

(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  
30 avril 2009 (30.04.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2009/053629 A2

(51) Classification internationale des brevets : Non classée

François [FR/FR]; 1 rue Charles Floquet, F-92120 Montrouge (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2008/051842

(74) Mandataire : CHAJMOWICZ, Marion; Becker & Associés, 25 rue Louis Le Grand, F-75 002 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :  
10 octobre 2008 (10.10.2008)

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
60/960,762 12 octobre 2007 (12.10.2007) US

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE [FR/FR]; 4, Place Jussieu, F-75005 Paris (FR). ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS [FR/FR]; 3 avenue Victoria, F-75004 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). UNIVERSITE PARIS XII [FR/FR]; 61 avenue du Général de Gaulle, F-94010 Creteil (FR).

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : COHEN, José [FR/FR]; 77-79 rue de la Mare, F-75020 Paris (FR). KLATZMANN, David [FR/FR]; 11 rue du Tage, F-75013 Paris (FR). MAURY, Sébastien [FR/FR]; 13, avenue de la République, F-94340 Joinville Le Pont (FR). LEMOINE,

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(54) Title: TREATMENT OF TUMOURS USING T LYMPHOCYTE PREPARATIONS

(54) Titre : TRAITEMENT DE TUMEURS PAR DES PREPARATIONS DE LYMPHOCYTES T

(57) Abstract: The invention relates to the treatment of a tumour in a patient, by injecting T lymphocytes depleted of regulatory T lymphocytes, and expressing a molecule enabling the specific destruction thereof, wherein the patient receives, beforehand, a non-myeloablative or myeloablative lymphopenia-inducing treatment.

(57) Abrégé : L'invention concerne le traitement d'une tumeur chez un patient, par injection de lymphocytes T déplétés en lymphocytes T régulateurs, et exprimant une molécule permettant leur destruction spécifique, le patient recevant au préalable un traitement lymphopéniant non myéloablatif ou myéloablatif.

WO 2009/053629 A2

## Traitement de tumeurs par des préparations de lymphocytes T

La présente invention concerne le domaine de la thérapie cellulaire des cancers. En particulier l'invention a trait au traitement des hémopathies malignes, après rechute ou en première intention.

### ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE DE L'INVENTION

L'efficacité de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques pour le traitement des hémopathies malignes, dont les leucémies, repose à la fois sur la myéloablation induite par le conditionnement mais aussi sur le transfert, au sein du greffon, de cellules immunocompétentes du donneur exerçant un effet anti-leucémique. Cet effet est dénommé "graft versus leukemia" (GVL) en anglais. L'existence d'un tel effet GVL a été initialement suggérée par des modèles animaux et des analyses statistiques rétrospectives effectuées chez l'homme comparant les taux de rechute de la leucémie entre les patients greffés avec un donneur allogénique ou syngénique, entre ceux recevant un greffon non manipulé ou T-déplété, et entre ceux ayant développé, ou pas, une maladie du greffon contre l'hôte (GVH) aigüe ou chronique (Horowitz, et al. 1990). Plus récemment, la démonstration d'un effet GVL a été apportée par la transfusion de leucocytes provenant du sang périphérique du donneur chez des patients en rechute après la greffe de CSH allogéniques. En effet, chez des patients présentant une rechute de leucémie myéloïde chronique (LMC) après greffe, il a été montré que l'injection de leucocytes provenant du donneur initial (injection de lymphocytes du donneur ou ILD) pouvait induire une nouvelle rémission, sans nécessiter de chimiothérapie ou de radiothérapie complémentaire (Kolb, et al 1990). Cette stratégie est devenue un traitement de première intention chez ces patients et a été développée pour d'autres pathologies hématologiques récidivantes après la greffe telles que les myelodysplasies, les leucémies aigüe lymphoblastiques (LAL) et les leucémies aigüe myéloblastiques (LAM), certains lymphomes, ou les myélomes. Initialement utilisée après greffe avec un donneur familial HLA géno-identique, l'ILD est aujourd'hui aussi utilisée dans le cadre des greffes avec un donneur volontaire de CSH non apparentés (Porter, et al. 2000 ; Dazzi, et al. 2000a).

Chez des patients en rechute après greffe, pour lesquels il y a peu d'alternative, et dont le pronostic est sévère, l'ILD constitue une option thérapeutique acceptable, à laquelle on peut néanmoins espérer apporter des améliorations.

Précédemment, plusieurs stratégies ont été développées dans le but d'amplifier la  
5 réponse anti-tumorale après ILD.

