Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2434399 A1 2002/07/18

(21) 2 434 399

(12) DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION

(13) A1

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2002/01/10
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/07/18
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/07/10
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2002/000088
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/055676
(30) Priorité/Priority: 2001/01/10 (01/00275) FR

(51) Cl.Int.^{7}/Int.Cl.^{7} C12N 5/06, A61K 35/12, A61P 37/00, A61P 35/00, A61P 31/00, A61P 17/00, G01N 33/50

(71) Demandeur/Applicant:
L C O SANTE, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
RIGAL, DOMINIQUE, FR;
MASSEAU, DANIEL, FR

(74) Agent: SIM & MCBURNEY

(54) Titre : PROCEDE DE MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES ET D'ACTIVATION DES MACROPHAGES AVEC LE RU 41740

(54) Title: METHOD FOR PROCESSING DENDRITIC CELLS AND FOR ACTIVATING MACROPHAGES WITH RU 41740

(57) Abrégé/Abstract:
L'invention porte sur des procédés de maturation de cellules dendritiques par leur mise en présence de RU 41740 ou d'un composé analogue du RU 41740. La maturation des cellules dendritiques au contact du RU41740 peut être attestée tant par leurs propriétés fonctionnelles que par leurs propriétés phénotypiques.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
18 juillet 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/055676 A3

(51) Classification internationale des brevets[7] : C12N 5/06, A61K 35/12, G01N 33/50, A61P 35/00, 37/00, 17/00, 31/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00088

(22) Date de dépôt international :
10 janvier 2002 (10.01.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/00275 10 janvier 2001 (10.01.2001) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **L C O SANTE** [FR/FR]; 17, rue de Pontoise, F-95520 OSNY (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **RIGAL, Dominique** [FR/FR]; 4, chemin de Chantemerle, F-69370 Saint-Didier Mont d'Or (FR). **MASSEAU, Daniel** [FR/FR]; 16, rue Henri IV, F-95450 Us (FR).

(74) Mandataires : **ERNEST GUTMAN-YVES PLASSERAUD S.A.** etc.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
— *avec rapport de recherche internationale*

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 3 janvier 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

WO 02/055676 A3

(54) Title: METHOD FOR PROCESSING DENDRITIC CELLS AND FOR ACTIVATING MACROPHAGES WITH RU 41740

(54) Titre : PROCEDE DE MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES ET D'ACTIVATION DES MACROPHAGES AVEC LE RU 41740

(57) Abstract: The invention concerns methods for processing dendritic cells by contacting them with RU 41740 or a compound analogous to RU 41740. The processing of dendritic cells contacted with RU 41740 can be evidenced by their functional properties and their phenotypic properties.

(57) Abrégé : L'invention porte sur des procédés de maturation de cellules dendritiques par leur mise en présence de RU 41740 ou d'un composé analogue du RU 41740. La maturation des cellules dendritiques au contact du RU41740 peut être attestée tant par leurs propriétés fonctionnelles que par leurs propriétés phénotypiques.

PROCEDE DE MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES ET D'ACTIVATION DES MACROPHAGES AVEC LE RU 41740

DESCRIPTION

La présente invention se situe dans le domaine de la thérapie cellulaire. Elle a pour objet un procédé capable de générer des cellules dendritiques matures et/ou des macrophages activés de mammifères à partir de monocytes, de précurseurs des monocytes, ou de cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules dendritiques jouent un rôle critique dans l'émergence de la réponse immunitaire antitumorale, anti-infectieuse et auto-immune. En effet, les cellules dendritiques sont les seules cellules capables d'induire une réponse primaire à partir des lymphocytes T. Elles ont donc un rôle clef dans l'initiation de la réponse immunitaire. Une telle fonction est à rapprocher de nombreuses propriétés morphologiques et des molécules de surface des cellules dendritiques. En effet, grâce à de larges expansions de leur membrane cytoplasmique, les cellules dendritiques ont une surface de contact avec leur environnement particulièrement importante. De plus, elles possèdent à leur surface de très nombreux antigènes d'histocompatibilité de classe I et de classe II qui permettent la présentation antigénique.

Après sa prise en charge par la cellule dendritique, l'antigène subit un «apprêtement» (*processing* en anglais) avant d'être présenté au lymphocyte T. L'apprêtement (remaniement), qui nécessite un métabolisme cellulaire actif, comporte quatre étapes : la captation de l'antigène, sa dégradation enzymatique en petits fragments peptidiques dans un compartiment intracellulaire, l'association de ces fragments aux molécules de classe II du CMH, et la migration des complexes peptides-

molécules de classe II à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène (CPA) pour la présentation au récepteur des cellules T (RcT) du lymphocyte T auxiliaire (Th). La première étape (captation), qui est indépendante de la température, s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs non spécifiques ou par d'autres mécanismes encore mal connus. Plus les molécules sont de taille importante, mieux elles sont captées. La deuxième étape, qui est dépendante de la température (elle est bloquée à 4 degrés), est l'internalisation de l'antigène dans les phagosomes qui, ensuite, fusionnent avec les lysosomes (organites intracytoplasmiques riches en protéases), donnant ainsi naissance aux endosomes à pH acide. La protéolyse de l'antigène en fragments peptidiques s'effectue, dans ces vésicules, sous l'action, notamment, des cathepsines B, puis D. Cette étape peut être bloquée par les ions ammonium, qui inhibent la liaison phagosome-lysosome, ou par la chloroquine, qui élève le pH des lysosomes. La troisième étape est un processus complexe encore mal connu dans ses détails, qui aboutit à l'association entre la molécule de classe II du CMH, et certains fragments particuliers de l'antigène dégradé constitués généralement de neuf à vingt-cinq acides aminés. La quatrième étape implique la migration du complexe molécule de classe II-peptide (dite forme C3) à la surface de la CPA. Le complexe ainsi formé peut alors interagir avec le RcT approprié à la surface du lymphocyte Th sous réserve que les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) du lymphocyte appartiennent au même haplotype que celles de la cellule présentatrice (restriction allogénique).

Les cellules dendritiques sont par ailleurs très riches en molécules de costimulation de la réponse immunitaire, telles que les molécules CD80, CD86, CD40 qui activent respectivement les molécules CD28, CTLA-4 et CD40L des lymphocytes T en initiant la réponse immunitaire. Elles possèdent aussi de très nombreuses molécules de l'adhésion, comme la molécule CD54 ou la molécule CD11a/CD18, ce qui facilite la coopération

entre les cellules dendritiques et les cellules T. Une autre caractéristique particulière des cellules dendritiques est de déployer des fonctions différentes en fonction de leur stade de différenciation. Ainsi, la capture de l'antigène et sa transformation sont les deux fonctions principales de la cellule dendritique immature, tandis que ses capacités à présenter l'antigène pour stimuler les cellules T augmentent au fur et à mesure que les cellules dendritiques migrent dans les tissus et les ganglions lymphatiques. Ce changement de fonctionnalité correspond à une maturation de la cellule dendritique. Ainsi, le passage de la cellule dendritique immature à la cellule dendritique mature représente une étape fondamentale dans l'initiation de la réponse immunitaire. Cette maturation peut être facilement suivie grâce à l'évolution des marqueurs de surface durant ce processus. Les marqueurs de surface caractéristiques des différents stades de maturation des cellules dendritiques sont résumés dans le tableau ci-après.

Type cellulaire	Marqueurs de surface
Monocytes	CD14++, DR+,CD86+,CD16+/-,CD54+,CD40+
Cellule dendritique immature	CD14 -, CD16-, CD80+/-, CD83-, CD86+, CD1a+, CD54+, DQ+, DR++
Cellule dendritique mature	CD14-, CD83++, CD86++, CD80++, DR+++, DQ++, CD40++, CD54++, CD1a-.

Tableau 1

L'isolement des cellules dendritiques du sang périphérique est très difficile puisque moins de 1 % des globules blancs appartiennent à cette catégorie. De la même façon, l'extraction à partir des tissus est impossible chez l'homme et fort complexe chez l'animal. C'est pourquoi une avance importante a été réalisée lorsque l'on a pu générer des cellules

dendritiques à partir de précurseurs hématopoïétiques et des monocytes en présence de différentes cytokines. La production de cellules dendritiques à partir de monocytes peut se faire en présence de GM-CSF et d'IL-4 pour obtenir des cellules dendritiques immatures, qui matureront après contact avec du TNF-α ou avec d'autres agents tels que le CD40-ligand, le LPS ou des milieux conditionnés à partir de macrophages. Ces derniers agents sont des substances toxiques ou complexes. De même, l'activation des macrophages *in vivo* est complexe et difficilement contrôlable. C'est pourquoi l'activation *ex vivo* représente un moyen approprié pour des études expérimentales et des applications thérapeutiques.

Les macrophages activés sont des cellules que l'on rencontre dans les tissus après une activation du processus inflammatoire par des inducteurs spécifiques ou non spécifiques. Ces cellules interviennent dans l'élimination des agents toxiques, pathogènes ou des cellules altérées ou cancéreuses.

Le RU 41740, commercialisé sous la marque Biostim par les Laboratoires Cassenne (France), est un médicament composé d'extraits glycoprotéiques obtenus à partir d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* K_2O_1 (souche O1K2 NCTC 5055). Il est obtenu après lyse des parois bactériennes, extraction organique, centrifugation et ultrafiltration.

Il se compose de : - 80 % de glycoprotéines
- d'acides aminés, de lipides et d'acides nucléiques.

La partie glycoprotéique est divisée en 3 fractions : P1, F1, F2.

P1, d'origine capsulaire, représente environ 50 % du RU 41740, et a un poids moléculaire moyen de 95 kD,

F1 est d'origine membranaire et représente environ 20 % du RU 41740, et a un poids moléculaire moyen de 350 kD

F2 semble être une partie de P1.

Le RU 4170 ne provoque pas d'effet pyrogène, comme en atteste la négativité du test au Limulus effectué avec ce composé.

La présente invention décrit un nouveau procédé de maturation des cellules dendritiques en utilisant, comme agent inducteur de cette maturation, le RU 41740 ou un analogue de celui-ci tel que défini ci-après.

Parmi les agents permettant la maturation des cellules dendritiques, le TNF-α est celui dont l'activité a été le mieux caractérisée. Malheureusement, cette lymphokine est très toxique et peut déclencher des réponses extrêmement violentes *in vivo*, ce qui présente un obstacle majeur à son utilisation en thérapie cellulaire. Le LPS est un autre composé capable d'induire la maturation des cellules dendritiques. Il présente aussi une toxicité importante et induit un effet pyrogène puissant, ce qui est attesté par la positivité du test au Limulus effectué avec le LPS. Il produit en outre des résultats variables suivant le lot utilisé. Le LPS présente enfin l'inconvénient de se dégrader très rapidement. Quant au ligand du CD40 (CD40L), il oriente la différenciation des cellules dendritiques de façon variable selon la concentration et la période d'incubation, ce qui le rend difficilement utilisable en thérapie cellulaire.

Comme cela est illustré dans les exemples expérimentaux ci-après, le RU 41740 permet d'induire la maturation des cellules dendritiques avec une efficacité comparable ou supérieure aux agents de référence cités ci-dessus. Il présente en outre plusieurs avantages importants par rapport à ces agents. En particulier, le RU 41740, commercialisé sous la marque Biostim, est utilisé depuis 1982 comme médicament pour stimuler le système immunitaire lors d'infections chroniques (bronchite chronique,

otite, rhinite, ...), à titre curatif ou préventif. Sa parfaite tolérance par l'organisme a été démontrée. De plus, le RU 41740 est un composé extrêmement stable, et les inventeurs ont montré qu'il induisait la maturation des cellules dendritiques de façon très reproductible et dépendante de la dose utilisée.

Dans une perspective de thérapie cellulaire nécessitant des cellules dendritiques matures, le RU 41740 est donc particulièrement intéressant, de par son innocuité et sa simplicité d'utilisation liée à sa stabilité et à la reproductibilité des résultats obtenus.

L'utilisation de tout composé analogue du RU 41740 et présentant des propriétés comparables à celui-ci, dans des procédés tels que ceux décrits ci-dessous, entre bien évidemment dans le cadre de la présente invention. Dans la suite, on appellera « analogue du RU 41740 » un composé comportant 60 à 90 % de glycoprotéines, et capable d'induire, lors de sa mise en contact de cellules dendritiques immatures, à des concentrations inférieures ou égales à 1 mg/ml, une augmentation significative de l'expression des molécules CD40, CD83, CD86 et HLA–DR et une diminution très marquée de l'expression des molécules CD14 et CD1a par lesdites cellules dendritiques. Des exemples d'analogues du RU 41740 sont le LCOS 1013 et le LCOS 1014, dont les procédés de fabrication sont décrits à l'exemple 10. Dans la suite du texte, et sauf indication contraire, le terme « RU 41740 » désignera aussi bien le RU 41740 proprement dit, constituant le principe actif du Biostim, qu'un analogue de celui-ci.

Un « analogue du RU 41740 » est défini ici comme un composé d'extraits glycoprotéiques obtenus à partir d'une souche de *Klebsiella* (par exemple, la souche O_1 K_2 NC TC 5055 de *Klebsiella pneumoniae*), par au moins les étapes suivantes :

- culture de la souche
- lyse des parois bactériennes

- extraction organique
- centrifugation
- ultrafiltration
- séchage

L'exemple 10 ci-dessous présente deux procédés de productions d'analogues du RU 41740, désignés sous les références LCOS 1013 et LCOS 1014.

La structure chimique d'un analogue du RU 41740 est majoritairement composée de :

- hydrate de carbone = 70% ± 12
- protéines = 20% ± 6.

Des lipides, nucléosides et acides aminés sont présents à l'état de traces.

Le RU 41470 ou un analogue de celui-ci présentent un taux d'endotoxines bactériennes indétectable (à 10 pg/ml).

Le RU 41740 est actif dans tous les procédés utilisant les monocytes, des précurseurs des monocytes, ou les cellules souches hématopoïétiques chez l'homme et l'animal. De plus, le RU 41740 permet d'obtenir en même temps des macrophages activés à partir des mêmes cellules de départ.

La maturation des cellules dendritiques par leur mise en présence de RU 41740 peut être attestée par leurs propriétés phénotypiques ou par leurs propriétés fonctionnelles.

Ainsi, l'invention porte sur un procédé d'obtention de cellules dendritiques matures (Monocyte Dendritic Cells, ou MODC) ou de macrophages activés à partir de monocytes, de précurseurs des monocytes, ou de cellules souches hématopoïétiques, caractérisé en ce que lesdits monocytes, précurseurs ou cellules souches sont mis en contact avec le RU 41740 ou un composé analogue de celui-ci, ce composé étant choisi de telle sorte que la mise en contact de cellules dendritiques immatures avec ledit

composé permette la maturation fonctionnelle des cellules dendritiques, attestée par leur capacité à :

- déclencher *in vitro* une réponse primaire contre un antigène infectieux ou tumoral mis en contact avec les cellules dendritiques préalablement et/ou au cours de leur culture avec les lymphocytes T ;
- induire la prolifération de lymphocytes T en culture mixte autologue ou allogénique.

Les exemples 6, 7 9, 11 et 12 sont une illustration de ce procédé.

L'invention porte également sur un procédé d'obtention de cellules dendritiques matures ou de macrophages activés à partir de monocytes, de précurseurs des monocytes, ou de cellules souches hématopoïétiques, caractérisé en ce que lesdits monocytes, précurseurs ou cellules souches sont mis en contact avec le RU 41740 ou un composé analogue de celui-ci, ce composé étant choisi de telle sorte que la mise en contact de cellules dendritiques immatures avec ledit composé permette la maturation phénotypique des cellules dendritiques, attestée par une augmentation significative de l'expression des molécules CD40, CD83, CD86, et HLA-DR et une diminution très marquée de l'expression des molécules CD14 et CD1a par lesdites cellules dendritiques.

Les exemples 1 à 3 sont une illustration de ce procédé.

Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques naturelles du RU 41740 permettent d'y adsorber des molécules, en particulier des molécules antigéniques. Ceci permet donc de réaliser de façon simple un couplage non covalent entre le RU41740 et des molécules antigéniques. Il sera alors possible d'obtenir des cellules dendritiques matures spécifiques des antigènes adsorbés au RU 41740 ou à un analogue de celui-ci, en incubant des cellules dendritiques immatures avec un produit de couplage entre le RU 41740 ou son analogue et les molécules antigéniques choisies. Le couplage entre le RU 41740 ou un analogue de celui-ci et les molécules

antigéniques peut être réalisé par n'importe quel procédé connu de l'homme du métier. De façon préférée, les antigènes seront adsorbés à la surface du RU 41740 ou de son analogue, mais d'autres moyens de couplage (liaison covalente, affinité, etc ...) peuvent aussi être envisagés. Le procédé de couplage le plus simple, par adsorption à la surface du RU41740, présente en outre l'avantage de permettre un couplage avec des molécules antigéniques essentiellement non protéiques.

Le produit de couplage entre le RU 41470 ou un analogue de celui-ci et des molécules antigéniques, pour induire la maturation de cellules dendritiques ou l'activation de macrophages, fait partie de la présente invention. Dans une réalisation préférée des produits de couplage de l'invention, le couplage est assuré par une liaison non covalente. Un produit de couplage particulier est celui du RU41740 ou d'un analogue de celui-ci, avec une molécule antigénique de nature essentiellement non protéique.

L'invention porte aussi sur un procédé d'obtention de cellules dendritiques matures présentant des antigènes choisis, à partir de monocytes, précurseurs des monocytes, ou de cellules souches hématopoïétiques, caractérisé en ce que lesdits monocytes, précurseurs ou cellules souches sont mis en contact avec le RU 41740 ou un analogue de celui-ci, couplé à des molécules comportant lesdits antigènes.

Dans une réalisation préférée de l'invention, les procédés décrits ci-dessus permettent d'obtenir des cellules dendritiques matures ou des macrophages activés par la mise en contact de monocytes, précurseurs des monocytes, ou de cellules souches hématopoïétiques avec le RU 41740, couplé ou non à des molécules antigéniques.

Dans une mise en œuvre préférée des procédés de l'invention, le RU 41740 est ajouté au milieu de culture des cellules à une concentration finale comprise entre 1 ng/ml et 1 mg/ml, préférentiellement entre 100 ng/ml et 10 µg/ml.

Dans une autre mise en œuvre préférée des procédés de l'invention, les monocytes, précurseurs ou cellules souches sont mis en contact avec un analogue du RU 41740 obtenu à partir de la souche O_1 K_2 NCTC 5055 de *Klebsiella pneumoniae*. Un tel analogue est par exemple le LCOS 1013 ou le LCOS 1014, qui est ajouté au milieu de culture des cellules à une concentration finale comprise de préférence entre 1 ng/ml et 1 mg/ml, et, de manière encore préférée, entre 100 ng/ml et 50 µg/ml.

Dans les procédés de l'invention, la durée d'incubation des monocytes, précurseurs des monocytes, ou des cellules souches hématopoïétiques en présence de RU 41740 ou d'un composé analogue de celui-ci est préférentiellement de 1 à 15 jours.

La thérapie cellulaire est une approche récente consistant à administrer à un patient des cellules modifiées *ex vivo* de façon à leur conférer des propriétés susceptibles d'avoir un effet bénéfique pour le patient. Les propriétés naturelles des cellules dendritiques en font un excellent candidat pour des approches de thérapie cellulaire dans plusieurs domaines de pathologie, de par leur capacité à induire une réponse immunitaire primaire à partir des lymphocytes T. En particulier, l'immunothérapie anti-tumorale par administration de cellules dendritiques présentant un ou plusieurs antigènes tumoraux, est une approche de thérapie cellulaire particulièrement prometteuse. Le principe de cette approche est de présenter au système immunitaire des antigènes tumoraux, de façon particulièrement efficace, afin de stimuler une réponse contre les cellules présentant ces antigènes. Cette approche est illustrée dans l'exemple 6 ci-après.

L'exemple 7 présenté ci-après démontre que l'administration de cellules dendritiques présentant des antigènes de micro-organismes permet d'obtenir une immunisation primaire vis-à-vis de ces micro-organismes, et peut donc être utilisée dans la lutte anti-infectieuse.

Une autre approche de thérapie cellulaire utilisant des cellules dendritiques consiste à orienter les cellules dendritiques vers une réaction de tolérance de l'hôte vis-à-vis d'antigènes particuliers. Ceci peut être utile par exemple pour induire une tolérance vis-à-vis d'alloantigènes lors d'une greffe allogénique, d'autoantigènes lors d'une maladie autoimmune, ou d'allergènes lors d'une maladie allergique.

En effet, les cellules dendritiques, dans certaines conditions de culture, peuvent provoquer une réaction d'anergie, c'est-à-dire l'inactivation fonctionnelle des lymphocytes T au lieu de leur activation. La culture des cellules dendritiques en présence d'immunosuppresseurs comme la cyclosporine ou l'histamine, entraîne une modification des antigènes de membrane, qui va induire une réponse de tolérance et non une réponse cytotoxique. Cette constatation pourrait avoir des implications importantes dans le cadre des greffes d'organes d'une part, et des traitements des maladies auto-immunes d'autre part, comme la polyarthrite rhumatoïde, la myasthénie, le diabète insulinodépendant, la sclérose en plaques, l'eczéma, le psoriasis, etc. et les maladies allergiques. L'exemple 8 illustre cette approche en montrant l'influence de la cyclosporine A en présence de RU 41740 sur la maturation des cellules dendritiques.

Quel que soit le type de pathologie concerné, la thérapie cellulaire peut être réalisée en administrant au patient humain ou animal des cellules autologues, homologues ou xénologues après leur modification *ex vivo*.

La présente invention porte ainsi sur un procédé tel que ceux décrits ci-dessus, dans lequel les cellules dendritiques sont traitées *ex vivo* et administrées après maturation à un patient, humain ou animal, de façon autologue, homologue ou xénologue, pour la prophylaxie, l'atténuation ou le traitement de maladies cancéreuses, infectieuses, allergiques, ou auto-immunes.

L'utilisation du RU 41740 ou d'un analogue de celui-ci, pour la préparation d'une composition comprenant des cellules dendritiques matures et/ou des

macrophages activés et/ou des cellules de Langerhans de la peau, entre aussi dans le cadre de la présente invention.

Les inventeurs ont montré que le RU 41740 permettait d'induire *in vitro* la maturation des cellules de Langerhans (exemple 4). Cette propriété pourrait donc être avantageusement utilisée pour favoriser une réponse immunitaire au niveau de la peau ou des muqueuses, par administration topique d'une composition comportant du RU 41740. Des exemples d'indication d'une telle composition sont notamment les gingivites et les parodontites. L'utilisation du RU 41740 ou d'un analogue de celui-ci, pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour une administration topique ou systémique, fait donc également partie de cette invention.

Dans un autre aspect de l'invention, le RU 41740 ou un analogue de celui-ci est couplé à un ou plusieurs antigènes d'intérêts, puis administré directement *in vivo* pour induire la production par l'organisme de cellules dendritiques matures ou de macrophages activés présentant lesdits antigènes. Dans cette réalisation de l'invention, le RU 41740 ou son analogue sert en fait de vecteur pour les antigènes d'intérêt, et permet la présentation de ces antigènes au système immunitaire d'une façon telle qu'il induit la production de cellules dendritiques matures ou de macrophages activés présentant lesdits antigènes.

L'invention porte donc sur un procédé tel que ceux décrits ci-dessus, dans lequel les cellules dendritiques matures ou les macrophages activés sont produits directement *in vivo*.

L'utilisation d'un produit de couplage entre le RU 41470 ou un analogue de celui-ci et un ou plusieurs antigènes, pour la préparation d'une composition apte à induire la production de cellules dendritiques matures ou de macrophages activés présentant lesdits antigènes, entre aussi dans le cadre de cette invention.

Les cellules dendritiques matures obtenues par des procédés tels que ceux décrits ci-dessus peuvent être utilisées dans le traitement de divers types de pathologies, notamment en immunothérapie anti-tumorale, dans la lutte anti-infectieuse, ou pour augmenter la tolérance de l'organisme vis-à-vis de certains antigènes particuliers. Dans une mise en oeuvre préférée de l'invention, les cellules dendritiques obtenues par un procédé tel que décrit ci-dessus sont utilisées dans la fabrication d'une composition apte à favoriser une réponse immunitaire antitumorale.

De même, l'utilisation de cellules dendritiques obtenues par un procédé de la présente invention, dans la fabrication d'une composition apte à favoriser une réponse immunitaire contre une infection par un micro-organisme, est partie intégrante de l'invention.

Dans une autre réalisation préférée de l'invention, les cellules dendritiques obtenues par un procédé tel que décrit ci-dessus sont incubées en présence d'un immunosuppresseur, et utilisées dans la fabrication d'une composition apte à modifier la réponse immunitaire dans le sens d'une tolérance.

Les cellules dendritiques matures produites par les procédés de l'invention peuvent aussi être utilisées pour identifier des antigènes mineurs d'histocompatibilité. Cette technique consiste à récupérer les monocytes en les faisant différencier en cellules dendritiques matures, puis en les utilisant comme des cellules stimulantes dans une réaction de culture mixte lymphocytaire entre individus de la même famille HLA compatible. Ce système permet de détecter des disparités concernant les antigènes mineurs d'histocompatibilité et de pouvoir approfondir la compatibilité ou les incompatibilités entre personnes d'une même famille, ce qui présente des avantages certains dans le domaine des greffes de tissus et d'organes en intra familial ou même extra familial. L'utilisation de cellules dendritiques obtenues par un procédé de l'invention, pour la détection et/ou la

caractérisation des antigènes d'histocompatibilité, fait aussi partie de la présente invention.

Les exemples et figures présentés ci-dessous à titre non limitatif permettront de mettre en évidence certains avantages et caractéristiques de la présente invention.

Légende des figures

La figure 1 représente l'évolution des marqueurs cellulaires au cours de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques à J0 (courbes en pointillés = marqueurs monocytaires avant traitement), J6 (courbes en traits fins = cellules dendritiques immatures), et J8 (courbes en traits gras = cellules dendritiques matures), après ajout du RU 41740 à 25 µg/ml à partir de J6.

La figure 2 illustre la génération de lignées T cytotoxiques spécifiques du peptide de la thyrocalcitonine. En abscisse est indiqué le ratio effecteur/cible utilisé, tandis qu'en ordonnée est indiqué le pourcentage de lyse des cellules cibles.

La figure 3 démontre la présentation de la toxine tétanique par les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains cultivés en présence de GM-CSF, IL-4 et RU 41740. L'ordonnée indique l'incorporation de thymidine tritiée, mesurée en coups par minutes (cpm).

La figure 4 illustre l'influence de la cyclosporine A (CsA) sur la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes cultivés en présence de GM-CSF, d'IL-4 et de RU 41740. Les courbes, obtenues en cytométrie de flux, montrent l'expression du CD83 en absence de CsA (4A) et en présence de CsA à 5 µg/ml (4B). Les figures 4C et 4D montrent les mêmes courbes pour un autre marqueur des cellules dendritiques, l'antigène DC Lamp. Les courbes en pointillé ont été obtenues avec un anticorps primaire anti-KLH, non pertinent pour les cellules dendritiques.

La figure 5 montre l'orientation de la réponse immune vers une réponse immune de type Th2 par des cellules dendritiques dérivées de monocytes et traitées par la cyclosporine A (CsA). L'ordonnée représente respectivement la sécrétion d'IL-12 (figure 5A) et le rapport de sécrétion de cytokines IFN-γ/IL-10 (Th1/Th2) (Figure 5B) par des cellules dendritiques dérivées de monocytes cultivées en présence de GM-CSF, IL-4 et RU 41740, et traitées par la cylosporine A à 5 μg/ml (colonne noires) ou non (colonnes blanches). Trois expériences sont représentées pour chaque condition. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules monocytaires non traitées par la cyclosporine, dont les mesures ont été ramenées à 100.

La figure 6 montre les résultats de réactions mixtes lymphocytaires allogéniques, réalisées avec des cellules dendritiques obtenues à partir de monocytes purifiés de trois donneurs différents. Deux types de cellules dendritiques ont été comparés, dont la maturation a été induite soit par le TNF-α (200 U/ml), soit par le LCOS 1013 (25 μg/ml) (courbe notée « LCOS »), pendant 48 heures. L'axe horizontal correspond au nombre de cellules dendritiques irradiées déposées dans chaque puits, pour une quantité constante de 10^5 lymphocytes T par puits. La prolifération des lymphocytes T, stimulée par les cellules dendritiques, est déterminée après 4 jours de culture par incorporation de thymidine tritiée (axe vertical).

La figure 7 montre les résultats de réactions mixtes lymphocytaires autologues, réalisées avec des cellules dendritiques obtenues à partir de monocytes purifiés de trois donneurs différents. Deux types de cellules dendritiques ont été comparés, dont la maturation a été induite soit par le TNF-α (200 u/ml), soit par le LCOS 1013 (25 μg/ml) (courbe notée « LCOS »), pendant 48 heures. L'axe horizontal correspond au nombre de cellules dendritiques irradiées déposées dans chaque puits, pour une quantité constante de 10^5 lymphocytes T par puits. La prolifération des

lymphocytes T, stimulée par les cellules dendritiques, est déterminée après 5 jours de culture par incorporation de thymidine tritiée (axe vertical).

La figure 8 montre les résultats de réactions mixtes lymphocytaires allogéniques et autologues, réalisées avec des cellules dendritiques dont la maturation a été induite soit par le TNF-α (200 u/ml), soit par le LCOS 1013 à 5, 10 ou 25 µg/ml (courbes notée « LCO »), pendant 48 heures. Les graphes ont été obtenus de la même façon que les graphes des figures 6 et 7, respectivement.

L'ensemble des techniques de culture cellulaire, de marquage de cellules, de phénotypage par fluorométrie, etc..., ainsi que les réactifs (anticorps, toxine tétanique, ...) utilisés dans les expériences décrites dans les exemples suivants, ont été détaillés dans un article de Karine Duperrier *et al.*, Journal of Immunological Methods 238 (2000), p. 119-131.

Exemple 1 : Procédé de production des cellules dendritiques à partir des monocytes humains avec le RU 41740

Le sang périphérique est prélevé chez le sujet concerné. Ce sang est ensuite centrifugé 20 minutes à 200 g de façon à diminuer la contamination des cellules du sang périphérique par les plaquettes. La partie supérieure contenant la plupart des plaquettes et le plasma est éliminée soigneusement avant de purifier les cellules mononuclées en les centrifugeant sur un gradient de séparation de Ficoll dont la densité est de 1,077. La couche de cellules mononuclées est récupérée puis lavée deux fois dans un tampon PBS et déposée sur un gradient contenant 4 densités discontinues de Percoll pour isoler les monocytes. Ce gradient est constitué par des dilutions d'une solution isotonique de percoll à raison de 75 % (6,5 ml), 50.5 % (15 ml), 40 % (3,5 ml) et 30 % (3 ml) dans un milieu de Dulbecco sans magnésium ni calcium et contenant 5 % de sérum humain. 75 à 100 millions de cellules sont ainsi déposées sur chaque tube

et centrifugées à 1000 g pendant 25 minutes à 4°C. Les cellules de faible densité, principalement les monocytes, sont récoltées à l'interface entre la dilution 40 % et 50.5 %, et lavées deux fois dans du PBS. Elles sont ensuite resuspendues dans un milieu de culture, puis déposées dans des plaques à culture contenant 6 puits à une densité de 5 x 10^6 cellules par puits dans un volume final de 3 ml et laissées adhérer pendant 1 heure à 37°C. On peut substituer cette étape d'adhérence par une purification complémentaire des monocytes en utilisant un système de purification négatif utilisant un mélange d'anticorps monoclonaux associant un anti-CD3, CD7, CD19, CD45A, CD56 et anti-IgG à l'aide d'un système de microbilles de type Macs (Miltenyi Biotec). Cette purification complémentaire permet d'obtenir des concentrations de monocytes ayant une pureté supérieure à 90 %.

Les cellules sont ensuite mises en culture dans des puits de culture à 37°C sous 5 % de CO_2. Le milieu qui comporte du RPMI, contient 200 UI/ml de GM-CSF humain recombinant, 500 UI/ml de IL-4 humaine recombinante dans un volume final de 6 ml. Au jour 3 et au jour 5, les cultures sont renouvelées en éliminant 3 ml et en ajoutant 3 ml de milieu frais avec les cytokines. Au 6ème jour, les cellules sont transférées dans des pots en Teflon et cultivées à une densité de 5 x 10^5 cellules par pots sous 3 ml en présence de RU 41740 à différentes concentrations ou de TNF-α humain recombinant à raison de 200 UI/ml pendant 2 jours. Les cellules sont récoltées au 8ème jour, lavées et cultivées en l'absence de stimulation pendant 3 jours supplémentaires.

