

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 960 882

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

10 54429

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 N 5/0786** (2006.01)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 04.06.10.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 09.12.11 Bulletin 11/49.

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

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *HOSPICES CIVILS DE LYON Etablis-
sement public — FR et UNIVERSITE CLAUDE BER-
NARD LYON I Etablissement public — FR.*

⑦② Inventeur(s) : MIOSSEC PIERRE et EL JAAFARI
ASSIA.

⑦③ Titulaire(s) : HOSPICES CIVILS DE LYON Etablis-
sement public, UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I
Etablissement public.

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

⑤④ CO-CULTURE DE CELLULES MONONUCLEÉES ET DE CELLULES MESENCHYMEUSES POUR
L'OBTENTION DE CELLULES PRODUCTRICES D'IL-17.

⑤⑦ La présente invention concerne l'obtention de cellules
productrices d'IL-17 à partir de cellules mononucléées acti-
vées en présence de cellules mésenchymateuses. Elle a
également pour objet les cellules productrices d'IL-17 obte-
nues par l'utilisation de cellules mononucléées activées en
présence de cellules mésenchymateuses, ainsi que leur uti-
lisation en tant que médicament, et en particulier comme
vaccin cellulaire, vecteur pour transfert de gènes, outil de
diagnostic, de screening, ou d'immunosurveillance.

FR 2 960 882 - A1



La présente invention concerne le domaine général de la biologie cellulaire, et en particulier la préparation de cellules par culture *in vitro*.

Plus précisément, la présente invention concerne l'obtention de cellules productrices d'IL-17 à partir de cellules mononucléées activées en présence de
5 cellules mésenchymateuses. Les défenses immunitaires de l'organisme contre des agents pathogènes, utilisent deux types de réponses :

- la réponse innée, qui permet de signaler le danger, et qui utilise des mécanismes de reconnaissance non spécifique, et

- la réponse adaptative, dont le but est de solliciter des cellules aptes
10 à reconnaître de façon spécifique l'agent pathogène et à activer les réponses cytokiniques, cytotoxiques, et phagocytaires. Parmi les différents effecteurs de cette réponse adaptative, les lymphocytes T jouent un rôle prépondérant. Ainsi, après reconnaissance d'un agent pathogène, les cellules présentatrices d'antigène, et notamment les cellules dendritiques migrent vers les ganglions périphériques dans
15 lesquels les lymphocytes T naïfs circulent. Parmi ceux-ci, certains vont reconnaître l'antigène étranger et débutent alors pour eux une différenciation vers différentes sous-populations : essentiellement de type TH1, TH2.

Les lymphocytes TH1 ont pour fonction de répondre à l'agression par des mécanismes cellulaires, faisant intervenir d'autres types cellulaires cytotoxiques,
20 phagocytaires etc. Ils sont activés essentiellement à la suite d'une infection par des bactéries intracellulaires, des virus, des protozoaires, ou un greffon allogénique (provenant d'une autre personne).

Les lymphocytes TH2 sont impliqués dans la réponse de type « humorale », qui a pour but essentiel d'induire une réponse anticorps par des lymphocytes B,
25 eux-mêmes induits à se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps : les plasmocytes. Cette réponse intervient dans les défenses contre les bactéries (opsonisation, neutralisation) et les parasites de type nématode par exemple, mais est également responsable des réactions allergiques.

Depuis peu, une autre sous-population lymphocytaire a été identifiée comme
30 étant un effecteur important de la réponse immunitaire via l'activation ou l'amplification de la réponse inflammatoire. Ce sont les lymphocytes TH17 qui sont définis par leur capacité à produire de l'IL-17. Ces cellules dérivent également des lymphocytes T naïfs, et ont pour rôle d'attirer les polynucléaires neutrophiles sur le site du danger, afin de lutter contre les bactéries extracellulaires et les

champignons. Du fait de la propagation de l'inflammation (par sécrétion de cytokines, de chimiokines, de protéases...), d'autres cellules sont également appelées à migrer sur ce même site (pour revue : P. Miossec et al, *N. Engl.J. Med.* 361: 888-98 ; 2009). Cependant, les lymphocytes TH17 ont également été
5 impliqués dans certaines maladies auto-immunes, telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la sclérose en plaques, etc. Mais leur rôle en tant qu'initiateur, ou propagateur de la maladie n'est pas encore clairement établi.

Très récemment, différentes études, chez l'animal et l'homme ont montré que les TH17 pouvaient jouer un rôle important dans les défenses anti-tumorales, en promouvant les réponses cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux (N. Martin-Orozco et al, *Immunity*, 2009, 31 : 787-98). Ainsi, il a été montré dans un modèle de souris déficientes en IL-17, que l'injection de cellules tumorales malignes d'origine pulmonaire, cutanée, ou mésenchymateuse, augmentait en fréquence et en taille les foyers tumoraux, en comparaison à ce qui se passait dans des souris
15 sauvages. A l'inverse, la vaccination préalable de souris sauvages par des lymphocytes TH17 générés *ex-vivo*, a permis de réduire dans cette même étude, le nombre et la taille des foyers tumoraux. Cette injection de TH17 a en effet entraîné une infiltration de cellules dendritiques et de lymphocytes T au sein des tissus tumoraux, ce qui a engendré une meilleure présentation des antigènes tumoraux
20 aux lymphocytes T cytotoxiques, et de ce fait une amplification de la réponse cytotoxique. Par ailleurs, les TH17 ont également induit la migration de polynucléaires neutrophiles et l'amplification de la réponse inflammatoire locale. Enfin, dans un autre modèle de tumeur pré-établie, l'injection ultérieure de lymphocytes TH17 a permis de montrer leur efficacité thérapeutique dans l'induction
25 d'une immunité anti-tumorale, puisqu'ils ont été capables de réduire de 75 % le nombre de foyers tumoraux, alors que l'injection de TH1 n'a induit qu'une diminution de 40 % des foyers tumoraux.

Chez l'homme, nombre de cancers sont infiltrés par des TH17, conférant une protection anti-tumorale (prostate, ovaire, poumon, mélanome) (pour revue : W. Zou et N. Restigo, *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10 : 248-256).
30

Compte tenu du rôle des TH17 en situation inflammatoire, cancéreuse, infectieuse et auto-immune, il serait souhaitable de pouvoir disposer d'un apport d'IL-17. Si l'administration directe d'IL-17 n'est gère envisageable *in vivo*, compte tenu de la trop courte durée de vie et des effets secondaires connus des cytokines,

il apparaît cependant envisageable d'administrer des cellules capables de produire cette cytokine, telles que les TH17.

C'est ainsi qu'il apparaît utile de pouvoir obtenir des cellules productrices d'IL-17 *in vitro* ou *ex-vivo*, afin de les injecter au patient pour l'aider à amplifier ses
5 réponses immunitaires.