La première, développée par l'équipe de S. Slavin, visait à stimuler les Lymphocytes T du donneur soit in vitro avant l'injection soit à la fois in vitro mais aussi in vivo après l'injection, par de l'interleukine 2 (IL-2) recombinante humaine (Slavin, et al, 1996). Une telle injection de Lymphocytes T du donneur « activés » était réservée à des  
10 patients ne répondant pas à une injection de Lymphocytes T du donneur frais. Ainsi, chez 5 patients en situation de rechute cytologique de l'hémopathie maligne, l'injection de Lymphocytes T activés a permis d'obtenir une rémission complète de l'hémopathie qui n'avait pas été obtenue après injection de Lymphocytes T du donneur frais. Dans cette étude, il est néanmoins difficile d'attribuer l'efficacité de la seconde injection à  
15 l'activation des Lymphocytes T dans la mesure où il peut exister un effet cumulatif bénéfique des injections de Lymphocytes T du donneur, même à l'état frais (Dazzi et al, 2000b). Il faut aussi noter que depuis 1996, cette stratégie d'activation des Lymphocytes T par l' IL-2 n'a pas fait l'objet de publications venant confirmer son efficacité. De ce fait, son utilisation n'a pas connu de développement à une large  
20 échelle.

Une autre stratégie en cours de développement vise à améliorer la présentation des antigènes tumoraux par les cellules leucémiques et les rendre ainsi plus sensibles à l'effet GVL. Elle repose sur des données obtenues in vitro sur des cellules de leucémies myéloïdes, qui peuvent être différenciées en cellules dendritiques à l'aide de cytokines  
25 telles que l'interleukine 4 ou le granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) (Brouwer, et al 2000 ; Chen, et al, 2000). L'utilisation de GM-CSF in vivo est ainsi envisagée pendant la période entourant l'injection de lymphocytes T du donneur afin d'amplifier l'effet GVL attendu (Kolb, et al, 2004).

Une autre stratégie, proposée par Miller et al, 2007 consiste en un conditionnement du  
30 patient par une chimiothérapie lymphopénisante, avant une ILD. Ce conditionnement a conduit à une expansion des lymphocytes avec une activation immunitaire accrue.

De leur côté, Powell et al ont essayé d'administrer des lymphocytes autologues déplétés en lymphocytes T régulateurs à des patients atteints d'un mélanome (Powell et al, 2007).

## 5 RESUME DE L'INVENTION

Les inventeurs proposent maintenant d'effectuer une injection de lymphocytes T du donneur, combinée à un conditionnement lymphopéniant, myéloablatif ou non, du patient, dans le but d'augmenter l'effet anti-leucémique des lymphocytes injectés.

10

Plus précisément l'objet de l'invention est l'utilisation de lymphocytes T, déplétés en lymphocytes T régulateurs, et exprimant une molécule permettant leur destruction spécifique, pour la préparation d'une composition destinée à traiter une tumeur chez un patient, la composition étant destinée à être administrée au patient après un traitement  
15 lymphopéniant, myéloablatif ou non, de préférence non-myéloablatif.

Est également décrite une méthode pour traiter une tumeur, la méthode comprenant :

- le conditionnement du patient par un traitement lymphopéniant, de préférence non myéloablatif ;
- 20 - l'injection au patient de lymphocytes T, qui ont été préalablement déplétés en lymphocytes T régulateurs, et expriment une molécule permettant leur destruction spécifique.

Cette procédure permet de diminuer le rejet immunitaire contre les lymphocytes T, d'augmenter l'effet anti-leucémique des lymphocytes T injectés, et d'injecter des  
25 lymphocytes T provenant d'un fonds génétique différent de celui du premier donneur et du receveur.

Est également décrite une méthode pour traiter une tumeur en première intention, la  
30 méthode comprenant :

- le conditionnement du patient par un traitement lymphopéniant, myéloablatif ou non;

- l'injection au patient de cellules souches hématopoïétiques déplétées en lymphocytes T ; et
- l'injection au patient de lymphocytes T, qui ont été préalablement déplétés en lymphocytes T régulateurs, et expriment une molécule permettant leur destruction spécifique.

Selon les cas, on peut en effet utiliser des lymphocytes T autologues ou allogéniques, comme décrit en détails ci-après.

## 10 DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

### *Définitions*

Les lymphocytes T sont « déplétés » en lymphocytes T régulateurs, à savoir que la préparation de lymphocytes T administrée au patient ne comprend pratiquement plus de lymphocytes T régulateurs. De préférence, elle comprend moins de 10 % de la fraction des lymphocytes T régulateurs avant déplétion, de préférence encore moins de 1% de la fraction des lymphocytes T régulateurs avant déplétion.

Les lymphocytes T expriment une « molécule permettant leur destruction spécifique ». Il peut s'agir d'une molécule codée par un transgène ou une molécule exprimée naturellement par les lymphocytes T, lorsque ceux-ci sont allogéniques. Le terme « destruction spécifique » signifie que seuls les lymphocytes T administrés au patient seront détruits, pour empêcher le développement d'une réaction de GVH.