Au terme de la culture, la qualité de la maturation est évaluée par l'expression des molécules CD80, 83, 86, 14, 1a, HLA-DR à la surface des cellules. Les marquages révèlent que plus de 80 % des monocytes viables ont maturé en cellules dendritiques caractérisées par le phénotype suivant : CD83+, CD86++, CD80++, HLA-DR+++, CD1a-, CD14-,

CD40+++, CD54++, ce qui les place dans le groupe des cellules dendritiques tissulaires très différenciées.

La figure n° 1 montre en effet que les molécules HLA-DR, HLA-DQ, CD40, CD54, CD80, et CD86 sont présentes sur la majorité des cellules à J8, après ajout du RU 41740 à 25 µg/ml, alors que la molécule CD14 n'est quasiment plus exprimée.

Afin d'étudier l'action du RU 41740 sur la maturation des cellules dendritiques (DC), différentes concentrations de la molécule ont été testées et comparées à l'action du TNF.

Les 3 expériences suivantes (a, b, c) ont été réalisées à partir de monocytes d'un même donneur.

a) Les concentrations de RU 41740 testées ici sont 0.1µg/ml, 1µg/ml, et 10µg/ml.

Le tableau 2 présente les résultats obtenus, en ce qui concerne le pourcentage de cellules marquées et l'intensité moyenne de fluorescence (IFM).

	J0		J6		J8							
	Monocytes		Cellules dendritiques indifférenciées		RU 41740 0,1µg/ml		RU 41740 1µg/ml		RU 41740 10µg/ml		TNF-alpha 200 UI/ml	
	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM
HLA-DR	98,9	275	98,3	552	98,7	978	99,1	1164	98,9	1195	98,9	1225
CD 40	97,8	128	97,5	464	98,3	1340	98	1205	98,2	1328	98,4	1603
CD54	98,6	41	95,6	85	96,4	220	96	210	95,6	282	97,4	295
CD86	96,5	52	69,9	77	98,8	310	98,5	290	98	303	98,8	326
CD83	0,2	325	5,5	119	82,1	156	76,1	165	84,7	184	84,5	173
HLA-DQ	24,2	48	63,2	61	86,4	160	88,8	153	84,1	174	84,3	157
CD 80	0,1	46	3,1	112	60,5	173	50,1	187	70	250	62,1	129
CD 14	96,2	5395	1,9	199	1,55	nd	0,97	nd	1,06	nd	0,87	nd

Tableau 2 : Pourcentage (%) de cellules marquées et intensité moyenne de fluorescence (IFM) du marqueur considéré.

Ces résultats sont exprimés avec une marge d'erreur de +/- 2,5 %.

Après 8 jours de culture, l'expression de la molécule CD14 a disparu (pourcentage inférieur à 1,5 %), quelles que soient les conditions de culture.

L'intensité moyenne de fluorescence (IFM) des marquages des molécules HLA-DR, CD40, CD54 et CD86 apparaît plus faible en présence des doses de RU 41740 utilisées qu'en présence du TNF-α.

En revanche, les molécules CD83 et HLA-DQ sont légèrement plus exprimées en présence d'une concentration de RU 41740 de 10 µg/ml qu'avec le TNF-α.

De plus, l'IFM de la molécule CD80 apparaît toujours supérieure en présence de RU 41740.

D'après ces résultats, on voit que le RU 41740 induit la maturation des cellules dendritiques, même à de faibles concentrations. L'IFM des différents marqueurs apparaît cependant augmentée pour les plus fortes concentrations de RU 41740 testées, avoisinant les résultats obtenus en présence de TNF-α.

L'action du RU 41740 sur les cellules dendritiques à de plus fortes concentrations a donc été investiguée dans une deuxième série d'expériences.

b) Les concentrations de RU 41740 testées pour cela sont 5µg/ml, 10µg/ml, et 50µg/ml.

Les résultats sont présentés dans le tableau n°3.

L'IFM des différentes molécules d'adhésion, de costimulation, molécules HLA de classe II apparaît augmentée de façon dépendante de la concentration de RU 41740 ajoutée au milieu de culture. La molécule CD40 présente toujours une IFM inférieure en présence de RU 41740 par rapport à la concentration obtenue en présence de TNF-alpha.

Le CD83, qui est le marqueur spécifique de la maturation, a un pourcentage et une intensité de fluorescence qui augmentent également en fonction de la quantité de RU 41740.

La molécule HLA-DQ présente un maximum d'expression avec 10 µg/ml de RU 41740.

	J0		J6		J8							
	Monocytes		Cellules dendritiques indifférenciées		RU 41740 5µg/ml		RU 41740 10µg/ml		RU 41740 50µg/ml		TNF-alpha 200 UI/ml	
	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM	%	IFM
HLA-DR	99,2	275	98,3	552	98,9	1207	99,1	nd	99,3	nd	99,1	946
CD 40	97,8	128	97,5	464	99,8	1417	99,4	1441	99,8	1507	99,6	1728
CD54	98,6	41	95,6	85	97,1	195	97	216	98,2	255	95,6	255
CD86	96,5	52	69,9	77	98,9	267	98,7	271	99,7	248	99,5	273
CD83	0,2	325	5,5	119	67,9	132	74,6	147	84,8	159	89,5	196
HLA-DQ	24,2	48	63,2	61	68,5	189	85,9	191	80,3	143	84,2	183
CD 80	0,1	46	3,1	112	63	86,7	64,6	101	76,1	95,8	70,5	93,5
CD 14	96,2	5395	1,9	199	0,47	nc	1,1	n	0,66	nd	0,61	nd
CD 1a					2,52	nd	1,55	nd	2,9	nd	0,21	nd

Tableau n°3 : Pourcentage (%) de cellules marquées et intensité moyenne de fluorescence (IFM) de ce marqueur (nd = non déterminable).

Ces résultats comportent une marge d'erreur de +/- 2,5 %.

Avec une concentration plus importante (50 pg/ml) de RU 41740, par rapport à l'expérience du tableau 2, l'IFM des molécules CD40 et CD54 a augmenté, alors que d'autres IFM ont diminué (molécules CD86 et HLA-DQ). Quelques marqueurs, comme le CD80 et CD54, sont exprimés avec

la même intensité après une maturation avec 50 µg/ml de RU 41740 ou avec le TNF-α.

Des concentrations de RU 41740 encadrant 50 µg/ml ont alors été testées, dans une troisième série d'expériences.

c) Les concentrations de RU 41740 testées sont 25 µg/ml, 50 µg/ml, et 100 µg/ml.

Les résultats sont présentés dans le tableau n°4.

	J0		J6		J8							
	Monocytes		Cellules dendritiques indifférenciées		RU 41740 25µg/ml		RU 41740 50µg/ml		RU 41740 100µg/ml		TNF-alpha 200 UI/ml	
	%	**IFM**	**%**	**IFM**	**%**	**IFM**	**%**	**IFM**	**%**	**IFM**	**%**	**IFM**
HLA-DR	99,2	275	98,3	552	98,5	630	97,5	823	99,4	682	99,4	694
CD 40	97,8	128	97,5	464	99,7	1592	99,1	1958	99,8	2088	99,3	1480
CD54	98,6	41	95,6	85	98,5	280	97,2	321	98,9	361	98,2	249
CD86	96,5	52	69,9	77	99,3	284	98,3	291	99,6	295	99,5	284
CD83	0,2	325	5,5	119	86,6	192	91,2	227	92,8	213	89	166
HLA-DQ	24,2	48	63,2	61	79	109	84,8	123	78,8	118	nd	nd
CD 80	0,1	46	3,1	112	74	128	82,4	165	90,8	196	nd	nd
CD 14	96,2	5395	1,9	199	1,03	nd	4,07	nd	1,75	nd	3,27	nd

Tableau n°4 : Pourcentage (%) de cellules marquées et intensité moyenne de fluorescence (IFM) de ce marqueur (nd = non déterminable).

Ces résultats comportent une marge d'erreur de +/- 2,5 %.

Les molécules CD40, CD54, CD86 et HLA-DR sont présentes sur plus de 97 % des cellules avec les trois concentrations. RU 41740. Leurs IFM sont comparables à celles obtenues avec du TNF-α, pour une concentration de 25 µg/ml de RU 41740. Cependant, dans cette expérience, elles continuent d'augmenter avec des concentrations supérieures de RU 41740.

Le CD 83 est présent sur un pourcentage très élevé de cellules à 100 µg/ml et à 50 µg/ml, supérieur aux résultats obtenus avec du TNF-α. Son IFM apparaît plus importante avec 50 µg/ml.

A 100 µg/ml de RU 41740, les intensités de fluorescence des molécules HLA-classe II ont tendance à diminuer, ce qui peut suggérer que cette concentration est une concentration limite de RU 41740.

L'ensemble des expériences suggère que la dose optimale de RU 41740 se situe entre 10 et 50 pg/ml.

Exemple 2 : Procédé de production des cellules dendritiques à partir des cellules souches CD34+ hématopoïétiques humaines avec le RU 41740

• Conditions expérimentales :

Purification : Après ficoll, les CD34+ représentaient 4.2 % des cellules mono nucléées (CMN).

Après purification par sélection positive avec le procédé MAC System (Miltenyi Biotec) avec des billes recouvertes d'un anticorps anti CD34, 90 % des cellules sont CD34+.

Mise en culture :

- *milieu de culture* : RPMI contenant 10 % de SVF, 2 % de pénicilline/streptomycine, 1 % de glutamine, et 1 % de bicarbonate de sodium.

Culture dans des puits de 2 ml avec 5.10^5 cellules par puits.

- *cytokines présentes dans le milieu de culture* :

de J0 à J5 : SCF à 25 ng/ml, GM-CSF à 100 ng/ml et soit du TNF-α à 2.5 ng/ml,
soit du RU 41740 à 6.25ng/ml,
de J5 à J14 : GM-CSF à 100 ng/ml.

Dédoublement des cultures : - les cellules sont homogénéisées dans le puits, puis 1 ml est prélevé et déposé dans un nouveau puits. 1 ml de milieu de culture est ensuite ajouté dans le nouveau puits et dans l'ancien, ainsi que du GM-CSF en fonction du milieu ajouté.

Marqueurs : CD34 - CD45 - CD14 - HLA-DR - CD40 - CD54 - CD83 - CD86 – CD1a.

Un anticorps primaire anti-KLH marqué à la fluorescence, a été utilisé comme contrôle pour soustraire la fluorescence non spécifique des signaux obtenus.

- Résultats :

	J8		J12		J14	
	TNF-α	RU 41740	TNF-α	RU 41740	TNF-α	RU 41740
CD14	40	37	63,2	47,4	54,1	52,5
CD34	0,7	17				
CD45	96	96				
CD83	0,5	0,2	1,3	1,3	0,8	1
CD86	13	11	7,4	10,8	2,2	4,7
CD1a	8,7	17	8,4	17,5	10,3	28,9
CD40	44	38	64,3	59,4		
CD54	33	56	61,8	57,9		
HLA DR	88	80	80,3	65,3	69,9	69,54
HLA DQ			54,1	52,3		
CD80			5,3	16		

Tableau n°5 : pourcentage de cellules exprimant un marqueur cellulaire à différents temps de culture.

Le CD1a est plus exprimé avec le RU 41740 (17.5% de cellules à J12) qu'avec le TNF-α, à l'inverse du CD14, qui est plus exprimé avec le TNF-α à la surface cellulaire.

Les niveaux d'expression en présence de RU 41740 du CD40, CD54 ou HLA-DR sont quasiment identiques aux niveaux d'expressions en présence de TNF-α.

Le CD83 n'est pas exprimé quelles que soient les conditions.

Exemple 3 : Procédé de production des cellules dendritiques à partir des cellules CD34+ du sang de cordon humain avec le RU 41740

- Les conditions expérimentales sont similaires à l'exemple 2, hormis le fait que les cellules sont issues de sang de cordon :

Purification : Après ficoll, les cellules CD34+ représentent 0.83 % des cellules mononucléées (CMN).

Après purification par sélection positive, on obtient 18.1% de CD34+.

2.10^6 cellules ont été obtenues.

Dédoublement : à J6, J7, J8, J10 et J12

- Résultats : Les résultats sont présentés dans le tableau n° 6.

	J7		J9		J10		J12		J13		J14	
	TNF-α (200 UI/ml)	**RU 41740 (10 µg/ml)**	**TNF-α**	**RU 41740**	**TNF-α**	**RU 41740**	**TNF-α**	**RU 41740**	**TNF-α**	**RU 41740**	**TNF-α**	**RU 41740**
CD14	32	20,39	59,6	43,52	60	50,05	66,77	59,23	57,73	52,28	46,77	30,88
CD34	19,79	19,92	2,53	2,94	2,26	2,08	0,69	1,25	0,45	0,61	0,38	0,57
CD45	99,84	97,57	99,96	99,76	99,97	99,86	99,85	99,92	99,69	99,82	99,93	99,91
CD16	2,24	3,68	2,16	2,78	2,11	4,89						
CD83	1,09	0,39	4,24	4,9	2,46	1,19	0,71	1,35	3,19	3,41	1,22	0,83
CD86	11,61	11,97	22,23	13,69	9,23	7,48	13,94	11,91	12,78	17,1	19,33	10,56
CD1a	4,41	13,95	23,75	20,32	20,63	22,68	27,9	20,14	36,13	23,67	34,2	16,63
CD40							75,91	55,23	63,35	56,02	64,56	41,47
CD54							74,66	65,62	61,7	58,57	64,4	41,69
HLA DR							81,34	73,8	73,04	63,28	57,84	37,69

Tableau n° 6

POURCENTAGE DE CELLULES MARQUEES

cellules CD34+ de sang de cordon mises en culture jusqu'à J6 avec du GM-CSF, SCF et du RU 41740 (10 µg/ml) ou du TNF-α (200 UI/ml), puis de J6 à J14 avec du GM-CSF

Dans les deux protocoles de culture, l'expression des molécules de surface évolue avec les mêmes tendances :

- augmentation du CD14 jusqu'à J12 puis diminution
- diminution puis disparition de la molécule CD34 à J12
- très faible expression du CD83 et CD16 qui reste stable.

Le CD1a est exprimé précocement à J7 sur les cellules avec le RU 41740 puis se stabilise autour de 23 % à J14, ce qui révèle une cinétique plus rapide avec le RU 41740 qu'avec le TNF-α.

Après J12, les molécules CD40, CD54 et HLA-DR sont moins exprimées en présence de RU 41740 qu'en présence de TNF-α.

Exemple 4 : Procédé de différenciation des cellules de Langerhans.

Les cellules souches sont obtenues après un passage à travers un gradient de ficoll du sang de cordon. Les cellules mononuclées CD34+ sont purifiées par sélection positive avec un anticorps monoclonal anti CD34 (Immu 133.3, Immunotech Marseille, France). Après purification, les cellules sont à plus de 90% CD34+.

Ces cellules CD 34+ sont ensuite cultivées en présence de GM-CSF (100 ng/ml), et de TNF-α (2.5ng/ml) ou de RU 41740 (10 μg/ml) durant 12 jours dans un milieu RPMI - SVF 10 % - pénicilline streptomycine 2 %, glutamine 1 % - bicarbonate de sodium 1 % et 10 mM d'HEPES. Au terme de la culture à J12, les cellules sont marquées avec les anticorps anti CD1a, CD14, Lag, E-Cadherin, DR et DQ de façon à identifier les cellules de Langerhans qui sont Lag+, CD1a+, CD14-, DR+ et DQ+.

Les résultats, présentés dans le tableau n° 7, montrent une meilleure efficacité du RU 41740 par rapport au TNF-α pour la différenciation des cellules de Langerhans.

