

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑳ Date de dépôt : 03.04.01.

㉑ Priorité :

㉒ Date de mise à la disposition du public de la demande : 04.10.02 Bulletin 02/40.

㉓ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

㉔ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

㉕ Demandeur(s) : NEUROTECH Société anonyme — FR.

㉖ Inventeur(s) : OSTANKOVITCH MARINA, CHAUX PASCAL et CROUZET JOEL.

㉗ Titulaire(s) :

㉘ Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ SIMONNOT.

㉙ ASSOCIATION D'UN ANTIGENE TUMORAL ET D'UN SYSTEME DE DELIVRANCE D'UNE CYTOKINE OU D'UNE CHEMOKINE A DES FINS D'IMMUNOTHERAPIE DU CANCER.

㉚ La présente invention a pour objet une association de deux substances actives dans l'immunothérapie anti-tumorale pour être administrée à un patient, caractérisée en ce que la première substance est un antigène tumoral ou un mélange d'antigènes tumoraux et la seconde substance est un système de délivrance d'une cytokine ou d'une chémokine immunostimulante. La première substance active est avantageusement un lysat de cellules tumorales et la seconde substance active est des cellules modifiées génétiquement exprimant de façon stable un gène codant pour une cytokine ou chémokine immunostimulante.

FR 2 822 707 - A1



ASSOCIATION D'UN ANTIGENE TUMORAL ET D'UN  
SYSTEME DE DELIVRANCE D'UNE CYTOKINE OU D'UNE CHEMOKINE A  
DES FINS D'IMMUNOTHERAPIE DU CANCER.

5                   La présente invention concerne le domaine du  
traitement des cancers et consiste à administrer à un  
patient cancéreux une association de composants  
potentialisant mutuellement leur effet immunothérapeutiques  
*in vivo*. Plus particulièrement, l'invention concerne  
10 l'association d'un système de délivrance d'une cytokine ou  
d'une chémokine stimulant le système immunitaire et  
d'antigènes tumoraux, délivrés par exemple sous forme de  
lysats cellulaires.

15                   De nombreux arguments expérimentaux et  
cliniques ont montré que les cellules du système  
immunitaire pouvaient contrôler le développement et la  
croissance tumorale. Le rôle capital des lymphocytes T  
comme effecteurs de la réponse immunitaire anti-tumorale  
20 est largement confirmé dans de nombreux modèles animaux,  
dans lesquels la régression et la prévention des lésions  
tumoraux est le plus souvent dépendante de ce type de  
cellules.

25                   Divers mécanismes peuvent générer des épitopes  
antigéniques reconnus par des lymphocytes T anti-tumoraux.  
Ces épitopes peuvent provenir de gènes normaux dont  
l'expression est limitée aux cancers et aux cellules de la  
lignée germinale mâle (MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, NY-ESO-1).  
Certains antigènes sont les produits de gènes codant pour  
30 des antigènes de différenciation (*tyrosinase, gp100,*

*MelanA*, *TRP-1* et *TRP-2*) ou proviennent de gènes mutés dans les cellules tumorales (mutation de *CDK4*, *caténine B*, *caspase 8*, *Ras*, *p53*). Enfin, certains antigènes sont codés par des gènes sur-exprimés dans les tumeurs (*p53*, *Her-2/neu*, *PRAME*) ou sont des antigènes viraux (protéine E7 du virus HPV16) (Curr Opin Immunol 1997 Oct ;9(5) :684-93). L'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale inclut la présentation des antigènes associés aux tumeurs, la sélection et l'activation des lymphocytes T spécifiques, la migration de ces cellules au site tumoral et la reconnaissance des antigènes tumoraux conduisant à l'élimination des cellules tumorales.