La « molécule permettant leur destruction spécifique » peut être par exemple un antigène du système HLA, les molécules Thy-1, récepteur NGF ou une forme tronquée du récepteur, ou encore un antigène non-immunogène et non exprimé naturellement par les lymphocytes T. Les lymphocytes T portant l'une ou l'autre de ces molécules peuvent alors être détruits spécifiquement par un sérum anti-lymphocytaire, ou des anticorps dirigés spécifiquement contre lesdits antigènes.

La « molécule permettant la destruction spécifique » des lymphocytes T peut également être une molécule codée par un « gène suicide ».

Le terme « gène suicide » se réfère à un gène codant pour une molécule toxique pour la cellule qui l'exprime, de manière conditionnelle.

Les lymphocytes T peuvent être utiles pour traiter le patient après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, en particulier dans le cas de rechute.

Le terme « rechute » signifie que la tumeur, qui avait montré une régression ou une stagnation, a repris son développement ou, le cas échéant, a métastasé.

- 5 Les lymphocytes T peuvent aussi être administrés en première intention, c'est à dire pour traiter des tumeurs qui n'ont pas été soignées auparavant chez le patient par une greffe de cellules souches hématopoïétiques,

#### ***Sources des lymphocytes T***

- 10 Le donneur est de préférence humain, et peut être un fœtus, un nouveau-né, un enfant, un adulte.

Les préparations de lymphocytes T sont obtenues par exemple de sang périphérique, du produit sanguin d'une lymphaphérèse, de ganglions lymphatiques périphériques, de la rate, du thymus, du sang de cordon, etc.

- 15 Avant d'être administrés au patient, les lymphocytes T peuvent être manipulés ex vivo de manière à exprimer une molécule permettant leur destruction spécifique, après élimination des lymphocytes T régulateurs. De préférence les lymphocytes Treg sont éliminés avant introduction transduction d'un gène codant pour la molécule permettant la destruction spécifique des lymphocytes T.

20

Dans le cas d'un traitement d'un patient ayant déjà reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes T proviennent de préférence du premier donneur de cellules souches hématopoïétiques. Mais il est également possible que lymphocytes T ne proviennent ni du donneur ni du receveur de la greffe de cellules souches

25 hématopoïétiques.

#### ***Déplétion en lymphocytes T régulateurs (Treg) :***

En 1995, le groupe de Shimon Sakaguchi au Japon a identifié les lymphocytes Treg comme constituant une sous-population de lymphocytes T CD4+, représentant environ

30 5 % d'entre eux, et sont caractérisées par une expression forte et constitutive du marqueur CD25, qui est le récepteur de l'IL-2 (Sakaguchi, et al, 1995).

Des données plus récentes montrent que les Treg humains répriment l'expression du

CD127, qui est le récepteur de l'IL-7 (Seddiki et al, 2006a). Il a également été montré que les Treg avaient un phénotype de cellules naïves CD45RA+ (Seddiki et al, 2006b).

De manière avantageuse, la déplétion en lymphocytes T régulateurs est réalisée ex vivo  
5 par sélection négative des cellules CD25+ ou sélection positive des cellules CD127+.

L'élimination des cellules Treg peut être réalisée en utilisant des techniques de  
séparation par affinité, notamment la séparation magnétique, utilisant des billes  
magnétiques recouvertes d'anticorps, la chromatographie par affinité, des agents  
cytotoxiques liés à un anticorps monoclonal ou utilisés en combinaison avec un  
10 anticorps monoclonal. Les techniques de séparation peuvent utiliser par exemple des  
trieurs de cellules actives par fluorescence.

Les réactifs d'affinité peuvent être des récepteurs spécifiques ou des ligands des  
marqueurs indiqués ci-dessus. De préférence il s'agit d'anticorps, qui peuvent être  
15 conjugués par exemple à des billes magnétiques, à de la biotine, ou à des  
fluorochromes. Des détails sur les techniques possibles de séparation sont présentés  
dans la demande de brevet US2006/0063256.

Comme dans Attia et al, 2006, qui élimine les lymphocytes T régulateurs sur la base de  
leur expression du CD25 pour augmenter l'effet antitumoral d'une injection de  
20 lymphocytes T dans le cas de cancers solides, on peut d'abord séparer les cellules  
CD4+, puis parmi celles-ci les cellules CD25+.

Dans un mode de réalisation particulier, les donneurs subissent une cytophérèse  
correspondant à deux-trois masses sanguines en utilisant de préférence une machine  
25 Cobe Spectra. Cette technique de prélèvement permet d'obtenir en moyenne 1 à 2 x 10<sup>10</sup>  
cellules mononucléées contenant 20 à 30% de monocytes, 70 à 80 % de lymphocytes T,  
B et cellules NK. Les cellules sont ensuite déplaquettées et lavées en circuit clos sur  
machine COBE 2991 permettant ainsi de recueillir une population cellulaire contenant  
au moins 5 x10<sup>9</sup> lymphocytes T.

