'étouffement des cellules NK qui peut être observé lorsque la quantité de cellules dendritiques est trop importante, et du faible niveau d'activation qui peut être observé lorsque le nombre de cellules dendritiques est trop faible. Des conditions particulièrement préférées sont celles dans lesquelles le rapport initial cellules NK sur cellules dendritiques est compris entre 0,1 et 1, plus préférentiellement de 0,1 à 0,5 environ.

Concernant le temps de la coculture, il peut également être adapté par l'homme du métier en fonction des populations cellulaires utilisées et notamment du stade de maturation et de déclenchement des cellules dendritiques. Généralement, l'activation optimale des cellules NK est observée après coculture pendant une période comprise entre 18 et 48 heures environ. Préférentiellement, lorsque les cellules dendritiques sont déclenchées comme décrit ci-dessus, l'activation des cellules NK au repos est obtenue après une période de coculture inférieure à 20 heures. Les périodes de coculture

indiquées ci-dessus permettent notamment d'obtenir la meilleure combinaison entre la proportion de cellules NK activées et la proportion de cellules viables. Il est à noter à cet égard que, durant la période d'activation par les cellules dendritiques, aucune prolifération globale significative des cellules NK n'est observée (facteur 2 environ) n'excluant pas la prolifération isolée et particulière d'une sous-population NK. De plus, de manière particulièrement inattendue, il apparaît que les cellules dendritiques exercent également un effet positif sur la survie des cellules NK en culture. De ce fait, le procédé de l'invention permet d'obtenir des cellules NK activées, sans recours obligatoire à des cytokines, et avec des rendements améliorés. De même, les cellules NK en retour augmentent la survie des CD matures.

L'activation des cellules NK et le déclenchement des cellules dendritiques in vitro peuvent être réalisés dans tout dispositif approprié à la culture cellulaire, de préférence en conditions stériles. Il peut s'agir notamment de plaques, boîtes de culture, flasques, fioles, poches, etc. La co-culture est par ailleurs réalisée dans tout milieu adapté à la culture des cellules dendritiques et des cellules NK. Il peut s'agir plus généralement de milieux de culture disponibles dans le commerce pour la culture de cellules mammifères, tels que par exemple le milieu RPMI, le milieu DMEM, le milieu IMDM ou des milieux GBEA (AIMV, X-VIVO), etc.

Selon une première variante particulière du procédé de l'invention, l'activation in vitro ou ex vivo des cellules NK est réalisée par coculture de cellules dendritiques matures avec des cellules NK.

Dans une expérience typique, les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse par traitement avec GM-CSF+IL-4, maturées en LPS, ou des cellules d'une lignée établie de cellules dendritiques, à l'état mature, sont resuspendues dans leur milieu de culture à 1 million/ml. Elles sont ensuite mises en culture en plaques ou tout autre dispositif approprié. Des cellules NK fraîches au repos (autologues ou allogéniques), obtenues après étape d'adhérence, sont resuspendues dans un milieu approprié (milieu RPMI supplémenté par exemple) à la concentration d'1 million/ml. Elles sont ensuite ajoutées à la plaque contenant les cellules dendritiques, de telle façon que le ratio initial NK : CD soit de 0,1 à 0,3 environ. La coculture est recueillie à 18-36 heures environ. Le caractère activé des cellules NK est contrôlé par mesure de la production d'IFN γ dans le surnageant et mesure de la cytotoxicité contre des cellules cibles. Les cellules NK sont également comptées (par exemple en bleu trypan) et analysées (par exemple en cytométrie de flux) pour l'expression de marqueurs

caractéristiques (tels que NK1.1 D x 5, ou asialo-GM1 chez la souris) et pour évaluer la mortalité cellulaire.

Selon une autre variante particulière du procédé de l'invention, l'activation in vitro ou ex vivo des cellules NK est réalisée par coculture de cellules dendritiques immatures avec des cellules NK.

Dans une expérience typique, les cellules sont traitées de façon identique à celle décrite ci-dessus, mais elles ne sont pas incubées en milieu de maturation, de manière à maintenir les cellules dendritiques à un stade immature. Dans ce mode de réalisation, la coculture est maintenue avantageusement au moins 36-72 heures pour permettre une activation optimale des cellules NK. Les cellules NK activées peuvent ensuite être analysées et contrôlées comme décrit ci-avant.

Dans un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, l'activation in vitro ou ex vivo des cellules NK est réalisée par coculture de cellules dendritiques déclenchées avec des cellules NK. Dans ce mode de réalisation, une coculture de moins de 20 heures est suffisante pour permettre une activation optimale des cellules NK. Les cellules NK activées peuvent ensuite être analysées et contrôlées comme décrit ci-avant. Plus préférentiellement, il s'agit de cellules dendritiques immatures préincubées en présence d'un milieu de déclenchement. Encore plus préférentiellement, il s'agit de cellules dendritiques immatures préincubées en présence de fibroblastes ou d'un surnageant de fibroblastes ou d'un facteur protéique produit par des fibroblastes.

Lorsque les cellules NK ont été ainsi activées, il est possible soit de séparer les cellules NK des cellules dendritiques, soit de récolter directement la coculture cellules NK:cellules dendritiques. A cet égard, l'invention a également pour objet une composition comprenant des cellules NK et des cellules dendritiques, en particulier une coculture cellules NK:cellules dendritiques. Comme indiqué ci-avant, il s'agit avantageusement de cellules NK activées. En outre, il peut s'agir de cellules dendritiques matures ou immatures, préférentiellement déclenchées. Enfin, dans ces compositions selon l'invention, les populations cellulaires sont préférentiellement autologues, c'est-à-dire issues d'un même organisme. Ces compositions sont avantageusement constituées de populations cellulaires isolées, c'est-à-dire que chacune des deux populations cellulaires est composée au moins à 10%, de préférence au moins 30%, notamment au moins 50% du type cellulaire correspondant (NK ou dendritique). Par ailleurs, les compositions préférées selon l'invention

comprennent généralement au moins 10%, de préférence de 20 à 60%, encore plus préférentiellement de 30 à 60% de cellules NK, et au moins 40%, de préférence de 40 à 80% de cellules dendritiques. L'invention concerne aussi toute composition comprenant des cellules NK activées comme décrit dans la présente demande. Les compositions de l'invention peuvent être conditionnées dans tout dispositif adapté tel que poches, fioles, ampoules, seringues, flacons, etc., et peuvent être conservées (au froid) ou utilisées extemporanément, comme décrit plus loin. Avantageusement, ces compositions comprennent de 10^4 à 10^9 cellules NK, de préférence de 10^6 à 10^8 environ (notamment pour une administration chez l'homme) ou encore de 10^5 - 10^6 (notamment pour une administration chez la souris).

Activation de NK en présence d'une préparation dérivée de CD

Dans un autre mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend l'activation des cellules NK in vitro, ex vivo ou in vivo par mise en présence des cellules NK avec une préparation dérivée de cellules dendritiques. La préparation dérivée de cellules dendritiques peut être toute préparation ou fraction membranaire de cellules dendritiques, un lysat cellulaire de cellules dendritiques, des vésicules membranaires de cellules dendritiques, ou le facteur de stimulation dérivé des cellules dendritiques, sous forme isolée, enrichie ou purifiée.

En effet, comme illustré dans la présente demande, l'activation des cellules NK peut être obtenue non seulement en présence de cellules dendritiques intactes, mais également de préparations membranaires de celles-ci, en particulier de vésicules membranaires (e.g., dexosomes), ou également d'un facteur de stimulation de nature protéique.

Selon une première variante, le procédé de l'invention comprend l'activation des cellules NK in vitro, ex vivo ou in vivo par mise en présence des cellules NK avec des vésicules membranaires produites par les cellules dendritiques. A cet égard, il a été mis en évidence que les cellules dendritiques produisent des vésicules membranaires, d'un diamètre compris généralement entre 50 et 100 nm, désignées dexosomes (FR9709007 ; FR9801437). La présente invention montre à présent que ces vésicules sont également douées de l'activité de stimulation des cellules NK. En particulier, la présente demande montre que les dexosomes produits à partir de cellules dendritiques humaines ou murines sont capables d'activer des cellules NK murines. En outre, les

résultats obtenus montrent que cette activation est observée même avec des dexosomes produits par des cellules dendritiques non-déclenchées.

De préférence, pour la mise en oeuvre de cette variante, on utilise des dexosomes produits à partir de cellules dendritiques immatures, de préférence autologues ou allogéniques. Pour des applications in vitro ou ex vivo, il est préférable d'utiliser les dexosomes dans une gamme de concentration variant de 10 à 100 µg de protéines exosomales pour un million de cellules NK. La quantité de protéines exosomales peut être aisément déterminée par l'homme du métier, par exemple par le test de Bradford (Annal. Biochem. 72 (1976) 248). Plus préférentiellement on utilise les dexosomes à une concentration supérieure ou égale à 15 µg/10⁶ cellules NK, encore plus préférentiellement supérieure ou égale à 20 µg/10⁶ cellules NK. Il est à noter que ces concentrations peuvent être adaptées par l'homme du métier, et peuvent être transposées aux utilisations in vivo. En particulier, pour une utilisation in vivo, on peut utiliser des doses d'exosomes supérieures à 50 ou à 100µg/injection.

Les dexosomes peuvent être préparés selon les techniques décrites dans les demandes FR9709007 et FR9801437, par exemple, qui sont illustrées dans les exemples. Brièvement, les cellules dendritiques sont cultivées, de préférence au stade immature, de préférence dans un milieu favorisant la production des dexosomes. Les dexosomes sont ensuite isolés par des méthodes telles que la centrifugation (notamment par ultracentrifugation différentielle à 70 000g), ou toute autre technique connue de l'homme du métier. Les dexosomes sont ainsi isolés, aliquotés et conservés ou utilisés extemporanément pour la stimulation des cellules NK.

Selon une autre variante, le procédé de l'invention comprend l'activation des cellules NK in vitro, ex vivo ou in vivo par mise en présence des cellules NK avec un facteur de stimulation provenant des cellules dendritiques, notamment des cellules dendritiques déclenchées.

Les résultats présentés dans la présente demande illustrent en effet le caractère spécifique de l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques, et donc indiquent l'implication d'un ou plusieurs facteurs produits ou exprimés par les cellules dendritiques dans la réalisation de cet effet. A cet égard, la présente demande montre également, dans une expérience de "transwell", qu'un contact intercellulaire entre les cellules NK et les cellules dendritiques ou une préparation membranaire dérivée de celle-ci semble nécessaire à l'activation. Ces résultats illustrent donc clairement l'existence d'un facteur de stimulation des cellules NK exprimé (à la surface) par les cellules dendritiques et les

dexosomes, responsable de ou au moins nécessaire à cette activation des cellules NK. Ce facteur de (co-)stimulation (membranaire), ou toute préparation acellulaire le comprenant, ou tout dérivé ou formes recombinantes de ce facteur ainsi que les acides nucléiques correspondants, peuvent donc également être utilisés in vitro ou in vivo pour
5 activer les cellules NK, notamment pour des applications dans l'immunisation antitumorale ou antivirale. Ce facteur peut par ailleurs être bloqué par l'utilisation d'un compétiteur, d'anticorps spécifiques ou encore d'antisens, dans certaines situations telles que la maladie du greffon contre l'hôte ou le rejet de greffe.

Un autre objet de la présente invention concerne également une composition
10 comprenant un facteur de stimulation des cellules NK dérivé des CD, en particulier un facteur membranaire impliqué dans l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques. Le terme "impliqué" signifie que ce facteur est nécessaire ou tout au moins participe à l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques. Cette composition est par exemple composée d'un extrait acellulaire de cellules dendritiques
15 comprenant ledit facteur, ou de vésicules membranaires ou de toute forme isolée ou purifiée de ce facteur. Le terme "dérivé" indique que ce facteur, de nature essentiellement protéique, peut en particulier être purifié par différentes méthodes d'isolement bien connues de l'homme du métier, telles que la lyse cellulaire, suivie de différentes étapes de centrifugation (centrifugations différentielles, ultracentrifugations,
20 etc), et/ou la chromatographie, l'électrophorèse, la production d'anticorps neutralisants et leur utilisation pour l'isolement par immuno-affinité, etc. Chacune de ces techniques, seule ou en combinaison(s), peut être utilisée pour isoler le facteur de stimulation impliqué dans l'activation, en suivant les différentes étapes de la purification par un test d'activation des cellules NK tel que décrit dans la présente demande. Une autre
25 approche pour l'identification de ce facteur réside dans l'utilisation d'une banque de l'ADN de cellules dendritiques, et en la recherche de clones doués de l'activité ou capables de compléter des mutants de cellules dendritiques déficients pour cette activité. Dans cette optique, des banques d'ADN différentielles (par soustraction entre une cellule dendritique déclenchée et une cellules dendritique non déclenchée) peuvent
30 être établies.

De manière plus générale, la présente invention décrit à présent un procédé de préparation de facteurs capables de stimuler les NK, impliquant un contact intermembranaire entre des cellules NK et une composition test. Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé d'identification et/ou de préparation d'un facteur de

stimulation de cellules NK, comprenant la mise en contact d'un matériel biologique comprenant une fraction membranaire et d'une population de cellules NK, la mise en évidence d'une activation des cellules NK, et l'isolement du facteur d'activation présent dans le matériel biologique. Plus préférentiellement, le matériel biologique comprenant
5 une fraction membranaire peut être une cellule dendritique, une préparation subcellulaire de cellule dendritique (notamment une vésicule membranaire), ou une cellule transformée par un acide nucléique codant un produit polypeptidique. Ainsi, il peut s'agir de cellules mammifères (par exemple de cellules COS) transformées par une banque d'ADN d'origine humaine, en particulier d'une banque d'ADNc de cellules
10 dendritiques. Les clones induisant une stimulation de l'activité des NK sont sélectionnés, et l'insert qu'ils contiennent est isolé, purifié et caractérisé. Cette méthode permet donc de cloner tout acide nucléique codant un facteur de stimulation des cellules NK. L'acide nucléique obtenu peut être modifié, introduit dans un vecteur d'expression, et utilisé dans un procédé de production d'un facteur de stimulation de
15 nature protéique.

L'invention concerne donc aussi une méthode d'identification et/ou de préparation d'un facteur de stimulation de cellules NK, comprenant la mise en contact d'un matériel biologique comprenant une fraction membranaire et d'une population de cellules NK, la mise en évidence d'une activation des cellules NK, et l'isolement du
20 facteur d'activation présent dans le matériel biologique.

Une composition particulière de la présente invention comprend donc un facteur de stimulation des cellules NK dérivé des CD, de nature essentiellement protéique, susceptible d'être obtenu à partir de membranes de cellules dendritiques matures ou de vésicules membranaires produites par des cellules dendritiques immatures.

25 Une composition plus particulière comprend un facteur de nature essentiellement protéique, susceptible d'être obtenu à partir d'exosomes produit par des cellules dendritiques immatures humaines, et capable de stimuler la sécrétion d'interféron gamma par des cellules NK au repos.

Par ailleurs, le terme "dérivé" indique également que les compositions de
30 l'invention peuvent comprendre tout variant ou forme recombinante du facteur de stimulation identifié ci-dessus, en particulier exprimé à partir d'une cellule recombinante en culture, telle qu'une levure ou une cellule mammifère.

A cet égard, les compositions de l'invention peuvent également contenir tout acide nucléique codant pour le facteur membranaire de stimulation des cellules

dendritiques (en particulier déclenchées) tel que décrit ci-dessus. Cet acide nucléique peut être obtenu par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment à partir de la banque d'ADN de cellules dendritiques déclenchées. Enfin, les compositions selon l'invention peuvent également contenir tout autre facteur de co-stimulation des cellules NK, et notamment toute lymphokine ou cytokine susceptible, en combinaison avec le facteur de stimulation décrit ci-dessus, d'activer les cellules NK.

Selon un mode de mise en oeuvre particulier, l'invention comprend donc un procédé d'activation de cellules NK in vitro, ex vivo ou in vivo par mise en présence des cellules NK avec un facteur de stimulation dérivé des cellules dendritiques.

10 L'invention concerne donc en outre l'utilisation du facteur de stimulation tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition destinée à l'augmentation de l'activité cytolytique des cellules NK ou la production d'IFN γ et/ou de TNF α in vivo.

L'invention concerne aussi l'utilisation du facteur de stimulation tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition destinée à l'augmentation de l'immunité naturelle d'un organisme.

15 L'invention concerne encore l'utilisation du facteur de stimulation tel que décrit ci-dessus pour l'augmentation de l'activité cytolytique des cellules NK ou la production d'IFN γ et/ou TNF α in vitro ou ex vivo.

L'invention concerne également un procédé pour contrôler négativement l'activation des cellules NK in vitro ou in vivo comprenant la mise en présence de cellules NK et d'un composé capable d'interférer (i.e., d'inhiber au moins partiellement) avec l'interaction entre les cellules NK et les cellules dendritiques. Un tel composé peut comprendre par exemple une forme soluble (récepteur soluble) ou tout autre fragment du facteur de stimulation (notamment le domaine extracellulaire, en particulier le site de liaison), un analogue, un antagoniste, un compétiteur, un anticorps ou fragment d'anticorps, un antisens, etc. Un tel composé peut être identifié et/ou caractérisé dans un test de screening à partir du facteur de stimulation décrit ci-avant ou dans tout test fonctionnel direct ou indirect d'activation des NK.

20 A cet égard, l'invention concerne également une méthode d'identification et/ou de caractérisation d'un composé capable d'inhiber l'activation des cellules NK, comprenant l'incubation d'un composé test ou d'une composition comprenant un ou plusieurs composés test, avec des cellules NK au repos et des cellules dendritiques, de préférence déclenchées, ou des dexosomes, ou un facteur de stimulation des NK tel que décrit ci-avant, la mesure de l'activation des cellules NK, et la sélection des

composés/compositions capables d'inhiber (i.e., de réduire) l'activation des cellules NK, par rapport à une expérience contrôle réalisée en l'absence de composé/composition test. L'invention concerne donc aussi l'utilisation de composés inhibiteurs de cette activation des NK par les cellules dendritiques, comme médicament ou composition pharmaceutique à usage externe (ex vivo) ou interne (in vivo).

A cet égard, l'invention concerne aussi tout composé capable d'interférer avec l'interaction entre les cellules dendritiques et les cellules NK, et donc d'inhiber au moins partiellement le contact entre une cellule dendritique (ou un dexosome) et une cellule NK. Ce composé peut être, comme décrit ci-dessus, un anticorps neutralisant, un ligand compétitif, un analogue, fragment ou dérivé du facteur de stimulation, toute molécule chimique, etc. L'invention concerne aussi l'utilisation d'un tel composé pour contrôler l'activation des cellules NK in vivo ou in vitro, notamment dans des applications telles que la prévention du rejet de greffe et de la GVH. En outre, l'invention concerne aussi l'utilisation de cellules dendritiques de phénotype "tolérogène", telles que les GC-DC, décrites notamment par Grouard et al. (Nature 384, 364-367, 1996) ou d'un produit dérivé de cellules dendritiques tolérogènes pour inhiber l'activation de cellules NK.

Activation des NK par augmentation des CD in vivo

Dans un autre mode de réalisation, le procédé de l'invention comprend l'activation des cellules NK in vivo, par augmentation des niveaux de cellules dendritiques in vivo. Cette augmentation in vivo permet en effet d'exercer une activation in situ des cellules NK, et donc de renforcer l'immunité naturelle d'un organisme, notamment à l'encontre des cellules tumorales ou infectées.