	TNF-α	RU 41740
CD1a+ DR+	8 %	17 %
Lag+ DR+	5,2 %	8,6 %

Tableau n° 7

Exemple 5 : Procédé de production des cellules dendritiques matures à partir des cellules mononuclées de chien avec le RU 41740

Un élutriateur est un appareil qui permet de soumettre des cellules à deux forces opposées, l'une centrifuge et l'autre centripète, en milieu liquide. Ceci permet de séparer les cellules suivant leur taille et leur densité, tout en les maintenant dans leur milieu physiologique. Ce procédé est particulièrement avantageux pour séparer les cellules de chien (monocytes/lympocytes) qui forment des agrégats dans des gradients de type ficoll.

MILIEU D'ELUTRIATION :

PBS 1X - SVF 2% - EDTA 0.01%

PREPARATION DES CELLULES MONONUCLEES :

La poche de sang est prélevée sur CPD (citrate phosphate dextrose), le sang est dilué avec du chlorure de sodium, centrifugé à 800 tr/min pendant 15 min sans frein pour éliminer un maximum de plaquettes.

On réalise un ficoll à 1600 tr/min pendant 25 min sans frein.

Les CMN sont récupérées, et lavées deux fois au PBS (la première pour déplaquetter).

La concentration cellulaire est de 5.10^6 cellules/ml dans du PBS ou dans le milieu d'élutriation.

PROTOCOLE D'OBTENTION DES MONOCYTES :

Débit : 25 ml/min (réglage à la pompe selon la droite de calibration)

Faire varier la vitesse de centrifugation :

chargement des cellules à 3200 tr/min à 300 ml

3000 tr/min à 250 ml

2700 tr/min à 200 ml

2500 tr/min à 200 ml

2300 tr/min à 200 ml

2100 tr/min à 200 ml

Rotor off à 200 ml

RESULTATS

La fraction obtenue à 2700 tr/min contient des monocytes avec une pureté supérieure à 80 %.

CULTURE

Les monocytes de chien sont cultivés de la même façon que les monocytes humains et avec les mêmes facteurs de différenciation humains : GM-CSF, TNF ou RU 41740. En revanche, l'IL4 est spécifique de l'espèce canine. Les cellules dendritiques ainsi obtenues possèdent la même morphologie avec des dendrites, mais les marqueurs de surface ne sont pas comparables à ceux de l'homme bien qu'elles soient CD14-, DR+ et DQ+, car nous ne disposons pas des anticorps spécifiques dans cette espèce. Le RU 41740 a les mêmes effets que le TNFα.

Exemple 6 : Utilisation des cellules dendritiques matures dans l'émergence d'une réponse antitumorale.

La thyrocalcitonine est un antigène tumoral relativement peu immunogène s'exprimant fortement dans les cancers médullaires de la thyroïde. Dans le

système utilisé, les inventeurs ont pu faire produire des clones lymphocytaires T dirigés contre la thyrocalcitonine. Il s'agit de clones cytotoxiques susceptibles d'avoir une activité antitumorale dans les cancers à thyrocalcitonine.

La figure 2 illustre la génération de lignées T cytotoxiques spécifiques du peptide de la thyrocalcitonine.

Des cellules dendritiques dérivées de monocytes après culture en présence de GM-CSF, IL-4 et RU 41740, sont incubées avec le peptide de la thyrocalcitonine, puis mises en culture en présence de lymphocytes T autologues afin d'induire l'activation de lymphocytes T spécifiques du peptide.

Après plusieurs stimulations des lymphocytes T à l'aide de cellules dendritiques puis de cellules EBV incubées avec le peptide, des lignées de cellules T cytotoxiques (H10 et B7) capables de lyser spécifiquement des cellules EBV cibles incubées avec le peptide de la thyrocalcitonine, ont pu être générées.

Exemple 7 : Utilisation des DC matures dans les activités anti-infectieuses

En utilisant l'anatoxine tétanique comme antigène présenté par les MODC (Monocyte Dentritic Cells), il a été possible de générer des lignées cytotoxiques anti-anatoxines tétaniques, ce qui démontre à l'évidence que ce système permet d'avoir une immunisation primaire vis-à-vis d'antigènes de type infectieux.

La figure 3 représente une réponse secondaire des lignées anti-toxine tétanique par les cellules dendritiques dérivées de monocytes humains cultivés en présence de GM-CSF, IL-4 et RU 41740.

Exemple 8 : Utilisation des cellules dendritiques matures dans l'induction d'une réponse de tolérance.

Les cellules dendritiques, dans certaines conditions de culture, peuvent provoquer une réaction d'anergie. La culture de ces cellules en présence d'immunosuppresseurs comme la cyclosporine ou l'histamine, entraîne une modification des antigènes de membrane qui va induire une réponse de tolérance et non une réponse cytotoxique. De cette façon, il est donc possible d'éduquer les cellules dendritiques pour les orienter vers une réaction de tolérance.

A titre d'exemple nous donnons l'influence de la Cyclosporine A (CsA) sur la maturation des cellules dendritiques.

Des monocytes purifiés ont été cultivés en présence de GM-CSF et d'IL-4 pendant 6 jours et en présence de RU 41740 pendant 2 jours de plus, dans un milieu contenant 10% de sérum humain type AB. 1 µg/ml ou 5 µg/ml de CsA ont été ajoutés ou non dès le début de la culture. L'expression des molécules HLA-DR, CD83, CD86, CD80, CD40 et CD1a a été analysée par cytométrie en flux (tableau n° 8).

	sans CsA		CsA (1µg/ml)		CsA (5µg/ml)	
	% ± SD	IFM	% ± SD	IFM	% ± SD	IFM
HLA-DR	99 ± 0.8	1605	98.8 ± 0.9	1504	99.2 ± 0.7	1101
CD40	98.9 ± 0.6	1697	98.4 ± 0.8	1314	99 ± 0.6	1278
CD86	97.7 ± 1.8	373	98.6 ± 1.2	318	96.4 ± 3.3	253
CD83	77.1 ± 8.5	169	64.2 ± 20	170	49.9 ± 6.2	132
CD80	78.1 ± 5.6	216	68.9 ± 2.6	162	58.3 ± 17	143
CD1a	14.3 ± 9.5	45.5	27 ± 7	74	25.9 ± 6.5	78

Tableau n° 8

Cette étude démontre que la cyclosporine provoque une diminution nette de l'expression des molécules CD83 et CD80 ainsi qu'une augmentation de l'expression du CD1a. Une analyse graphique (figure 4) révèle en réalité l'existence de deux populations cellulaires, l'une CD83+ et l'autre CD83- qui est douée de propriétés immunorégulatrices.

En effet les cellules dendritiques en présence de CsA (CsA-MODC) sont capables d'orienter la réponse des lymphocytes T vers une réponse de type TH_2 qui favorise une réaction commune suppressive.

La figure 5 illustre cette polarisation de la réponse immune vers une réponse de type Th_2 par des cellules dendritiques dérivées de monocytes et traitées par la cyclosporine A.

Les cellules dendritiques dérivées de monocytes cultivées en présence de GM-CSF, IL-4 et RU 41740, et traitées par la cylosporine A, sécrètent moins d'IL-12 que les cellules dendritiques non traitées (figure 5A).

De plus, le rapport de sécrétion de cytokines IFN-γ/IL-10 (Th1/Th2) par des cellules T est diminué lorsque les cellules T sont stimulées par des cellules dendritiques traitées par cyclosporine A (Figure 5B).

Exemple 9 : Utilisation des DC matures pour induire une culture mixte lymphocytaire allogénique ou autologue.

En présence de MODC matures, les lymphocytes T allogéniques, au 6ème et même au 8ème jour, sont doués d'une prolifération extrêmement importante, très largement supérieure à ce que l'on constate avec l'utilisation des lymphocytes T allogéniques et des monocytes allogéniques. Il en est de même pour une culture mixte autologue.

Des cultures mixtes lymphocytaires autologues ont donc été induites par des cellules dérivées de monocytes (MODCs) générées en présence de GM-CSF (200 UI/ml), d'IL-4 (500 UI/ml) et de RU 41740 (10 μg/ml)

Dix mille MODCs, irradiées à 30 Grays, sont cultivées avec différentes sous-populations lymphocytaires triées soit par billes magnétiques Dynal (CD4+ et CD8+), soit avec le module de tri du FACS Calibur ($CD8^{bright}$, CD28-, et $CD8^{bright}$, CD28+ autos). Dans le tableau 8, les valeurs indiquées représentent l'incorporation de Thymidine tritiée après culture mixte autologue, sauf (**). Les expériences sont réalisées en triplicate, sauf (*), en duplicate.

Condition	Valeurs			*Test Student par rapport au contrôle négatif* *p=*
(100.000 CD4+ autos) + (35.000 CD4+ autos)	7898	10720	8613	
(100.000 CD4+ allos) + (35.000 CD4+ allos) (**)	119066	193392	206319	***3,827E-03***
(100.000 CD4+ autos) + (35.000 CD28- autos)	37808	45223	42027	***1,458E-04***
(100.000 CD4+ autos) + (35.000 CD28+ autos)	32990	54800		***2,394E-02***
(100.000 CD4+ autos) + (100.000 CD8+ autos) (*)	13985	12941	13573	***3,978E-03***

Condition	Moyenne	Ecart-type
(100.000 CD4+ autos) + (35.000 CD4+ autos)	9077	692
(100.000 CD4+ allos) + (35.000 CD4+ allos) (**)	172926	22198
(100.000 CD4+ autos) + (35.000 CD8bright CD28- autos)	41686	1753
(100.000 CD4+ autos) + (35.000 CD8bright CD28+ autos)(*)	43895	7711
(100.000 CD4+ autos) + (100.000 CD8+ autos)	13500	248

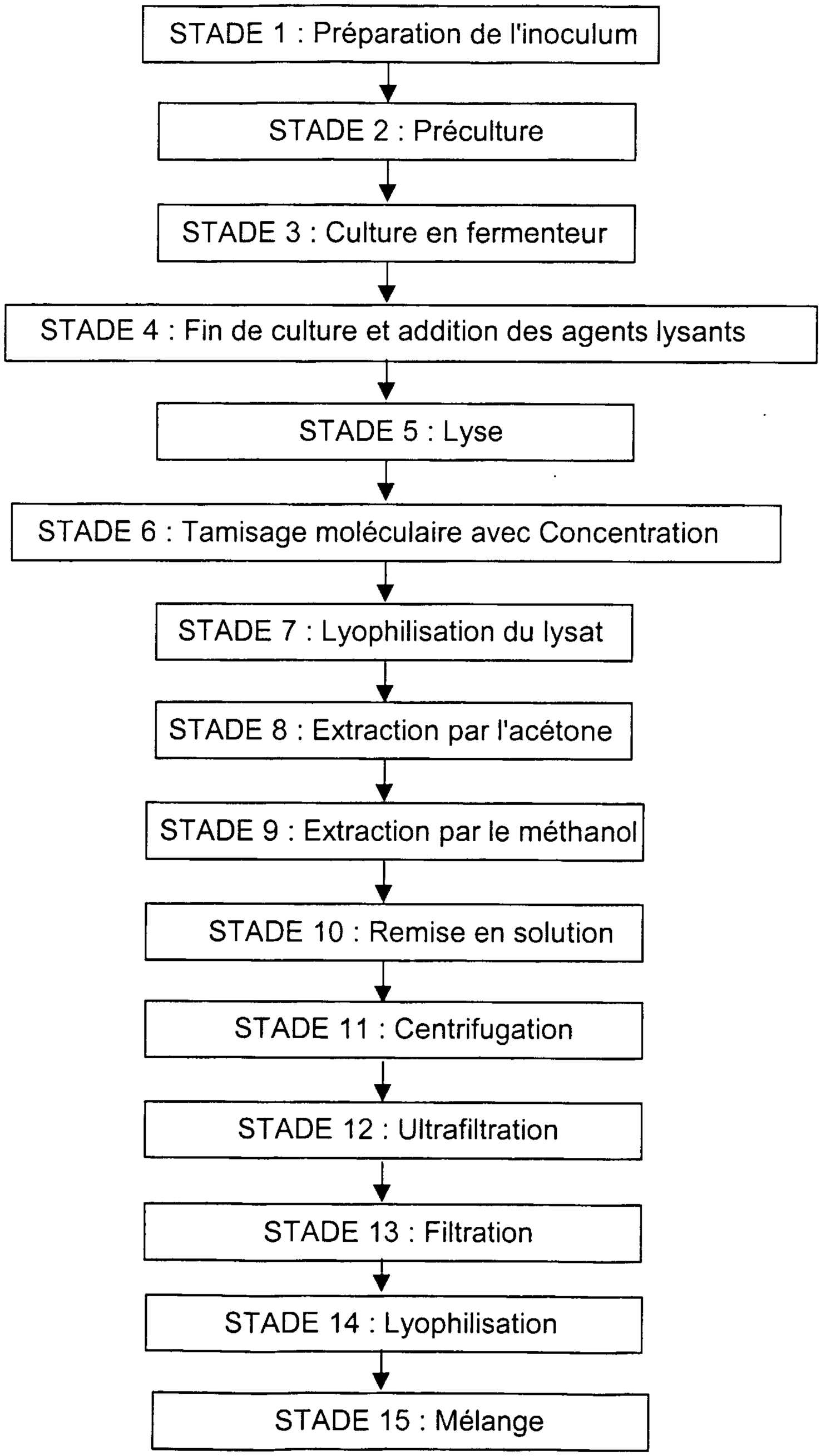
Tableau n° 9

Exemple 10 : Procédés de production du LCOS 1013 et du LCOS 1014.

A. PRESENTATION GENERALE DU LCOS 1013

Le LCOS 1013 est un analogue du RU 41740, constitué par un ensemble de substances extraites à partir d'un lysat de culture de *Klebsiella pneumoniae*. Son mode de fabrication repose sur la succession d'étapes ou stades, dont le schéma général est présenté ci-dessous. Des milieux utilisables pour les cultures, ainsi qu'une présentation indicative du déroulement de chaque étape, sont décrits plus en détail après ce diagramme.

La technique de fabrication décrite ci-après, à titre purement illustratif, correspond à une unité opératoire basée sur un volume de culture bactérienne obtenue dans un fermenteur de 600 litres.


STADE 1 : Préparation de l'inoculum
STADE 2 : Préculture
STADE 3 : Culture en fermenteur
STADE 4 : Fin de culture et addition des agents lysants
STADE 5 : Lyse
STADE 6 : Tamisage moléculaire avec Concentration
STADE 7 : Lyophilisation du lysat
STADE 8 : Extraction par l'acétone
STADE 9 : Extraction par le méthanol
STADE 10 : Remise en solution
STADE 11 : Centrifugation
STADE 12 : Ultrafiltration
STADE 13 : Filtration
STADE 14 : Lyophilisation
STADE 15 : Mélange

B. DESCRIPTION DE DIFFÉRENTS MILIEUX UTILISABLES POUR LA CULTURE DES BACTERIES

La culture des bactéries, en vue de produire du LCOS 1013 suivant la succession d'étapes précisées ci-dessus, peut être effectuée en utilisant les milieux de culture contenant les composants suivants :

<u>Bouillon Nutritif</u>	
Peptone Papaïnique de Soja	4 +/- 2 g/l
Autolysat de levure	4 +/- 2 g/l
Chlorure de Sodium	5 +/- 2 g/l
Hydroxyde de Sodium	qsp pour pH 7,4 ± 0,2
<u>Boite de Roux</u>	
Chlorure de Sodium	5 +/- 2 g/l
Glucose anhydre	5 +/- 2 g/l
Autolysat de levure	12 +/- 3 g/l
Peptone Papaïnique de Soja	5 +/- 2 g/l
Gélose	30 +/- 4 g/l
Hydroxyde de Sodium	qsp pour pH 7,5 ± 0,2
Phosphate Dipotassique	4 +/- 2 g/l
Phosphate Monopotassique	0,5 à 0,9 g/l
<u>Milieu de préculture</u>	
Peptone Papaïnique de Soja	20+/- 3 g/l
Autolysat de levure	10+/- 2 g/l
Chlorure de Sodium	5 +/- 2 g/l
Phosphate Dipotassique	3,5 +/- 1 g/l
Phosphate Monopotassique	1 à 2 g/l
<u>Milieu de culture pour fermenteur</u>	
Autolysat de levure de boulangerie	10 +/- 2 g/l
Chlorure de Sodium	5+/- 2 g/l
Peptone Papaïnique de Soja	20+/- 3 g/l
Phosphate Dipotassique	3,5+/- 1 g/l
Phosphate Monopotassique	1 à 2 g/l

C. DESCRIPTION DETAILLÉE DES DIFFÉRENTS STADES DE PRODUCTION DU LCOS 1013

STADE 1 : Préparation de l'inoculum

Ce stade a pour but de réaliser, sur milieu gélosé en boîte de Roux, la culture de *Klebsiella pneumoniae* nécessaire à l'inoculation d'une préculture en milieu liquide, à partir d'un cryotube ou d'un lyophilisat issu de la banque de travail.