30 La stratégie de déplétion des lymphocytes Treg est réalisée à partir de cellules  
provenant soit de produit frais de cytophérèse ou soit de produit congelé de cytophérèse  
notamment lorsque les donneurs n'ont pu être prélevés dans un des centres impliqués

dans l'essai. La déplétion des Lymphocytes Treg repose sur l'élimination des cellules CD25-positives. Pour cela un kit de séparation cellulaire en circuit clos Miltényi est utilisé. En bref, les cellules fraîches ou décongelées sont marquées avec un anticorps monoclonal anti-CD25 directement couplé à des billes magnétiques. Les cellules sont  
5 ensuite déposées sur colonne de purification et séparées par l'appareil CliniMACS. La fraction positive est enrichie en cellules CD25, la fraction négative est déplétée en cellules CD25. Cette procédure permet de déléter à plus de 95% les cellules CD25<sup>+</sup> tout en conservant une population cellulaire contenant plus de  $2 \times 10^9$  lymphocytes T. Tandis qu'une fraction des cellules est destinée aux tests de contrôle qualité, à la  
10 constitution d'une cellulothèque, la majorité de cellules est remise en culture pour être transduites, amplifiées en culture et sélectionnées avant d'être conditionnée en poches de façon à être injectées aux patients.

***Transduction de molécules permettant la destruction spécifique des lymphocytes T :***

15 Dans un mode de réalisation particulier, les lymphocytes T sont modifiés de manière à exprimer un transgène codant pour une molécule permettant la destruction spécifique desdits lymphocytes T.

De manière préférentielle, le transgène est un gène « suicide ». Par exemple il peut s'agir d'un gène qui code pour une molécule apte à phosphoryler un analogue de  
20 nucléoside en une molécule monophosphatée, elle-même convertible par des enzymes cellulaires en nucléotide triphosphaté incorporable dans des acides nucléiques en cours d'élongation sous l'effet des polymérase avec pour effet l'interruption d'élongation des chaînes. Ledit analogue de nucléoside peut être par exemple l'acyclovir ou le gancyclovir. Ladite molécule exprimée par le gène « suicide » peut être notamment la  
25 thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès simplex de type 1.

La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex 1 (HSV1-TK), est apte, lorsqu'elle est présente en une concentration suffisante dans les cellules en cause, à phosphoryler des analogues de nucléosides, tels que l'acyclovir (9-t(2-hydroxyethoxy)méthyl]guanine) ou le gancyclovir (9-[1,3-IOhydroxy-2- propoxyméthyl]guanine), en des molécules  
30 monophosphatées, elles-mêmes convertibles par des enzymes cellulaires en nucléotides triphosphatés incorporables dans des acides nucléiques en cours d'élongation sous l'effet

des polymérase au sein desdites cellules, avec pour effet l'interruption d'élongation de chaînes et la mort cellulaire qui s'ensuit.

En cas de GVH, on administre alors au patient l'analogue de nucléoside (par exemple le gancyclovir).

5 On peut avoir recours à toute technique adéquate pour transférer le transgène, notamment par infection in vitro des cellules correspondantes par une pseudo-particule virale de type Moloney amphotrope. Ces particules virales sont produites par une lignée cellulaire dite de "packaging" que l'on aura construite au préalable. Une lignée de packaging est capable de fabriquer tous les éléments structuraux constituant une  
10 particule virale, mais est incapable d'introduire dans des particules virales en voies de maturation les ARNs viraux produits par cette lignée cellulaire. C'est pourquoi, ces lignées dites de packaging fabriquent en permanence des particules virales vides.

L'introduction d'une construction génétique appropriée, qui contient l'ADN recombinant tel qu'il a été défini plus haut, permet à ces lignées de packaging d'être introduites dans  
15 les particules virales vides réalisant ainsi des pseudo-particules virales. Ces pseudo-particules virales sont capables d'infecter différentes cellules cibles, cellules cibles qui varient selon la lignée de packaging qu'on a utilisée au départ. Par exemple, si cette lignée de packaging est dérivée d'un virus dit de Moloney amphotrope, les particules virales produites infectent parfaitement les cellules hématopoïétiques humaines.

20 Les techniques classiques pour la production de lignées de cellules transformées par un vecteur rétroviral (voir par exemple Danos et al, 1988 et Markowitz et al, 1988), peuvent être transposées à la production de lymphocytes. De même les techniques de transfert génétique mettant en oeuvre de tels systèmes (Kasid et al, 1990) peuvent être appliquées au transfert, chez l'homme, des cellules telles qu'elles ont été définies plus  
25 haut.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les lymphocytes T peuvent être modifiés génétiquement en utilisant un vecteur rétroviral SFCMM-2 codant pour le gène « suicide » de fusion HSV-TK/Neo, selon le procédé de transduction décrit dans Ciceri et al, 2007.