A l'heure actuelle, la production de cellules humaines productrices d'IL-17 est encore difficile tant au plan quantitatif que qualitatif.

La production de TH17 chez l'homme à partir de cellules T naïves est assez mal établie et peu reproductible, en comparaison aux travaux chez la souris. Le
10 principe général consiste à purifier les lymphocytes T naïfs, grâce à leur phénotype : CD4+, CD45RA+, CCR7+ et ce, à l'aide d'anticorps fixés à des billes magnétiques, ou d'un tri cellulaire à l'aide d'un cytomètre de flux, puis à ajouter des cytokines pour les différencier en TH17, telles que : IL-6, IL-23, TGFβ et des anticorps dirigés contre les cytokines essentielles des TH1 et TH2 : anti-IFNγ, anti-IL4, et/ou anti-IL-
15 10. Par contre, il semble plus facile de les obtenir à partir du pool de cellules T mémoires. Certains tentent donc de purifier directement les TH17 (à confirmer) selon certaines de leurs caractéristiques phénotypiques (CD4+ CD45RO+ CCR7- CCR6+) et ce, à l'aide de billes magnétiques, puis de les amplifier à l'aide de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-23 et l'IL-6, d'autres rajoutent en plus de la PGE2. Le
20 rôle du TGFβ est très controversé chez l'homme contrairement à la souris, puisque pour certains, il est indispensable à l'activation du facteur de transcription des TH17 : RORC, alors que pour d'autres, il serait plutôt inhibiteur. Il semble néanmoins que la présence d'IL-1, IL-21 ou IL-23 lèverait l'action inhibitrice du TGFβ (pour revue : E. de Jong *et al*, *Clin Exp Immunol*, 2009, 159 : 148-158).

25 Par conséquent, la production de TH17 requiert la mise en œuvre de procédés assez complexes, avec plusieurs étapes :

1- les lymphocytes T (naïfs, mémoires ou TH17) doivent être au préalable purifiés; et

2- ces cellules doivent ensuite être cultivées en présence de plusieurs
30 cytokines impliquées dans la différenciation et/ou l'expansion des TH17, avec ou sans anticorps monoclonaux dirigés contre d'autres cytokines pouvant interférer, telles que celles secrétées par les lymphocytes de type TH1 et TH2.

La reproductibilité de ces différents procédés semble être par ailleurs assez peu fiable, puisqu'elle dépend notamment du milieu utilisé, de l'origine des
35 cytokines, et du degré de pureté des cellules.

Ainsi, la préparation de cellules productrices d'IL-17, et en particulier de lymphocytes TH17, est encore très difficile, du fait du besoin de purifier au préalable les cellules dont dérivent ces cellules productrices à savoir les lymphocytes T naïfs, ou bien les TH17 eux-mêmes, et de les cultiver dans des milieux nécessitant
5 l'adjonction de nombreuses cytokines et/ou d'anticorps dirigés contre des cytokines ayant des effets opposés. Ces procédés coûteux et dont la mise en œuvre est laborieuse compliquent considérablement les possibilités d'utilisation thérapeutique de ces cellules.

Dans ce contexte, la présente invention se propose de fournir un moyen
10 simple, efficace, rapide et reproductible pour obtenir des cellules productrices d'IL-17, sans nécessité d'adjonction de cytokines et/ou d'anticorps.

Il a en effet été découvert, et ceci constitue le fondement de la présente invention, que la co-culture de cellules mononucléées avec des cellules mésenchymateuses permet d'induire et d'amplifier la différenciation des
15 lymphocytes T en cellules productrices d'IL-17.

Jusqu'à présent les cellules mésenchymateuses étaient connues pour inhiber les réponses lymphocytaires TH1, et aucune étude ne permettait de suggérer que les cellules mésenchymateuses pouvaient également induire l'effet opposé, c'est-à-dire permettre aux lymphocytes T soit de se différencier, soit d'amplifier leur
20 différenciation vers des cellules productrices d'IL-17.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation de cellules mononucléées activées en présence de cellules mésenchymateuses pour l'obtention de cellules productrices d'IL-17.

La présente invention consiste ainsi à activer les lymphocytes T présents au
25 sein de la population de cellules mononucléées issues d'un échantillon biologique en présence de cellules mésenchymateuses, et à éventuellement expandre et purifier les populations cellulaires obtenues qui correspondent aux cellules productrices d'IL-17. Contrairement à ce qui est pratiqué dans l'art antérieur, la mise en œuvre de la présente invention ne nécessite pas obligatoirement de purifier spécifiquement les
30 lymphocytes T pour pouvoir obtenir des cellules productrices d'IL-17, bien que cette possibilité ne soit pas exclue de la portée de la présente invention.

La présente invention repose sur la mise en œuvre d'un système de co-culture de cellules mononucléées en présence de cellules mésenchymateuses qui permet d'obtenir des cellules productrices d'IL-17 de manière simple, rapide, et à

moindre coûts, puisqu'il ne nécessite pas l'adjonction de différentes cytokines et/ou anticorps.

Elle ne nécessite pas non plus de culture au long cours, puisque les cellules productrices qui sont obtenues dans le cadre de la présente invention produisent de l'IL-17 dans les 24 premières heures.

La seule étape de purification ou séparation qui soit nécessaire pour la mise en œuvre de l'invention représente l'obtention des cellules mononucléées à partir d'un échantillon biologique, et ce afin de se débarrasser des globules rouges et des polynucléaires.

Cette étape consiste de préférence à recueillir la population totale de cellules mononucléées présentes dans l'échantillon biologique choisi, sans obligation de purifier les lymphocytes T, ce qui présente l'avantage d'éviter de multiples manipulations et qui rend la préparation des cellules productrices selon l'invention simple et rapide. De préférence, les cellules mononucléées qui sont activées sont la population totale de cellules mononucléées présente dans un échantillon biologique, et en particulier dans l'échantillon biologique choisi. La population totale de cellules mononucléées contient essentiellement les lymphocytes T et B, les cellules tueuses ou *natural killer* (NK) et les monocytes.

Il est néanmoins possible d'utiliser ou de recueillir directement des parties ou fractions de la population totale de cellules mononucléées. Ainsi, les cellules mononucléées qui sont activées dans le cadre de l'invention sont de préférence des fractions de la population totale de cellules mononucléées présente dans un échantillon biologique. Ces fractions peuvent être obtenues par séparation de la population totale qui aura été recueillie au préalable à partir de l'échantillon biologique, mais elles peuvent également être directement recueillies à partir de l'échantillon biologique. Les fractions de la population totale de cellules mononucléées sont notamment choisies parmi les cellules mononucléées dépourvues de lymphocytes B, les cellules mononucléées dépourvues de monocytes, les lymphocytes T purifiés, notamment naïfs, mémoires (c'est-à-dire ayant déjà rencontré l'antigène), effecteurs, et en particulier les lymphocytes TH17. En d'autres termes, les cellules mononucléées qui sont activées et utilisées selon l'invention sont constituées soit de l'ensemble des cellules mononucléées présentes dans l'échantillon biologique choisi, soit du mélange de certains types seulement de cellules mononucléées (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, monocytes) du moment que ce mélange contient au moins des lymphocytes T.