L'augmentation in vivo des niveaux de cellules dendritiques peut être réalisée par administration in vivo de cellules dendritiques, éventuellement déclenchées (transfert passif) ou également par administration in vivo d'un ou plusieurs facteurs de croissance et/ou de déclenchement des cellules dendritiques, éventuellement en association. Cette administration est réalisée par exemple par injection, de préférence par injection sous cutanée ou systémique. L'injection est de préférence une injection locale ou régionale, notamment une injection au site ou proche du site à traiter, notamment proche d'une tumeur. Les résultats présentés dans les exemples démontrent en particulier que l'administration par injection sous-cutanée ou intraveineuse de cellules dendritiques in vivo, immatures ou matures, allogéniques ou autologues, au site de la tumeur, permet de réduire la croissance de tumeurs CMH

class I négatives. Les injections sont généralement réalisées sur la base de doses de cellules pouvant aller de 10^4 à 10^9 cellules dendritiques, de préférence comprises entre 10^5 et 10^7 inclus. En outre, le protocole d'injection peut être adapté par l'homme du métier selon les situations (préventif, curatif, tumeurs isolées, métastases, infection importante ou localisée, etc). Ainsi, il est possible d'effectuer le transfert passif de cellules dendritiques par des administrations répétées, par exemple 1 à 2 administrations par semaine pendant plusieurs mois.

L'augmentation des cellules dendritiques *in vivo* peut également être réalisée par injection de facteur de croissance des cellules dendritiques *in vivo*. De tels facteurs sont par exemple le composé Flt3L (désigné dans ce qui suit composé "FL"), décrit par Lyman S.D et al., (Blood 83, 2795-2801, 1994, Cloning of the human homologue of the murine Flt3L: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells) et Maraskovsky E. et al., (J. Exp. Med. 184, 1953-1962, 1996) ou le GM-CSF, par exemple. Comme le montrent les exemples, une stimulation de l'immunité naturelle (et donc de l'activité des cellules NK) *in vivo* est obtenue après injection quotidienne de Flt3L. Les résultats présentés montrent en outre que cette injection produit une augmentation du nombre absolu de cellules NK *in situ*, et induit des effets antitumoraux, qui sont dépendants des cellules dendritiques lymphoïdes et de l'interaction B7/CD28 et de l'IFN γ *in vivo*. Comme indiqué ci-après, le composé FL peut par ailleurs être associé avantageusement avec le facteur de déclenchement des cellules dendritiques.

Ce mode de réalisation constitue donc une autre approche particulièrement efficace pour augmenter l'activité cytolytique des cellules NK *in vivo*. Cette approche peut-être avantageusement associée à la co-administration d'un facteur de croissance des cellules NK *in vivo*.

L'invention a donc également pour objet l'utilisation de cellules dendritiques pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules NK *in vivo*. L'invention concerne aussi l'utilisation de cellules dendritiques pour la préparation d'une composition destinée à activer l'activité cytolytique des cellules NK *in vivo* et la production d'IFN γ et/ou TNF α par les cellules NK activées. Comme indiqué ci-avant, les cellules dendritiques utilisées à cet effet sont des cellules matures ou immatures, autologues ou allogéniques, en particulier déclenchées. En outre, il peut également s'agir de cellules dendritiques sensibilisées à un ou plusieurs antigènes.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un facteur de croissance des cellules dendritiques pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules NK *in*

vivo ainsi que pour la préparation d'une composition destinée à activer l'activité cytolytique des cellules NK in vivo. Le facteur de croissance est préférentiellement le composé FL. Le facteur de croissance peut avantageusement être associé au facteur de déclenchement des cellules dendritiques in vivo.

5 L'invention concerne encore l'utilisation d'un facteur protéique, ou plus généralement biologique, de déclenchement des cellules dendritiques pour l'activation directe in vivo des cellules NK, éventuellement en association avec un facteur de croissance des cellules dendritiques et/ou un ou des chemokines ou cytokines.

10 Dans un mode particulier de réalisation du procédé de l'invention, l'augmentation des niveaux de cellules dendritiques in vivo est réalisée soit par administration in vivo, dans les conditions décrites ci-avant, de cellules dendritiques déclenchées in vitro comme décrit plus haut (transfert passif) soit également par administration in vivo d'un ou plusieurs facteurs de croissance des cellules dendritiques et d'un ou plusieurs facteurs de déclenchement des cellules dendritiques. Ce mode de
15 réalisation permet d'améliorer l'efficacité de l'activation des cellules NK in vivo, dans la mesure où les cellules ou composés administrés permettent d'obtenir in vivo des niveaux importants de cellules dendritiques déclenchées.

A cet égard, l'invention concerne aussi une composition comprenant au moins un facteur de déclenchement des cellules dendritiques et un facteur de croissance des
20 cellules dendritiques, tels que décrits ci-avant, en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps. Plus particulièrement, une telle composition comprend le composé FL et une préparation dérivée de fibroblastes comprenant un facteur soluble de déclenchement. Encore plus particulièrement, elle comprend le facteur soluble recombinant. L'invention concerne aussi l'utilisation d'une telle
25 composition pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules NK in vivo ainsi que pour la préparation d'une composition destinée à activer l'activité cytolytique des cellules NK in vivo. Pour leur utilisation, ces composés peuvent être conditionnés dans tout milieu approprié (solutions salines, tampons, etc), de préférence isotonique, et dans tout dispositif connu de l'homme du métier (ampoule, flacon, tube,
30 seringue, poche, etc).

Préparation des cellules NK au repos

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, les cellules NK peuvent être obtenues par différentes techniques connues de l'homme du métier. Plus particulièrement, ces cellules peuvent être obtenues par différents procédés

d'isolement et d'enrichissement à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (lymphoprep, leucaphérèse, etc). Ainsi, ces cellules peuvent être préparées par gradients de densité Percoll (Timonen et al., J. Immunol. Methods 51 (1982) 269), par des méthodes de déplétion négatives (Zarling et al., J. Immunol. 127 (1981) 2575) ou
5 par des étapes de tri par FACS (Lanier et al., J. Immunol. 131 (1983) 1789). Ces cellules peuvent également être isolées par immunoadsorption sur colonne en utilisant un système avidine-biotine (Handgretinger et al., J. Clin. Lab. Anal. 8 (1994) 443) ou encore par immunosélection en utilisant des microbilles greffées avec des anticorps (Geiselhart et al., Nat. Immun. 15 (1996-97) 227). Il est également possible d'utiliser
10 des combinaisons de ces différentes techniques, éventuellement combinées avec des méthodes d'adhérence sur plastique.

Ces différentes techniques permettent d'obtenir des populations cellulaires fortement enrichies en cellules NK au repos, comprenant de préférence plus de 70% de cellules NK au repos. Plus préférentiellement, les populations de cellules NK utilisées
15 pour la mise en œuvre de l'invention comportent généralement plus de 30% de cellules NK, avantageusement plus de 50%. La pureté des populations cellulaires peut être améliorée si nécessaire en utilisant des anticorps spécifiques tels que des anticorps anti-CD56 et/ou des anticorps anti-CD16 et/ou des anticorps anti-CD3 (déplétion).

Les cellules NK peuvent être conservées dans du milieu de culture sous forme
20 congelée en vue d'une utilisation ultérieure. Avantageusement, les cellules NK sont préparées extemporanément, c'est-à-dire qu'elles sont utilisées pour l'activation après leur obtention.

Préparation des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques utilisées dans le cadre de la présente invention
25 peuvent être préparées selon différentes techniques. Ces cellules peuvent être des cellules immatures ou matures, autologues ou allogéniques, "naives" ou sensibilisées à un ou plusieurs antigènes particuliers, de préférence déclenchées. Par ailleurs, les cellules dendritiques utilisées peuvent être des cultures de cellules enrichies en cellules dendritiques, voire des cultures cellulaires comprenant essentiellement des cellules
30 dendritiques. Avantageusement, il s'agit bien évidemment de cellules dendritiques humaines.

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 hématopoïétiques ou à partir de précurseurs monocytes, ou encore isolées directement sous forme différenciée (Revue par Hart, Blood 90 (1997) 3245).

L'obtention de cellules dendritiques à partir de cellules souches est illustrée par exemple par Inaba et al. (J. Exp. Med. 176 (1992) 1693) chez la souris, et par Caux et al. (Nature 360 (1992) 258) ou Bernhard et al. (Cancer Res. 55 (1995) 1099) chez l'homme. Ces travaux montrent notamment que des cellules dendritiques peuvent être produites par culture de moelle osseuse en présence de Facteur de Stimulation des Colonies de Granocytes-Macrophages (GM-CSF) ou, plus précisément, à partir de cellules souches hématopoïétiques (CD34+) par culture en présence d'une
5
10 combinaison de cytokines (GM-CSF + TNF α $\pm$ IL-3 et IL-4 ou bien en CD40L).

L'obtention de cellules dendritiques à partir de précurseurs monocytes est illustrée par exemple par Romani et al. (J. Exp. Med. 180 (1994) 83), Sallusto et al. (J. Exp. Med. 179 (1994) 1109), Inaba et al. (J. Exp. Med. 175 (1992) 1157) ou encore Jansen et al. (J. Exp. Med. 170 (1989) 577). Ces méthodologies reposent
15 essentiellement sur le prélèvement de cellules mononucléées dans le sang 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 Interleukine-4 + GM-CSF ou Interleukine-13 + GM-CSF par exemple. Cette technique est également illustrée par Mayordomo et al.,
20 1995 (murin). Par ailleurs, il est également possible de traiter les précurseurs monocytes par des agents pharmacologiques de différenciation cellulaire, tels que des activateurs de canaux calciques ou le CD40L directement.

Une autre approche pour l'obtention de cellules dendritiques consiste à isoler, à partir d'échantillons biologiques, des cellules dendritiques déjà différenciées. Cette
25 approche a été décrite par exemple par Hsu et al. (Nature Medicine 2 (1996) 52). La méthodologie décrite par cette équipe consiste essentiellement à récolter des 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
30 production de cellules dendritiques à partir de précurseurs monocytes ou de moelle osseuse. Ces méthodologies sont illustrées dans les exemples. 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 ou la moelle) en présence d'une combinaison GM-CSF+IL-4 ou GM-CSF+IL-13.

Comme indiqué ci-avant, pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est possible d'utiliser une population de cellules dendritiques comprenant des cellules dendritiques immatures et/ou matures. Avantageusement, on utilise une population de cellules dendritiques composée principalement (i.e., au moins 60%, de préférence 70%) de cellules dendritiques immatures, préférentiellement déclenchées. L'état immature des cellules dendritiques correspond à un stade précoce de leur développement, auquel elles 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.

Par ailleurs, il est également possible d'utiliser dans le cadre de la présente invention des lignées de cellules dendritiques. Il peut s'agir de lignées de cellules dendritiques immortalisées produites par exemple par introduction d'un oncogène dans les cellules dendritiques. Il peut s'agir à titre d'exemple murin d'une telle lignée, des lignées suivantes décrites dans l'art antérieur : lignée D1 (Winzler et al., J. Exp. Med. 185, 317-328, 1997), lignée XS (A. Takashima et al., J. Immunol. 1995; Vol. 154 : 5128-5135), lignée tsDC (Volkman et al., Eur. J. Immunol. 26: 2565-72, 1996). L'intérêt d'utiliser des lignées de cellules dendritiques réside dans la constitution de banques de cellules "universelles", utilisables industriellement pour activer des populations de cellules NK allogéniques provenant de sujets différents. Dans ce mode de mise en oeuvre, la lignée est préférentiellement entretenue en 30% de milieu de déclenchement ou avec une concentration optimale de facteur de déclenchement.

Lorsque les cellules dendritiques sont préparées, elles peuvent être maintenues en culture, purifiées d'avantage, stockées ou utilisées directement dans la mise en oeuvre de la présente invention (activation in vitro, ex vivo ou in vivo de cellules NK, production d'extraits acellulaire, de dexosomes, obtention du facteur de stimulation membranaire, etc). En outre, préalablement à leur utilisation pour l'activation de cellules NK, les cellules dendritiques ainsi préparées peuvent être sensibilisées à un antigène ou à un groupe d'antigènes. La présence de motifs antigéniques à la surface des cellules dendritiques pourrait en effet améliorer (par cross-priming) ou inhiber (sur un mode KIR) leur activité immunogène (immunité acquise), notamment dans le cas d'utilisations in vivo.

Dans cette optique, différentes techniques peuvent être utilisées pour sensibiliser les cellules dendritiques à des antigènes. Ces techniques comprennent notamment :

- la mise en contact des cellules dendritiques avec des peptides antigéniques ("peptide pulsing"). Cette approche consiste à incuber les cellules dendritiques, pendant un temps variable (généralement de 30 minutes à 5 heures environ) avec un ou plusieurs peptides antigéniques, c'est-à-dire avec un peptide issu d'un antigène, tel qu'il pourrait résulter du traitement dudit antigène par une cellule présentatrice de l'antigène. Ce type d'approche a été décrit par exemple pour des peptides antigéniques du virus HIV, de l'Influenza ou de HPV ou pour des peptides dérivés des antigènes Muc-1, Mart, Her2 / Neu par exemple (Macatonia et al., J. Exp. Med. 169 (1989) 1255 ; Takahashi et al., Int. Immunol. 5 (1993) 849 ; Porgador and Gilboa, J. Exp. Med. 182 (1995) 255 ; Ossevoort et al., J. Immunother. 18 (1995) 86 ; Mayordomo et al., précitée ; Mehta-Damani et al., J. Immunol. (1994) 996). Il est également possible d'incuber les cellules dendritiques avec un éluat peptidique acide d'une cellule tumorale selon la méthodologie décrite par Zitvogel et al. (1996, précitée).

- la mise en contact des cellules dendritiques avec un ou plusieurs antigènes ("antigen pulsing"). Cette approche consiste à incuber les cellules dendritiques non pas avec un ou plusieurs peptides antigéniques, mais avec le ou les antigènes intacts. L'intérêt de cette technique réside dans le fait que l'antigène va être transformé en peptides antigéniques par les mécanismes naturels de la cellule dendritique, de sorte que les peptides antigéniques résultant et présentés par la cellule dendritique devraient procurer une meilleure immunogénicité. Cette approche a été illustrée par exemple par Inaba et al. (J. Exp. Med. 172 (1990) 631) ou par Hsu et al., (Nature Medicine 2 (1996) 52).

- la mise en contact des cellules dendritiques avec un ou plusieurs complexes protéiques antigéniques. Cette approche est similaire à la précédente mais peut permettre d'améliorer l'efficacité de transformation et/ou de présentation de l'antigène. En particulier, l'antigène peut être utilisé sous forme soluble ou complexée à des éléments de ciblage, permettant notamment de cibler des récepteurs membranaires comme les récepteurs du mannose ou les récepteurs d'immunoglobulines (RFc) (complexes immuns). Il est également possible de rendre l'antigène particulaire de manière à améliorer sa pénétration ou encore sa phagocytose par les cellules.

- la mise en contact des cellules dendritiques avec des cellules (fusion hybridome-like) ou des membranes, lysats ou sonicats de cellules exprimant des antigènes ou peptides antigéniques. Cette technique repose sur le transfert direct d'antigènes ou peptides antigéniques par fusion de cellules ou de membranes

cellulaires. Cette approche a été illustrée par exemple par la fusion entre des cellules dendritiques et des membranes de cellules tumorales (Zou et al., Cancer Immunol. Immunother. 15 (1992) 1, et Gilboa, précitée).

- la mise en contact des cellules dendritiques avec des vésicules membranaires contenant des antigènes ou peptides antigéniques (notamment des exosomes de cellules tumorales tels que décrits ci-avant). Cette approche de sensibilisation des cellules dendritiques utilisant des exosomes, telle que mise en évidence dans 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. Cette technologie est illustrée dans les exemples.

- la mise en contact des cellules dendritiques avec des liposomes contenant des antigènes ou peptides antigéniques (Nair et al., J. Exp. Med. 175 (1992) 609).

- la mise en contact des cellules dendritiques avec des ARNs codant pour des antigènes ou peptides antigéniques, (voir Boczkowsky et al., 1996, précité).

- la mise en contact des cellules dendritiques avec des ADNs codant pour des antigènes ou peptides antigéniques ou des séquences d'acides nucléiques couplées à des antigènes protéiques (éventuellement incorporés dans des vecteurs de type plasmidique, viral ou chimique). Ainsi, un mode de sensibilisation des cellules dendritiques consiste par exemple à infecter les cellules dendritiques avec un virus contre lequel une protection est recherchée. Ceci a été décrit par exemple pour le virus de l'Influenza (Bhardwaj et al., J. Clin. Invest. 94 (1994) 797 ; Macatonia et al., précitée). Une autre approche consiste à délivrer, au moyen d'un virus ou d'autres vecteurs de transfert d'acides nucléiques, un ADN codant pour le ou les antigènes ou peptides antigéniques d'intérêt. Une telle approche a été illustrée par exemple par Arthur et al. (Cancer Gene Therapy, 1995) ou par Alijagie et al. (Eur. J. Immunol. 25 (1995) 3100). Certains virus tels les adénovirus, les AAV ou les rétrovirus semblent pouvoir être utilisés à cet effet, pour délivrer un acide nucléique dans une cellule dendritique.

30

Applications

L'invention concerne également l'utilisation des procédés, cellules et compositions décrits ci-avant, en particulier dans les domaines de l'immunologie, l'immunothérapie ou de la Biotechnologie médicale. Comme indiqué ci-avant, ces

utilisations sont multiples, à la fois in vitro et in vivo, pour contrôler l'activité des cellules NK. Des telles applications sont notamment le traitement de différentes pathologies telles que les cancers ou les maladies infectieuses, notamment virales ou à d'autres pathogènes, les maladies autoimmunes, les pathologies liées à la transplantation (rejet de greffe, GVHD), les maladies congénitales (déficits pour les récepteur à l'interféron ou à l'interleukine-12 par exemple), etc. Les procédés, cellules et compositions de l'invention sont en particulier utilisables pour retarder la croissance, voire supprimer des tumeurs (en particulier des tumeurs exprimant faiblement des molécules de classe I du CMH) ou d'autres cellules pathologiques. Pour ce type d'applications, comme indiqué ci-avant, les compositions cellulaires (cellules NK activées, cocultures NK/DC ou cellules dendritiques) peuvent être administrées de manière loco-régionale, de préférence par injection sous-cutanée ou systémique. Les doses de cellules sont indiquées ci-avant ainsi que dans la partie expérimentale qui suit. L'invention est également utilisable in vitro pour le traitement de préparations cellulaires, notamment pour la destruction de cellules sensibles aux cellules NK. L'invention peut également être utilisée en combinaison ou comme adjuvant des immunisations basées sur le développement d'une activité lymphocytaire T cytotoxique spécifique d'antigène. L'invention concerne en outre l'utilisation de cellules dendritiques ou d'un facteur membranaire de cellules dendritiques pour augmenter la survie de populations lymphocytaires NK, in vitro, ex vivo ou in vivo, ainsi que pour augmenter, le cas échéant, la prolifération de sous-populations lymphocytaires NK. L'invention concerne en outre l'utilisation de cellules NK ou d'un facteur membranaire de cellules NK pour augmenter la survie de cellules dendritiques matures, in vitro, ex vivo ou in vivo,

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

FIGURE 1 : Les cellules dendritiques immatures stimulent l'activité NK in vitro.