Un antigène, en soi, n'est pas immunogène. Il doit être présenté à des lymphocytes T par des cellules professionnelles présentatrices de l'antigène, telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B en périphérie, ou telles que les astrocytes ou les cellules de la microglie dans le système nerveux central. Les lymphocytes T reconnaissent sur ces cellules présentatrices de l'antigène des peptides dérivés de protéines endogènes ou exogènes, après un processus biologique appelé apprêtement (Immunol. Today 2000 Jul;21(7):317-9) (Immunol. Res. 1999;20(3):195-205). Les antigènes reconnus par les lymphocytes T CD8 sont généralement des peptides de 8 à 10 acides aminés associés aux molécules HLA de classe I, alors que les antigènes reconnus par les lymphocytes T CD4 sont généralement des peptides de 14 à 22 acides aminés présentés par les molécules HLA de classe II.

La progression tumorale résulte souvent de l'absence de reconnaissance des antigènes tumoraux par le système immunitaire, ou de l'absence de réponse immunitaire appropriée (Crit Rev Oncog. 2000;11(2):97-133). Une première approche dans l'immunothérapie du cancer est l'identification d'antigènes associés aux tumeurs reconnues par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Des techniques variées ont été utilisées afin d'identifier des peptides tumoraux présentés à des CTL. Pour chacune d'elles, il est important de prouver que les CTL obtenus *in vitro* et dirigés contre ces peptides reconnaissent les cellules exprimant la protéine parentale endogène.

La mort cellulaire peut être obtenue par différents procédés conduisant à l'apoptose ou la nécrose. L'utilisation de matériel tumoral sous forme de corps apoptotiques peut engendrer, sans restriction liée aux molécules HLA, la présentation de multiples antigènes présentés à la fois par les molécules HLA de classe II et de classe I par des cellules présentatrices de l'antigène, à des lymphocytes T CD4 et CD8 respectivement (J. Exp. Med. 2000 Dec 4;192(11):1535-44). Des antigènes exogènes peuvent en effet avoir accès au cytosol et à la voie de présentation via les molécules HLA de classe I (Reimann J, Schirmbeck R., Immunol. Rev. 1999 Dec ;172 :131-52). Les lymphocytes T CD4 restreints par les molécules HLA de classe II peuvent exercer des fonctions de type « helper » impliquées dans l'induction et dans le maintien de la réponse cytotoxique. En outre, ils peuvent avoir des effets soit directs contre les tumeurs exprimant les molécules HLA

de classe II (Qi L, Rojas JM, Ostrand-Rosenberg S. J Immunol 2000 Nov 15 ;165(10) :5451-61), soit indirects en activant d'autres cellules effectrices telles que les macrophages, les éosinophiles et les cellules NK.

5                    La lyse des cellules tumorales par nécrose permet leur relargage de « Heat Shock Proteins » (HSP), protéines intracellulaires solubles, capables d'interagir avec les cellules présentatrices de l'antigène (Int. Immunol. 2000 Nov;12(11):1539-46). Les HSP sont des  
10 protéines chaperonnes liant des peptides antigéniques (J. Biol. Chem. 2000 Feb 25;275(8):5472-7). Elles interagissent avec les cellules présentatrices de l'antigène par l'intermédiaire de récepteurs tels que CD91 ou CD14, entraînant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires  
15 telles que TNF- $\alpha$ , IL-12, GM-CSF et IL1- $\beta$  et la présentation des peptides en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I sur les cellules présentatrices de l'antigène (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1997 Nov 25;94(24):13146-51) (J. Immunol. 1999 Apr  
20 1;162(7):3757-60) (J Immunol. 2000 Jan 1;164(1):13-7) (J Immunol. 1999 Aug 1;163(3):1398-408). L'immunisation de souris avec HSP gp96 induit la maturation et la migration de cellules présentatrices de l'antigène au sein des ganglions lymphatiques. Il a été montré que les complexes  
25 HSP-peptides isolés de cancers murins induisaient une immunité protectrice et l'activation de lymphocytes T anti-tumoraux spécifiques du cancer à partir duquel les HSP avaient été isolées.