Par conséquent, dans le cadre de la présente invention, l'expression « cellules mononucléées » qui est utilisée sans référence à une population totale ou à des fractions de celle-ci, doit se comprendre comme pouvant couvrir à la fois la population totale des cellules mononucléées mais également toute fraction de cette population totale contenant des lymphocytes T, ou consistant en des lymphocytes T purifiés.

L'utilisation selon l'invention s'entend être une utilisation *in vitro* ou *ex-vivo*.

Les cellules mononucléées qui sont utilisées selon l'invention peuvent être obtenues par toute technique classique dans le domaine, et en particulier par séparation en gradient de densité, notamment de type Ficoll, du moment que cette technique permet d'obtenir au moins les lymphocytes T dans la population ou la fraction qui est utilisée pour être activées.

Les cellules mononucléées utilisées dans le cadre de l'invention peuvent être obtenues à partir de tout échantillon biologique les contenant. Elles peuvent être obtenues à partir de la moelle osseuse ou à partir du sang, par exemple du sang périphérique, du sang de cordon ombilical, du sang périphérique mobilisé à partir de la moelle osseuse par le G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) ou par tout autre facteur chimiotactique. De préférence, les cellules mononucléées utilisées sont obtenues à partir du sang, et en particulier du sang périphérique.

L'échantillon biologique à partir duquel les cellules mononucléées sont recueillies peut être issu d'un sujet sain ou bien d'une personne atteinte d'un trouble ou d'une maladie qui pourrait être traité, ou au moins atténué, par l'administration de cellules productrices d'IL-17. En effet, une des applications des cellules productrices d'IL-17 qui sont obtenues selon l'invention consiste à les obtenir à partir des propres cellules mononucléées issues du patient atteint du trouble ou de la maladie telle que définies ci-dessus pour ensuite lui ré-injecter les cellules productrices d'IL-17 obtenues selon l'invention.

Les lymphocytes T qui sont présents parmi les cellules mononucléées obtenues à partir de l'échantillon biologique ou bien qui ont été purifiés à partir de celui-ci, sont ensuite activés ou stimulés. L'activation est réalisée par tout moyen bien connu par l'homme du métier qui permette d'induire une réponse lymphocytaire telle qu'une production de cytokine, une réponse proliférative ou cytotoxique.

Cette activation peut être réalisée à l'aide d'un antigène, d'un agent mitogène tel que la phytohémagglutinine A (PHA), la concanavaline, des esters de

phorbols et/ou des ionophores calciques, d'un anticorps activant le récepteur T ou le complexe CD3 ou d'une combinaison d'anticorps de type anti-CD3+CD28, de composés activateurs tels que ceux activant des molécules extérieures au complexe TCR/CD3, comme par exemple CD2, ou ICOS (*Inducible COStimulatory molecule*),
5 ou de tout autre mode d'activation/stimulation des lymphocytes T aux normes GMP (*Good Manufacturing Procedures*, ou Règles de Bonne Pratiques)).

De préférence, cette activation est réalisée à l'aide d'un agent mitogène tel que la phytohémagglutinine (PHA) ou d'une combinaison d'anticorps de type anti-CD3+CD28.

10 Les cellules mononucléées utilisées selon l'invention sont activées en présence de cellules mésenchymateuses, afin d'augmenter le rendement d'obtention de cellules productrices d'IL-17. L'utilisation de ces cellules selon l'invention permet en effet d'augmenter la production d'IL-17 d'un facteur 10 environ, voire même de provoquer l'apparition d'IL-17, qui n'était pas produite en l'absence de cellules
15 souches mésenchymateuses.

Les cellules mésenchymateuses utilisées dans le cadre de la présente invention sont de préférence des cellules souches mésenchymateuses, quelle que soit leur origine. Elles peuvent par exemple être issues de la moelle osseuse ou de tout autre tissu comme les tissus graisseux, osseux, ou musculaire. Ces cellules
20 mésenchymateuses peuvent également être des cellules plus matures, c'est-à-dire plus différenciées, d'origine mésenchymateuse, comme par exemple des fibroblastes, des synoviocytes, voire même des ostéoblastes, ostéocytes, chondroblastes, chondrocytes, ténoblastes, ténocytes, adipoblastes, adipocytes, et myoblastes, myocytes.

25 Selon un mode de réalisation particulier, il est préférable de ne pas utiliser de PBMC issus de patients atteints d'arthrite rhumatoïde activés à l'aide du collagène II ou de la phytohémagglutinine lorsque les cellules mésenchymateuses utilisées sont des cellules souches mésenchymateuses issues de tissu adipeux.

Par ailleurs, les cellules mésenchymateuses utilisées peuvent être bloquées
30 dans leur cycle cellulaire. Tout procédé physique ou chimique bien connu de l'homme du métier peut être utilisé pour induire de blocage du cycle cellulaire des cellules mésenchymateuses. Parmi ceux-ci, on peut notamment citer l'irradiation, en particulier par rayons X, gamma ou beta, le traitement chimique, par exemple à la mitomycine. Ces procédés de blocage du cycle cellulaire permettent notamment de

ne pas laisser proliférer les cellules mésenchymateuses aux dépens des lymphocytes T.

Cependant, il n'est pas nécessaire que les cellules mésenchymateuses soient bloquées dans leur cycle cellulaire pour la mise en œuvre de l'invention. Ainsi, les
5 cellules mésenchymateuses seront de préférence non bloquées dans leur cycle cellulaire afin de ne pas rajouter d'étape de complexité pour obtenir les cellules productrices d'IL-17.

De préférence, les cellules mésenchymateuses sont utilisées selon un ratio cellule mésenchymateuse:cellule mononucléée qui appartient à la gamme allant de
10 1:1 à 1:100. Dans cette gamme, les ratios 1:10, et en particulier 1:5, représentent des ratios particulièrement préférés pour la réalisation de la co-culture dans le cadre de l'invention.

La co-culture des cellules mononucléées et des cellules mésenchymateuses peut être réalisée dans un milieu de culture classique, pour autant qu'il soit
15 compatible avec la culture des lymphocytes T. Le milieu utilisé peut être supplémenté en sérum mais cela n'est pas obligatoire. Si le milieu contient du sérum, on pourra notamment utiliser du sérum bovin tel que le sérum de veau foetal ou du sérum humain. De même que sa présence, le pourcentage de sérum présent dans le milieu de culture n'est pas critique. On pourra notamment utiliser un milieu
20 supplémenté avec 10 % de sérum. On peut également utiliser un milieu de culture enrichi, c'est-à-dire un milieu sans sérum, mais riche en protéines sériques telle que l'albumine sérique bovine (BSA) par exemple.