Les cellules dendritiques autologues immatures dérivant de la moelle de souris BALB/c, c'est-à-dire cultivées en GM-CSF et interleukine-4, ont été incubées 24h en 30% milieu de fibroblaste L-929 ou bien cocultivées avec des L-929 irradiées. Après 24h, elles ont été comptées, resuspendues en milieu classique (GM-CSF + IL-4) et co-incubées pendant une période de 40 à 72 heures à la concentration de 1 million de

cellules par ml en puits à fond rond, dans des plaques de 96 puits, avec des cellules spléniques (dont 10-30% sont des NK) au repos, provenant de la rate des souris syngénique SCID BALB/c à la même concentration. La cytotoxicité contre les cellules cibles YAC et P815 ainsi que le relargage d'interféron γ par les cellules NK sont
 5 déterminés comme décrit dans les Matériels et Méthodes.

FIGURE 2 : les cellules dendritiques matures stimulent directement l'activité NK in vitro.

(a) Les cellules dendritiques d'origine splénique (dérivées de rate d'animaux C57BL/6) matures stimulent de manière très prononcée l'activité cytolytique des cellules NK. Les cellules dendritiques incubées en présence de surnageant de L-929 (30%) puis, pendant 24 heures dans un milieu contenant du $\text{TNF}\alpha$, ont été co-cultivées avec des cellules mononucléées non-adhérentes de la rate provenant de souris B6-Rag-/- ou de souris SCID dans un rapport 1:1 pendant 40 à 48 heures. Les lymphocytes viables
 10 ont été testés contre les cellules YAC-1 dans un test de relargage du chrome 51 pendant 4 heures. Les résultats sont exprimés par le pourcentage de lyse spécifique à différents rapports cellules effectrices/cellules cibles. Ces expériences ont été réalisées
 15 5 fois avec des résultats similaires.

(b) Les cellules dendritiques d'origine splénique matures stimulent la production d'interféron γ par les cellules NK. Les surnageants de cellules dendritiques ou de cellules NK syngéniques ou allogéniques cultivées séparément ou ensemble à différents rapports de concentration, ont été collectés au temps 48 à 72 heures et testés pour la présence d'interféron γ murin par ELISA. A noter sur cette figure que les rapports NK : CD correspondent en fait aux rapports cellules spléniques d'animaux
 20 déplétés en T/B/Mac (contenant 10-30% NK purs) : CD. Aucune trace d'interféron γ n'a été détectée dans le surnageant de cellules NK ou de cellules dendritiques cultivées séparément comme contrôles.
 25

FIGURE 3 : L'activation implique un contact cellule NK:cellule dendritique.

30 Etude de la lyse spécifique de cellules cibles (YAC-1) induite par des cellules NK activées in vitro par une lignée de cellules dendritiques, soit par coculture (triangles pleins), soit dans un système "Transwells" dans lequel les deux populations cellulaires sont séparées physiquement par une membrane poreuse (triangles vides) et sont à

distance les unes des autres de 1mm. Les contrôles sont représentés par les cellules NK et dendritiques cultivées séparément.

FIGURE 4 : L'administration de FL dans les souris Nude B6 portant une tumeur AK7 induit une suppression significative de la croissance tumorale.

10 µg de FL ont été administrés quotidiennement pendant 20 jours à des souris B6-nude portant une tumeur établie au jour 20 du mésothéliome AK7. La croissance tumorale a été contrôlée 2 fois par semaine pendant 60 jours. Les tailles moyennes des tumeurs pour des groupes de 5 souris sont représentées sur la figure avec l'écart-type. Cette expérience a été répétée quatre fois avec une suppression de la croissance tumorale similaire. Des résultats similaires ont été obtenus dans les souris Rag2 B6-/-.

FIGURE 5: Les effets anti-tumoraux induits par FL sont dépendants des cellules NK.

(a) Le composé FL n'a aucun effet dans les souris B6-beige. 10 µg de FL ont été administrés quotidiennement pendant 20 jours dans des souris B6-beige portant une tumeur AK7 établie de jour 20. La croissance tumorale a été contrôlée deux fois par semaine pendant 50 jours. La taille moyenne des tumeurs pour des groupes de 5 souris est représentée sur la figure avec l'écart type. Cette expérience a été répétée deux fois avec des résultats identiques.

(b) La co-administration d'anticorps monoclonal neutralisant anti-NK1.1 en même temps que FL inhibe l'effet anti-tumoral de FL. 300 µg par souris d'anticorps anti-NK1.1 ont été co-administrés quotidiennement à des souris immunocompétentes B6 portant une tumeur établie de 20 jours en même temps que le composé FL. Les groupes de souris traitées par un tampon phosphate PBS présentaient une cinétique de croissance tumorale similaire dans les souris beiges et dans les souris Nude. (*) représente des tumeurs significativement plus grosses dans les groupes de souris déplétées par NK1.1 en comparaison avec les animaux traités par FL seulement. Cette expérience a été reproduite 2 fois avec des données identiques.

FIGURE 6 : La thérapie par FL s'accompagne d'une activité NK augmentée dans les rates de souris B6.

Les splénocytes de souris sans tumeur ou porteuses d'une tumeur AK7 ont été préparés après 20 jours de traitement en tampon phosphate (PBS) ou FL, et utilisés

comme cellules effectrices dans un test de relargage du chrome utilisant les cellules YAC-1 comme cellules-cibles. Les résultats sont exprimés par le pourcentage de lyse spécifique à différents rapports effecteurs : cibles. Chaque groupe comprend 3 souris.

5 **FIGURE 7** : Rôle des cellules dendritiques lymphoïdes, de l'interaction B7/CD28 et des cytokines associées à la différenciation Th1 dans l'effet anti-tumoral dépendant des cellules NK induit par FL.

(a) Expériences de déplétion *in vivo* en utilisant des anticorps anti-CD8 α ou anti-CD4 dans des souris B6-nude. Les souris B6 nude porteuses de tumeurs ont été
10 traitées avec FL seul ou associé avec des anticorps anti-CD8 α ou anti-CD4 selon le protocole décrit dans les Matériels et Méthodes. La taille des tumeurs a été déterminée deux fois par semaine pour des groupes de 5 animaux. (*) représente des tumeurs de taille significativement plus petite dans les groupes de souris injectées avec le FL et non déplétées comparés avec les animaux traités par l'anticorps anti-CD8 α . Ces
15 données ont été reproduites deux fois avec des résultats similaires.

(b) Co-administration de CTLA4Ig *in vivo*. Des expériences similaires ont été réalisées avec l'anticorps de souris CTLA4Ig tel que décrit dans les Matériels et Méthodes. (*) représente des tumeurs de taille significativement supérieures dans le groupe des animaux traités par CTLA4Ig en comparaison avec les animaux traités par
20 FL uniquement. Ces données ont été reproduites deux fois avec des résultats similaires.

(c) Co-administration d'anticorps monoclonal anti-p40 - mIL-12 *in vivo*. Des expériences similaires ont été réalisées avec l'anticorps anti-p40 - mIL-12 tel que décrit dans les Matériels et Méthodes. Aucun blocage significatif de l'activité antitumorale n'a
25 été observé. Ces données ont été reproduites deux fois avec des résultats similaires.

(d) Co-administration d'anticorps monoclonal anti-IFN- γ *in vivo*. Des expériences similaires ont été réalisées avec un anticorps anti-IFN- γ . (*) représente des tumeurs d'une taille significativement supérieure dans les groupes traités par anticorps anti-IFN- γ par comparaison avec des animaux traités par FL seul. Ces données ont été
30 reproduites deux fois avec des résultats similaires.

FIGURE 8 : Transfert adoptif de cellules dendritiques d'origine splénique dans des souris B6-nude portant des tumeurs AK7 : effets antitumoraux prophylactiques et thérapeutiques.

8a : De 2 à 5 millions de cellules dendritiques immatures ont été injectées par voie sous-cutanée intratumorale directe dans des souris B6 nude porteuses de tumeurs AK7 au jour 1 (en prophylaxie). Les injections ont été réalisées deux fois par semaine pendant 15 jours. La croissance tumorale a été contrôlée et comparée avec un groupe
5 d'animaux traités par PBS (cinq souris par groupe) selon le test t-student. Les résultats significatifs à 95% sont indiqués par une (*).

8b : Idem mais les cellules dendritiques ont été injectées dans des tumeurs AK7 établies depuis 20 jours (en thérapeutique).

10 **FIGURE 9** : Activation de cellules NK humaines purifiées à partir de PBL de donneurs sains ou malades par des cellules dendritiques immatures déclenchées en présence de fibroblastes (L-cells) ou de surnageant (SN L cells). 9a : Mesure de la sécrétion d'IFN γ . Les résultats sont exprimés en UI/ml, répétés dans au moins trois expériences séparées. 9b : Mesure de la cytolyse de cibles tumorales par dosage du
15 chrome libéré (tDC = Cellule Dendritique déclenchée (ou "triggered")).

FIGURE 10 : Les exosomes de cellules dendritiques murines (DEXm) activent les cellules NK murines. 10(a) Mesure de la production d'interféron gamma ; 10(b) mesure de la cytolyse des cellules YAC1 ; 10(c) mesure du taux de survie des cellules
20 NK ; 10(d) mesure de la taille moyenne de tumeurs in vivo. Dex BM-DC : dexosomes produits à partir de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse. Rapport E:T : rapport des cellules effectrices sur les cellules cibles. SN BM-DC : surnageant direct de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse.

25 **FIGURE 11** : Les exosomes de cellules dendritiques humaines (DEXh) activent les cellules NK murines au repos. Dex MD-DC : dexosomes produits à partir de cellules dendritiques dérivées de monocytes. SN MD-DC : surnageant direct de cellules dendritiques dérivées de monocytes.

30 **FIGURE 12** : Les exosomes de cellules dendritiques (DEXm) de souris "Knock-Out" pour le gène de la bêta-2-microglobuline (12a) ou pour les molécules du CMH de classe II (12b) activent les cellules NK murines. B6wt : souris B6 de type sauvage ; β 2m-/- : souris "Knock-Out" pour le gène de la bêta-2-microglobuline ; CI II-/- : souris "Knock-Out" pour les molécules du CMH de classe II.

FIGURE 13 : Activités relatives des cellules dendritiques et des dexosomes qu'elles produisent pour stimuler les cellules NK. 13(a) Etude comparée de l'activité de cellules dendritiques produites en faible dose ou en forte dose d'interleukine-4, et des dexosomes qu'elles produisent. 13(b) Etude comparée de l'activité de cellules dendritiques déclenchées ou non, et des dexosomes qu'elles produisent.

MATERIELS ET METHODES

1. ANIMAUX

Les souris femelles C57-BL/6 (B6) et BALB/c scid/scid (SCID) ont été obtenues du Centre d'Elevage Janvier (Le Genest St-Isle, France). Les souris femelles C57/BL/6-bg/bg (B6-beige) ont été achetées chez Harlan UK Limited (Oxon, Angleterre). Les souris femelles C57-BL/6-B6-nude (B6-nude) ont été obtenues du Centre de Recherche et d'Elevage Mollegaard A/S (Skensved, Danemark). Les souris femelles et mâles C57BL/6 Rag2^{-/-} (B6-Rag^{-/-}) ont été achetées auprès du Centre de Développement des Techniques avancées du Centre National de la Recherche Scientifique (Orléans, France). Les souris SCID beige et B6-nude ont été maintenues dans des conditions sans pathogène. Les souris ont été regroupées par âge (8 à 10 semaines) au début de chaque expérience.

2. CULTURES CELLULAIRES

Les cellules AK7, fournies par A. Kane (Brown University, Providence, Rhode Island), sont une lignée de mésothéliome murin générée par injection intra-péritonéale de fibre d'asbestos crocidolite dans les souris B6. Cette lignée cellulaire a été maintenue en milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum bovin-foetal inactivé par traitement à la chaleur, 1.0 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine. Les lignées de cellules tumorales ont été maintenues in vitro, pour une période n'excédant pas un mois avant les expériences in vivo. Les lignées de cellules dendritiques murines sont maintenues dans un milieu IMDM contenant 10% de sérum bovin foetal inactivé, 2 mM de L-glutamine, 50 µM de 2-βME, 100 UI/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine (Milieu IMDM). Pour induire la maturation des cellules, du TNF-α de souris recombinant (R&D Systems, Abingdon, UK) est ajouté à une concentration de 10 ng/ml pour 24 heures. La

maturation peut également être induite par incubation des cellules en présence de LPS (1-10 µg/ml). La lignée de cellules YAC-1 est une lignée de lymphome dans un contexte A/Sn très sensible aux cellules NK. Les cellules P815 sont des cellules de mastocytome en contexte DBA/2 résistantes aux cellules NK. Tous les milieux de cultures et réactifs
5 ont été obtenus de GIBCO BRL (Life Technologies, Merelbeke, Belgique).

3. GÉNÉRATION ET CULTURES DE CELLULES DENDRITIQUES DÉRIVÉES DE MOELLE OSSEUSE.

Les cellules dendritiques murines proviennent de la différenciation de cellules
10 précurseurs de la moelle osseuse cultivées en présence de GM-CSF et IL-4 pendant 6 jours dans un milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de sérum de veau foetal, de la L-glutamine, des acides aminés essentiels, de la pénicilline, de la streptomycine et du β-2ME. Ces cellules ont été obtenues selon un protocole décrit par Mayordomo et al (1996). Brièvement, la moelle osseuse est extraite de tibias et de fémurs, déplétée en
15 lymphocytes et macrophages, et étalée sur des plaques de cultures 24 puits (0,25.10⁶ cellules/ml) dans le milieu RPMI 1640 défini ci-dessus supplémenté avec rm IL-4 et rm GM-CSF (1000 UI/ml de chaque). Au jour 3, les cellules non ou peu adhérentes sont récoltées et étalées sur des plaques de cultures 24-puits (0,3.10⁶ cellules/ml) pour 3 jours de culture supplémentaires avec le même milieu neuf. Les cellules dendritiques
20 ainsi obtenues ont le phénotype attendu. Les cellules dendritiques ainsi obtenues, sont des cellules immatures. Elles peuvent être induites pour la maturation en culture combinant l'interleukine-4 et le GM-CSF avec le TNF-α (10 ng/ml) et/ou le LPS (1-10 µg/ml). Les cellules sont utilisées à 24/48 heures après le stimulus de maturation pour la co-culture. Des cellules dendritiques autologues et allogéniques ont été utilisées pour
25 la co-culture avec la même efficacité. En outre, les cellules dendritiques matures et immatures peuvent également être utilisées indifféremment.

4. DECLENCHEMENT DES CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques peuvent être déclenchées selon différents protocoles.
30 L'une des méthodes utilisées dans les exemples comprend la coculture de cellules dendritiques (matures ou immatures) en présence de cellules fibroblastiques en division (en particulier de cellules de la lignée L-929 ou NIH 3T3). La coculture est généralement maintenue pendant 24-48 heures, des tDC pouvant être obtenues dès 20 heures environ de coculture. Selon une autre méthode, les cellules dendritiques sont

incubées dans un milieu de déclenchement, comprenant avantageusement du surnageant de culture de cellules fibroblastiques en division (en particulier de cellules de la lignée L-929, NIH3T3 ou MRC5, culture primaire de fibroblastes humains pulmonaires). Dans les exemples qui suivent, le surnageant utilisé a été dilué au tiers, et les cultures ont été réalisées dans un milieu comprenant de l'IL-4 et du GM-CSF. Une autre expérience de déclenchement a été réalisée en utilisant comme milieu de déclenchement, un milieu comprenant du surnageant de culture de cellules tumorales (mastocytome).

5. GÉNÉRATION DES CELLULES NK

Les cellules NK sont obtenues à l'état de repos à partir des rates de souris SCID ou Rag2 -/- après une étape d'adhérence plastique pendant 2 à 3 heures à 37°C. Brièvement, les rates de souris B6-Rag-/- ou de souris SCID ont été dissociées en milieu complet RPMI 1640 tel que défini ci-avant pour générer des cultures de cellules en suspension. Après lyse des érythrocytes, les cellules ont été lavées une fois et étalées ($2,5 \cdot 10^6$ cellules/ml) pendant 2 à 3 heures à 37°C. Ensuite, les cellules non-adhérentes ont été récoltées et comptées. Ces cellules sont composées essentiellement de cellules NK au repos.

6. CO-CULTURE NK/DC

Pour les co-cultures, les cellules dendritiques immatures ou matures, autologues ou allogéniques, déclenchées ou non, ont été récoltées, lavées 3 fois et ajoutées dans différents rapports de concentration à des cellules NK au repos, fraîchement isolées ($1 \cdot 10^6$ cellules NK/ml) dans des plaques 96 puits à fond en U. Les cellules incubées individuellement (cellules dendritiques ou cellules NK) sont étalées à des concentrations similaires en tant que contrôles.

7. TEST DE SÉCRÉTION D'INTERFÉRON γ

Les surnageants de co-cultures cellules dendritiques/cellules NK sont collectés et le cas échéant congelés à -70°C. Les essais de dosage du relargage d'interféron γ sont effectués en utilisant des Kits ELISA commerciaux (Genzyme Corp. Cambridge, Etats-Unis). La sensibilité de détection des tests utilisés est proche de 5 pg/ml. Des effets de doses sont réalisés consistant à faire varier le ratio cellules dendritiques sur cellules NK.

8. TEST DE CYTOTOXICITE DES CELLULES NK.

La cytotoxicité *in vitro* des cellules NK est évaluée selon les méthodes classiques du relargage du chrome 51 des cibles marquées NK sensibles (YAC-1) ou NK résistantes (P815).

Plus précisément, les cellules de co-cultures NK/CD ou de cultures séparées incubées pendant 40 à 72 heures, ont été collectées, marquées au Bleu Trypan pour exclure les lymphocytes et les cellules dendritiques, et comptées et utilisées comme cellules effectrices dans un test de cytotoxicité utilisant les cellules YAC-1 et P815 comme cellules-cibles. Les cellules-cibles ont été pré-incubées pendant 1 à 2 heures à 37° avec du Na⁵¹CrO₄ (100 µCi/10⁶ cellules ; New England Nuclear) lavées une fois, incubées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 5% de sérum bovin foetal inactivé, pendant ½ heure à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois et étalées à 2.10³ cellules par puits, dans des plaques de microtitration 96 puits ayant un fond en V. Les cellules effectrices et cibles ont été mélangées à différents rapports effecteurs/cibles dans un volume total de 0,2 ml et incubées pendant 4 heures à 37°C. Le degré de lyse des cellules cibles a été mesuré en comptant 0.1 ml de surnageant transféré dans une plaque Luma. Le relargage spontané a été déterminé à partir de puits contenant des cellules cibles marquées seules et le relargage maximum de chrome 51 a été déterminé par addition de 2% de cétrimide. La cytotoxicité spécifique a été calculée comme suit : pourcentage du relargage du chrome ⁵¹ = 100 x (coût cpm expérimentaux - coût du relargage spontané) / (coût cpm du relargage maximum - coût cpm du relargage spontané).

Pour les tests *in vivo*, les rates de 2 ou 3 souris porteuses de cellules AK7 ou dépourvues de tumeurs ont été prélevées après 20 jours de traitement avec le composé FL ou par un tampon phosphate (PBS). Des suspensions de cellules de splénocytes déplétées en érythrocytes par lyse osmotique ont été utilisées immédiatement comme cellules effectrices dans un test de cytotoxicité en utilisant les cellules YAC-1 et P815 comme cibles tel que décrit ci-dessus.