La banque de travail est réalisée par exemple à partir d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* de l'Institut Pasteur de référence CIP 52.145.

Pour cela, la souche est revivifiée en réalisant une suspension bactérienne dans le bouillon nutritif, à partir duquel on ensemence des boîtes de Roux, qui sont ensuite incubées à 37°C ± 0,5 pendant 20 à 24 heures.

STADE 2 : Précultures

A partir de l'inoculum préparé au stade 1, une préculture est effectuée en flacon de 3 litres, destinée à ensemencer un fermenteur de 35 l, lui-même destiné dans un deuxième temps à ensemencer un fermenteur de 600 l.

La première préculture est réalisée dans le milieu de préculture décrit ci-dessus, auquel on ajoute une solution stérile de glucose, à raison de 30g de glucose pour 3 litres. La deuxième préculture, de 35 litres, est effectuée dans le milieu de culture pour fermenteur décrit plus haut, auquel on ajoute 400 g de glucose.

Des flacons satellites contenant respectivement une solution stérile d'hydroxyde de sodium 10 N, une solution stérile d'acide orthophosphorique dilué au ½, et une solution stérile d'anti-mousse, peuvent être utilisés pour la deuxième préculture, en fermenteur, afin notamment de maintenir le pH aux alentours de 6,5, pendant toute la durée de la préculture, soit environ 5 heures à environ 37°C, sous agitation.

STADE 3 : Culture en fermenteur

L'objet de cette étape est de réaliser en fermenteur, dans des conditions définies, une culture bactérienne de teneur supérieure ou égale à $1,7.10^{10}$ germes /ml, pour permettre l'extraction ultérieure d'une quantité de produit satisfaisante.

Pour cela, la suspension de germes contenue dans le fermenteur de 35 l est transférée dans un fermenteur de 600 litres contenant le milieu de culture en fermenteur décrit plus haut, auquel on a ajouté 5 kg de glucose.

Comme pour la préculture de 35 litres, des cuves satellites contenant respectivement une solution stérile d'hydroxyde de sodium 10 N et une solution stérile d'acide orthophosphorique dilué au ½ sont utilisées pour la régulation du pH aux alentours de 6,5, ainsi qu'une cuve satellite contenant une solution stérile d'anti-mousse. La culture est réalisée pendant environ 7 heures, à 37°C ± 1°C, sous agitation.

STADE 4 : Fin de culture et addition des agents lysants

Ce stade a pour but d'inactiver la culture par l'action d'agents lysants et chauffage de 55 à 75°C pendant une durée supérieure ou égale à 40 minutes. Pour cela, les agents lysants utilisés sont les suivants :

solution stérile de polysorbate 80,

solution stérile d'EDTA,

solution stérile de chlorydrate de lysozyme.

En fin de culture, le pH est amené à **5,8 ± 0,3** à l'aide d'une solution stérile d'acide orthophosphorique, puis les agents lysants ci-dessus sont transférés dans la culture.

Le contenu du fermenteur est ensuite porté à la température de 65°C ± 10°C et maintenu pendant au moins 40 minutes à cette température sous agitation.

Le biolysat obtenu est alors transféré dans une cuve de lyse industrielle (préchauffée à 65°C ± 10°C), et maintenu à cette température pendant au moins 20 minutes, avant d'être ramené à 37°C ± 2°C.

STADE 5 : Lyse

L'étape de lyse consiste à rompre la paroi des bactéries par voie enzymatique, ce qui entraîne la libération des constituants cytoplasmiques des cellules microbiennes. Elle est effectuée en maintenant la suspension prélysée du stade précédent, à 37°C ± 2°C, dans la cuve de lyse au moins pendant 6 jours

STADE 6 : Tamisage moléculaire et concentration

Dans cette étape, le volume de lysat brut est réduit de moitié pour diminuer la quantité à traiter aux stades suivants. La concentration s'effectue par exemple sur un ultrafiltre équipé de cartouche filtrante de type CARBOSEP d'un seuil de coupure ≤100 KD, éliminant ainsi les petites molécules non liées.

STADE 7 : Lyophilisation du lysat

Afin d'obtenir le lysat brut issu du stade 6 sous forme solide permettant les extractions ultérieures aux solvants, une opération de lyophilisation est réalisée immédiatement après le stade de concentration. On obtient ainsi une poudre brune, collante au toucher.

STADE 8 : Extraction par l'acétone:

Le lysat de LCOS 1013 lyophilisé, issu du stade 7, contient des lipides que l'on élimine partiellement par l'extraction solide-liquide, en utilisant de l'acétone à température ambiante.

Le volume d'acétone utilisé est proportionnel à la masse de lyophilisat. Ce volume est obtenu selon le calcul suivant :

10 x masse mise en œuvre ≤ V solvant ≤ 20 x masse mise en œuvre,
avec de préférence (V solvant / masse mise en œuvre) ≅ 15.
Le produit est récupéré par centrifugation, puis séché.

STADE 9 : Extraction par le méthanol :

Après extraction à l'acétone, le produit obtenu au stade 8 contient encore des lipides résiduels et des pigments que l'on élimine par extraction solide-liquide, en utilisant du méthanol à température ambiante.
Le volume de méthanol utilisé est proportionnel à la masse de lyophilisat.
Ce volume est obtenu selon le calcul suivant :
10 x masse mise en œuvre ≤ V solvant ≤ 20 x masse mise en œuvre,
avec de préférence (V solvant / masse mise en œuvre) ≅ 15.
Le produit est récupéré par centrifugation, puis séché.

STADE 10 : Remise en solution

"L'extrait méthanol" issu du stade 9 est remis en solution aqueuse, pour permettre l'isolement ultérieur du produit par centrifugation et ultrafiltration.

STADE 11 : Centrifugation

L'extrait brut en suspension issu du stade 10 contient des protéines dénaturées et des matières insolubles dans l'eau que l'on élimine par centrifugation entre 14000 et 18000 g.
Le produit centrifugé est d'aspect légèrement colloïdal et de couleur beige à brun.

STADE 12 : Ultrafiltration

Ce stade représente l'étape essentielle de l'isolement du produit.

Le produit issu du stade 11 contient des substances de différentes tailles moléculaires : sels minéraux, protéines, glycoprotéines, etc...

Les macromolécules de PM ≥ 300000 constituant le produit sont isolées par ultrafiltration sur une membrane de seuil de coupure de 300 KD.

Le produit, une fois introduit dans la cuve de l'appareil, est véhiculé en permanence au moyen d'une pompe, dans un circuit fermé comportant un ultrafiltre. Le milieu est maintenu homogène au moyen d'une agitation. La pression créée par la pompe sur la membrane filtrante, oblige une partie du soluté à traverser cette membrane (perméat).

La partie retenue (rétentat), reste en circulation. Sachant que l'on opère à volume constant, la perte de volume est compensée en permanence par l'apport d'un même volume d'eau.

En fin d'opération la solution est ultrafiltrée.
L'ultrafiltrat obtenu est une solution liquide translucide légèrement jaune.

STADE 13 : Filtration

La clarification du surnageant de centrifugation obtenu au stade 11 est affinée par filtration sur membrane de rétention nominale de 1,2 µm.

On obtient ainsi une "solution de glycoprotéines" opalescente, de couleur beige clair à crème.

STADE 14 : Lyophilisation

Afin de permettre une bonne conservation du produit, la solution issue du stade 13 est ensuite lyophilisée, par un procédé comportant une étape de congélation, puis la lyophilisation proprement dite.
Les glycoprotéines lyophilisées ont l'aspect d'une poudre floconneuse de couleur blanche à crème, hygroscopique.

STADE 15 : Mélange

Cette dernière étape a pour but d'homogénéiser les glycoprotéines lyophilisées issues du stade 14.

L'atomisation peut se substituer avantageusement à la lyophilisation et au mélange (LCOS 1014).

Exemple 11 : Etude de l'effet de la molécule LCOS 1013 sur la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains.

L'effet du LCOS 1013 sur la maturation des cellules dendritiques générées à partir de monocytes humains, a été étudié sur des cellules provenant de 3 donneurs différents, par comparaison avec le TNF-α.

A. Protocole

- Les monocytes purifiés (plus de 90%) ont été mis en culture dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum humain AB, en présence de facteurs de croissance GM-CSF (200U/ml) et Il-4 (500U/ml) pendant 6 jours afin d'induire la différenciation des monocytes en cellules dendritiques immatures. La maturation des cellules a été induite par addition de TNF-α (200U/ml) ou du composé LCOS 1013 (25 μg/ml) pendant 48H.
- Le phénotype des cellules ainsi générées (après 8 jours de culture) a été examiné par cytométrie en flux. L'expression du marqueur spécifique de maturation des cellules dendritiques (CD83), des molécules de co-stimulation CD80, CD86, CD40, de la molécule d'adhésion CD54, de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II HLA-DR, a été analysée. L'expression de la molécule CD1a, marqueur spécifique des cellules de Langerhans, cellules dendritiques immatures, a également été testée.
- Les propriétés fonctionnelles des cellules ont été étudiées à l'aide de réactions mixtes lymphocytaires (MLR). Pour ce faire, une gamme de concentrations de cellules dendritiques a été mise en présence d'une concentration définie de lymphocytes T allogéniques (réaction mixte allogénique) ou de lymphocytes T autologues (réaction mixte autologue), pendant 4 et 5 jours respectivement. La prolifération des lymphocytes T a

été déterminée par incorporation de thymidine tritiée. Les protocoles expérimentaux de ces réactions mixtes lymphocytaires sont décrits plus en détail dans l'article de K. Duperrier et al. mentionné plus haut.

B. Résultats

Phénotype des cellules dendritiques

Les tableaux 10 à 12 ci-dessous résument les pourcentages d'expression des différents marqueurs ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence (IFM) de chaque marqueur (entre parenthèses).

donneur 1	CD83	CD80	CD86	CD40	CD54	HLA-DR	CD1a
TNF-α	91% (132)	69.7% (85)	99.5% (209)	99.4% (1084)	98.4% (195)	99.5% (803)	13.2% (28)
LCOS1013	84.6% (157)	**93.2% (134)**	99.7% (214)	99.7% **(1270)**	99.2% **(306)**	99.7% (502)	10.8% (20)

Tableau n° 10

donneur 2	CD83	CD80	CD86	CD40	CD54	HLA-DR	CD1a
TNF-α	88% (221)	55.1% (89)	99.1% (299)	99.2% (1104)	97.8% (355)	98.6% (1108)	20.6% (215)
LCOS1013	81.4% (242)	**81.8% (169)**	98.1% (298)	99.3% **(1441)**	97.5% **(416)**	98.8% (1102)	11.1% (299)

Tableau n° 11

donneur 3	CD83	CD80	CD86	CD40	CD54	HLA-DR	CD1a
TNF-α	91.8% (108)	48.7% (65)	98.5% (209)	98.7% (918)	95.9% (154)	98.9% (768)	neg.
LCOS1013	92.3% (118)	**89.4% (104)**	98.2% (214)	98.7% **(1270)**	98.4% **(288)**	97.5% (588)	neg.

Tableau n° 12

Les cellules dendritiques générées en présence de la molécule LCOS 1013 présentent un phénotype caractéristique des cellules dendritiques matures, de par l'expression des molécules CD83, des molécules de co-stimulation et d'adhésion, ainsi que la faible expression du CD1a.

Il apparaît cependant que le pourcentage d'expression, ainsi que l'IFM de la molécule CD80, sont augmentés en présence de la molécule LCOS 1013, par rapport au TNF-α, de même que l'IFM des molécules CD40 et CD54.

Ces résultats suggèrent un effet différentiel de la molécule LCOS 1013 par rapport au TNF-α, quant à la maturation des cellules dendritiques.

Fonctions des cellules dendritiques

Les résultats des réactions mixtes lymphocytaires allogéniques sont illustrés à la figure 6. Ils montrent que les cellules dendritiques cultivées en présence de LCOS 1013 présentent une capacité allostimulatrice élevée, comparable à celle des cellules générées en présence de TNF-α.

Les résultats des réactions mixtes lymphocytaires autologues sont présentés à la figure 7. De façon remarquable, les cellules dendritiques cultivées en présence de LCOS 1013 présentent une capacité de

stimulation des lymphocytes T autologues beaucoup plus importante que les cellules générées en présence de TNF-α (au moins 5 fois supérieure).

C. Conclusion

Les résultats ci-dessus montrent que la molécule LCOS 1013 induit de façon efficace la maturation des cellules dendritiques générées à partir de monocytes humains, aux niveaux phénotypique et fonctionnel.

Il est intéressant de noter cependant que l'expression de la molécule CD80 est fortement augmentée en présence de LCOS 1013, et que les cellules induisent une forte réponse autologue, par comparaison avec le TNF-α, ceci pour les 3 donneurs testés.

Ceci est en accord avec les résultats présentés par Scheinecker et al. (*Journal of Immunology*, 1998, 161 : 3966-3973), qui suggèrent que la molécule CD80 jouerait un rôle essentiel dans l'initiation de la réaction mixte autologue.

Exemple 12 : Etude de l'effet de différentes concentrations de LCOS 1013 sur la maturation des cellules dendritiques.

L'effet de différentes concentrations de LCOS 1013 sur la maturation des cellules dendritiques générées à partir de monocytes humains d'un seul donneur, a été étudié, par comparaison avec le TNF-α.

Les concentrations testées pour le LCOS 1013 sont 5, 10 et 25 μg/ml, et 200 u/ml pour le TNF-α.

Les résultats de l'étude phénotypique sont résumés dans le tableau suivant :

donneur 1	HLA-DR	CD 83	CD54	CD 40	CD 86	CD 80
TNF-α	92,12 %	70,02%	87,12%	83,44%	94,44%	0,49%
(200 U/ml)	877,54	65,55	137,49	289,54	180,81	95,04
LCOS1013	81,69%	76,35%	89,39%	75,02%	93,33%	3,26%
(5 µg/ml)	545,30	119,62	**229,59**	**454,18**	197	90,79
LCOS1013	87,17%	68,20%	90,66%	79,99%	94,47%	2,92%
(10 µg/ml)	500,55	93,85	**229,17**	**411,53**	184,14	91,01
LCOS1013	94,52%	66,35%	93,15%	91,22%	91,07%	1,07%
(25 µg/ml)	504,84	105,29	**237,68**	**394,41**	191,62	99,64

Tableau n°13

La fonctionnalité des cellules obtenues a été étudiée par des réactions mixtes lymphocytaires allogéniques et autologues, dont les résultats sont présentés à la figure 8.

Les cellules dendritiques cultivées en présence de LCOS 1013, aux trois concentrations testées, présentent une capacité allostimulatrice élevée, comparable à celle des cellules générées en présence de TNF-α.

Là encore, et quelle que soit la concentration de LCOS 1013 utilisée, on observe que les cellules dendritiques cultivées en présence de LCOS 1013 présentent une capacité de stimulation des lymphocytes T autologues beaucoup plus importante que les cellules générées en présence de TNF-α.

REVENDICATIONS

1. Procédé d'obtention de cellules dendritiques matures ou de macrophages activés à partir de monocytes, de précurseurs des monocytes, ou de cellules souches hématopoïétiques, caractérisé en ce que lesdits monocytes, précurseurs ou cellules souches sont mis en contact avec le RU 41740 ou un composé analogue de celui-ci, ce composé étant choisi de telle sorte que la mise en contact de cellules dendritiques immatures avec ledit composé permette la maturation fonctionnelle des cellules dendritiques, attestée par leur capacité à

   - déclencher *in vitro* une réponse primaire contre un antigène infectieux ou tumoral mis en contact avec les cellules dendritiques préalablement et/ou au cours de leur culture avec les lymphocytes T ;
   - induire la prolifération de lymphocytes T en culture mixte autologue ou allogénique.