Parmi les exemples classiques de milieux de culture qui peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention, on peut par exemple citer le milieu RPMI,
25 éventuellement supplémenté avec du sérum, et en particulier avec du sérum de veau foetal, ou un milieu enrichi tel que le X-vivo20. De manière générale, le milieu de culture utilisé peut également contenir des antibiotiques et/ou de la glutamine, ce qui est classique dans le domaine de la culture cellulaire et bien connu de l'homme du métier.

30 Les cellules mononucléées sont activées en présence des cellules mésenchymateuses pendant au moins 24 heures, mais cette activation peut se poursuivre sans aucune modification du milieu de culture jusqu'à 72 heures.

Dès le lendemain, c'est-à-dire 24 heures après l'activation des lymphocytes T co-cultivés en présence des cellules mésenchymateuses, il est possible de recueillir
35 des cellules productrices d'IL-17. Leur capacité de production peut éventuellement

être vérifiée par mesure de l'IL-17, par exemple par RT-PCT quantitative, par un test de type ELISA ou ELISPOT, par immunofluorescence (après perméabilisation des cellules), etc ou par tout autre moyen de mesure permettant de conclure à la présence de cette interleukine dans le surnageant de culture.

5 Le nombre de cellules productrices d'IL-17 obtenues selon l'invention peut éventuellement être amplifié lors d'une étape d'expansion. Cette étape d'expansion ou d'amplification peut être initiée dès le lendemain, ou bien quelques jours après l'activation des lymphocytes T, par exemple de 48 à 72 heures après activation.

Lorsque cette étape d'amplification (ou d'expansion) du nombre des cellules
10 productrices d'IL-17 est effectuée, celle-ci est de préférence réalisée en présence d'IL-2, qui est classiquement utilisée à des concentrations de 5 à 1000 UI/ml, même si des concentrations supérieures peuvent également être utilisées. De préférence, le nombre de cellules productrices d'IL-17 obtenues selon l'invention sera amplifié par une étape d'expansion réalisée en présence d'IL-2. Dans ce cas, on préférera
15 utiliser une concentration d'environ 20 UI/ml d'IL-2. L'IL-23 est également une cytokine qui est connue et qui peut être utilisée pour expandre les cellules productrices d'IL-17. Dans cette application, son utilisation est classiquement de l'ordre de 10 à 100 ng/ml.

Cette expansion de cellules peut se poursuivre plus ou moins longtemps en
20 renouvelant la moitié du milieu tous les 2-3 jours, et en rajoutant de l'IL-2. Classiquement une culture de 10 à 14 jours semble adéquate.

Suite à l'activation des lymphocytes T co-cultivés en présence des cellules
mésenchymateuses, en l'absence ou en présence d'une étape d'expansion, les
cellules productrices d'IL-17 qui sont obtenues selon l'invention peuvent en outre
25 être purifiées. Par conséquent, s'agissant des applications des cellules productrices d'IL-17 qui sont obtenues selon l'invention, il est possible de les utiliser directement ou bien de les purifier préalablement à leur utilisation. Parmi les méthodes de purification, on peut par exemple mentionner l'utilisation de billes magnétiques ciblant les cellules sécrétant de l'IL-17, ou l'utilisation de techniques comme celles
30 qui ont été mentionnées ci-dessus.

Il est à noter que l'utilisation selon l'invention conduit à l'obtention de
différentes populations cellulaires parmi lesquelles figurent les cellules productrices
d'IL-17. Par conséquent, l'IL-17 n'est pas la seule cytokine qui sera présente dans le
surnageant suite à la réalisation de cette co-culture. Le nombre et la nature des
35 différentes populations cellulaires obtenues seront fonction de la mixité des cellules

mononucléées utilisées au départ (population totale ou fractions telles que définies ci-dessus) suite à leur activation non-spécifique. Plus la population de cellules mononucléées utilisée au départ est mixte, c'est-à-dire contient différentes types de cellules mononucléées (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, monocytes), plus l'étape de purification finale pourra s'avérer nécessaire afin de pouvoir purifier la population cellulaire d'intérêt.

Sans vouloir être limité, les inventeurs pensent que les cellules productrices d'IL-17 qui sont obtenues selon l'invention sont des lymphocytes de type TH17 dans la mesure où l'IL-17 n'est pas synthétisée par d'autres cellules que les TH17. Ainsi, l'utilisation décrite ci-dessus selon l'invention concerne en particulier l'utilisation de cellules mononucléées activées en présence de cellules mésenchymateuses pour l'obtention de lymphocytes TH17.

Selon un deuxième aspect, la présente invention a pour objet des cellules productrices d'IL-17 caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par l'utilisation de cellules mononucléées activées en présence de cellules mésenchymateuses.

L'invention a également pour objet les cellules productrices obtenues selon l'invention pour leur utilisation en tant que médicament.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet l'utilisation des cellules productrices d'IL-17 obtenues selon l'invention, en tant que vaccin cellulaire, vecteur pour transfert de gènes, outil de diagnostic, de screening, ou d'immunosurveillance.

Ainsi, dans un but thérapeutique, ces cellules peuvent être utilisées comme vaccin cellulaire, dans le but de renforcer les réponses immunes, et notamment via une induction de la réponse inflammatoire, chez des patients atteints d'une infection, de cancer ou immuno-déficients (pour revue, W. Zou et N. Restigo, *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, 10 : 248-256). De plus, des gènes visant par exemple à cibler les sites tumoraux, ou à tuer spécifiquement les cellules cancéreuses pourront être transfectés dans ces cellules, afin de les rendre plus efficaces.

Dans un but diagnostique, la production d'IL-17 par les cellules productrices obtenues conformément à l'invention peut servir de test diagnostique pour détecter un déficit en production d'IL-17, comme par exemple dans certaines réponses immunes déficitaires, ou dans certaines maladies auto-immunes, ou dans certains cancers.

Ces cellules productrices d'IL-17 peuvent également permettre d'aider à développer des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-17 et ses variants, ou de

tester différents anticorps monoclonaux, ou développer des techniques de validation requérant la production d'IL-17.

Dans un but de surveillance des patients sur le plan immunologique, ces cellules productrices peuvent également être utilisées pour évaluer l'effet de
5 certains médicaments sur la production d'IL-17, en particulier chez certains patients chez qui la production d'IL-17 est déficiente, afin de suivre au cours du temps la capacité de production d'IL17 sous l'effet du traitement.

Dans le domaine thérapeutique, les cellules productrices d'IL-17 obtenues conformément à l'invention peuvent permettre de renforcer l'immunité anti-
10 tumorale, anti-infectieuse, les réponses inflammatoires, ou les réponses immunitaires chez les personnes immunodéprimées ou chez des patients transitoirement incapables de se défendre, tel que dans le choc septique, par exemple.