9. TRAITEMENT *IN VIVO* DE SOURIS PAR LE COMPOSE FL.

Des souris sont inoculées par voie intradermique dans le flanc droit avec la dose tumorigène minimum de cellules AK7 (3.10⁶ cellules) dans un volume de 0,1 ml de PBS. Le composé FL dérivé de cellules CHO a été fourni par Immunex Corp. (Seattle, USA,

Lynch et al., Nature Medecine 3 : 625, 1997). Cette cytokine a été utilisée sous forme diluée dans du PBS à 100 µg par ml. Des tumeurs AK7 établies au jour 20 (environ 20 mm² de diamètre) ont été traitées par une injection journalière unique (injection sous-cutanée dans le flanc gauche) soit de FL soit de PBS (10µg) dans un volume total de 0,1 ml pendant 20 jours consécutifs. Les souris ont été contrôlées pour la croissance tumorale 2 fois par semaine et la taille moyenne des tumeurs a été illustrée en mesurant deux diamètres perpendiculaires en millimètres en utilisant un pied à coulisse. Les taux de croissance tumorale ont été déterminés en rapportant la taille des tumeurs (mm²) par rapport au temps après le jour 1 de traitement par FL. Toutes les études ont été réalisées au moins 4 fois avec des groupes de 5 animaux.

10. EXPERIENCES DE DEPLETION PAR ANTICORPS IN VIVO.

Les anticorps anti-CD8α (clone YTS 191.1.2, IgG2a de rat), anti-CD4 (clone YTS 169.4.2.1, IgG2a de rat) et anti-NK1.1 (clone PK136, IgG2 de souris) ont été utilisés dans les expériences de déplétion. Les hybridomes ont été cultivés dans des souris athymiques et les fluides ascitiques ont été récoltés et purifiés selon les techniques décrites précédemment par précipitation à l'acide caprylique puis au sulfate d'ammonium, dialysés contre du PBS, puis ajustés à 1 mg/ml (McKinney, 1987). Sauf contre-indication dans les légendes des figures, la déplétion est commencée au jour 1 du traitement par FL des souris B6, 200 à 300 µg d'anticorps monoclonal sont injectés par voie intra-péritonéale pendant 3 jours consécutifs, puis tous les deux jours pendant le traitement FL. Après le traitement FL, les anticorps monoclonaux sont administrés 2 fois à 4 jours d'intervalle. Des expériences réalisées en parallèle par cytométrie de flux aux moyens d'anticorps fluorescents ont permis de confirmer que les déplétions observées sont supérieures à 99% pour les sous-populations cellulaires ciblées, au jour 9 et au jour 20 du traitement FL. Pour les expériences de blocage de B7, les souris ont été injectées par voie intra-péritonéale avec 200µg de protéine de fusion de souris CTLA4Ig (fournie par L. Adorini, Hoffman La Roche, Italie) à 2 jours d'intervalle entre le jour 10 et le jour 18 du traitement FL. Pour les études de neutralisation de l'IL-12 endogène, l'anticorps purifié anti-p40 IL-12 (clone C-17-8, IgG2a de rat), a été injecté par voie intrapéritonéale à des doses individuelles de 300 µg à 3 jours d'intervalle entre le jour 5 et le jour 17 du traitement FL. Pour les études de neutralisation de l'interféron γ endogène, 300 µg d'anticorps anti-interféron γ (IgG de hamster) ont été injectés par

souris par voie intra-péritonéale aux jours 10, 15 et 20 de l'administration de FL. Toutes les expériences ont été réalisées avec 5 souris par groupe et au moins deux fois.

11. TRANSFERT ADOPTIF DE CELLULES DENDRITIQUES DANS LES SOURIS.

Des souris B6-nude ou SCID portant une tumeur AK7 au jour 1 ou au jour 20 ont été injectées par voie intratumorale sous-cutanée deux fois par semaine, avec $2 \text{ à } 5 \cdot 10^6$ cellules dendritiques immatures pendant deux semaines. Cinq souris par groupe ont été traitées. La croissance tumorale a été contrôlée comme décrit précédemment.

10

12. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES.

La méthode exacte de Fisher a été utilisée pour interpréter le caractère significatif des différences entre les différents groupes expérimentaux (présentés comme une moyenne avec écart type). Pour interpréter des expériences de transfert passif de cellules dendritiques, 2 groupes ont été comparés en utilisant le t-test de Student. Le caractère significatif à 95% des résultats est représenté pour chaque expérience individuelle.

15

EXEMPLES

20

Les résultats présentés dans les exemples qui suivent démontrent en particulier :

1) que la coculture de cellules dendritiques et de cellules NK purifiées entraîne la survie des cellules dendritiques matures et des cellules NK et l'activation rapide des cellules NK, en d'autres termes que la cellule dendritique, à défaut de toute autre connue, peut permettre de rendre une cellule NK fortement tueuse et sécrétrice d'IFN γ contre ses cibles naturelles NK sensibles, sans addition de cytokines et sans mise en évidence de taux détectables de sécrétion d'IL-2, IL-12 dans ces cocultures ;

25

2) que le transfert adoptif de cellules dendritiques ou bien l'expansion directe in vivo des cellules dendritiques entraîne des effets antitumoraux importants dus à l'activation des NK.

30

EXEMPLE 1 : Les cellules dendritiques stimulent l'activité cytolytique et la production d'interféron γ par les cellules NK in vitro.

Cet exemple illustre les propriétés des cellules dendritiques à différents stades de différenciation d'activer les cellules NK au repos *in vitro*. L'activité cytotoxique, la production d'interféron γ et la prolifération ont été testées.

Dans une série d'expériences, des cellules dendritiques fraîchement dérivées de moelle osseuse syngénique ont été cultivées en présence d'interleukine-4 et de GM-CSF et maintenues à l'état immature (voir matériels et méthodes). Les cellules dendritiques immatures ont été collectées, lavées de manière intensive et co-incubées dans un rapport initial 1:1 environ avec des cellules mononucléées non-adhérentes obtenues à partir de splénocytes fraîchement récoltés chez des souris SCID BALB/c syngéniques, dans du milieu complet en l'absence de cytokine. Le tiers de ces splénocytes non-adhérents sont marqués positivement avec l'anticorps monoclonal Dx5 ou avec l'anticorps monoclonal anti-NK1.1. Après co-culture pendant 40 à 72 heures, les cellules NK sont comptées et testées dans un essai de cytotoxicité par mesure du relargage du chrome 51 pendant 4 heures contre des cellules YAC-1 et P815 à différents ratios effecteur/cible.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 1 et montrent que ces cellules dendritiques induisent l'activation de l'activité cytolytique des cellules NK. En particulier, ces résultats montrent :

- que la co-culture des deux types cellulaires permet de récolter des cellules NK viables, et

- que lorsque les cellules NK et les cellules dendritiques sont co-incubées à un ratio de 0,1 à 0,3:1, une lyse spécifique de 20 à 50 % des cellules YAC-1 est obtenue à un rapport cellules effectrices /cellules cibles de 25 à 100:1. Les cellules P815, qui sont NK insensibles, ne sont pas lysées dans les conditions testées et aucune des deux populations cellulaires (cellules NK et cellules dendritiques) cultivées séparément à des concentrations similaires n'induit de lyse significative des cellules YAC-1 (Figure 2).

Dans une autre série d'expériences, une lignée de cellules dendritiques de rate à été utilisée. Cette lignée à été maintenue dans des conditions de culture permettant une croissance à long terme de cellules au stade immature et leur déclenchement. Cette lignée a ensuite été induite à maturation en présence de $\text{TNF}\alpha$ ou de LPS pendant 24 heures. Les cellules maturées présentent des changements morphologiques importants comme décrits précédemment par Winzler et al. Les agrégats ne sont plus adhérents et des analyses par FACS font apparaître une expression importante des molécules CD11c, I-Ab, B7.2, et CD40. Ces cellules

dendritiques matures ont été testées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, par co-incubation pendant 40 à 48 heures avec des cellules NK au repos fraîchement récoltées chez des souris B6-Rag-/- à différents ratios. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 2. Ces résultats montrent que:

5 - la co-culture des deux types cellulaires permet de récolter des cellules NK viables dans les puits de manière significativement supérieure que dans une culture de cellules NK séparée (10 à 30 % vs 2 à 5 %).

 - lorsque les cellules NK et les cellules dendritiques sont co-incubées à un ratio de 0,1 à 0,3:1, une lyse spécifique de 40 à 60 % des cellules YAC-1 est obtenue à un
10 rapport cellules cibles/cellules effectrices de 25:1. Les cellules P815 qui sont NK insensibles, n'ont pas été lysées dans toutes les conditions testées. Aucune des deux populations cellulaires (cellules NK et cellules dendritiques) cultivées séparément dans du milieu de culture à des concentrations similaires n'a induit une lyse significative des cellules YAC-1 (Figure 2a). Une lyse d'autres cellules tumorales faiblement positives en
15 MHC classe I, telles que MCA205, MCA101, TS/A ou AK7 a également été observée en présence des cellules NK activées (résultats non présentés).

 Les résultats obtenus montrent également que le surnageant de co-culture NK-DC contient des niveaux significatifs d'interféron γ qui diminuent en fonction du nombre de cellules dendritiques stimulantes (figure 2b). En revanche, l'interféron γ n'était pas
20 détectable dans le surnageant de cellules dendritiques ou de cellules NK cultivées séparément. Aucune prolifération significative n'a été observée dans ces conditions de co-culture ainsi que déterminé par l'incorporation de thymidine après une co-culture de 40 à 70 heures.

 Ces résultats illustrent donc la capacité des cellules dendritiques immatures et
25 matures à stimuler l'activité des cellules NK à la fois pour la production d'interféron γ et pour l'activité de lyse spécifique contre des cellules tumorales, outrepassant parfois l'effet KIR.

 De manière similaire aux expériences précédentes, il a également été démontré que les cellules dendritiques allogéniques étaient capables de stimuler l'activation de
30 cellules NK. Brièvement, des splénocytes allogéniques non-adhérents de souris SCID BALB/c ont été activés par co-culture de 40 à 48 heures en présence de cellules dendritiques matures à un ratio NK:DC de 0,1 à 0,3:1. Les résultats sont présentés sur la figure 2a et 2b et montrent que ces

cellules dendritiques allogéniques activent à la fois les propriétés lytiques des cellules NK et la production d'interféron γ .

L'ensemble de ces résultats montre clairement que les cellules dendritiques matures ou immatures, autologues ou allogéniques, qu'il s'agissent de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse ou de rate ou de lignées établies de
5 cellules dendritiques, sont capables, lorsqu'elles sont déclenchées, d'activer efficacement par co-culture l'activité lytique des cellules NK ainsi que la production d'interféron γ par les cellules NK.

10 **EXEMPLE 2** : La stimulation des cellules NK par les cellules dendritiques implique un contact cellulaire direct.

Les cellules dendritiques matures sont connues pour sécréter différentes cytokines telles que l'IL-12, l'IL-15, l'IFN α/β ou TNF α qui pourraient être responsables de l'activation des cellules NK. Un système de culture "Transwell" a été utilisé pour
15 déterminer l'implication possible de facteurs solubles dans l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques. Les résultats présentés sur la figure 3 montrent que l'activité cytolytique et la production d'interféron γ par les cellules NK en réponse aux cellules dendritiques n'est détectée que dans le cas où les cellules NK sont co-incubées en contact avec les cellules dendritiques mais pas lorsque les cellules sont séparées
20 par une membrane poreuse. Ces résultats montrent donc que l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques requiert un contact ou une interaction directe cellules/cellules, et que cette activation implique un facteur de co-stimulation, présent dans la membrane des cellules dendritiques.

25 **EXEMPLE 3** : L'expansion de cellules sanguines blanches de la lignée dendritique par le composé FL s'accompagne de la régression d'une tumeur établie de classe 1 négative dans les souris B6-nude ou dans les Rag2 B6 -/-.

Les cellules AK7 représentent une lignée de mésothéliome syngénique de souris B6 faiblement immunogéniques qui infiltrent spontanément la cavité péritonéale
30 après établissement prolongé dans le flanc abdominal. La tumeur AK7 ainsi obtenue exprime des niveaux très faibles de molécules de classe I *in vitro*. Le traitement par le composé FL de tumeurs AK7 établies au jour 20 dans les souris B6-nude induit une suppression transitoire de la croissance tumorale et finalement un retard de croissance significatif *in vivo* (voir figure 4). Le composé FL n'exerce en revanche aucun effet

cytotoxique direct sur les cellules AK7 *in vitro*. Ces effets anti-tumoraux *in vivo* commencent à être observés au jour 10 du traitement par FL lorsqu'une splénomégalie et adénomégalie, attribuable à l'expansion des cellules sanguines blanches de la lignée dendritique, ont été observées.

5 Les cinétiques de croissance tumorale reprennent un rythme normal 5 à 10 jours après arrêt du traitement FL, lorsque le nombre des cellules dendritiques décroît. Les effets anti-tumoraux induits par FL observés dans les souris B6-nude ou Rag2 B6 -/- ont été aussi prononcés que ceux rapportés dans les souris immunocompétentes (figures 5b), soulignant que ni les cellules T, ni les cellules B ne sont impliquées dans le
10 retard de croissance tumorale.

Ces résultats démontrent donc que l'administration d'un facteur de croissance des cellules dendritiques induit une régression de tumeurs de classe I négative. Ces résultats montrent en outre que cet effet n'est pas dû à l'activité de cellules T ou B.

15 **EXEMPLE 4** : Les effets anti-tumoraux médiés par le composé FL ne sont pas observés dans les souris beige et sont bloqués par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-NK1.1 dans des souris immunocompétentes porteuses de la tumeur.

De manière à déterminer plus précisément les mécanismes des effets anti-tumoraux induits par FL, des souris B6-beige portant la tumeur AK7 ont été traitées par
20 FL selon un régime thérapeutique similaire.

Les souris B6-beige présentent des mésothéliomes qui grossissent progressivement jusqu'à entraîner la mort, malgré une administration de FL (Figure 5a). De manière à déterminer plus précisément l'implication des cellules NK dans l'activité tumoricide induite par FL, des souris B6-immunocompétentes ont été déplétées en
25 utilisant des anticorps monoclonaux anti-NK1.1. Comme le montrent les résultats présentés sur la figure 5b, cette déplétion est nécessaire et suffisante pour annuler complètement les effets anti-tumoraux induits par FL. En conséquence, ces résultats montrent que les cellules NK jouent un rôle critique nécessaire et suffisant dans l'efficacité du composé FL comme agent anti-tumoral.

30

EXEMPLE 5 : Le composé FL augmente de manière significative l'activité NK splénique *in vivo*.

Cet exemple illustre la capacité du composé FL à augmenter l'activité des cellules NK *in vivo*. Le nombre absolu de cellules NK marquées positivement avec

l'anticorps monoclonal anti-NK1.1 par analyse FACS dans les splénocytes et les cellules mononucléées des ganglions lymphatiques étaient légèrement augmenté de 3 à 5 fois dans les souris présentant les tumeurs et dans les souris sans tumeur. Les splénocytes récoltés au jour 20 de souris B6 traitées par le composé FL ou par une solution saline, chez des souris présentant ou ne présentant pas de tumeurs AK7, ont été testés pour l'activité cytolytique spontanée contre des cellules YAC-1 *in vitro* dans un essai de relargage du chrome 51 sur une période de 4 heures. Une augmentation significative de l'activité NK mais pas de la production d'interféron γ a été montrée dans différentes expériences réalisées à la fois avec des souris nude ou immunocompétentes, sans effet significatif attribuable à la présence de la tumeur elle-même (figure 6). Aucune lyse n'a été observée contre des cellules P815. En outre, les niveaux de cytokine pour l'interféron γ et le TNF α dans le sérum ou les surnageants de culture de cellules mononucléées de ganglions lymphatiques de la rate n'étaient pas statistiquement différents dans toutes les conditions testées et aucun niveau détectable n'a été observé pour l'IL-1 β et l'IL-12. Ces résultats montrent donc que le traitement par le composé FL est associé à une augmentation de l'activité NK dans la rate *in vivo*.

EXEMPLE 6 : La déplétion de souris Nude par administration d'anticorps monoclonal anti-CD8 α ou de CTLA4-Ig bloque de manière significative les effets anti-tumoraux dépendant des cellules NK.

Cet exemple décrit le rôle des sous-populations de cellules dendritiques myéloïdes ou lymphoïdes induites par le composé FL dans l'augmentation périphérique de l'activité NK cytolytique et dans les effets anti-tumoraux NK dépendants. Puisque les cellules dendritiques lymphoïdes ont été décrites comme sécrétant de l'IL-12 en réponse à une stimulation SAC+IFN γ *in vitro* et dans la mesure où l'IL-12 est un facteur de stimulation des cellules NK, une déplétion sélective des cellules dendritiques lymphoïdes CD8 α positives (DEC205+) en utilisant un anticorps monoclonal anti-CD8 α a été entreprise dans les souris B6-nude. L'injection de l'anticorps monoclonal déplétant a été débutée aussitôt que des cellules dendritiques différenciées en présence de FL (jour 0 FL) apparaissent et poursuivie pendant jusqu'à 10 jours après l'arrêt du traitement FL à hautes doses. La molécule CD8 α n'est pas exprimée sur les cellules NK de souris dans les souris B6-nude, ce qui rend de ce fait la déplétion ciblée vers les sous-populations de cellules dendritiques lymphoïdes. Des souris porteuses de tumeurs

AK7 déplétées avec l'anticorps monoclonal anti-CD8 α répondent significativement moins au traitement FL que des souris contrôles non déplétées ou des souris injectées avec un anticorps anti-CD4 (figure 7a). Cependant, le composé FL demeure efficace dans les souris ayant reçu FL et déplétées pour les cellules CD8 α positives en
5 comparaison avec les animaux non traités par le composé FL, soulignant que les cellules dendritiques lymphoïdes sont seulement partiellement impliquées dans des effets anti-tumoraux dépendant des cellules NK. La petite population de cellules dendritiques myéloïdes exprimant le marqueur CD4 ne semble pas participer à ces effets anti-tumoraux (figure 7a).

10 Pour confirmer encore le rôle critique des cellules dendritiques dans les effets anti-tumoraux dépendant des cellules NK, des molécules de co-stimulation B7 qui sont connues pour être impliquées dans la phase effectrice de la reconnaissance par les cellules NK, ont été ciblées en utilisant une injection systémique de la protéine de fusion murine CTLA4-Ig. Durant la période complète d'administration de CTLA4-Ig, une
15 perte statistiquement significative d'efficacité de FL sur la suppression de la croissance tumorale a été observée (figure 7b). Au contraire, une injection d'IgG humaine dans l'expérience contrôle n'a pas altéré l'efficacité de FL *in vivo*. Il faut souligner que la tumeur AK7 n'exprime pas les molécules B7 *in vitro*. Dans l'ensemble, ces données montrent que les cellules B7 positives et/ou les cellules dendritiques sont essentielles
20 dans les effets anti-tumoraux dépendants des cellules NK obtenus par le facteur de croissance FL.

EXEMPLE 7 : L'interleukine 12 n'est pas impliquée dans les effets anti-tumoraux NK induits par FL.

25 Les cytokines IL-12 et IFN- γ sont des cytokines T de type Th1 qui sont connues pour stimuler l'activité NK *in vivo*. De plus, comme décrit dans l'exemple précédent, la sous-population de cellules dendritiques lymphoïdes capables de sécréter de l'IL-12 est importante pour l'effet anti-tumoral observé. Bien que les niveaux d'IL-12 dans les sérums ou les surnageants de ganglions lymphatiques ou de rates dérivées de cellules
30 mononucléées, étaient indétectables dans les animaux traités par FL, des souris ont été injectées avec l'anticorps neutralisant anti-p40 IL-12 depuis le jour 5 jusqu'au jour 20 du traitement par FL. Aucun effet inhibiteur de ces anticorps monoclonaux sur les effets anti-tumoraux induits par FL n'a été observé *in vivo* (figure 7c). Une neutralisation de l'interféron γ *in vivo* permet par contre de bloquer transitoirement les effets anti-

tumoraux médiés par FL ce qui sous-entend que la cytotoxicité des NK est médiée par l'IFN γ car le mésothéliome est IFN γ sensible (figure 7d). D'autres résultats obtenus confirment ces observations. En particulier, (i) les souris knock-out pour le récepteur de l'interféron de type-1 présentent toujours des cellules NK activables par les cellules dendritiques selon l'invention, (ii) les surnageants de ces cocultures ne font pas proliférer les CTLL2, ce qui atteste de l'absence d'IL-2 ou d'IL-15 produites dans ces conditions, et (iii) l'anticorps anti-IFN γ interfère peu sur l'activité du composé FL in vivo.