30 Un exemple de protocole de transduction comprend une première phase de culture cellulaire de 1 à 6 jours pour induire l'activation et la mise en cycle des cellules puis une deuxième phase d'infection rétrovirale de 24 heures. L'activation et la mise en

cycle des lymphocytes est obtenue en 1 à 6 jours après activation par un anticorps anti-CD3 en milieu RPMI contenant 10% de sérum humain et 600 UI/ml d'interleukine 2 recombinante humaine. La veille de l'infection, le milieu de culture est renouvelé. L'infection proprement dite est réalisée avec du surnageant contenant soit des particules  
5 rétrovirales pseudotypées avec une enveloppe provenant du virus de la leucémie du Gibbon (GALV) soit des particules lentivirales pseudotypées avec une enveloppe provenant du virus VSV et contenant le vecteur rétroviral bicistronique Thy-1-IRES-HSV1-TK. Après infection rétrovirale, les cellules sont remises en culture avant d'être sélectionnées.

10 La sélection des lymphocytes transduits peut être effectuée grâce à la présence du gène rapporteur Thy-1 qui permet de sélectionner les lymphocytes T transduits à l'aide de billes immunomagnétiques. Ainsi, les lymphocytes T sont incubés en présence d'un anticorps monoclonal anti-Thy-1 directement couplé à la biotine. Les cellules sont ensuite incubées avec des microbilles couplées à la Streptavidine puis déposées sur une  
15 colonne magnétique. Les cellules transduites Thy-1 positives sont séparées par technique immunomagnétique. Après sélection immunomagnétique, une population de lymphocytes T Thy-1 positifs purifiée au moins 90% est obtenue. Après sélection, les lymphocytes sont soit injectés au receveur soit congelés dans l'attente d'une utilisation ultérieure.

20

***Validation phénotypique et fonctionnelle des préparations cellulaires:***

De préférence, les préparations de lymphocytes T sont testées pour vérifier leur phénotype. Des exemples de tels tests sont décrits ci-après.

a) Analyse immunophénotypique : les populations cellulaires sont étudiées par  
25 cytométrie en flux avant et après déplétion en cellules CD25, avant et après modification génétique, avant et après culture, avant et après sélection des cellules transduites. Pour cela, des techniques de double triple voire quadruple marquages des cellules par des anticorps monoclonaux sont utilisées. Les pourcentages de cellules B, NK et monocytes sont déterminées avec les marqueurs CD19, CD14, CD16, CD56,  
30 CD45. Les sous-populations de lymphocytes T sont étudiées en utilisant les marqueurs CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD62L. Le pourcentage de Lymphocytes Treg

est évalué sur le marqueur CD25 et sur le marqueur FOXP3 ou CD127 ou CD45RA seul et en combinaison de marqueurs

b) Analyse fonctionnelle : Les lymphocytes T sont analysés sur le plan fonctionnel avant et après chacune des étapes de manipulation selon deux méthodes :

5 - Stimulation allogénique : Les cellules du donneur déplétées ou non en Lymphocytes Treg sont mises en présence de cellules mononucléées irradiées du receveur, les cellules mononucléées irradiées provenant d'un volontaire sont utilisées comme contrôle positif. La prolifération cellulaire dans ces différentes conditions, évaluée par test d'incorporation en thymidine tritiées, permet de comparer si la déplétion en  
10 Lymphocytes Treg induit in vitro une augmentation de l'alloréactivité. Dans ces conditions de stimulation allogénique, on peut étudier également par cytométrie de flux la sécrétion intra-cytoplasmique de cytokines (IFN-Gamma, IL-2, IL-4, IL-10) par les lymphocytes T.

- Réponse aux antigènes de rappel : Les cellules déplétées ou non en Lymphocytes Treg  
15 du donneur sont cultivées pendant 4 jours en présence de cellules dendritiques autologues irradiées chargées ou non avec différents antigènes tels que la toxine tétanique, la tuberculine (PPD) et/ ou la candidine. Les cellules dendritiques générées à partir des monocytes du donneur servent de cellules présentatrices. La prolifération lymphocytaire T en réponse à ces antigènes de rappel est évaluée par test  
20 d'incorporation de thymidine tritiée. On peut ainsi apprécier in vitro si les populations déplétées en Lymphocytes Treg ont une meilleure capacité ou non à répondre à des antigènes classiques de rappel.

### ***Patient***

25 Le patient visé est un humain, quel que soit son âge et son sexe. Lorsque le patient est âgé, une greffe de cellules souches hématopoïétiques n'est pas indiquée. On préférera alors administrer les lymphocytes T en première intention.