Selon encore un autre de ses aspects, l'invention a également pour objet un
15 procédé de préparation de cellules productrices d'IL-17, comprenant les étapes consistant à :

- a) recueillir les cellules mononucléées à partir d'un échantillon biologique;
- b) activer les lymphocytes T qui sont présents parmi les cellules mononucléées ainsi obtenues; cette activation étant réalisée en présence de cellules
20 mésoenchymateuses ; et
- c) récolter les cellules productrices ainsi obtenues.

Contrairement à l'art antérieur, ce procédé ne nécessite pas de devoir purifier au préalable les lymphocytes T, même si cette possibilité n'est pas exclue dans le cadre du procédé selon l'invention.

25 Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, ce procédé de préparation de cellules productrices d'IL-17 comprend uniquement les étapes a), b) et c) telles que mentionnées ci-dessus, ou uniquement les étapes a), b) et c) additionnées d'une étape d'expansion.

Dans le cadre de ce procédé, l'expression « récolter les cellules productrices»
30 ne signifie pas nécessairement que les cellules productrices d'IL-17 soient purifiées à partir des différentes populations de cellules qui sont obtenues. Cependant, l'étape c) du procédé peut éventuellement consister à purifier ces cellules productrices d'IL-17 puisqu'elles représentent la population de cellules d'intérêt dans le cadre de la présente invention.

Les modes de réalisation préférés concernant le procédé ci-dessus sont identiques à ceux qui ont été énoncés précédemment s'agissant de l'utilisation des cellules mononucléées selon l'invention.

5 Diverses autres caractéristiques ressortent de la description faite ci-dessous en référence aux dessins annexés qui montrent, à titre d'exemples non limitatifs, des formes de réalisation de l'objet de l'invention.

La **figure 1** représente le niveau d'expression de l'ARNm codant l'IL-17, après activation des lymphocytes T à l'aide de PHA en présence de différentes quantités relatives de cellules souches mésenchymateuses irradiées (**A**) ou après
10 activation des lymphocytes T à l'aide d'une combinaison d'anticorps anti-CD3+CD28 en présence de différentes quantités relatives de cellules souches mésenchymateuses non irradiées (**B**).

La **figure 2** représente le niveau d'expression de l'ARNm codant l'IL-17 (**A**) et la quantité d'IL-17 produite par les cellules obtenues (**B**) après activation
15 des lymphocytes T à l'aide de PHA et en présence (+ MSC) ou non (- MSC) de cellules souches mésenchymateuses.

La **figure 3A** représente la mise en évidence des cellules productrices d'IL-17 obtenues 24 heures seulement après activation de cellules mononucléées par la PHA en l'absence (- MSC) ou en présence (+ MSC) de cellules souches
20 mésenchymateuses. La **figure 3B** correspond à la quantité d'IL-17 mesurée 24h et 48h post-stimulation à partir des cellules productrices obtenues purifiées.

La **figure 4** représente le niveau d'expression de l'ARNm codant l'IL-17, après activation des lymphocytes T à l'aide de PHA en présence (+ FLS) ou non (- FLS) de synoviocytes issus de la membrane synoviale.

25 **EXEMPLES**

Exemple 1 : étude de l'expression de l'IL-17 dans les cellules obtenues selon l'invention

a) Activation des cellules mononucléées avec un agent mitogène, en présence de cellules mésenchymateuses bloquées dans leur cycle cellulaire

30 10 millions de cellules mononucléées obtenues à partir du sang périphérique après un gradient de Ficoll, ont été activées (à hauteur de 100 000 cellules/puits de plaque 96 puits, ou de 1 million de cellules/puits dans des plaques de 24 puits) à l'aide de 5µg/ml de PHA en présence des ratios 20/100 (1:5), 10/100 (1:10) et 5/100 (1:5) de cellules souches mésenchymateuses (MSC) issues de moelle osseuse
35 préalablement irradiées par rapport aux cellules mononucléées (PBMC). Des puits

contrôles sans cellules souches mésenchymateuses ont également été réalisés en parallèle. Après 24 heures de co-culture dans un milieu de type RPMI 1640 additionné de 10 % de SVF), le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 a été mesuré par RT-PCR quantitative et rapporté au niveau de l'expression de l'ARNm du CD3 ϵ , à l'aide du kit d'extraction commercialisé par la société Qiagen comprenant des amorces anti-IL-17 produites, à la demande, par la Société Qiagen, et utilisé selon les instructions d'utilisation fournies.

Les résultats sont regroupés dans la **figure 1A**. Le niveau d'expression d'IL-17 est exprimé en comparaison avec celui mesuré sans cellules mésenchymateuses dans les puits contrôles qui est considéré comme étant égal à 1.

b) Activation des cellules mononucléées avec une combinaison d'anticorps CD3+CD28, en présence de cellules mésenchymateuses non bloquées dans leur cycle cellulaire

10 millions de cellules mononucléées obtenues à partir du sang périphérique après un gradient de Ficoll, ont été activées (à hauteur de 100 000 cellules/puits de plaque 96 puits, ou de 1 million de cellules/puits dans des plaques de 24 puits) par la combinaison d'anticorps anti-CD3+CD28, pour mimer l'activation physiologique par le Récepteur T, à raison de 5 μ g/ml de chaque, en présence des ratios 20/100 (1:5), 10/100 (1:10) et 5/100 (1:5) de cellules souches mésenchymateuses (MSC) issues de moelle osseuse non bloquées dans leur cycle cellulaire par rapport aux cellules mononucléées (PBMC). Des puits contrôles sans cellules souches mésenchymateuses ont également été réalisés en parallèle.

Le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL17 a été mesuré par RT-PCR quantitative et exprimé comme indiqué ci-dessus. Les résultats sont regroupés dans la **figure 1B**.

Exemple 2 : étude de l'expression et de la production d'IL-17 dans les cellules obtenues selon l'invention

10 millions de cellules mononucléées obtenues à partir du sang périphérique après un gradient de Ficoll. Les cellules mononucléées ont été déplétées en monocytes, puis activées (à hauteur de 100 000 cellules/puits de plaque 96 puits, ou de 1 million de cellules/puits dans des plaques de 24 puits) à l'aide 5 μ g/ml de PHA en présence (+ MSC) ou non (- MSC) de cellules souches mésenchymateuses issues de moelle osseuse, utilisées à raison de 1 cellule mésenchymateuse pour 5 cellules mononucléées. Des puits contrôles sans cellules souches

mésenchymateuses (- MSC + PHA) et sans cellules souches mésenchymateuses ni activation par la PHA (- MSC - PHA) ont également été réalisés en parallèle.