                  La progression tumorale est souvent associée à  
30 un défaut de l'immunité cellulaire et à une diminution de

la production de cytokines ou de chémokines impliquées dans cette immunité. L'identification et le clonage de gènes codant pour des cytokines ou des chémokines spécifiques a permis une avancée importante concernant la compréhension des réponses immunitaires anti-tumorales. La modulation des réponses immunes par l'utilisation de cytokines ou de chémokines recombinantes est l'une des stratégies utilisées pour la thérapie anti-tumorale. En effet, la différenciation de lymphocytes T naïfs en cellules effectrices est régulée par les cytokines envers lesquelles sont exposées ces cellules T au moment de la stimulation antigénique. Des études pré-cliniques ont montré que des cytokines stimulant les réactions immunitaires médiées par les lymphocytes T helper de type I, lorsqu'elles sont induites au site tumoral, entraînaient une réponse immunitaire anti-tumorale.

Afin d'améliorer les stratégies consistant à employer séparément un lysat de cellules tumorales et une cytokine ou une chémokine immunostimulante en immunothérapie anti-tumorale, la Demanderesse a maintenant développé une technologie permettant de délivrer localement et de façon soutenue une cytokine ou une chémokine immunostimulante, en combinaison avec une source d'antigène représentée par des corps apoptotiques et/ou nécrotiques provenant de cellules tumorales.

Les cytokines exerçant leurs effets modulateurs de façon paracrine au site antigénique, cette combinaison peut être placée directement au voisinage de la tumeur ou dans un site périphérique approprié pour l'initiation d'une

réponse immunitaire. Ce mode de délivrance permet d'obtenir d'une part des concentrations élevées de cytokine au niveau du site d'implantation tout en minimisant une éventuelle toxicité systémique, d'autre part une grande diversité et des niveaux élevés d'antigènes tumoraux directement apprêtables par les cellules présentatrices de l'antigène présentes au site d'implantation.

L'invention a donc tout particulièrement pour objet une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale pour être administrée à un patient, caractérisée en ce que le premier composant est un antigène tumoral ou un mélange d'antigènes tumoraux et le second composant est un système de délivrance d'une cytokine ou d'une chémokine immunostimulante.

L'association de composants actifs selon l'invention permet d'offrir une méthode d'immunothérapie des cancers qui s'affranchit de la détermination fine des déterminants antigéniques tumoraux.

L'association selon l'invention est remarquable en ce qu'elle permet de s'affranchir de la restriction HLA à laquelle se heurte l'utilisation des peptides tumoraux antigéniques synthétiques présentés par des molécules HLA de classe I et/ou de classe II. En outre, la présente invention offre l'avantage de s'affranchir de l'absence d'informations sur le caractère immunogène des peptides synthétiques *in vivo*.

Les antigènes tumoraux de l'association selon l'invention peuvent provenir :

- D'une ou de plusieurs lignées de cellules tumorales ou de cellules tumorales primaires, rendues

incapables de proliférer *in vivo* et représentant une source d'antigènes tumoraux susceptibles d'activer une réponse immunitaire antitumorale.

5 - D'antigènes tumoraux non-définis, purifiés ou non, provenant de cellules tumorales primaires ou de cellules tumorales issues de la lignée autologue ou de lignées allogéniques, ou de leur mélange, rendues incapables de proliférer *in vivo* et lysées par un mécanisme biologique, physique, mécanique ou autre. Les antigènes  
10 peuvent inclure, à titre d'exemple, des débris cellulaires ou des sous-fractions cellulaires purifiées, telles que les hsp.

15 - D'antigènes tumoraux caractérisés pouvant être soit purifiés, soit synthétisés et utilisés sous forme de peptides et/ou de protéines recombinantes.

Selon une forme préférée de réalisation de l'invention, l'antigène tumoral est un lysat de cellules tumorales. Avantageusement ledit lysat de cellules  
20 tumorales est constitué par des corps apoptotiques et/ou par des corps nécrotiques.