2. Procédé d'obtention de cellules dendritiques matures ou de macrophages activés à partir de monocytes, de précurseurs des monocytes, ou de cellules souches hématopoïétiques, caractérisé en ce que lesdits monocytes, précurseurs ou cellules souches sont mis en contact avec le RU 41740 ou un composé analogue de celui-ci, ce composé étant choisi de telle sorte que la mise en contact de cellules dendritiques immatures avec ledit composé permette la maturation phénotypique des cellules dendritiques, attestée par une augmentation significative de l'expression des molécules CD40, CD83, CD86, et HLA-DR et une diminution très marquée de

l'expression des molécules CD14 et CD1a par lesdites cellules dendritiques.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les monocytes, précurseurs ou cellules souches sont mis en contact avec un analogue du RU 41740 obtenu à partir de la souche O_1 K_2 NCTC 5055 de *Klebsiella pneumoniae*.

4. Procédé d'obtention de cellules dendritiques matures présentant des antigènes choisis, à partir de monocytes, précurseurs des monocytes, ou cellules souches hématopoïétiques, caractérisé en ce que lesdits précurseurs sont mis en contact avec le RU 41740 ou un analogue de celui-ci, couplé à des molécules comportant lesdits antigènes.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le couplage entre le RU 41740 ou son analogue et les antigènes est non covalent.

6. Procédé selon l'une des revendications 1, 2, 4 et 5, dans lequel le composé mis au contact des monocytes, précurseurs des monocytes, ou cellules souches hématopoïétiques est le RU 41740, couplé ou non à des molécules antigéniques.

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel le RU 41740 est ajouté au milieu de culture des monocytes, précurseurs des monocytes, ou cellules souches hématopoïétiques, à une concentration finale comprise entre 1 ng/ml et 1 mg/ml, préférentiellement entre 100 ng/ml et 10 μg/ml.

8. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'analogue du RU 41740 est le LCOS 1013 ou le LCOS 1014.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel le LCOS 1013 ou le LCOS 1014 est ajouté au milieu de culture des monocytes, précurseurs des monocytes, ou cellules souches hématopoïétiques, à une concentration finale comprise entre 1 ng/ml et 1 mg/ml, préférentiellement entre 100 ng/ml et 50 µg/ml.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, dans lequel les cellules dendritiques sont traitées *ex vivo*, pour la préparation d'un médicament destiné à la prophylaxie, l'atténuation ou le traitement de maladies cancéreuses, infectieuses, allergiques ou auto-immunes.

11. Utilisation du RU 41740 ou d'un analogue de celui-ci, pour la préparation d'une composition comprenant des cellules dendritiques matures et/ou des macrophages activés.

12. Utilisation du RU 41740 ou d'un analogue de celui-ci, pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour une administration topique, destinée à favoriser la maturation des cellules de Langerhans de la peau.

13. Utilisation d'un produit de couplage entre le RU 41470 ou un analogue de celui-ci et un ou plusieurs antigènes, pour la préparation d'une composition apte à induire la production de cellules dendritiques matures ou de macrophages activés présentant lesdits antigènes.

14. Utilisation de cellules dendritiques obtenues par un procédé selon l'une des revendications 1 à 10, dans la fabrication d'une composition apte à favoriser une réponse immunitaire antitumorale.

15. Utilisation de cellules dendritiques obtenues par un procédé selon l'une des revendications 1 à 10, dans la fabrication d'une composition apte à favoriser une réponse immunitaire contre une infection par un micro-organisme.

16. Utilisation de cellules dendritiques obtenues par un procédé selon l'une des revendications 1 à 10 et incubées en présence d'un immunosuppresseur, dans la fabrication d'une composition apte à modifier la réponse immunitaire dans le sens d'une tolérance.

17. Utilisation de cellules dendritiques obtenues par un procédé selon l'une des revendications 1 à 10, pour la détection et/ou la caractérisation des antigènes d'histocompatibilité.

18. Produit de couplage entre le RU 41740 ou un analogue de celui-ci et des molécules antigéniques, pour induire la maturation de cellules dendritiques ou l'activation de macrophages.

19. Produit de couplage selon la revendication 18, caractérisé en ce que le RU41740 ou son analogue est lié aux molécules antigéniques par des liaisons non covalentes.

20. Produit de couplage selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que les molécules antigéniques sont de nature non protéique.

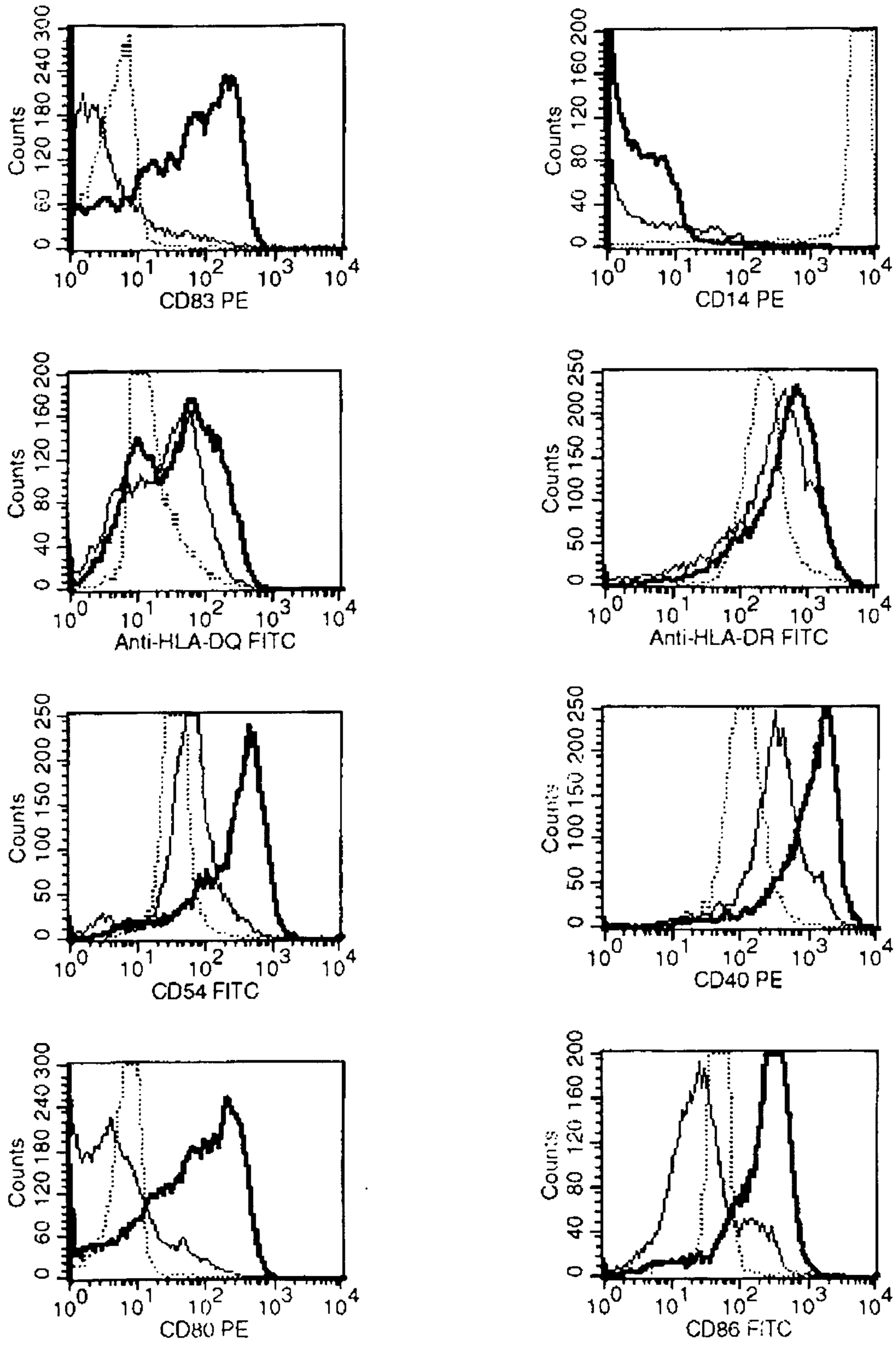

Counts
CD83 PE
CD14 PE
Anti-HLA-DQ FITC
Anti-HLA-DR FITC
CD54 FITC
CD40 PE
CD80 PE
CD86 FITC

Figure 1

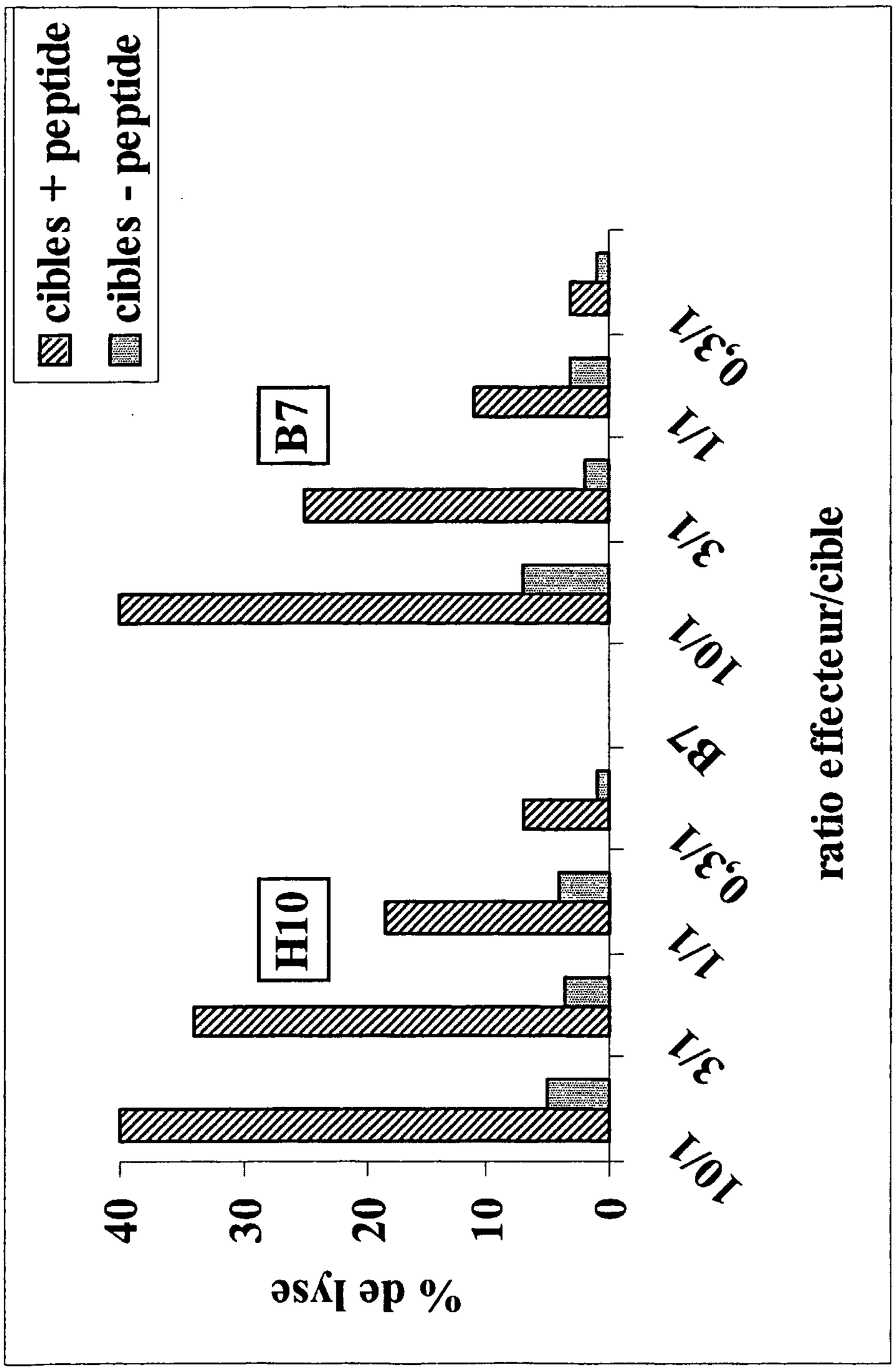

cibles + peptide
cibles - peptide
B7
H10
10/1
3/1
1/1
0,3/1
ratio effecteur/cible
0
10
20
30
40
% de lyse

Figure 2

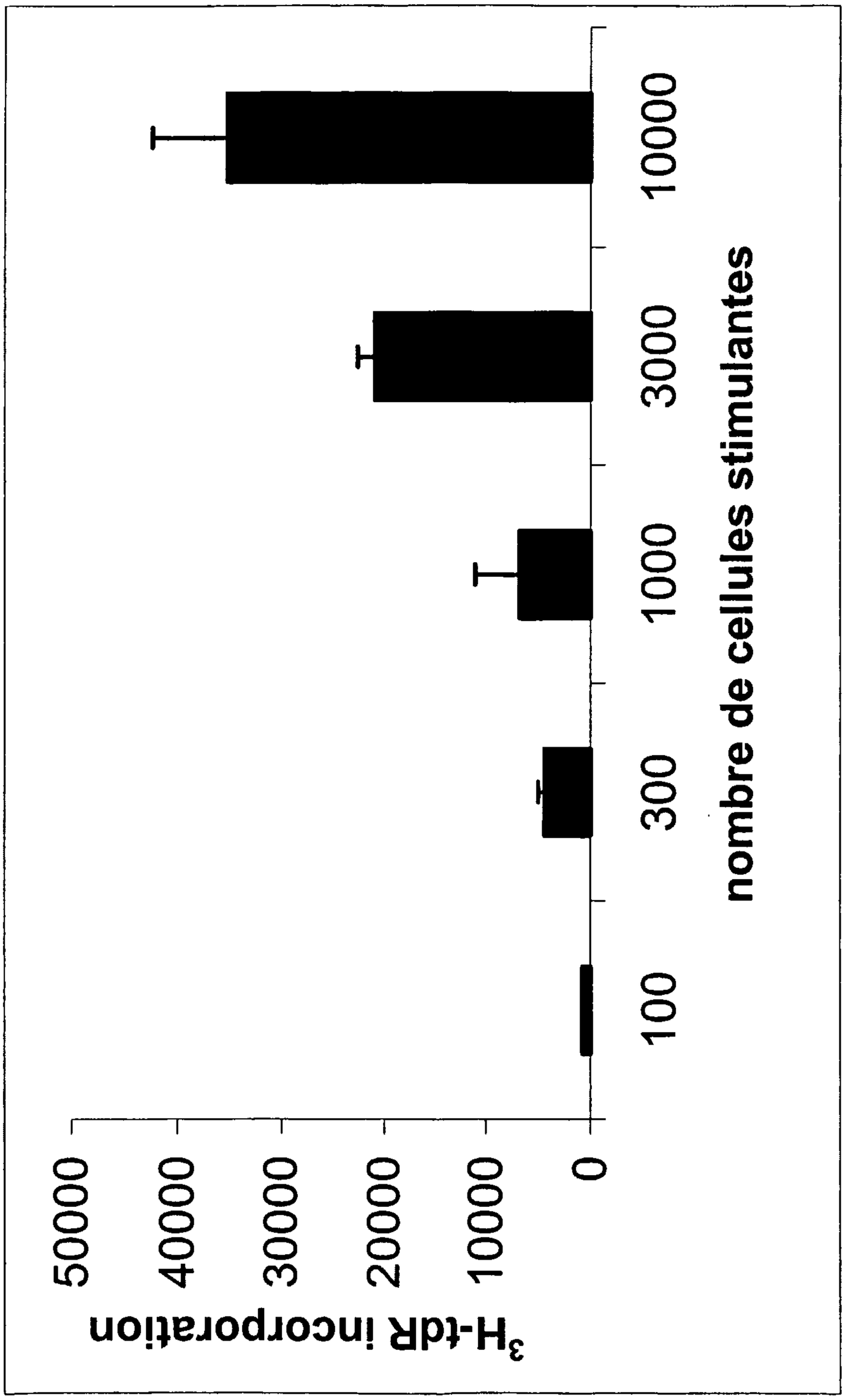

^{3}H-tdR incorporation
0
10000
20000
30000
40000
50000
100
300
1000
3000
10000
nombre de cellules stimulantes