EXEMPLE 8 : Le transfert adoptif des cellules dendritiques au début de l'établissement de tumeurs ou en cours de croissance tumorale à J20 dans les souris SCID affecte la croissance tumorale.

De manière à écarter définitivement tout événement indirect susceptible de rendre compte de l'augmentation de l'activité NK indépendante de la population développée des cellules dendritiques et de manière à tester de manière formelle un effet *in vivo* direct de dialogue entre les cellules dendritiques et les cellules NK des souris B6-nude ou SCID porteuses de tumeurs AK7, connues pour présenter une activité NK forte, ont été transférées passivement avec 2 à 5 millions de cellules dendritiques immatures par injection sous-cutanée deux fois par semaine pendant deux semaines dès J1 ou dès J20 AK7.

Les résultats sont présentés sur les figures 8a et 8b et montrent un retard significatif de croissance tumorale dans le groupe de souris traitées par les cellules dendritiques en comparaison avec le groupe contrôle. Ces résultats démontrent clairement le rôle des cellules dendritiques dans la stimulation de l'activité des cellules NK *in vivo*.

25

EXEMPLE 9 : Déclenchement de cellules dendritiques immatures par milieu de déclenchement xénogénique.

Cet exemple illustre le fait que les cellules dendritiques immatures peuvent être déclenchées dans un milieu (en présence d'un facteur) xénogénique, et que le déclenchement ne modifie pas leur stade de maturité.

5x10⁶ CD immatures dérivées de monocytes (MD-CD) en IL-4 + GM-CSF (CM) pendant 8 jours ont été cultivées, pendant 24-48 heures (de J8 à J10) en présence :

- soit d'un milieu composé de CM (2/3 du milieu final) et d'un milieu de déclenchement (1/3 du milieu final) correspondant au surnageant de 10×10^6 fibroblastes L-929 cultivés pendant 48 heures;

5 - soit dans un milieu CM, en présence de 1×10^6 fibroblastes L-929 irradiés (5000 rads).

Après 48 heures d'incubation, les MD-DC ont été récupérées et mises en coculture seules ou en présence de cellules NK humaines allogéniques, purifiées par immunosélection négative à partir du sang de donneur sain (ratio de culture: 2 DC pour 1 NK, concentration des NK de $0,3 \times 10^6$ /ml). Le surnageant de coculture DC/NK ou DC
10 seules ou NK seules a ensuite été évalué en ELISA pour doser l'IFN γ . Parallèlement, les cellules des cocultures ont été récupérées, énumérées et mises sur des cibles chromées ^{51}Cr pour évaluer leur pouvoir lytique sur 4 heures. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 9. Ces résultats montrent clairement la forte capacité des cellules dendritiques immatures déclenchées à activer la sécrétion d'IFN γ et l'activité
15 lytique des cellules NK au repos.

EXEMPLE 10 : Activation des cellules NK par une préparation dérivée de cellules dendritiques.

Cet exemple illustre le fait que des préparations dérivées de cellules
20 dendritiques peuvent être utilisées pour activer les cellules NK. En particulier, cet exemple montre que des vésicules membranaires (ou dexosomes) produites à partir de cellules dendritiques activent les cellules NK.

Dans cet exemple, les cellules MD-DC humaines ont été cultivées à partir de la fraction adhérente des monocytes de sujets sains ou porteurs de tumeurs
25 métastatiques (mélanomes, myélomes, lymphomes) en milieu de culture type AIMV+PeniStrepto+L-Glutamine+ 10% FCS + 1000IU/ml d'IL-4 et GM-CSF. Le milieu est changé à J5 ou J6 puis les surnageants de ces MD-DC incubées à 37°C, 5% CO $_2$ pendant 24-48 heures, sont passés à travers un filtre de 0.2 μm puis ultracentrifugés à 70 000 g pour isoler les dexosomes.

30 Les BM-DC murines ont été cultivées et déclenchées comme décrit dans les matériels et méthodes (points 3 et 4). De plus, les précurseurs médullaires ont été aussi et alternativement cultivés en GM-CSF seul à 1000 IU/ml. Les CD ont été cultivées jusqu'à J6, et les surnageants de culture d'où proviennent les dexosomes (DEXm) sont accumulés de J3 à J6. Ils sont ensuite récupérés selon la procédure décrite par

exemple dans les demandes de brevet FR9709007 et FR9801437, c'est-à-dire par ultracentrifugations différentielles.

Les cellules NK murines et humaines ont été recueillies comme décrit dans les matériels et méthodes (point 5).

5 Pour la mise en présence des cellules NK et des dexosomes, les cellules NK de rates de souris SCID/BALBc ont été incubées dans des plaques 96 puits à fond conique, à la concentration de 1,5 million/ml (ces splénocytes contiennent 30% de Dx5+ NK). Ensuite, les dexosomes ont été ajoutés, à raison de 10-20µg de protéines (test de Bradford) exosomales par puits, et les cellules ont été récupérées à 18-20
10 heures pour effectuer les test de cytotoxicité (contre les cellules YAC-1) et de production d'interféron gamma (surnageant testé en ELISA IFNγ murin). Les tests de cytotoxicité et de dosage d'interféron ont été réalisés comme décrit dans les matériels et méthodes (points 7 et 8).

Les résultats obtenus sont présentés dans les Figures 10 à 13. Ces résultats
15 montrent clairement une activation des cellules NK par les dexosomes de cellules dendritiques, activation particulièrement prononcée par les dexosomes produits à partir de cellules dendritiques immatures et non déclenchées. En outre, l'activation observée croise la barrière d'espèce puisque les dexosomes humains activent les cellules NK murines.

20 Plus particulièrement, la figure 10(a) montre la production d'IFNγ murin par des NK de souris SCID BALB/c (splénocytes comprenant 30 à 40 % de cellules Dx5+, c'est-à-dire de cellules NK) stimulées par une préparation d'exosomes provenant de cellules dendritiques murines cultivées en IL-4+GM-CSF (BM-DC), à une dose de l'ordre de 20µg/million de Dx5+ NK. A cette dose, les exosomes augmentent aussi la cytotoxicité
25 de base des NK au repos (Figure 10b) ainsi que leur survie in vitro (Figure 10c), alors que, dans la plupart de ces cas, le surnageant direct des BM-DC n'a pas d'effet majeur sur l'activation des NK (figure 10c). Les résultats présentés sur la Figure 10d confirment en outre cette activité in vivo, puisqu'ils montrent une diminution de la taille moyenne de tumeurs AK7 dans des souris "nude" après administration de dexosomes. Ces résultats
30 montrent donc que les exosomes de cellules dendritiques immatures stimulent l'activité des NK. Ils montrent également que le niveau d'activation est influencé par la concentration en dexosomes, et que des doses supérieures ou égales à environ 10µg/10⁶ cellules NK sont préférées pour une activation in vitro ou ex vivo.

Les résultats présentés sur la Figure 11 confirment par ailleurs ces observations sur des dexosomes de cellules dendritiques humaines. Dans cette expérience, les MD-DC ont été cultivées en IL-4+GM-CSF pendant environ 9 jours. Les exosomes (DEXh) sécrétés par ces cellules, qui se trouvent dans un état essentiellement immature, ont
5 été récupérés de J7 à J9 ou de J6 à J8. Ces dexosomes humains (DEXh) ont été incubés dans les conditions décrites ci-avant en présence de cellules NK murines, à des doses allant de 20 à 40 μ g / million de cellules NK. Les résultats obtenus montrent une stimulation de la production d'IFN γ , démontrant l'activation des cellules NK.

Par ailleurs, les résultats présentés sur la Figure 12 montrent que les exosomes
10 de CD murines provenant de souris déficientes ("Knock Out") pour le gène de la Béta2-microglobuline (molécule du CMH de classe I classique ou apparentée) ou pour les molécules du CMH classe II conservent leur capacité à stimuler les NK au repos pour la production d'IFN γ . Ces résultats (i) confirment l'activité stimulatrice des dexosomes et (ii) indiquent que le facteur de stimulation ne semble pas être une molécule du CMH
15 classe I (contrairement à certains éléments de la famille des KIRs-Killer inhibitory receptr, small, ou KIRI-killer inhibitory receptor, long). Les résultats obtenus montrent notamment que les productions d'IFN- γ par des NK stimulées avec des dexosomes de CD provenant de souris beta2microglobuline -/- K.O (Figure 12a) ou classe II K.O (figure 12b) sont fortes. Une stimulation des NK a également été observée en utilisant
20 les cellules dendritiques entières.

Enfin, la Figure 13 montre une certaine corrélation entre l'activité stimulatrice des cellules dendritiques et des exosomes qu'elles sécrètent. Ainsi, les résultats présentés montrent que des cellules dendritiques fortement actives (par exemple matures et, le cas échéant déclenchées) sécrètent des dexosomes plus faiblement
25 actifs. En revanche, des cellules dendritiques présentant une activité plus faible (par exemple des cellules dendritiques immatures et non déclenchées) sécrètent des dexosomes très actifs. Ces éléments suggèrent donc un transfert, selon l'état des cellules dendritiques, du facteur de stimulation depuis les vésicules membranaires internes jusqu'à la membrane plasmique externe. Plus particulièrement, la Figure 13a
30 montre que les exosomes de CD cultivées en présence de GM-CSF et de faibles doses d'interleukine-4 (1x) stimulent significativement mieux les NK que leurs homologues provenant de CD cultivées en présence de GM-CSF et de fortes doses (5x) d'IL-4, alors que la situation est inversée pour les CD dont ils dérivent.

De manière similaire, la Figure 13b montre que les exosomes murins sécrétés par des cellules BM-DC déclenchées (en surnageant de L929) stimulent significativement moins les NK que leurs homologues provenant de BM-DC non déclenchées, et que la situation est inversée pour les CD dont ils dérivent. Des résultats comparables ont été obtenus avec des cellules dendritiques humaines.

L'ensemble de ces résultats montre donc (i) que les dexosomes sont capables de stimuler l'activité des cellules NK au repos, (ii) que les dexosomes les plus actifs semblent être produits par des cellules dendritiques moins actives, c'est-à-dire immatures (et éventuellement non déclenchées), (iii) que l'activation par les dexosomes croise la barrière d'espèces, (iv) que le facteur de stimulation responsable de l'activation des NK est à la surface des DEX et présenté aux NK directement, avec ou sans costimulation (autre facteur membranaire ou cytokine) et (v) que le facteur de stimulation ne semble pas être une molécule du CMH classe I. Ces résultats supportent donc l'utilisation des dexosomes pour l'activation des NK in vitro, ex vivo ou in vivo.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'activation de cellules tueuses naturelles (NK) comprenant la mise en contact de cellules NK avec des cellules dendritiques ou une préparation dérivée de cellules dendritiques, in vitro ou ex vivo.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les cellules dendritiques sont des cellules dendritiques matures.

3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les cellules dendritiques sont des cellules dendritiques immatures.

4. Procédé selon l'une des revendication 1 à 3 caractérisé en ce que les cellules dendritiques et NK sont autologues.

5. Procédé selon l'une des revendication 1 à 3 caractérisé en ce que les cellules dendritiques et NK sont allogéniques.

6. Procédé selon l'une des revendication 1 à 5 caractérisé en ce que les cellules dendritiques sont des cellules déclenchées.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que le rapport cellules NK / cellules dendritiques est compris entre 0,01 et 10, de préférence entre 0,05 et 5.

8. Co-culture de cellules dendritiques et de cellules NK.

9. Composition comprenant des cellules NK activées ou au repos et des cellules dendritiques autologues.

10. Composition comprenant des cellules NK activées par le procédé de la revendication 1.

11. Utilisation de cellules dendritiques ou d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, pour l'activation de cellules tueuses naturelles in vitro ou ex vivo.

12. Utilisation de cellules dendritiques ou d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules tueuses naturelles in vivo.

13. Utilisation de cellules dendritiques ou d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, pour la préparation d'une composition destinée à activer l'activité cytolytique des cellules tueuses naturelles in vivo.

14. Utilisation de cellules dendritiques ou d'une préparation dérivée de cellules dendritiques, pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la production d'IFN γ par les cellules NK in vivo.

N° 29.04.00

15. Utilisation selon les revendications 11 à 14 caractérisée en ce que les cellules dendritiques sont des cellules dendritiques matures.

16. Utilisation selon les revendications 11 à 14 caractérisée en ce que les cellules dendritiques sont des cellules dendritiques immatures.

5 17. Utilisation selon les revendications 11 à 16 caractérisée en ce que les cellules dendritiques sont des cellules dendritiques déclenchées.

18. Utilisation selon les revendications 11 à 17 caractérisée en ce que les cellules dendritiques sont sensibilisées à un ou plusieurs antigènes.

10 19. Utilisation d'un facteur de croissance des cellules dendritiques pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules tueuses naturelles in vivo.

20. Utilisation selon la revendication 19 caractérisée en ce que le facteur de croissance est le composé F1t3L.

21. Composition comprenant un facteur de stimulation des cellules NK dérivé des cellules dendritiques.

15 22. Composition comprenant un composé capable d'interférer avec l'interaction entre les cellules dendritiques et les cellules NK.

23. Utilisation d'un facteur selon la revendication 21 pour la préparation d'une composition destinée à activer les cellules tueuses naturelles in vivo.

20 24. Utilisation d'un composé selon la revendication 22 pour la préparation d'une composition destinée à contrôler négativement l'activité des cellules tueuses naturelles in vivo.

25 25. Utilisation de cellules dendritiques ou d'une composition selon les revendications 9 ou 10 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de tumeurs.

26. Utilisation de cellules dendritiques ou d'une composition selon les revendications 9 ou 10 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de cellules infectées.

27. Utilisation d'une composition selon la revendication 21 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de tumeurs ou de cellules infectées.

30 28. Utilisation d'une composition selon la revendication 22 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif du rejet de greffe ou de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD).

29. Utilisation d'un facteur de croissance des cellules dendritiques pour la préparation d'une composition destinée au traitement des tumeurs de classe I négative ou faiblement positive par augmentation de l'activité NK in situ.

5 30. Utilisation d'un facteur membranaire de cellules dendritiques pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie ou la prolifération de sous-population lymphocytaires NK.

31. Utilisation d'un facteur membranaire de cellules NK pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie de cellules dendritiques matures.

10 32. Utilisation de cellules dendritiques de phénotype tolérogène ou d'un produit dérivé de cellules dendritiques tolérogènes pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activation de cellules NK.

33. Méthode de traitement des cellules dendritiques comprenant la mise en contact des cellules dendritiques avec un milieu de déclenchement, permettant d'améliorer (ou de provoquer) leur capacité de stimulation des cellules NK.

15 34. Composition comprenant au moins un facteur de déclenchement des cellules dendritiques et un facteur de croissance des cellules dendritiques, en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

35. Composition comprenant des cellules dendritiques déclenchées, notamment humaines.

20 36. Milieu de déclenchement de cellules dendritiques, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules de la matrice extracellulaire, une préparation dérivée de telles cellules ou un facteur dérivé de telles cellules.

37. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la préparation dérivée de cellules dendritiques comprend des vésicules membranaires.

25 38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il s'agit de vésicules membranaires produites à partir de cellules dendritiques immatures.

39. Utilisation selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisée en ce que la préparation dérivée de cellules dendritiques comprend des vésicules membranaires.

30 40. Utilisation de vésicules membranaires produites à partir de cellules dendritiques pour la préparation d'une composition pour stimuler l'activité des cellules NK, in vitro, ex vivo ou in vivo.

41. Méthode d'identification et/ou de préparation d'un facteur de stimulation de cellules NK, comprenant la mise en contact d'un matériel biologique comprenant une fraction membranaire et d'une population de cellules NK, la mise en évidence d'une

29-04-2000

FR 009900482

N° 29.04.00

activation des cellules NK, et l'isolement du facteur d'activation présent dans le matériel biologique.

- 5 42. Procédé d'identification d'un composé capable d'inhiber l'activation des cellules NK, comprenant l'incubation d'un composé test ou d'une composition comprenant un ou plusieurs composés test, avec des cellules NK au repos et des cellules dendritiques, ou des dexosomes, ou un facteur de stimulation des NK tel que défini dans la revendication 21, la mesure de l'activation des cellules NK, et la sélection des composés/compositions capables d'inhiber (i.e., de réduire) l'activation des cellules NK.