Cette forme de réalisation de l'invention offre l'avantage de mettre en œuvre des cellules présentatrices de l'antigène qui sont capables d'apprêter les antigènes  
25 contenus dans les lysats issus de cellules tumorales, et de présenter les peptides résultant d'un processus physiologique au système immunitaire.

Les cellules tumorales sont de préférence soit des cellules provenant d'une ou de plusieurs lignées  
30 allogéniques, soit des cellules tumorales autologues

provenant patient à qui sera administrée l'association selon l'invention.

5 Selon une forme toute préférée de réalisation de l'invention, le système de délivrance d'une cytokine ou chémokine immunostimulante est une cellule modifiée génétiquement exprimant un gène codant pour une cytokine ou une chémokine immunostimulante. Avantageusement, il s'agit d'une cellule xénogénique ou allogénique.

10 Les cellules modifiées génétiquement pour exprimer une cytokine ou une chémokine peuvent être des cellules primaires allogéniques ou xénogéniques présentant soit spontanément, soit après immortalisation, une capacité de prolifération étendue. Ces cellules peuvent également  
15 provenir de lignées allogéniques ou xénogéniques. Ces cellules peuvent être des cellules primaires, choisies parmi les cellules épithéliales de la rétine, les cellules endothéliales, les cellules de rein, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules dérivées  
20 du muscle, les cellules de l'épiderme et du derme.

L'immortalisation des cellules peut être obtenues par introduction à l'aide de vecteurs :

- d'un ou plusieurs oncogènes cellulaires et viraux, incluant SV40T, E1A, E6, E7, v-myc, c-myc, src,  
25 ras ;

- de gènes ayant un effet anti-sénescence, tels que la télomérase ;

- de gènes ayant un effet anti-apoptotique, tels que bcl2.

On entend par vecteur toute séquence nucléotidique dans laquelle la séquence désirée peut être insérée par restriction et ligation et permettant le transfert dans des cellules cibles des-dites séquences insérées. Ces vecteurs sont par exemple des plasmides ou des virus. Les vecteurs viraux pourront être des virus humains ou non, rétroviraux, adénoviraux ou associés aux adénovirus, lentiviraux, poxviraux, ou des virus dérivés de l'Herpes.

10 Selon une forme de réalisation toute préférée, les cellules modifiées génétiquement pour exprimer une cytokine ou une chémokine sont encapsulées dans des microcapsules ou de macrocapsules de polymères biodégradable ou non. Il s'agit de microcapsules ou de  
15 macrocapsules, compatibles avec la survie et la bioactivité des cellules encapsulées et ne présentant aucune toxicité ni immunogénicité chez le receveur. La composition des capsules utilisées selon la présente invention permet une sécrétion contrôlée et prolongée de l'agent pharmaceutique  
20 actif par diffusion à travers les pores de ladite capsule. La composition pharmaceutique des capsules utilisées dans la présente invention est hautement biocompatible.

L'utilisation des cellules encapsulées modifiées génétiquement pour exprimer une cytokine ou une  
25 chémokine selon l'invention présente de nombreux avantages. Premièrement, cette encapsulation permet la sécrétion d'une protéine biologiquement active. Deuxièmement, cette approche permet d'obtenir une sécrétion soutenue dans le temps de ladite cytokine ou une chémokine. Une étude phase  
30 I a été conduite chez des patients atteints de sclérose

latérale amyotrophique, dans laquelle six patients ont reçu des capsules contenant des cellules BHK génétiquement modifiées pour produire le CNTF. Des niveaux de CNTF de l'ordre du nanogramme ont été mesurés dans les liquides 5 cérébrospinaux des patients pendant au moins dix-sept semaines post-implantation (P. Aebischer et coll., Nat Med 1996, 2 :696-699). Enfin, cette encapsulation offre une protection desdites cellules vis-à-vis d'un rejet immunitaire du receveur.