Figure 3

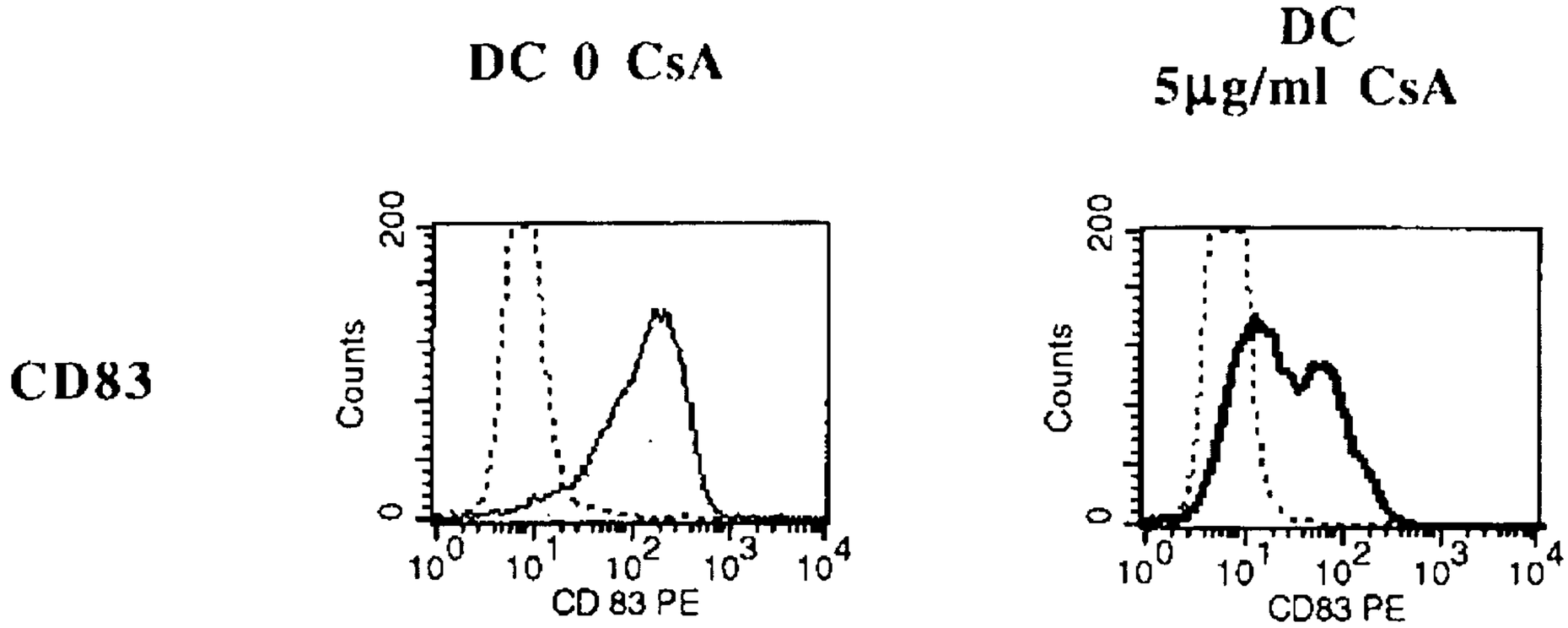
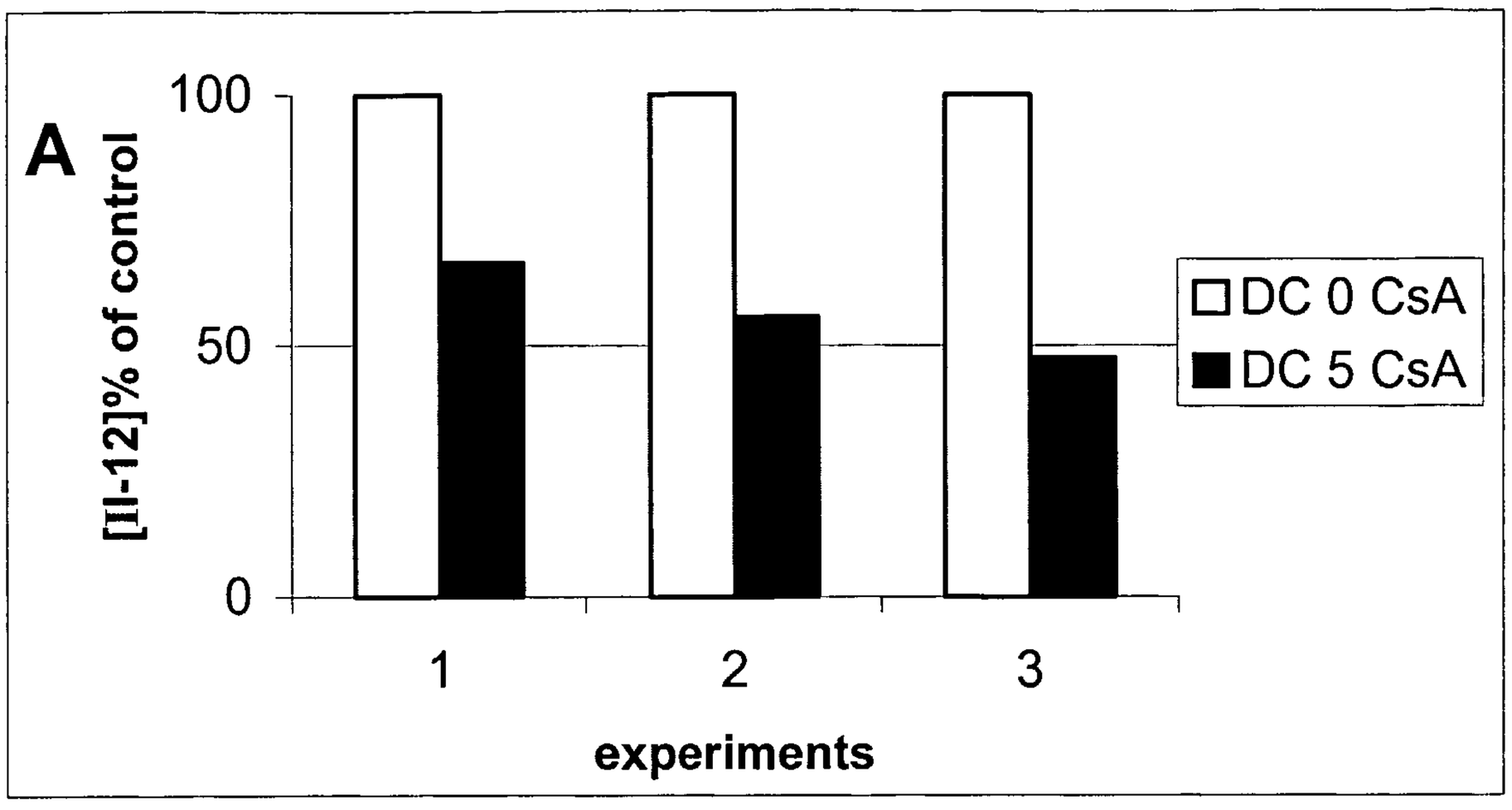

DC 0 CsA
DC
5µg/ml CsA
CD83
Counts
200
0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
CD 83 PE
CD83 PE
DC-LAMP
150
DC Lamp FITC

Figure 4


A
[Il-12]% of control
100
50
0
1
2
3
experiments
DC 0 CsA
DC 5 CsA

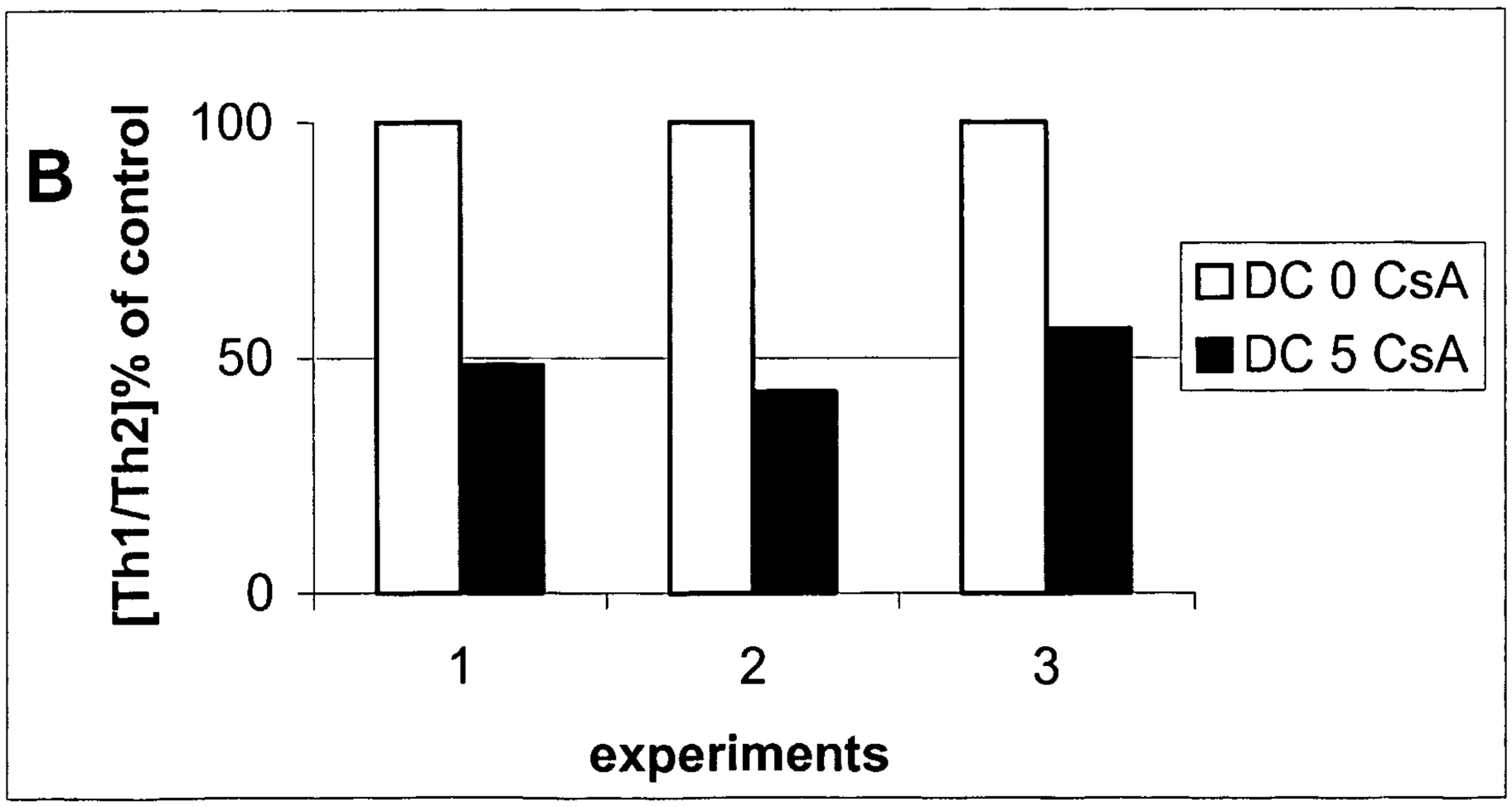

B
[Th1/Th2]% of control
100
50
0
1
2
3
experiments
DC 0 CsA
DC 5 CsA

Figure 5

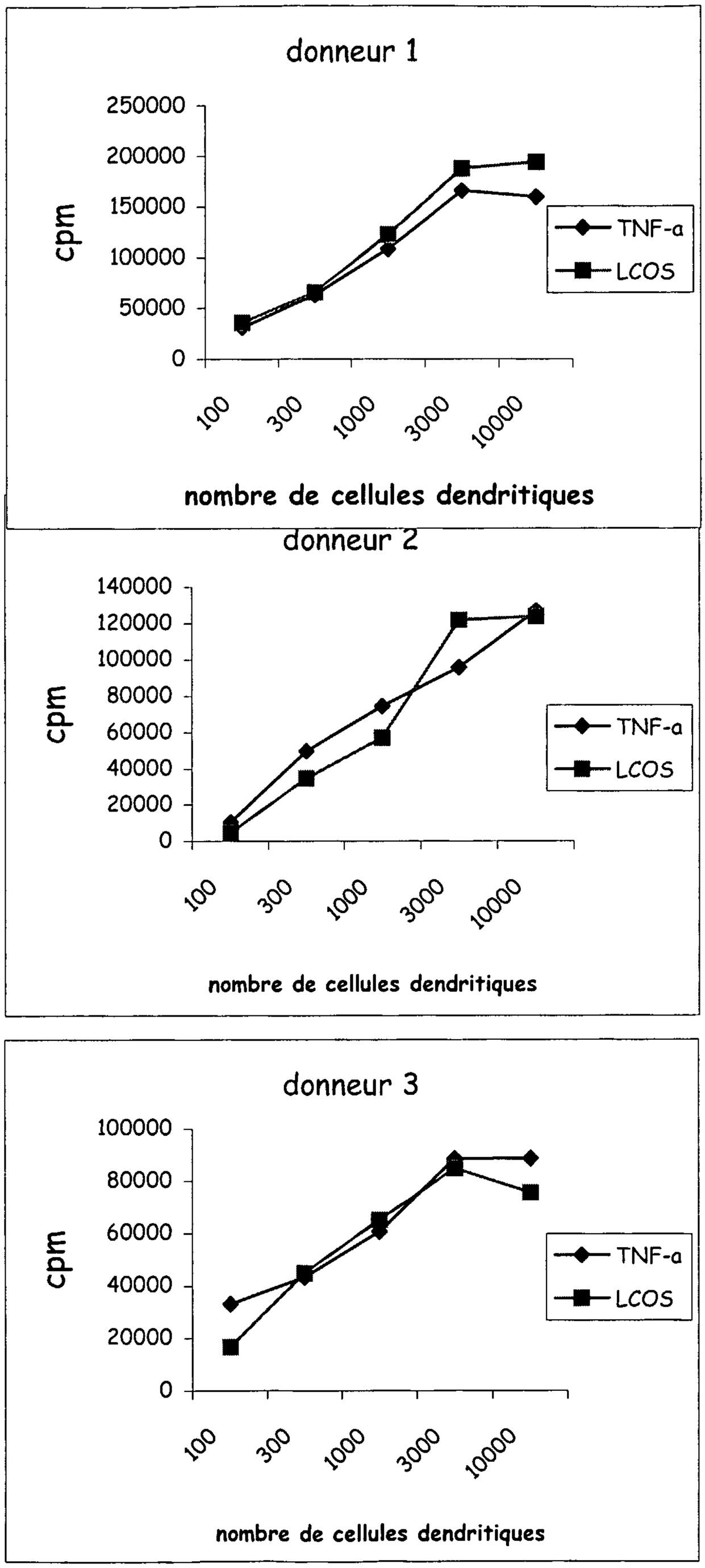
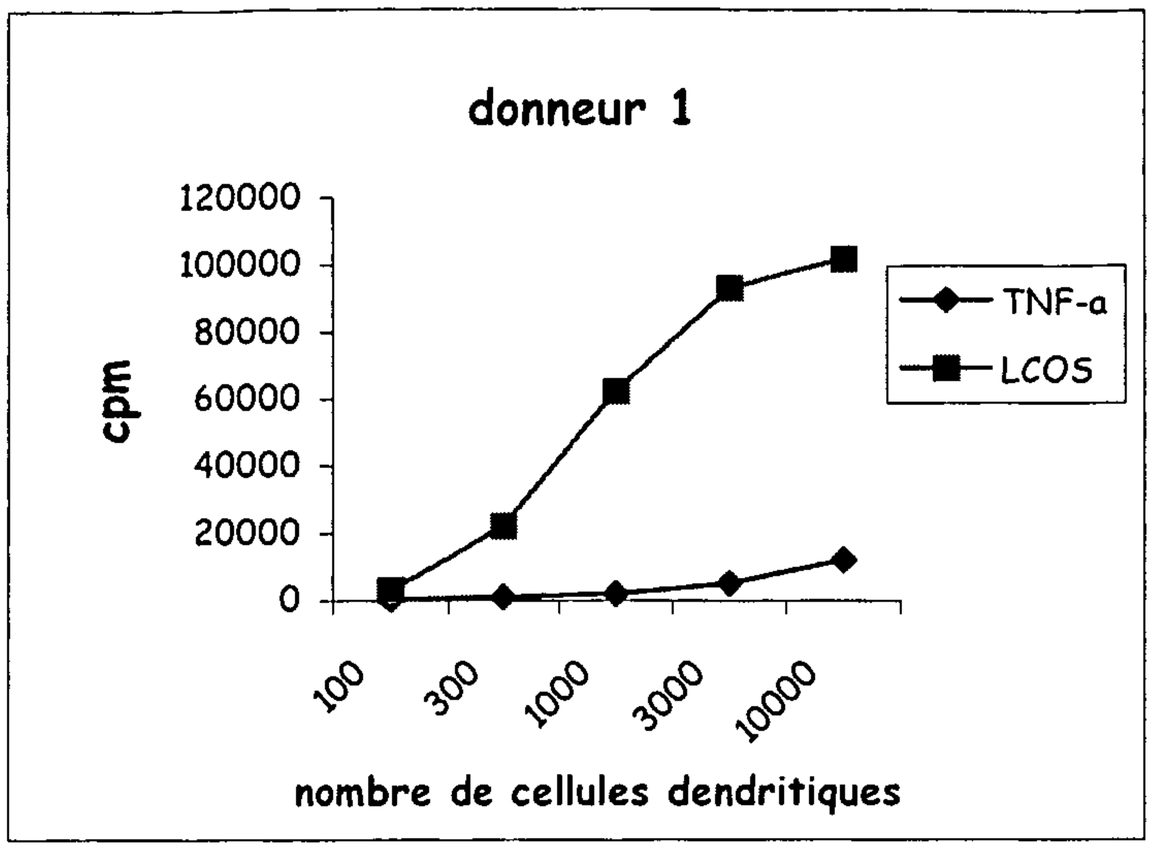
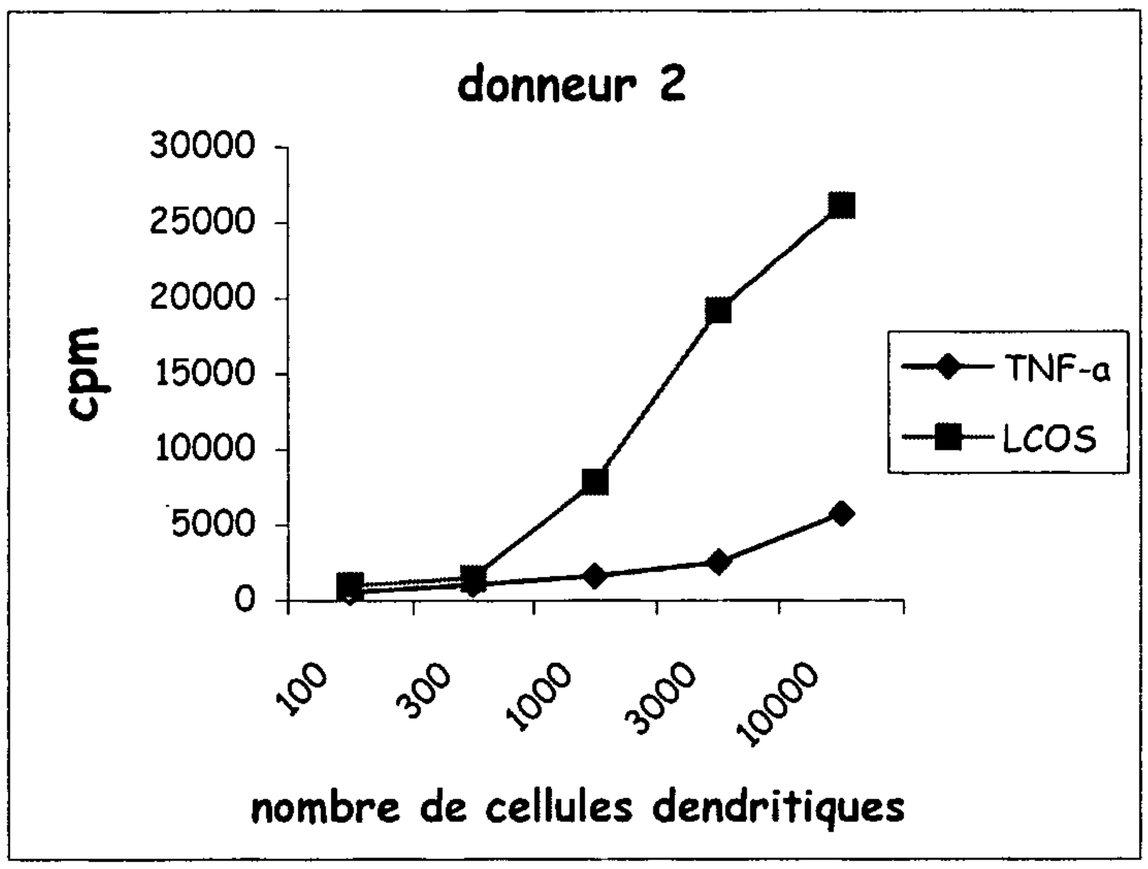