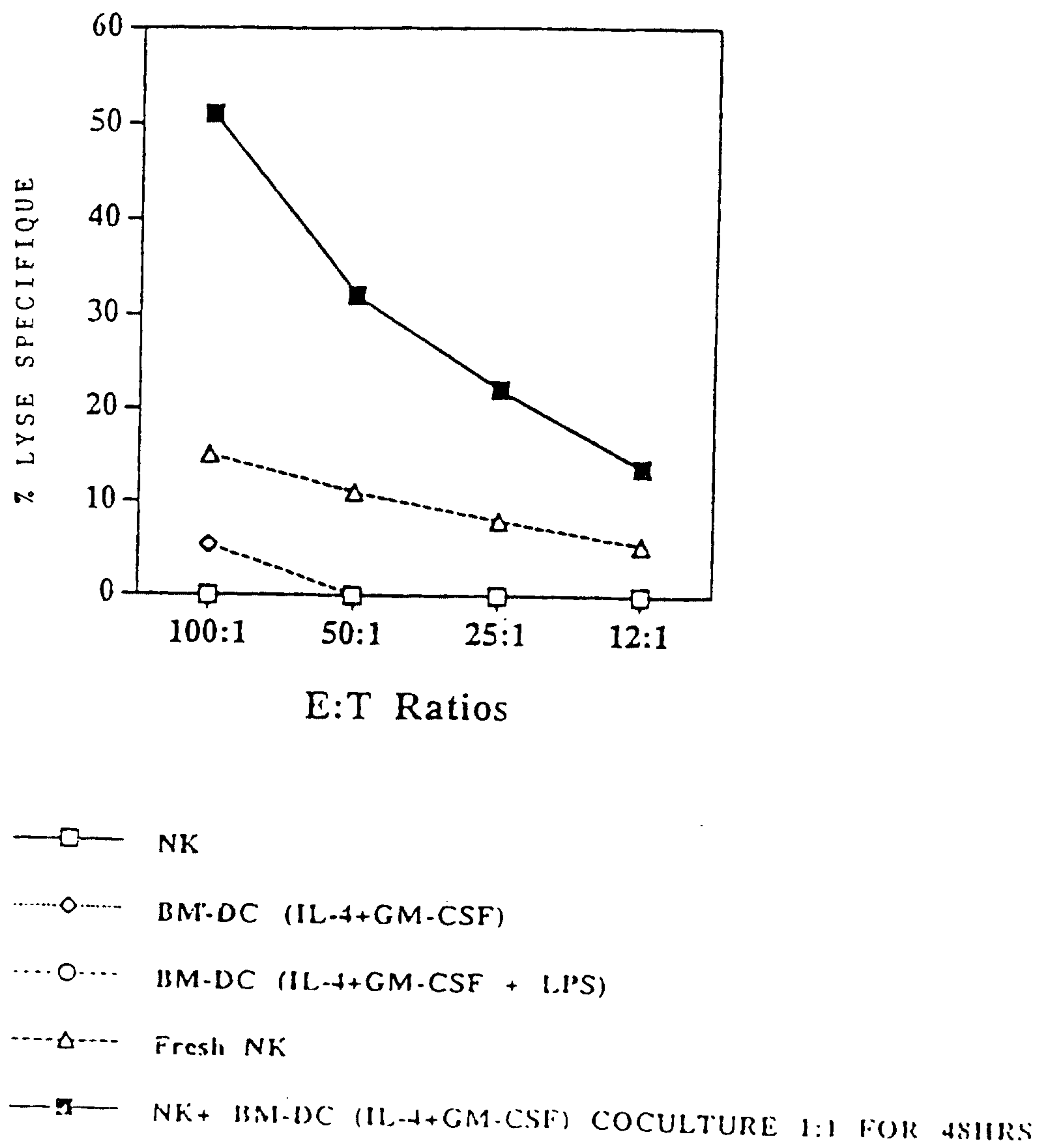


FIGURE 1

2/ 20

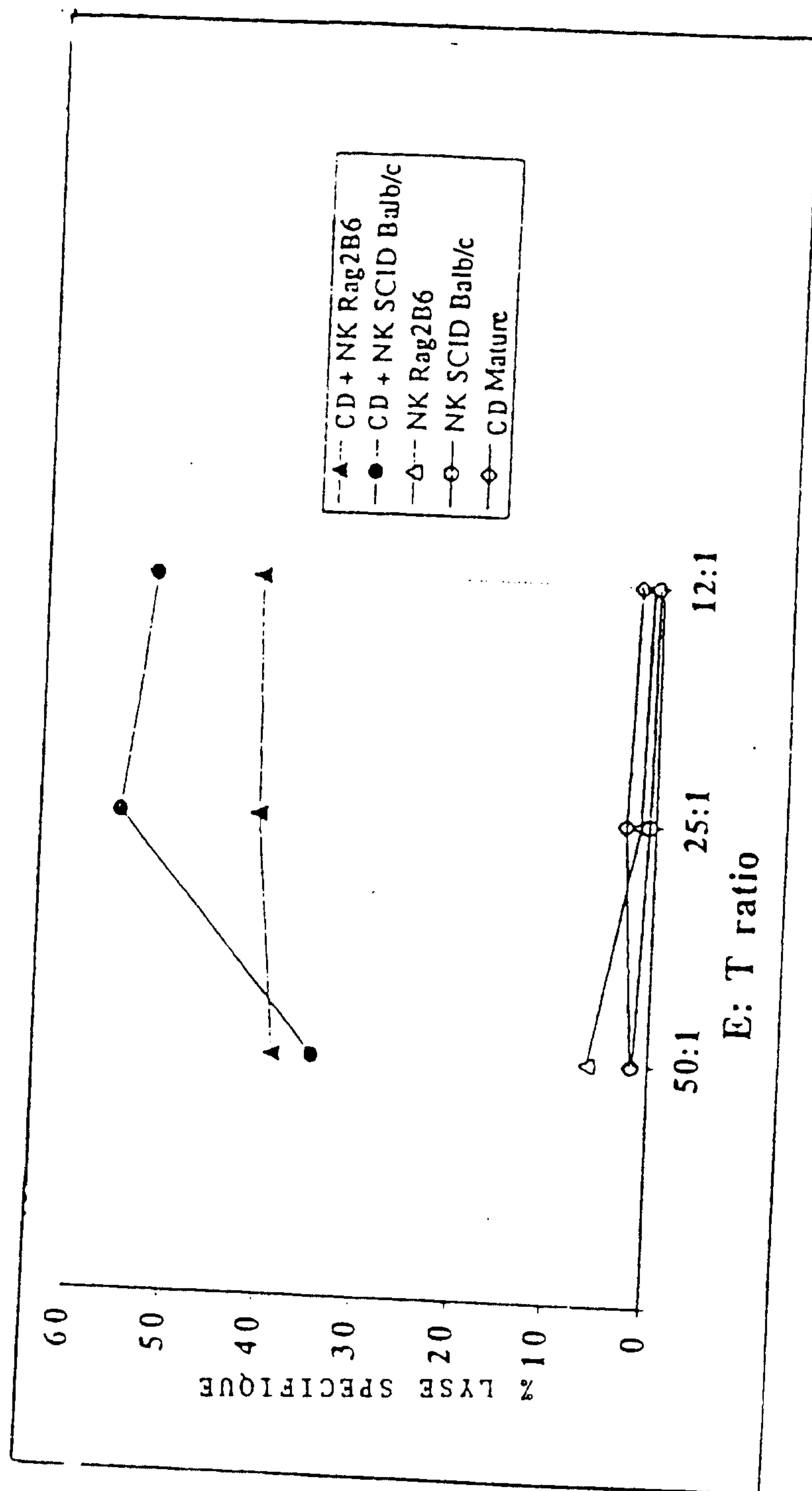


FIGURE 2a

3/ 20

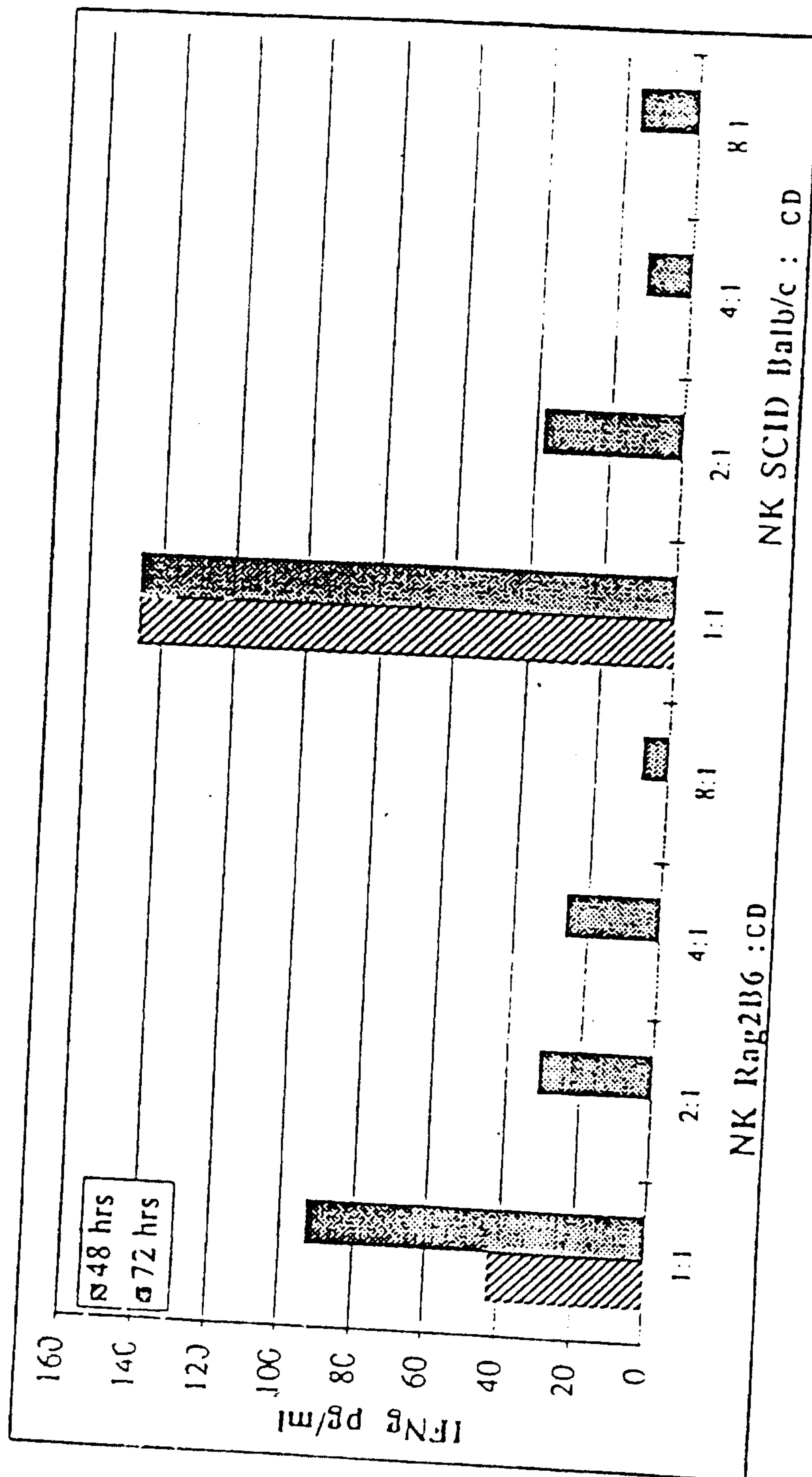


FIGURE 2b

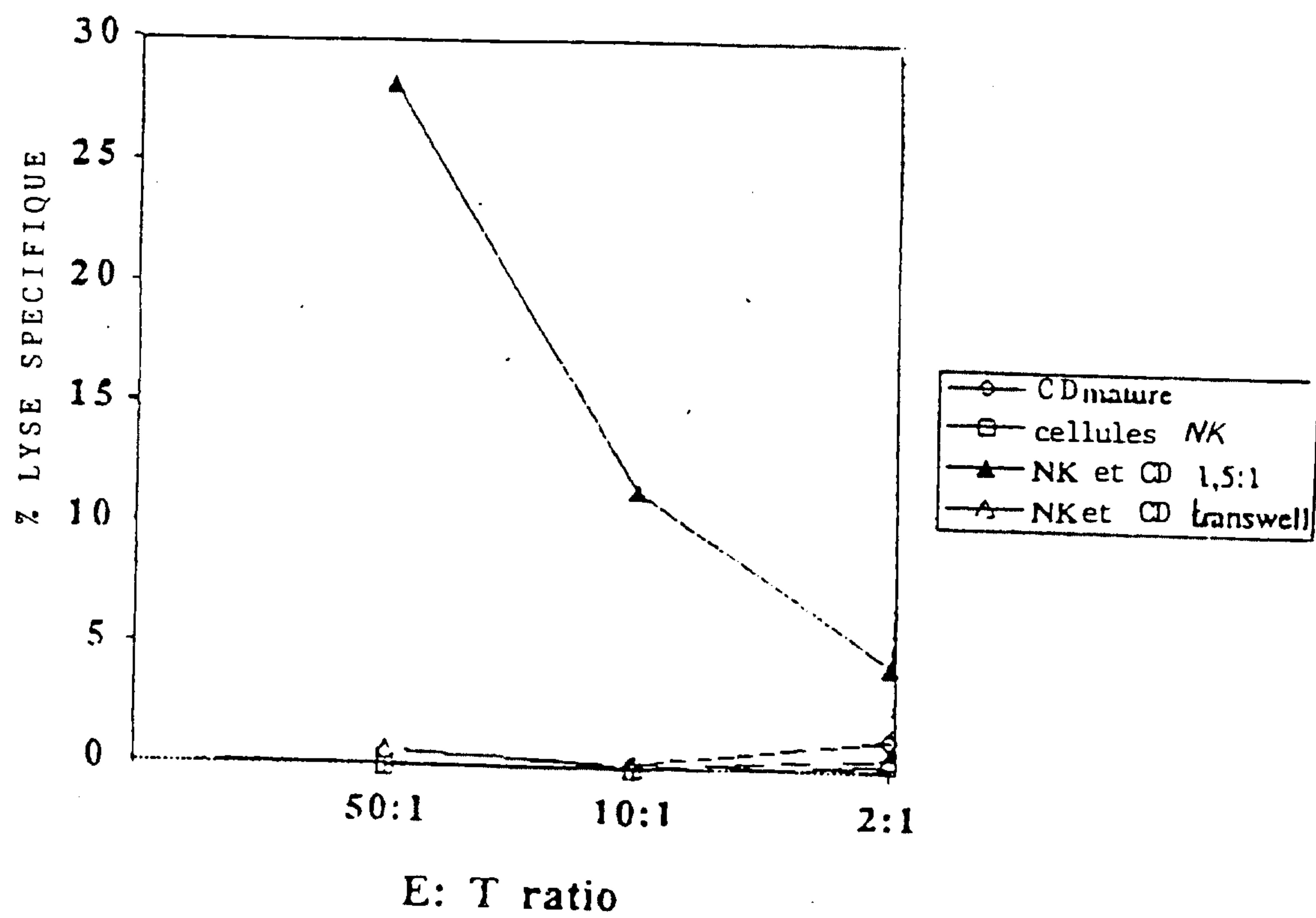


FIGURE 3

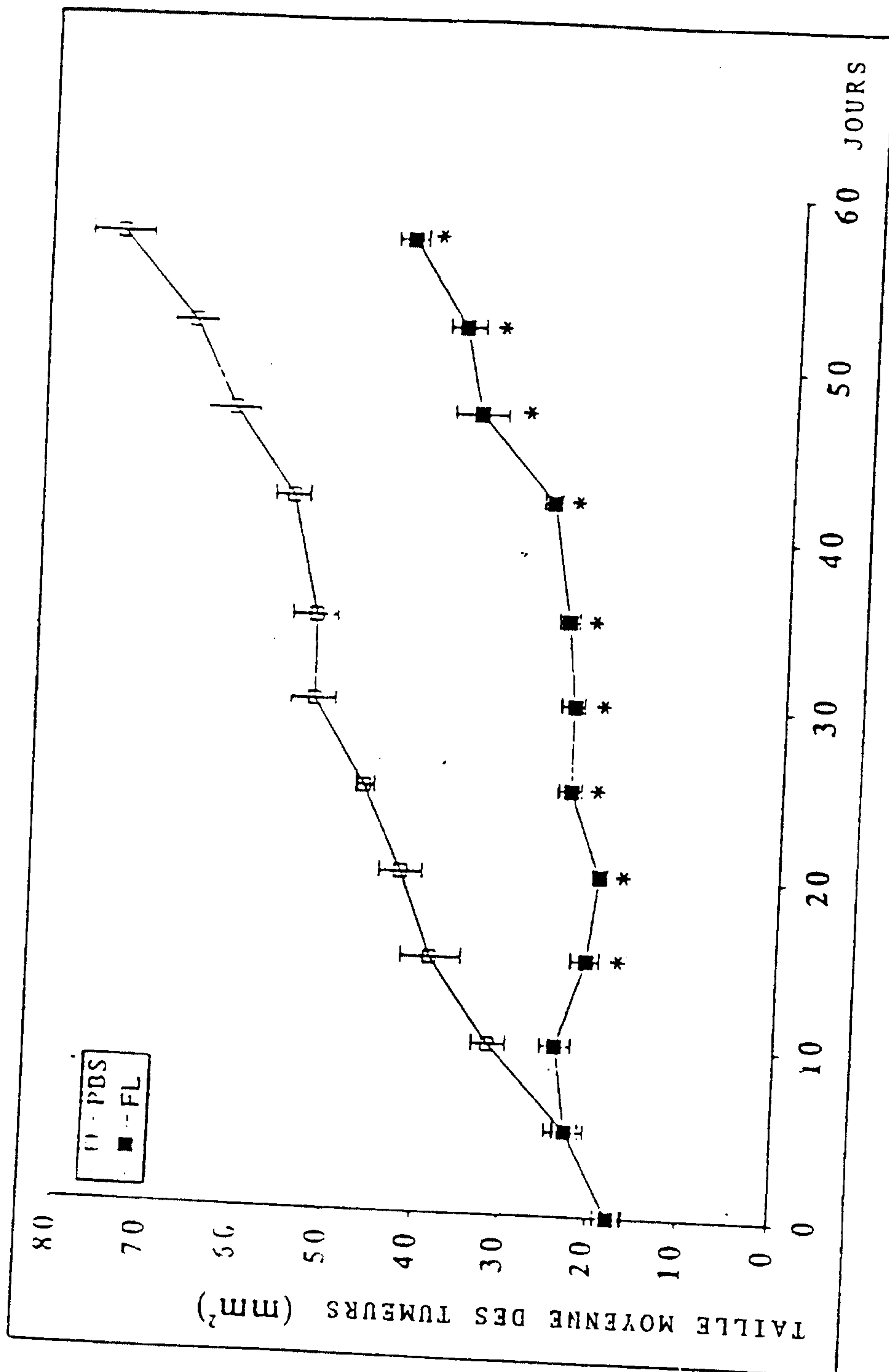


FIGURE 4

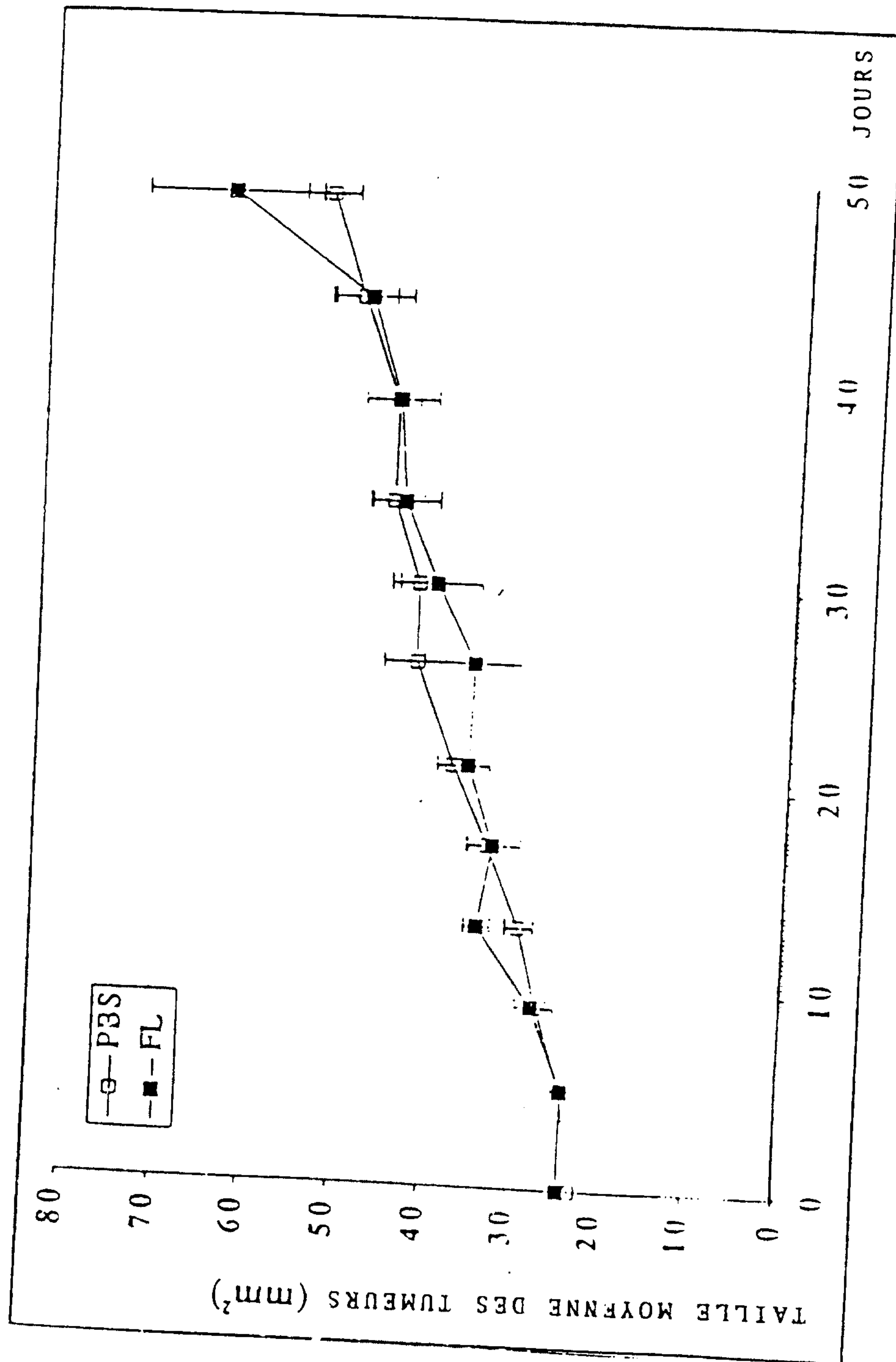


FIGURE 5a

7/20

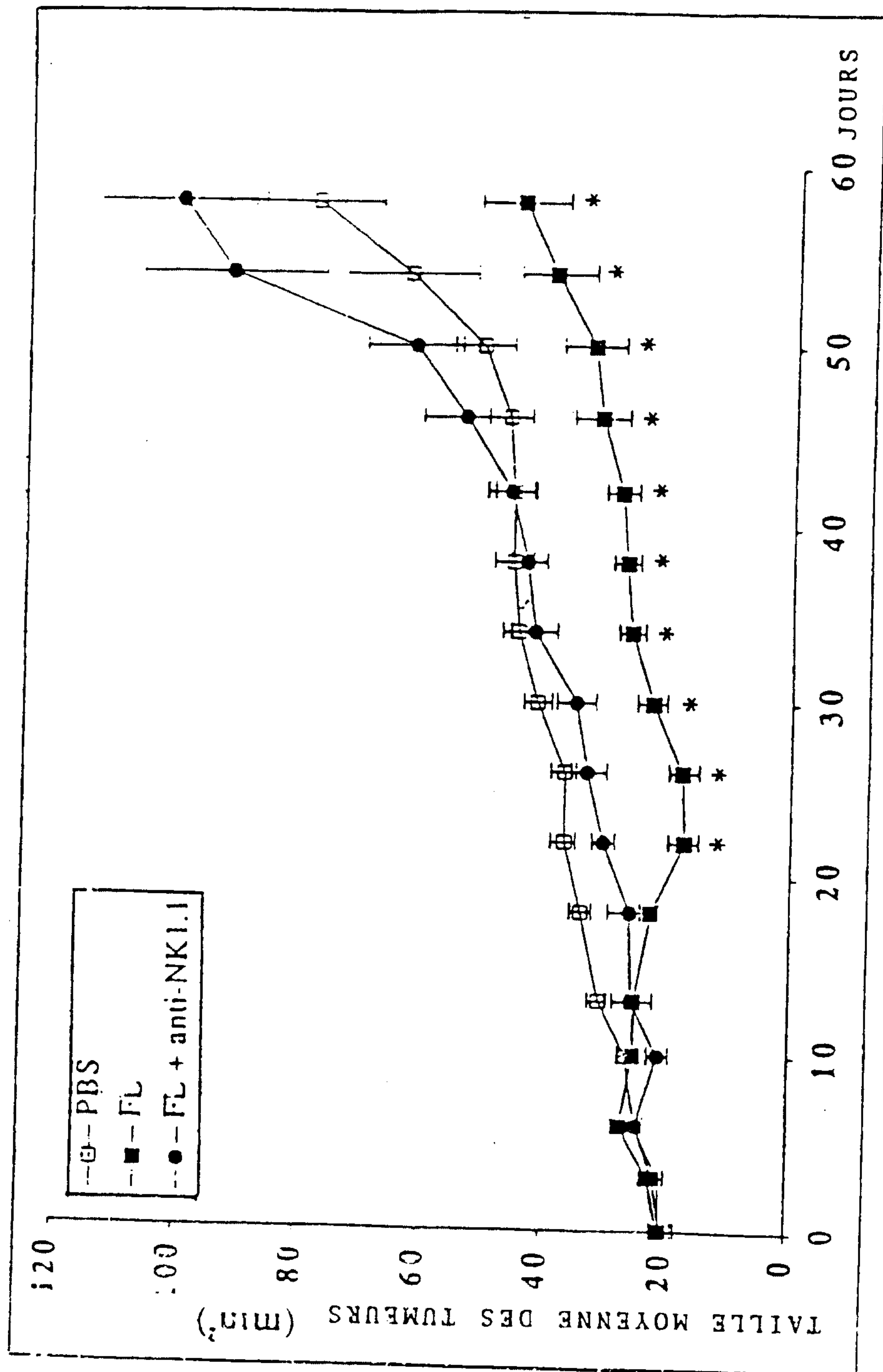


FIGURE 5b