10 Cette encapsulation présente en outre l'avantage de surmonter plusieurs limitations liées à l'administration systémique de protéines biologiquement actives, telles que la nécessité d'injections répétées due la faible stabilité de certaines protéines. Le taux de 15 relarguage d'une protéine, biologiquement active et sécrétée par des cellules modifiées génétiquement et contenues dans des capsules, est continu au cours du temps au contraire d'un système basé sur la diffusion passive d'une protéine recombinante contenue dans un polymère. De 20 plus, la cinétique de diffusion d'une protéine encapsulée est plus rapide que la sécrétion puis la diffusion observées avec des cellules encapsulées produisant la même protéine et selon le système d'encapsulation de cellules décrit dans la présente invention.

25 Des exemples préférés d'association selon l'invention sont les suivants :

Une première formulation comprend :

i) Des antigènes tumoraux sous forme de lysats cellulaires obtenus par exemple par des procédés physiques, 30 chimiques ou biologiques, combinés ou non, induisant

l'apoptose et/ou la nécrose dans les cellules tumorales. Les cellules tumorales ou leurs dérivés utilisés sont soit des cellules provenant d'une ou de plusieurs lignées allogéniques éventuellement caractérisées pour l'expression de certains gènes tumoraux par RT-PCR, soit des cellules tumorales autologues.

ii) Des cellules xénogéniques ou allogéniques modifiées génétiquement et exprimant de façon stable un gène codant pour une cytokine ou une chémokine immunostimulante. Ce mode de délivrance paracrine possède l'avantage de s'apparenter étroitement à la biologie naturelle des cytokines ou chémokines. Il peut s'agir d'interleukines connues pour activer les lymphocytes T, telles que l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-12, l'IL-18, ou de chemokines ayant un effet direct ou indirect sur les cellules présentatrices de l'antigène, notamment sur leur capacité de migration et d'activation, telles que GM-CSF, M-CSF, MIP-1alpha, MIP-1beta, MIP-5, MCP-3, MCP-4, RANTES, TECK, SDF-1 ou MIP-3beta/ELC, 6Ckine/SLC.

Une deuxième formulation comprend :

i) Des antigènes tumoraux sous forme de lysats cellulaires obtenus par des procédés physiques, chimiques ou biologiques, combinés ou non, induisant l'apoptose et/ou la nécrose dans les cellules tumorales. Les cellules tumorales ou leurs dérivés utilisés sont soit des cellules provenant d'une ou de plusieurs lignées allogéniques caractérisées éventuellement pour l'expression de certains gènes tumoraux par RT-PCR, soit des cellules tumorales autologues.

ii) Des cellules xénogéniques ou allogéniques modifiées génétiquement et exprimant de façon stable un gène codant pour une cytokine ou une chémokine immunostimulante, aussi dénommées «cellules immunostimulantes», protégées par encapsulation, avant leur  
5 implantation chez le patient, d'un rejet médié par le système immunitaire du patient.

Une quantité adéquate des deux composants de l'association selon l'invention peut être administrée à un  
10 patient atteint d'un cancer de manière simultanée. Les administrations peuvent être uniques ou multiples dans le temps et dans l'espace. L'administration peut être effectuée soit directement au voisinage de la tumeur, soit  
15 dans un site périphérique approprié pour l'initiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Dans le cas où les cellules sont encapsulées, l'implantation de(s) capsule(s) et d'antigènes tumoraux pourra se faire de manière séquentielle au voisinage de la tumeur ou dans un site  
20 périphérique approprié pour l'initiation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

Il peut s'agir d'une administration intramusculaire, intra-crânienne, sous-cutanée, intra-dermique, ou au sein d'une cavité, telle que la cavité péritonéale, la capsule rénale ou la prostate.  
25

Ainsi, dans une première forme de mise en œuvre de l'invention consistant à administrer conjointement les deux composantes, l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant à titre de composants actifs un  
30 mélange d'une quantité efficace des deux composants définis

précédemment. Dans une seconde forme de mise en œuvre de l'invention consistant à administrer séquentiellement les deux composants, l'invention concerne un pack pharmaceutique comprenant deux compositions pharmaceutiques, chacune comprenant une quantité efficace de l'un des deux composants définis précédemment.

Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation d'une association définie précédemment pour la préparation d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient. Ce médicament peut être sous la forme d'une composition ou d'un pack pharmaceutique ci-dessus selon que les deux composants sont administrés en mélange ou séparément. Un premier médicament selon l'invention est destiné à être administré directement au site tumoral ou voisinage ou au niveau d'un organe lymphoïde approprié pour l'initiation d'une réponse immunitaire, par exemple au niveau des ganglions lymphatiques drainant la tumeur. Un deuxième médicament selon l'invention est destiné à être administré en périphérie de la tumeur, par exemple par voie sous-cutanée. Un troisième médicament selon l'invention est destiné à être administré dans la cavité abritant la tumeur, telle que la cavité péritonéale dans le cas des cancers du côlon, la cavité pleurale dans le cas des mésothéliomes ou la cavité crânienne après exérèse éventuelle de la tumeur.

Un exemple préféré utilisant cette nouvelle approche consiste en l'immunothérapie des gliomes.

Longtemps considéré comme un site immuno-privilegié, le cerveau possède néanmoins des mécanismes de

présentation antigénique, distincts de ceux de la  
périphérie. La présence d'antigènes spécifiques des  
tumeurs, la présence des molécules HLA sur les gliomes et  
l'augmentation de leur expression dans des conditions  
5 appropriées (Int J Cancer. 1988 Nov 15;42(5):780-6) (J  
Neuroimmunol. 1991 Dec;35(1-3):139-52) suggèrent que les  
gliomes sont sensibles à une réponse immunitaire  
cellulaire. Les lymphocytes infiltrent, parfois en grand  
nombre, la plupart des maladies inflammatoires du système  
10 nerveux central. En particulier, les gliomes sont infiltrés  
principalement par des lymphocytes T CD4 et CD8, alors que  
les lymphocytes B et les cellules NK sont plus rares. Ces  
lymphocytes infiltrant les tumeurs correspondent des  
expansions polyclonales contre des antigènes de gliomes non  
15 encore identifiés (Int Immunol. 1999 Aug;11(8):1337-50).  
Bien que dans certaines circonstances, les cellules  
tumORALES soient capables de présenter leurs antigènes  
directement aux lymphocytes T, il est peu probable que le  
déclenchement d'une réponse immunitaire anti-tumorale soit  
20 possible sans intervention de cellules spécialisées dans la  
présentation antigénique, en présence d'antigènes de  
tumeurs. La présentation d'antigènes provenant de lysats  
cellulaires délivrés dans le cerveau pourrait être assurée  
entre autres par les cellules microgliales. Ces cellules,  
25 qui constituent 5 à 15 % de la population cellulaire du  
cerveau, possèdent la plupart des caractéristiques des  
cellules dendritiques, comme les molécules d'adhésion et de  
co-stimulation. Elles sont abondantes dans les tumeurs et  
dans les lésions inflammatoires. La localisation  
30 strictement cérébrale des gliomes et l'absence habituelle

de métastases suggèrerait qu'il est préférable d'injecter le matériel immunogène directement au site tumoral.

5           Toutefois, il est probable que ce site ne soit pas favorable à l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale, du fait de l'immunosuppression loco-régionale due par exemple au TGF- $\beta$ 2, aux prostaglandines E2, à l'IL-10 ou l'antagoniste au récepteur de l'IL-1  
10           secrétés par les cellules tumorales. Un autre site d'injection combinée pourrait être la périphérie. Il a été  
15           clairement établi que des lymphocytes T activés en dehors du cerveau pouvaient re-circuler et atteindre leur cible tumorale à l'intérieur du système nerveux central.