Le patient est atteint d'une tumeur, en particulier d'une tumeur cancéreuse. Il peut s'agir d'une tumeur solide ou d'une hémopathie maligne.

30 Parmi les tumeurs solides, on peut citer les cancers du poumon, peau, rein, vessie, os, foie, pancréas, ovaires, sein, utérus, prostate, colon, colorectal, tête et cou, etc.

Parmi les hémopathies malignes, on peut citer la leucémie aiguë, la myelodysplasie, ou le syndrome lymphoprolifératif (tel leucémie lymphoïde chronique, myélome, lymphome). les myelodysplasies, les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et les leucémies aiguës myélobastiques (LAM), des lymphomes, ou un myélome.

- 5 Le patient peut notamment souffrir d'une rechute tumorale, par exemple une rechute d'hémopathie maligne.

Dans un mode de réalisation particulier, le patient a subi une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Dans ce cas, les lymphocytes T administrés peuvent ne provenir ni du donneur ni du receveur de la greffe de cellules souches  
10 hématopoïétiques.

De préférence l'allogreffe antérieure de CSH provient d'un donneur familial, de préférence HLA géno-identique, ou d'un donneur volontaire non apparenté. Il peut s'agir d'une greffe à conditionnement myelo-ablatif ou non myelo-ablatif, et elle peut  
15 avoir été T-déplétée ou pas.

Le patient visé peut présenter une rechute moléculaire, cytogénétique, ou cytologique de l'hémopathie quelle qu'en soit la date après la greffe.

Les critères de rechute sont définis selon l'hémopathie traitée.

- 20 Par exemple, pour une Leucémie aiguë (LAM ou LAL) et myelodysplasie:

- persistance de blastes sanguins et/ou excès de blastes médullaires (>5%), et/ou
- en cas de maladie résiduelle analysable sur le plan moléculaire: absence de diminution (d'au moins un log) du signal moléculaire par rapport au point pré-ILD, ou diminution suivie d'une réascension (d'au moins un log par rapport au nadir).

- 25 · en cas de maladie résiduelle analysable sur le plan cytogénétique (classique ou FISH): absence de diminution (d'au moins 50%) du nombre de mitoses portant la(les) anomalie(s), ou diminution suivie d'une réascension (d'au moins 50% par rapport au nadir).

Pour un myélome:

- 30 · Stabilité ou augmentation du pic monoclonal par rapport au point pré-ILD.
- Myélome à chaînes légères: Stabilité ou augmentation des paramètres évaluables (lésions osseuses, protéinurie, infiltration médullaire plasmocytaire).

- Absence de diminution, diminution suivi d'une réaugmentation, ou apparition d'une tumeur plasmocytaire.

Pour une leucémie lymphoïde chronique, des lymphomes:

- Stabilité ou augmentation du clone (évalué par cytométrie de flux, biologie moléculaire) par rapport au point pré-ILD.

- Absence de diminution ou diminution suivi d'une réaugmentation du syndrome tumoral (évalué sur le plan clinique et/ou radiologique) par rapport au point pré-ILD.

Lorsqu'ils sont destinés à être administrés au patient en première intention, les lymphocytes T peuvent être autologues vis à vis du patient. Ils expriment alors un transgène, de préférence un gène « suicide », permettant leur destruction spécifique. Les lymphocytes T administrés peuvent aussi être allogéniques. Ils peuvent alors exprimer un transgène permettant leur destruction spécifique, ou peuvent être détruits par un sérum antilymphocytaire.

Lorsqu'il sont destinés à être administrés à un patient ayant déjà subi une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes T sont allogéniques, ou proviennent de tiers (à savoir ni du patient, ni du donneur de la première greffe). Ils peuvent alors exprimer un transgène permettant leur destruction spécifique, ou peuvent être détruits par un sérum antilymphocytaire

20

#### ***Conditionnement du patient***

Avant l'administration des lymphocytes T, le patient reçoit un traitement lymphopéniant non-myéloablatif.

De préférence le traitement lymphopéniant non myéloablatif est appliqué de 2 à 8 jours avant l'administration des lymphocytes T.

Le patient peut aussi recevoir un traitement lymphopéniant et myéloablatif auquel cas il reçoit en plus une greffe de cellules souches hématopoïétiques plus la préparation de lymphocytes T

Une revue de ce type de traitement est présentée dans Petersen, 2007.

Le patient peut être totalement irradié (« total body irradiation », par exemple à 2Gy), et/ou recevoir une chimiothérapie à base de cyclophosphamide, fludarabine, et/ou endoxan. Par exemple Miller et al, 2007, décrivent un traitement lymphopéniant non

myéloablatif, qui comprend une injection IV de cyclophosphamide 50mg/kg une fois à J-6 et J-5, et injection de fludarabine 25mg/m<sup>2</sup> de J-6 à J-2 (J étant le jour de la greffe des lymphocytes T). Powell et al ; 2007, décrivent un autre protocole comprenant l'injection de fludarabine 25mg/m<sup>2</sup> pendant 5 jours et d'endoxan 60mg/kg/jours pendant 2 jours.