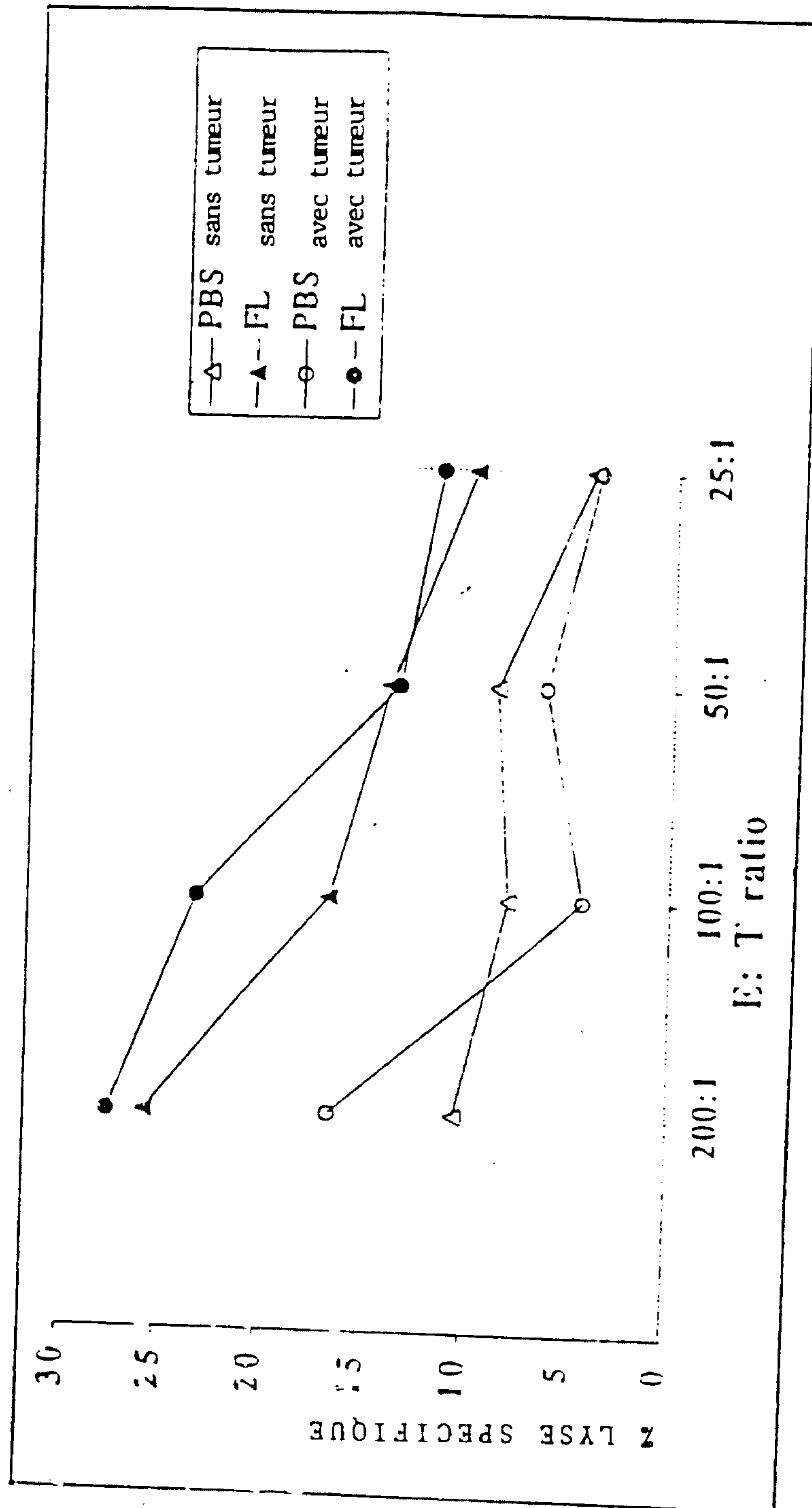


FIGURE 6

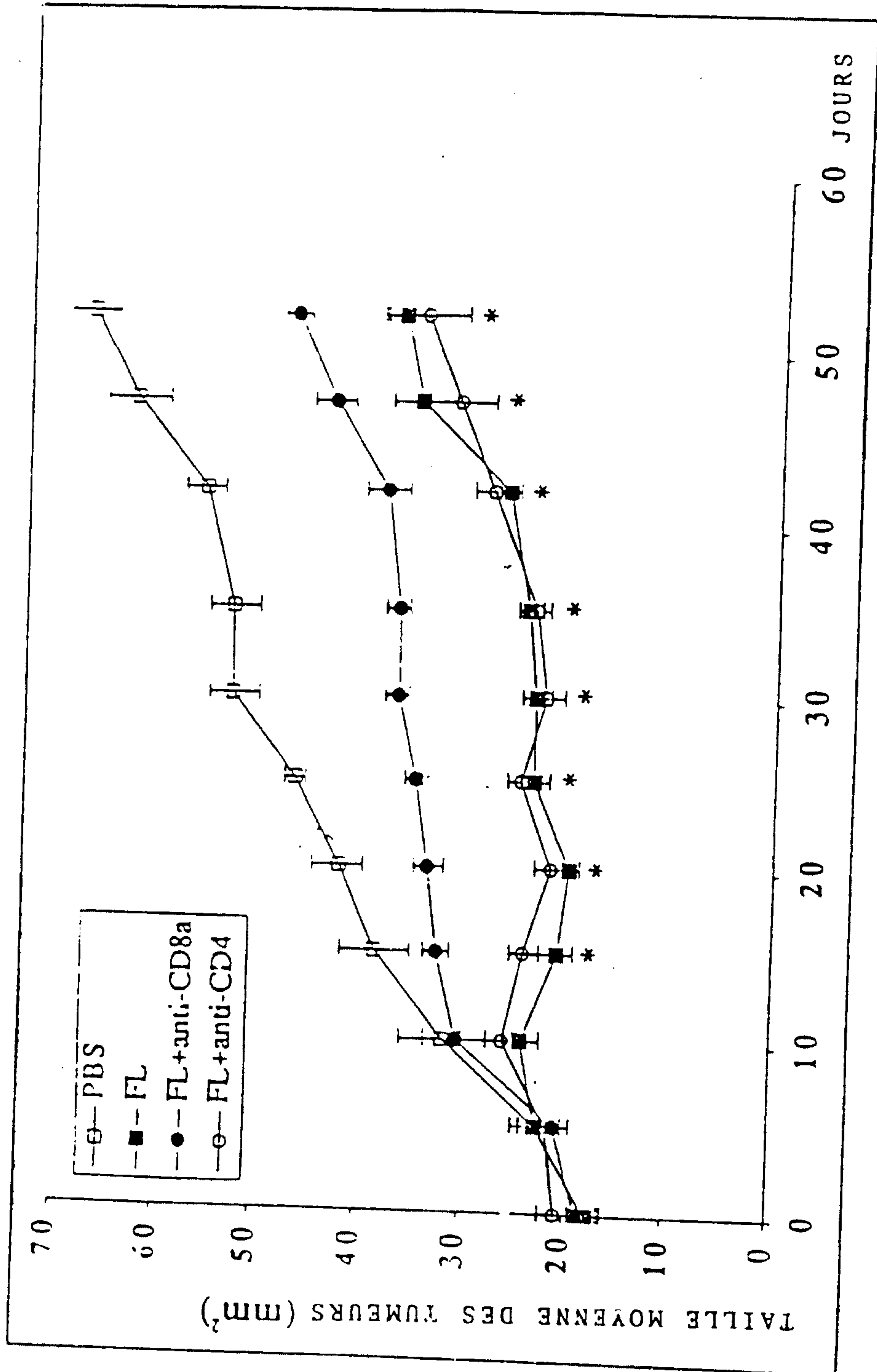


FIGURE 7a

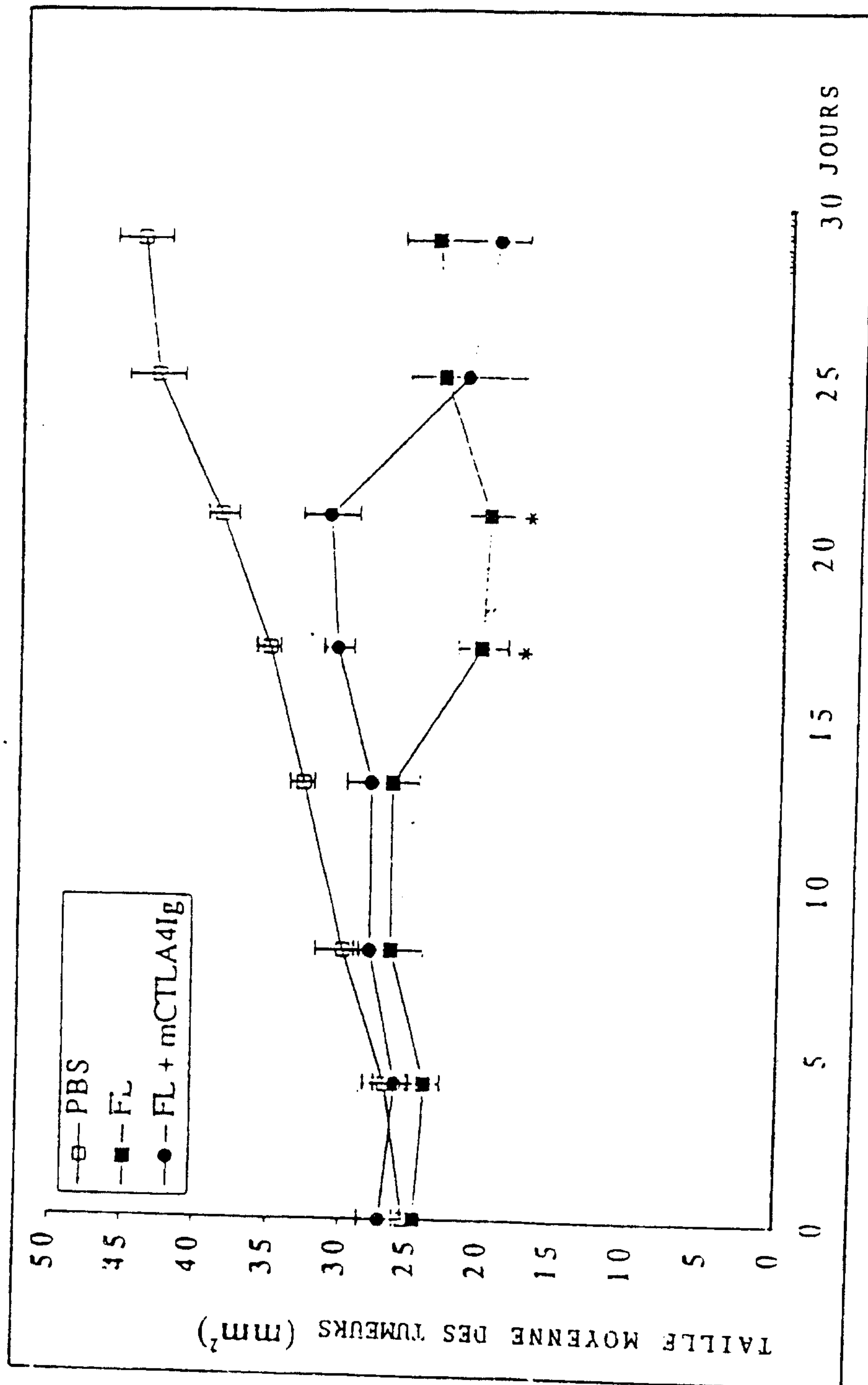


FIGURE 7b

11/ 20

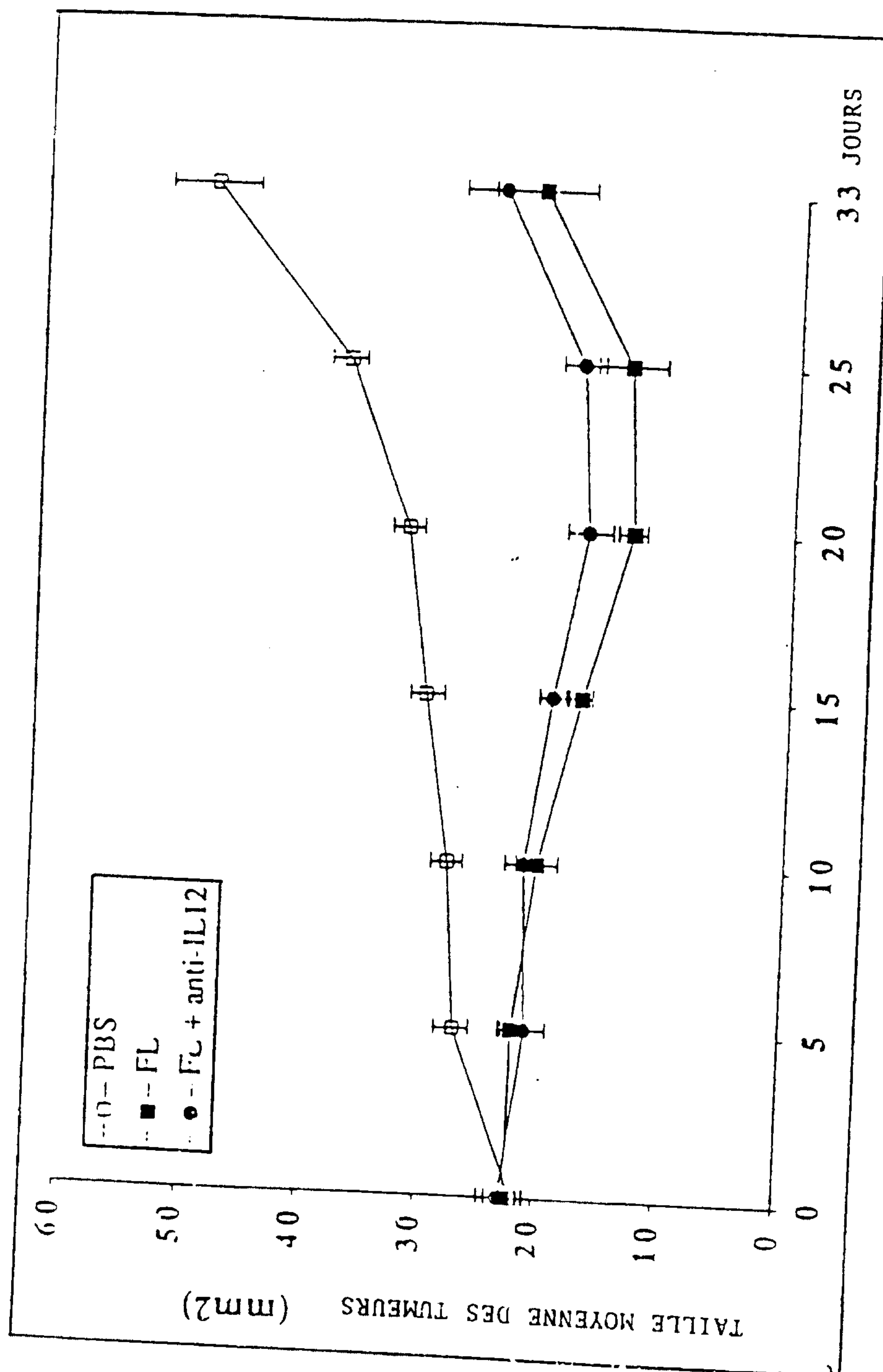


FIGURE 7c

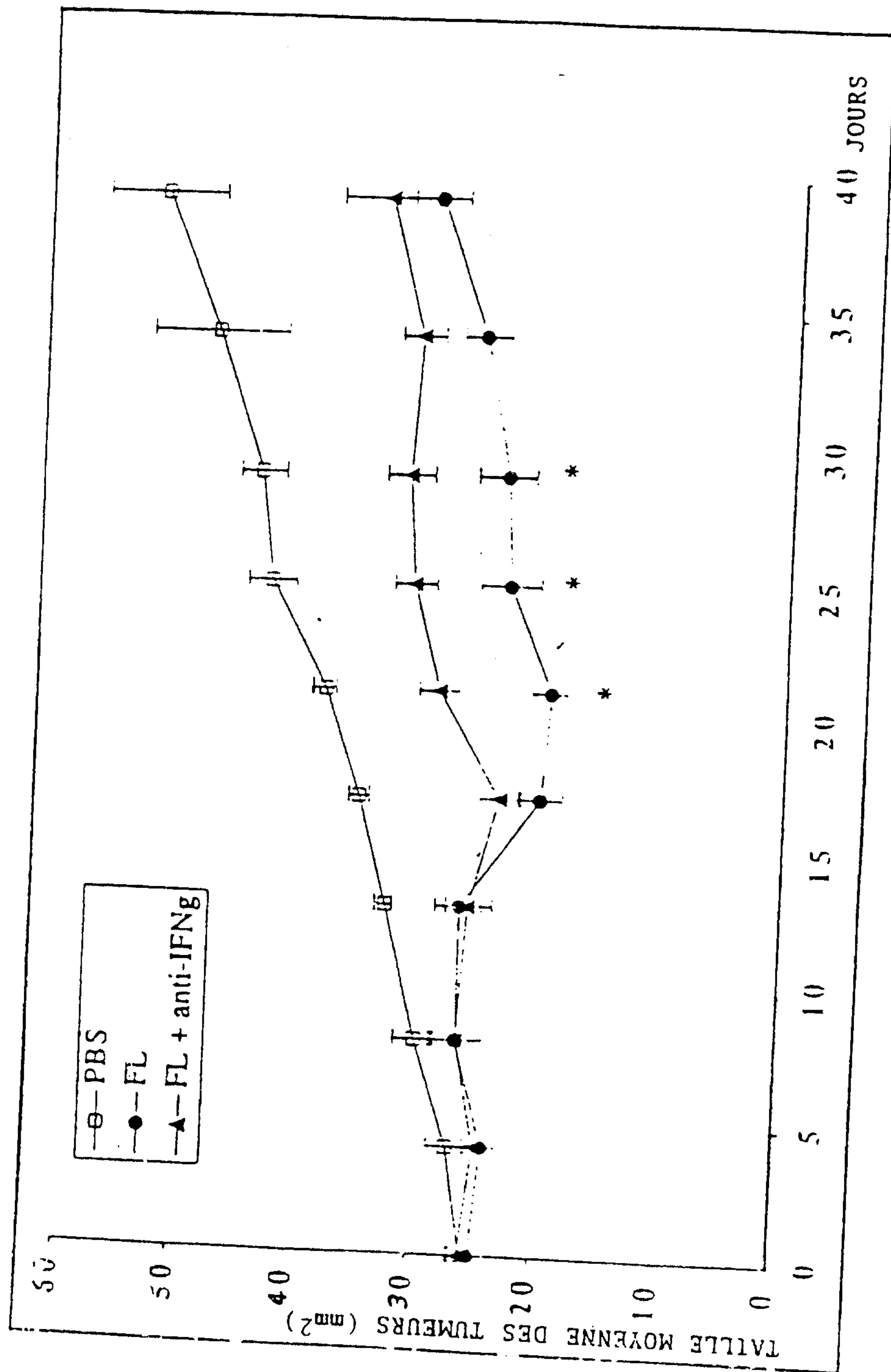


FIGURE 7d

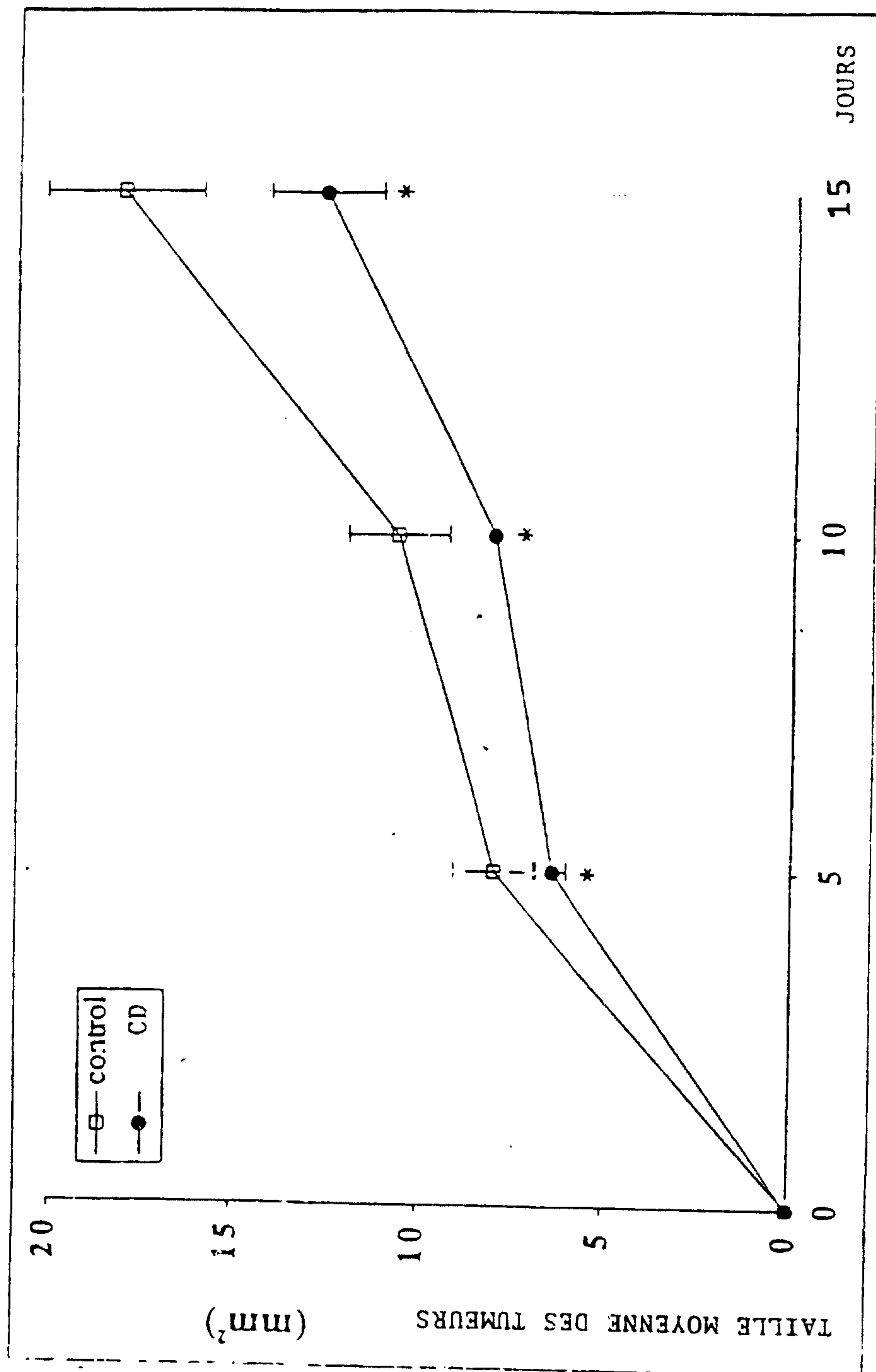


FIGURE 8 a

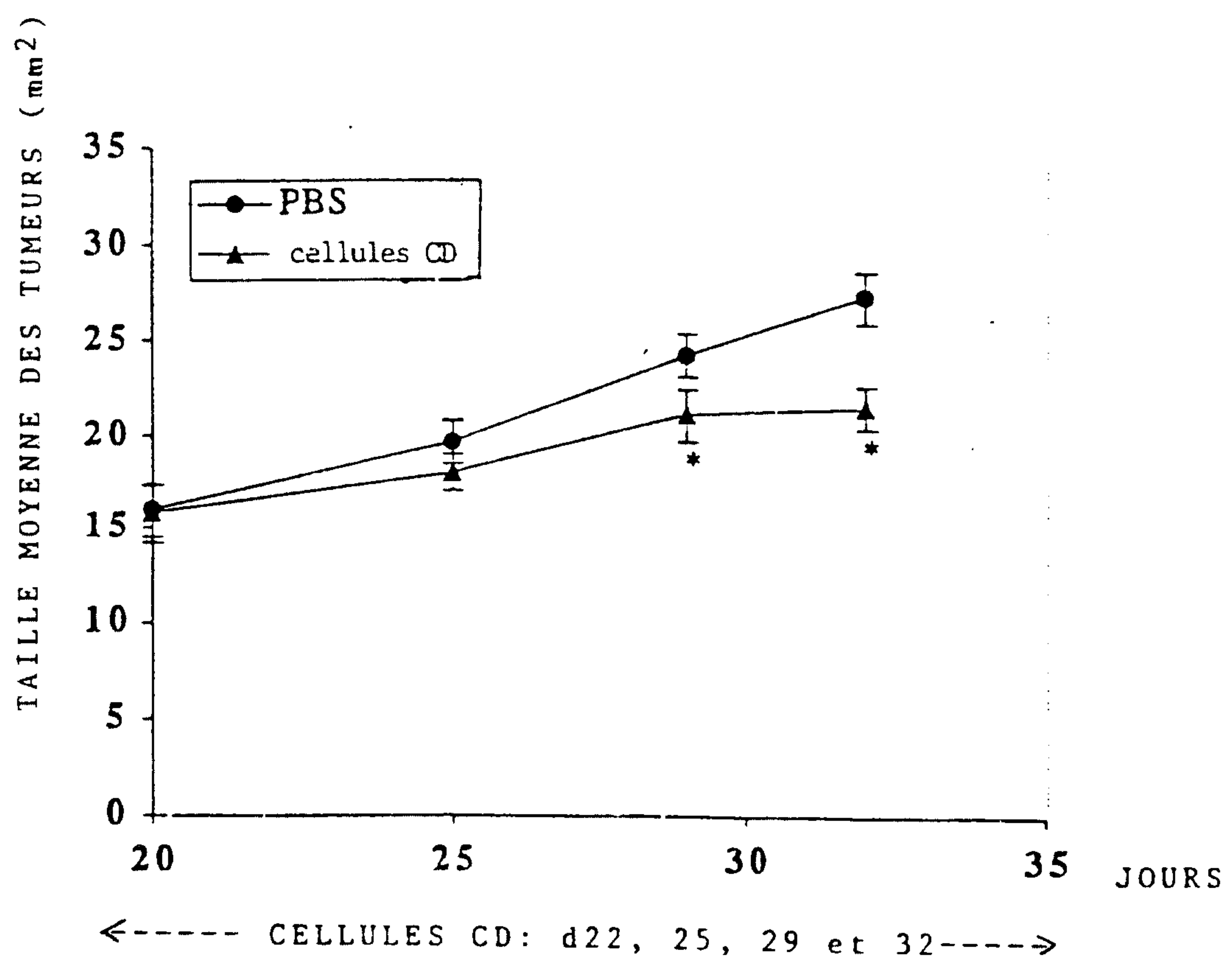


FIGURE 8b