Après 24 heures de co-culture, le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 a été mesuré par RT-PCR quantitative comme indiqué à l'exemple 1 (**figure 2A**). La
 5 quantité d'IL-17 produite par les cellules obtenues conformément à l'invention a été mesurée par ELISA (**figure 2B**).

Exemple 3 : mise en évidence des cellules obtenues selon l'invention

Après 24 heures de culture effectuée dans les conditions mentionnées à l'exemple 2, les lymphocytes T ont été purifiés en sélectionnant les cellules
 10 sécrétant de l'IL-17 à l'aide d'un système de billes magnétiques vendu par la société Myltenyi et consistant à isoler les cellules exprimant de l'IL-17 grâce à des anticorps dirigés contre l'IL-17 et la molécule CD45.

La détection des cellules productrices d'IL-17 a été réalisée par cytométrie de flux, à l'aide d'un anticorps anti-IL-17 marqué.

15 Les résultats sont regroupés dans la **figure 3A** et montrent qu'après seulement 24 heures de co-culture, l'utilisation selon l'invention (+ MSC) permet d'obtenir une proportion significativement augmentée de cellules capables de produire de l'IL-17 (3,6 % versus 0,4 %).

En parallèle, 24h et 48h après activation des cellules dans les conditions
 20 mentionnées à l'exemple 2, le taux d'IL-17 produite a été mesuré par ELISA à partir des cellules purifiées. Les résultats montrent (**figure 3B**) que le taux obtenu était de 0,518 pg/μl d'IL-17 en présence de cellules souches mésenchymateuses contre 0,044 pg/μl en leur absence, dès 24 heures post-stimulation. De façon intéressante, ces taux ont nettement augmenté après 48 heures.

25 Une étape d'expansion de ces cellules a ensuite été réalisée en présence d'IL-2 et d'IL-23 à raison de 20 UI/ml d'IL-2 et 10 ng/ml d'IL-23 pendant 10 jours, en changeant le milieu pour moitié 3 fois/semaine. Leur capacité de production d'IL-17 a été vérifiée par ELISA et RT-PCR quantitative suite à cette étape d'expansion.

Exemple 4 : étude de l'expression d'IL-17 dans les cellules obtenues selon l'invention

30 10 millions de cellules mononucléées obtenues à partir du sang périphérique après un gradient de Ficoll, ont été activées (à hauteur de 100 000 cellules/puits de plaque 96 puits, ou de 1 million de cellules/puits dans des plaques de 24 puits) à l'aide 5 μg/ml de PHA en présence (+ FLS) ou non (- FLS) de cellules synoviocytes
 35 issus de membrane synoviale (cellules mésenchymateuses différenciées obtenues à

partir de résidus opératoires de prothèse de hanche), utilisées à raison de 1 synoviocyte pour 5 cellules mononucléées. Des puits sans activation par la PHA ont également été réalisés en parallèle.

Après 24 heures de co-culture, le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-17 a été mesuré par RT-PCR quantitative et rapportée au niveau ARNm de CD3 ϵ , sur deux expériences réalisées en parallèle (E1) et (E2).

Les résultats sont regroupés dans la **figure 4** et montrent que la co-culture en présence de cellules mésenchymateuses (+ FLS) permet de stimuler de manière significative l'expression de l'IL-17 dans les cellules obtenues.

L'ensemble des résultats exposés dans la présente demande démontrent que la présente invention permet d'obtenir aisément des cellules productrices d'IL-17 grâce à un système de co-culture en présence de cellules mésenchymateuses, sans besoin de purification spécifique préalable des lymphocytes T, et sans nécessité d'ajouter des cytokines et/ou des anticorps pour induire et/ou d'amplifier la différenciation de ces cellules productrices d'IL-17.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation de cellules mononucléées activées en présence de cellules mésenchymateuses pour l'obtention de cellules productrices d'IL-17.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les cellules mononucléées qui sont activées sont la population totale de cellules mononucléées présente dans un échantillon biologique.

3. Utilisation selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules mononucléées qui sont activées sont des fractions de la population totale de cellules mononucléées présente dans un échantillon biologique.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que les fractions sont choisies parmi les cellules mononucléées dépourvues de lymphocytes B, les cellules mononucléées dépourvues de monocytes, les lymphocytes T purifiés, et les lymphocytes TH17.

5. Utilisation selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules mésenchymateuses utilisées sont des cellules souches mésenchymateuses.

6. Utilisation selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules mésenchymateuses sont utilisées selon un ratio cellule mésenchymateuse:cellule mononucléée qui appartient à la gamme allant de 1:1 à 1:100.

7. Utilisation selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le nombre de cellules productrices obtenues peut être amplifié lors d'une étape d'expansion.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'étape d'expansion est réalisée en présence d'IL-2.

9. Utilisation selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les cellules productrices d'IL-17 sont purifiées avant leur utilisation.