### *Exemple de protocole*

Selon un mode de réalisation particulier, la composition à injecter au patient à traiter comprend des lymphocytes T modifiés obtenus par :

- 10 i. lymphaphérèse du donneur ;
- ii. élimination des lymphocytes T régulateurs
- iii. transduction d'un gène codant pour une molécule permettant la destruction spécifique des lymphocytes T,
- iv. puis culture des lymphocytes T ainsi modifiés pendant dix à 21 jours.

15

Plus précisément, le protocole suivant peut être appliqué:

Vers J-15, on prélève des lymphocytes T du donneur et on élimine ex vivo les T régulateurs.

20 Puis le même jour on active in vitro (par exemple OKT3/IL-2) pendant une durée de quelques heures à 6 jours, puis on infecte les cellules en présence d'un surnageant viral (rétro ou lentiviral) comprenant le gène suicide codant pour la TK et un gène de sélection membranaire, par exemple Thy.1.

25 Puis on cultive les lymphocytes T jusqu'à l'obtention du nombre de cellules désirées (par exemple 15 jours). Les lymphocytes exprimant le gène TK seront sélectionnés sur la base de l'expression du gène Thy-1 utilisé comme gène rapporteur.

A J-6, on administre le traitement lymphopéniant au patient.

A J0, on injecte les lymphocytes T TK+ Treg déplétés, à des doses comprises entre 2.10<sup>6</sup> et 10<sup>8</sup> CD3+/kg.

30 En cas de GVH, du ganciclovir est administré quelque soit le moment post injection des lymphocytes T du donneur.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 5 - Attia P, Powell DJ Jr, Maker AV, Kreitman RJ, Pastan I, Rosenberg SA.: J Immunother (1997). 2006 Mar-Apr;29(2):208-14. Selective elimination of human regulatory T lymphocytes in vitro with the recombinant immunotoxin LMB-2.
- 10 - Brouwer, RE, van der Hoorn, M, Kluin-Nelemans, HC, van Zelder-Bhola, S, Willemze, R, and Falkenburg, JH. 2000. The generation of dendritic-like cells with increased allostimulatory function from acute myeloid leukemia cells of various FAB subclasses. Hum Immunol. 61:565-574.
- 15 - Ciceri F, Bonini C, Markt S, Zappone E, Servida P, Bernardi M, Pescarollo A, Bondanza A, Peccatori J, Rossini S, Magnani Z, Salomoni M, Benati C, Ponzoni M, Callegaro L, Corradini P, Bregni M, Traversari C, Bordignon C. 2007 Blood. 109(11):4698-707. Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation.
- 20 - Chen, X, Regn, S, Raffegerst, S, Kolb, HJ, and Roskrow, M. 2000. Interferon alpha in combination with GM-CSF induces the differentiation of leukaemic antigen-presenting cells that have the capacity to stimulate a specific anti-leukaemic cytotoxic T-cell response from patients with chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 111:596-607.
- 25 - Danos, O. and Mulligan R. C. 1988. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6460-6464.
- 30 - Dazzi, F, Szydlo, RM, Cross, NC, Craddock, C, Kaeda, J, Kanfer, E, Cwynarski, K, Olavarria, E, Yong, A, Apperley, JF, et al. 2000a. Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. Blood. 96:2712-2716.

- Dazzi, F, Szydlo, RM, Craddock, C, Cross, NC, Kaeda, J, Chase, A, Olavarria, E, van Rhee, F, Kanfer, E, Apperley, JF, et al. 2000b. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 95:67-71.
- 5
- Horowitz, MM, Gale, RP, Sondel, PM, Goldman, JM, Kersey, J, Kolb, HJ, Rimm, AA, Ringden, O, Rozman, C, Truitt, RL, et al. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 75:555-562.
- 10
- Kasid, A., Morecki, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Culver, K., Freeman, S., Director, E. Lotze, M. T., Blaese, R. M. Anderson., W. F., and Rosenberg, S. A. 1990. Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. *Proc. Natl. Sci. USA* 87, 473-477.
- 15
- Kolb, HJ, Mittermuller, J, Clemm, C, Holler, E, Ledderose, G, Brehm, G, Heim, M, and Wilmanns, W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 76:2462-2465.
- Kolb, HJ, Schmid, C, Barrett, AJ, and Schendel, DJ. 2004. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood*. 103:767-776.
- 20
- Miller JS, Weisdorf DJ, Burns LJ, Slungaard A, Wagner JE, Verneris MR, Cooley S, Wangen R, Fautsch SK, Nicklow R, Defor T, Blazar BR. 2007 *Blood*.110(7):2761-3, Lymphodepletion followed by donor lymphocyte infusion (DLI) causes significantly more acute graft-versus-host disease than DLI alone.
- 25
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A. 1988. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167:400-406.
- 30
- Petersen 2007. *Medical Bulletin*, 54 :112-39. Alloreactivity of therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies.