15/ 20

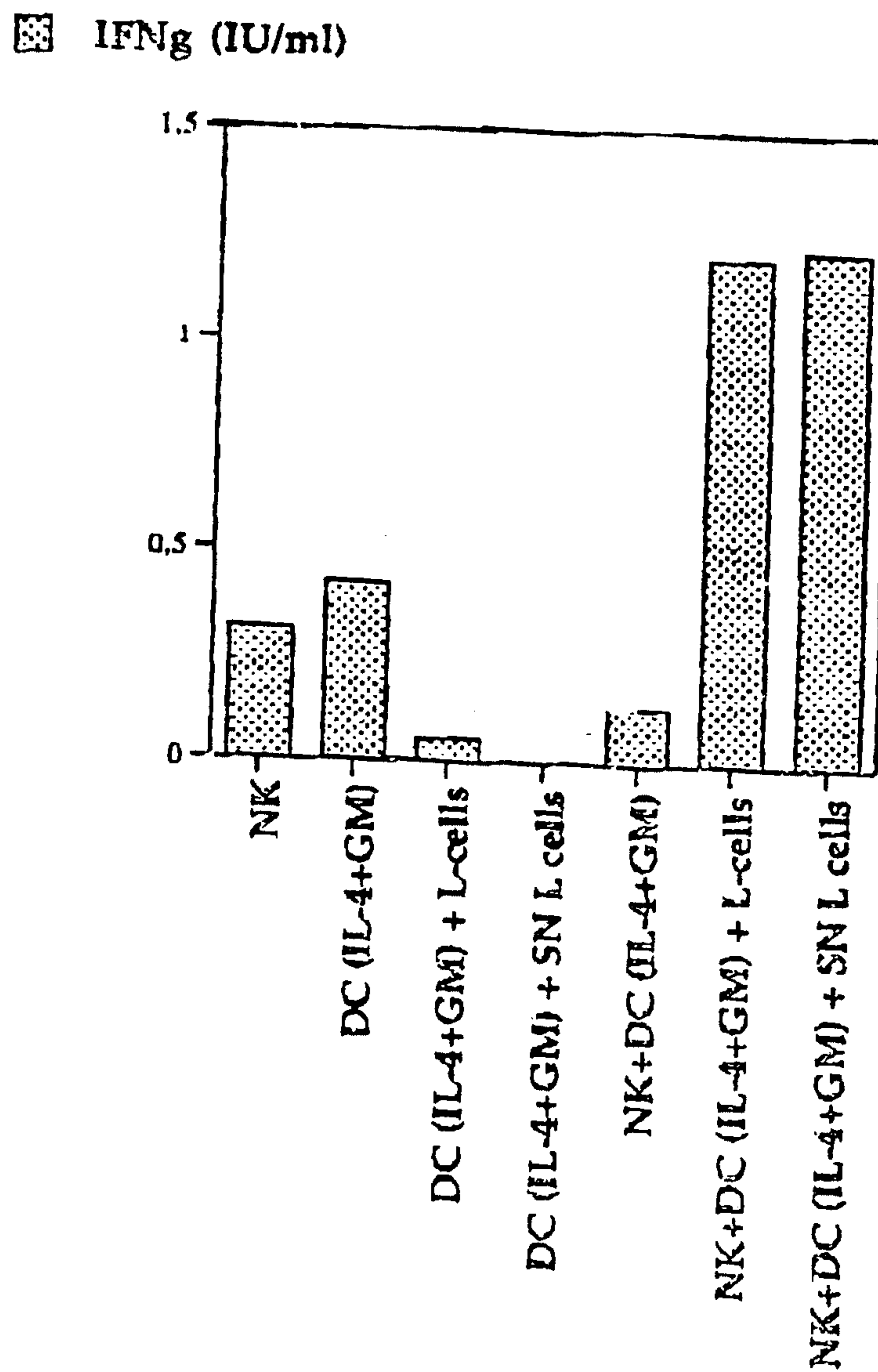


FIGURE 9a

16/ 20

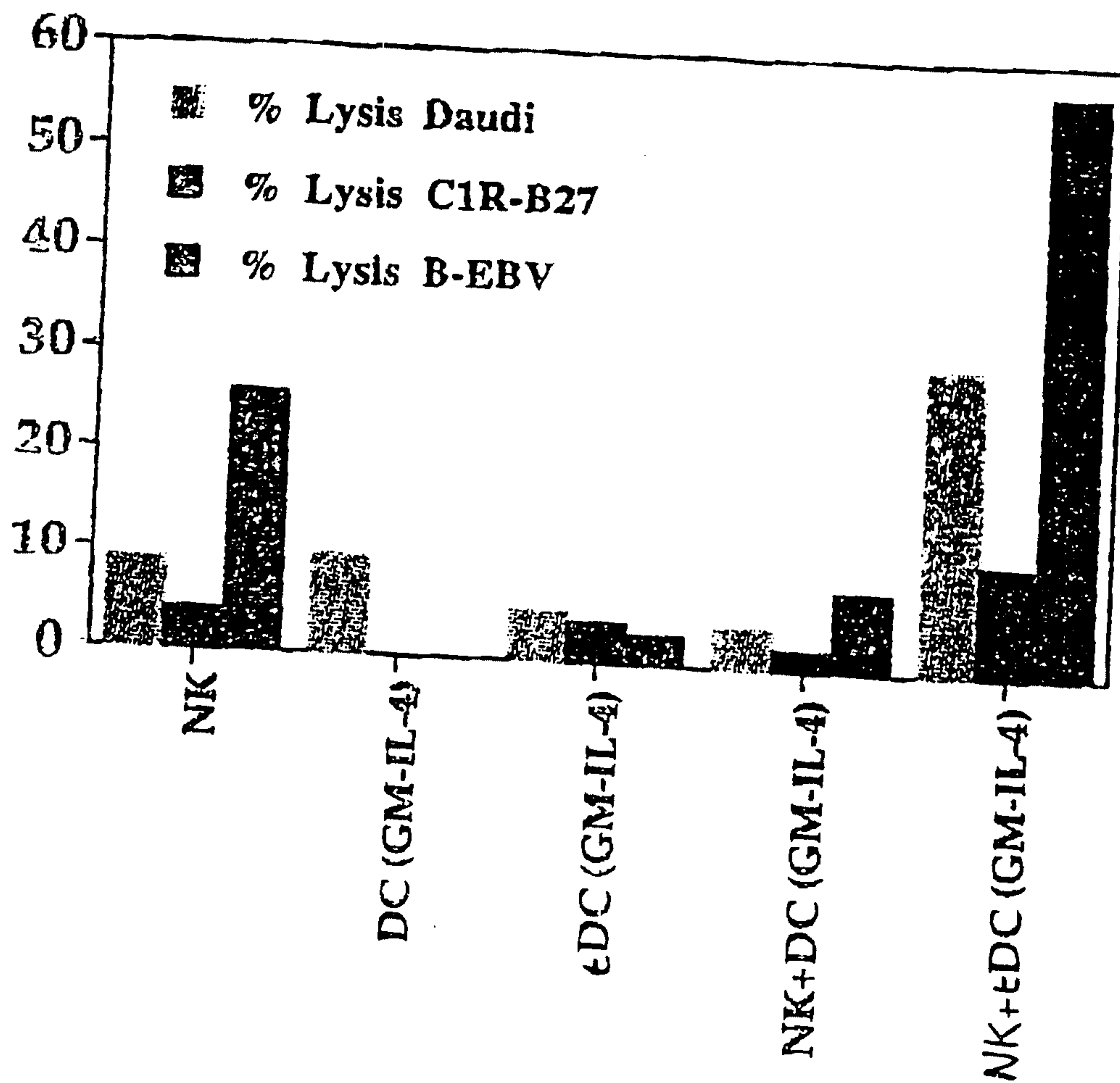


FIGURE 9b

#2322712

UNSCANNABLE ITEM

RECEIVED WITH THIS APPLICATION

(ITEM ON THE 10TH FLOOR ZONE 5 IN THE FILE PREPARATION SECTION)

DOCUMENT REÇU AVEC CETTE DEMANDE

NE POUVANT ÊTRE BALAYÉ

(DOCUMENT AU 10 IÈME ÉTAGE AIRE 5 DANS LA SECTION DE LA
PRÉPARATION DES DOSSIERS)