10. Cellules productrices d'IL-17, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

11. Cellules selon la revendication 10 pour leur utilisation en tant que médicament.

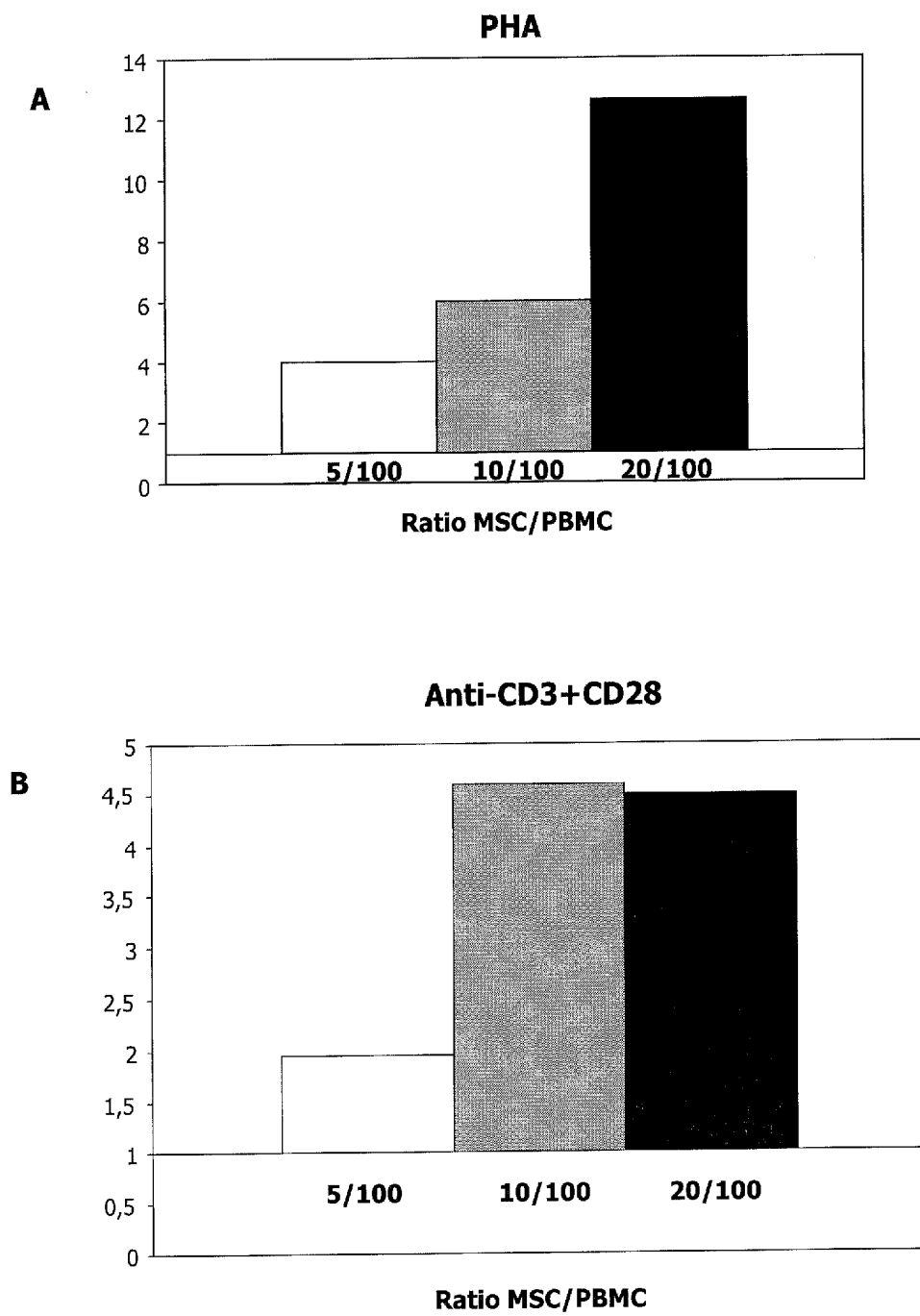
12. Cellules selon la revendication 10 pour leur utilisation en tant que vaccin cellulaire ou vecteur pour transfert de gènes.

13. Procédé de préparation de cellules productrices d'IL-17, comprenant les étapes consistant à :

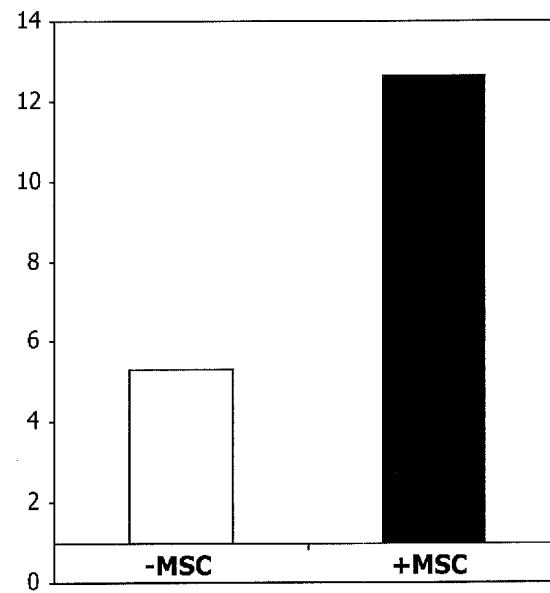
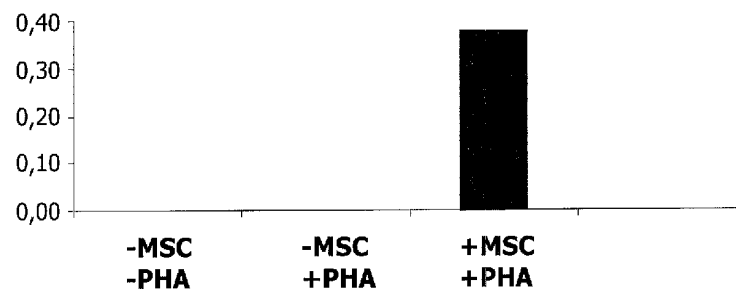
- a) recueillir les cellules mononucléées à partir d'un échantillon biologique;
- b) activer les lymphocytes T qui sont présents parmi les cellules mononucléées ainsi obtenues; cette activation étant réalisée en présence de cellules mésenchymateuses ; et
- c) récolter les cellules productrices d'IL-17 ainsi obtenues.

14. Utilisation des cellules selon la revendication 10 en tant qu'outil de diagnostic, de screening, ou d'immunosurveillance.