15           Il sera indiqué ci-après plusieurs exemples préférés de mise en œuvre de l'invention, ces exemples sont donnés à titre d'illustration et ne sauraient limiter la portée de la demande.

20           Exemple 1 : Encapsulation de cellules endothéliales de rat productrices d'IL-2 humaine.

25           Les cellules productrices d'IL-2 ont été encapsulées dans des macrocapsules disposant d'une membrane PES 14, d'un réseau matriciel PET coaté avec de la laminine et du collagen de type IV. Trois densités de chargement ont été utilisée :  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$  ou  $1.6 \times 10^6$  cellules par capsule. La production d'IL-2 humaine a été mesurée au cours du temps par ELISA (R&D).

Les résultats obtenus au jour 1, jour 3 et au jour 7 après le chargement sont respectivement présentés dans les figures 1, 2 et 3.

5                    Exemple 2 : Encapsulation de cellules endothéliales de rat productrices d'IL-2 humaine.

10                    La production d'IL-2 présentée sous forme de moyenne par type de capsule et suivi au cours du temps est présentée à la figure 4.

Les capsules ont été chargées au jour 0 par différentes quantités de cellules NTC-121 qui sont des cellules endothéliales de rat productrices d'IL-2 humaine, puis gardées en culture.

15                    La quantité d'IL-2 sécrétée dans le milieu de culture a été mesurée par ELISA aux jours 1, 3, 7, 10, 14 et 21 suivant le chargement des capsules.

## REVENDICATIONS

5 1) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale pour être administrée à un patient, caractérisée en ce que le premier composant est un antigène tumoral ou un mélange d'antigènes tumoraux et le second un système de délivrance d'une cytokine ou une chémokine immunostimulante.

10 2) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'antigène tumoral est un lysat de cellules tumorales.

15 3) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon la revendication 2, caractérisée en ce que le lysat de cellules tumorales est constitué par des corps apoptotiques et/ou par des corps nécrotiques.

20 4) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que le lysat de cellules tumorales est un lysat d'une ou de plusieurs  
25 lignées de cellules tumorales ou de cellules tumorales primaires.

30 5) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon la revendication 1, caractérisée en ce que le ou les antigènes tumoraux sont

des antigènes, purifiés ou non, provenant de la lyse de cellules tumorales primaires ou de cellules tumorales issues de la lignée autologue ou de lignées allogéniques, ou de leur mélange.

5

6) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon la revendication 1, caractérisée en ce que le ou les antigènes tumoraux sont des peptides ou des protéines recombinantes ou un mélange de ceux-ci.

10

7) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le système de délivrance d'une cytokine ou chemokine immunostimulante est constitué par des cellules modifiées génétiquement exprimant un gène codant pour une cytokine ou chemokine immunostimulante.

15

20

8) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon la revendication 7, caractérisée en ce que les cellules modifiées génétiquement exprimant un gène codant pour une cytokine ou chemokine immunostimulante sont des cellules xénogéniques ou allogéniques .

25

9) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que les cellules modifiées génétiquement pour exprimer une cytokine ou une

chemokine sont des cellules primaires ou des cellules issues de lignées allogéniques ou xénogéniques

10) Une association de deux composants actifs dans l'immunothérapie anti-tumorale selon la revendication 9, caractérisée en ce que les cellules sont choisies dans le groupe comprenant les cellules épithéliales de la rétine, les cellules endothéliales, les cellules de rein, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, des cellules dérivées du muscle, les cellules de l'épiderme et du derme.

11) Une association selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que les cellules modifiées génétiquement pour exprimer une cytokine ou une chemokine sont encapsulées dans des microcapsules ou des macrocapsules.

12) Une association selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la cytokine est une interleukine activant les lymphocytes T.