donneur 1
250000
200000
150000
100000
50000
0
cpm
TNF-α
LCOS
100
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques
donneur 2
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
cpm
TNF-a
LCOS
100
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques
donneur 3
100000
80000
60000
40000
20000
0
cpm
TNF-a
LCOS
100
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques

Figure 6


donneur 1
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
cpm
TNF-a
LCOS
100
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques


donneur 2
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
cpm
TNF-a
LCOS
100
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques

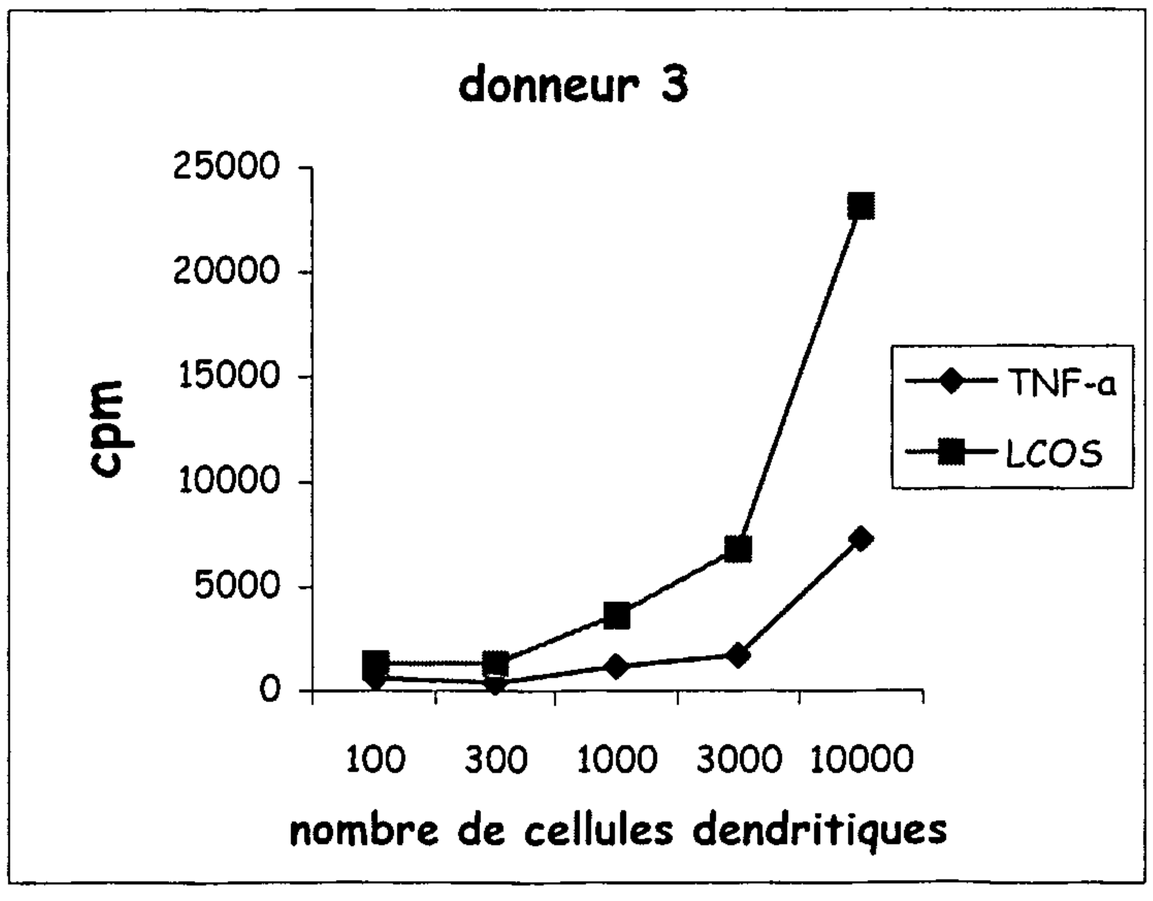
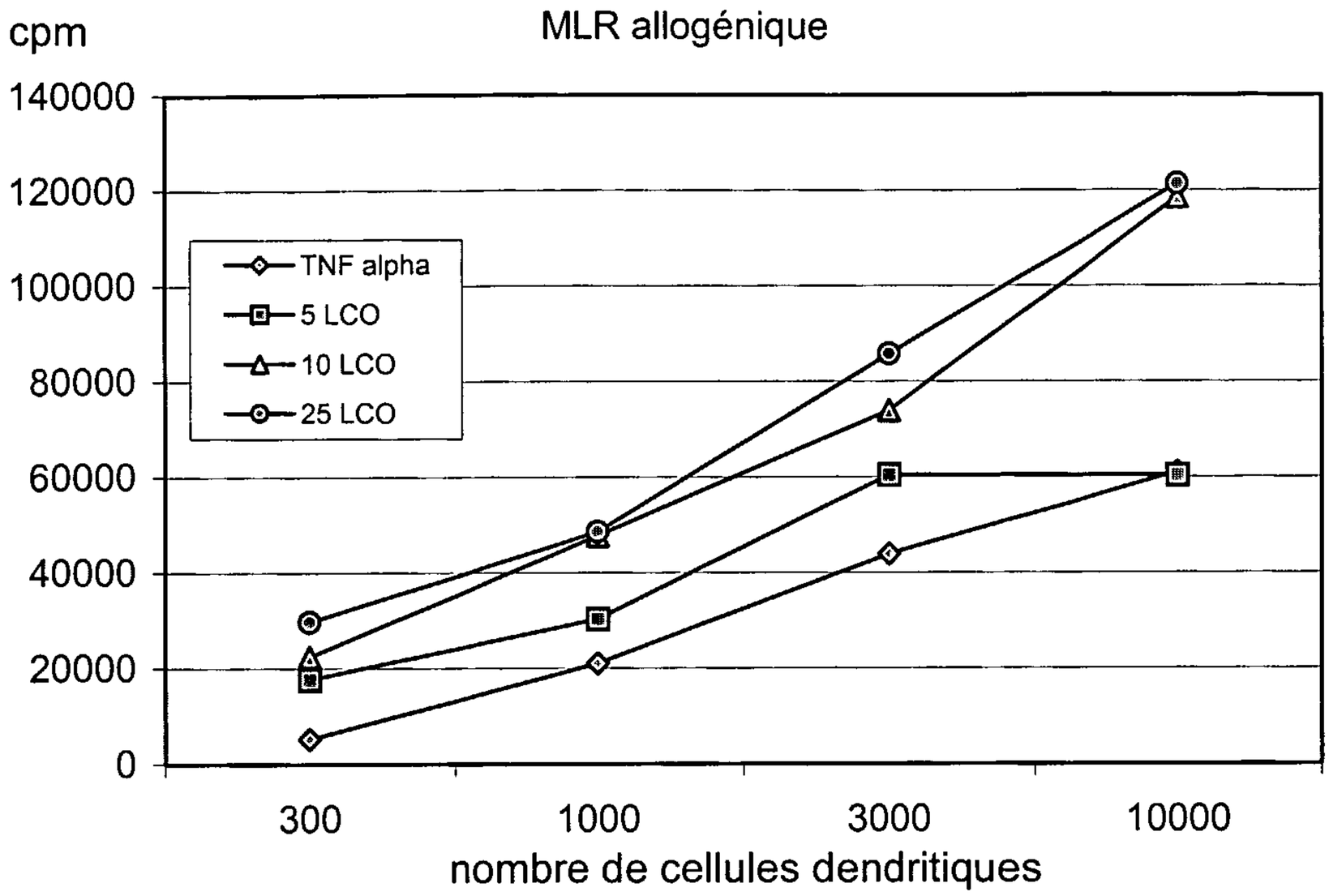

donneur 3
25000
20000
15000
10000
5000
0
cpm
TNF-a
LCOS
100
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques

Figure 7


cpm
MLR allogénique
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
TNF alpha
5 LCO
10 LCO
25 LCO
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques

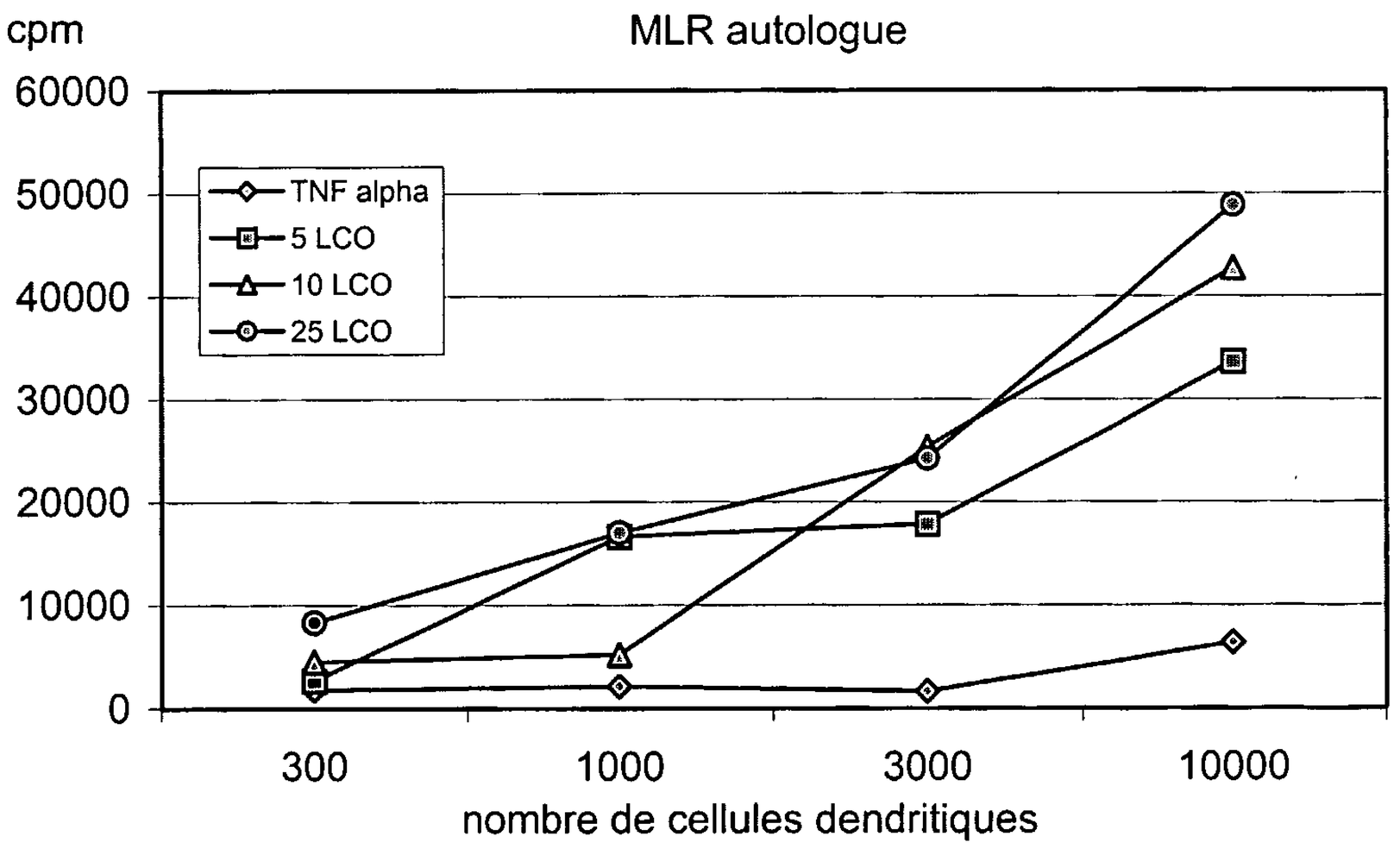

cpm
MLR autologue
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
TNF alpha
5 LCO
10 LCO
25 LCO
300
1000
3000
10000
nombre de cellules dendritiques

Figure 8