1 / 4

**Figure 1**

2 / 4

A**B****IL17 (pg/μl)****Figure 2**

3 / 4

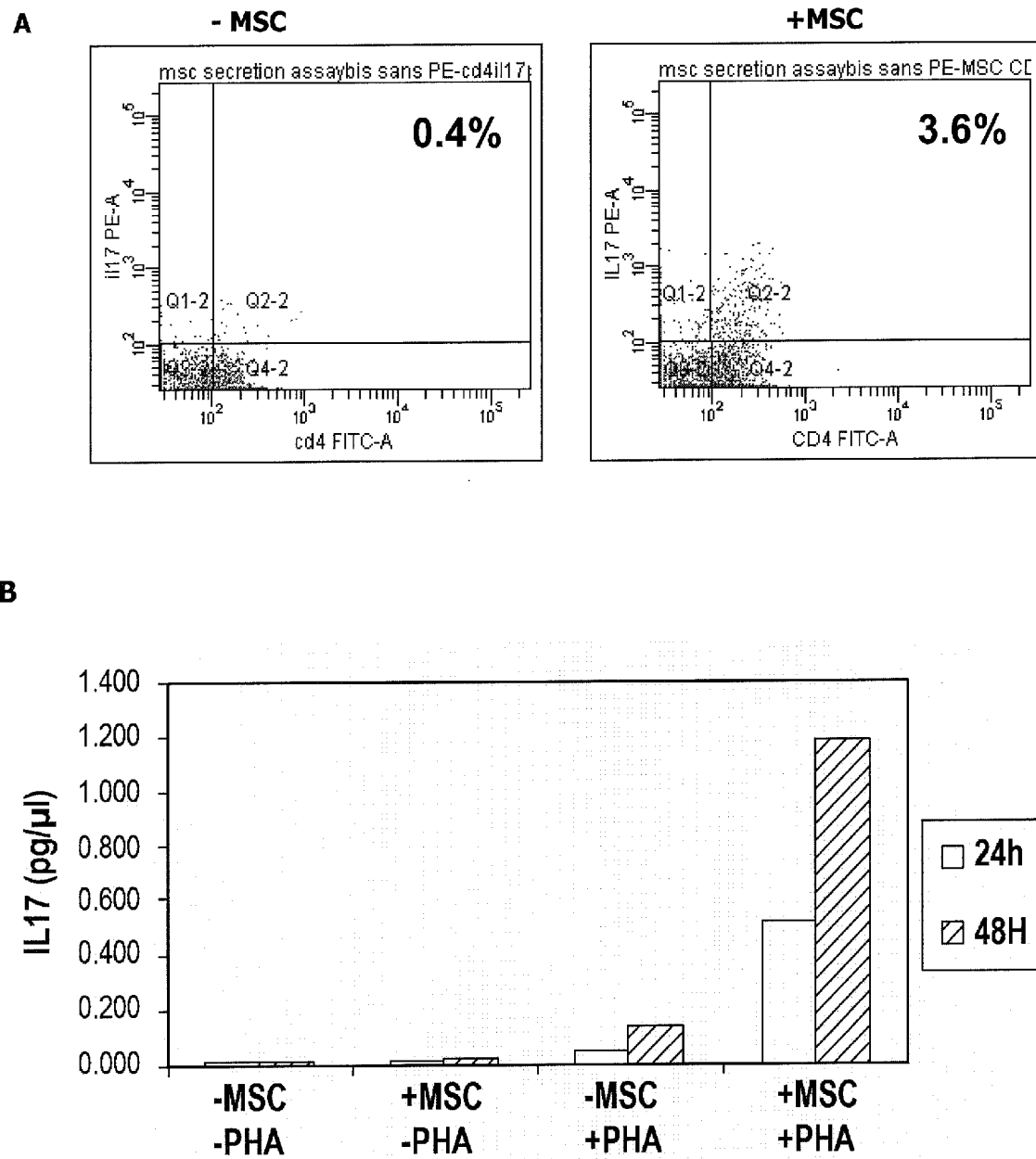
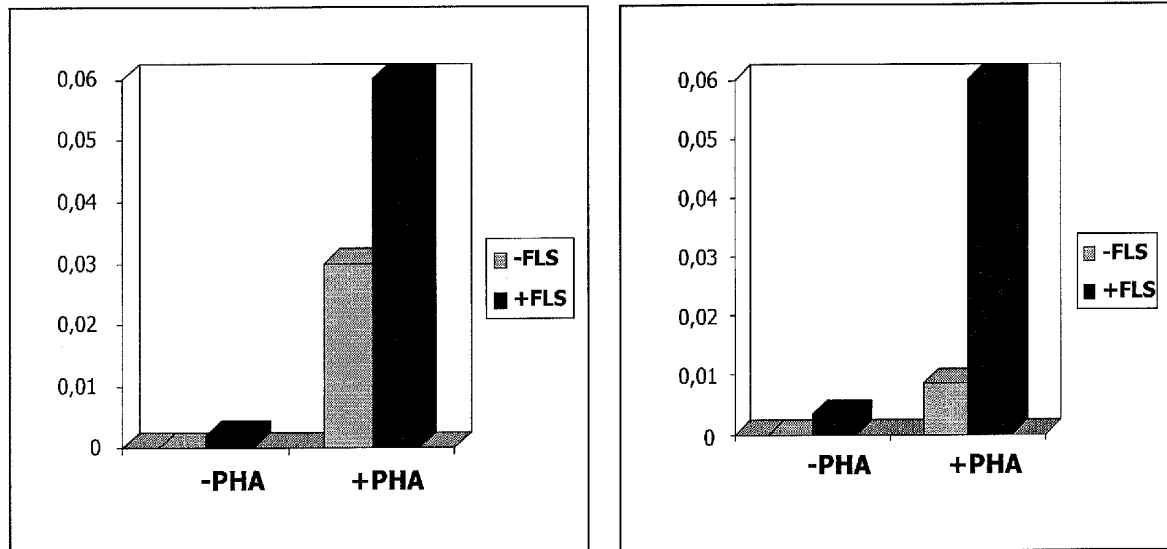


Figure 3

4 / 4



E1

E2

Figure 4



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 739944
FR 1054429

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	GUO ZHENXING ET AL: "Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 39, no. 10, octobre 2009 (2009-10), pages 2840-2849, XP002612947, ISSN: 0014-2980 * abrégé * * "FB-MSC promote the expansion of Th17 cells"; page 2842, colonne de droite - page 2843, colonne de gauche *	1-14	C12N5/0786
X	WO 2010/030947 A1 (UNIV FLORIDA; CHANG LUNG-JI [US]; PATEL EKTA SAMIR [US]) 18 mars 2010 (2010-03-18) * exemples 1-4 * * figure 4 *	1,3,4,7, 9-11,13	
X	MCGEACHY MANDY J ET AL: "Th17 cell differentiation: The long and winding road", IMMUNITY, vol. 28, no. 4, avril 2008 (2008-04), pages 445-453, XP002612948, ISSN: 1074-7613 * le document en entier *	10-12,14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12N
X	WO 2009/092087 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; KUCHROO VIJAY K [US]; ANDERSON DAVID E) 23 juillet 2009 (2009-07-23) * revendications 1-40 * ----- -/--	14	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 décembre 2010		Loubradou-Bourges, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 739944
FR 1054429

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	GONZALEZ M A ET AL: "Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells", ARTHRITIS AND RHEUMATISM 2009 JOHN WILEY AND SONS INC. USA LNKD- DOI:10.1002/ART.24405, vol. 60, no. 4, 2009, pages 1006-1019, XP002612949, ISSN: 0004-3591 * abrégé *	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	BAI LIANHUA ET AL: "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis.", GLIA 15 AUG 2009 LNKD- PUBMED:19191336, vol. 57, no. 11, 15 août 2009 (2009-08-15), pages 1192-1203, XP002612950, ISSN: 1098-1136 * abrégé *	1-14	
A	GHANNAM S ET AL: "Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype", JOURNAL OF IMMUNOLOGY 20100701 AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS USA LNKD- DOI:10.4049/JIMMUNOL.0902007, vol. 185, no. 1, 28 mai 2010 (2010-05-28), pages 302-312, XP002612951, ISSN: 0022-1767 * abrégé * ----- -/-	1-14	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 décembre 2010		Loubradou-Bourges, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 739944
FR 1054429

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	ELJAAFARI A ET AL: "MESENCHYMAL STEM CELLS PARTICIPATE IN THE LOOP LEADING TO AMPLIFICATION OF INFLAMMATION THROUGH SECRETION OF INTERLEUKIN (IL)6, ILB AND IL8", ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 69, no. Suppl. 2, février 2010 (2010-02), page A178, XP009142103, & 30TH EUROPEAN WORKSHOP FOR RHEUMATOLOGY RESEARCH; BAMBERG, GERMANY; MARCH 04 -07, 2010 * le document en entier * -----	1-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 décembre 2010		Loubradou-Bourges, N	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1054429 FA 739944**

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

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **07-12-2010**

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

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2010030947 A1	18-03-2010	AUCUN	
WO 2009092087 A2	23-07-2009	EP 2238241 A2	13-10-2010