- Porter, DL, Collins, RH, Jr., Hardy, C, Kernan, NA, Drobyski, WR, Giralt, S, Flowers, ME, Casper, J, Leahey, A, Parker, P, et al. 2000. Treatment of relapsed leukemia after unrelated donor marrow transplantation with unrelated donor leukocyte infusions. *Blood*. 95:1214-1221.
- 5
- Powell DJ Jr, de Vries CR, Allen T, Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. 2007 Inability to mediate prolonged reduction of regulatory T Cells after transfer of autologous CD25-depleted PBMC and interleukin-2 after lymphodepleting chemotherapy. *J Immunother* May-Jun;30(4):438-47.
- 10
- Sakaguchi, S, Sakaguchi, N, Asano, M, Itoh, M, and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 155:1151-1164.
- 15
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B.2006a. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. Jul 10;203(7):1693-700.
- 20
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, Fazekas de Saint Groth B.2006b. Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life. *Blood*.107(7):2830-8.
- 25
- Slavin, S, Naparstek, E, Nagler, A, Ackerstein, A, Samuel, S, Kapelushnik, J, Brautbar, C, and Or, R. 1996. Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 87:2195-2204.
- 30

## Revendications

- 5           1. Utilisation de lymphocytes T, déplétés en lymphocytes T régulateurs, et exprimant une molécule permettant leur destruction spécifique, pour la préparation d'une composition destinée à traiter une tumeur chez un patient, la composition étant destinée à être administrée au patient après un traitement lymphopéniant.
- 10
2. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle la tumeur est une hémopathie maligne.
3. Utilisation selon la revendication 2, dans laquelle l'hémopathie maligne est une
- 15           leucémie aigüe, une myélodysplasie ou un syndrome lymphoprolifératif.
4. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle la tumeur est une tumeur solide.
- 20           5. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle les lymphocytes T expriment un gène « suicide » permettant leur destruction spécifique.
6. Utilisation selon la revendication 5, dans laquelle le gène dit « suicide » code pour une molécule capable de réagir avec un analogue de nucléoside pour
- 25           conduire à la mort desdits lymphocytes T.
7. Utilisation la revendication 6, dans laquelle ladite molécule codée par le gène « suicide » est une molécule apte à phosphoryler un analogue de nucléoside en une molécule monophosphatée, elle-même convertible par des enzymes
- 30           cellulaires en nucléotide triphosphaté incorporable dans des acides nucléiques en cours d'élongation sous l'effet des polymérases avec pour effet l'interruption d'élongation des chaînes.

8. Utilisation selon la revendication 7, dans laquelle ledit analogue de nucléoside est l'acyclovir ou le gancyclovir.
- 5 9. Utilisation selon la revendication 7, dans laquelle ladite molécule codée par le gène « suicide » est la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1.
10. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle le patient souffre d'une rechute cancéreuse, après une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.
- 10 11. Utilisation selon la revendication 10, dans laquelle lesdits lymphocytes T ne proviennent ni du donneur ni du receveur de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.
- 15 12. Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle les lymphocytes T sont destinés à être administrés au patient en première intention, ledit patient n'ayant pas subi de greffe de cellules souches hématopoïétiques.
- 20 13. Utilisation selon la revendication 12, dans laquelle les lymphocytes T sont autologues vis à vis du patient et expriment un transgène permettant leur destruction spécifique.
- 25 14. Utilisation l'une des revendications 1 à 9, dans laquelle les lymphocytes T administrés au patient sont des lymphocytes T allogéniques.
- 30 15. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 14, dans laquelle la déplétion en lymphocytes T régulateurs est réalisée ex vivo par sélection négative des cellules CD25+ ou sélection positive des cellules CD127+.
16. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 15, dans laquelle le traitement lymphopéniant est non myéloablatif et consiste, de préférence, en une administration de cyclophosphamide, fludarabine et/ou endoxan.

17. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 16, dans laquelle la composition est destinée à être administrée de 2 à 8 jours après le traitement lymphopéniant non myéloablatif.

5

18. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 17, dans laquelle la composition comprend des lymphocytes T modifiés obtenus par :

- i. lymphaphérèse du donneur ;
- ii. élimination des lymphocytes T régulateurs
- 10 iii. transduction d'un gène codant pour une molécule permettant la destruction spécifique des lymphocytes T,
- iv. puis culture des lymphocytes T ainsi modifiés pendant 10 à 21 jours.