13) Une association selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'interleukine est choisie dans le groupe comprenant : l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7 , l'IL-12, l'IL-18.

14) Une association selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la chemokine est choisie parmi celles ayant un effet direct ou indirect

sur les cellules présentatrices de l'antigène, notamment sur leur capacité de migration et d'activation.

5 15) Une association selon la revendication 14, caractérisée en ce que la chémokine est choisie dans le groupe comprenant : GM-CSF, M-CSF, MIP-1alpha, MIP-1beta, MIP-5, MCP-3, MCP-4, RANTES, TECK, SDF-1 ou MIP-3beta/ELC, 6Ckine/SLC.

10 16) Une composition pharmaceutique pour l'immunothérapie anti-tumorale, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de composants actifs un mélange d'une quantité efficace des deux composants définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 15.

15 17) Un pack pharmaceutique pour l'immunothérapie anti-tumorale, caractérisé en ce qu'il comprend deux compositions pharmaceutiques, chacune comprenant une quantité efficace de l'une des deux  
20 composants définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 15.

25 18) Utilisation d'une association selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la préparation d'une composition pharmaceutique ou d'un pack pharmaceutique destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient.

30 19) Utilisation d'une association selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la préparation

d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient administré directement au site tumoral ou voisinage.

5                           20) Utilisation d'une association selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la préparation d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient administré au voisinage d'organes lymphoïdes appropriés pour l'initiation d'une réponse  
10                           immunitaire, tels que les ganglions lymphatiques drainant la tumeur.

                          21) Utilisation d'une association selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, pour la préparation  
15                           d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient administré en périphérie de la tumeur, par exemple par voie sous-cutanée.

                          22) Utilisation d'une association selon l'une  
20                           quelconque des revendications 1 à 15, pour la préparation d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient administré dans la cavité abritant la tumeur, telle que la cavité péritonéale, la cavité pleurale, la cavité crânienne, après exérèse éventuelle de  
25                           la tumeur.

                          23) Utilisation d'une association selon l'une  
                          quelconque des revendications 1 à 15, pour la préparation  
                          d'un médicament destiné à l'immunothérapie des gliomes.

24) Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que la cytokine est choisie dans le groupe comprenant l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-12, l'IL-18.

5

25) Utilisation selon la revendication 22, caractérisée en ce que la chémokine est le GM-CSF.

Figure 1

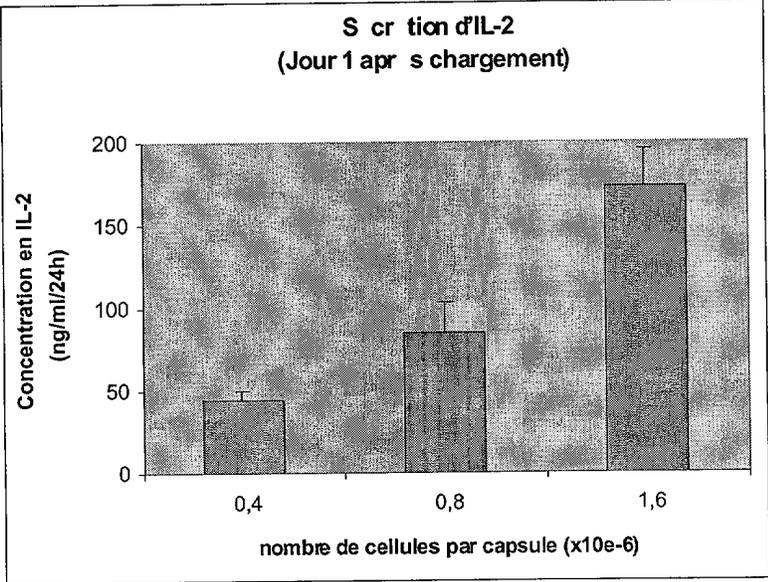


Figure 2

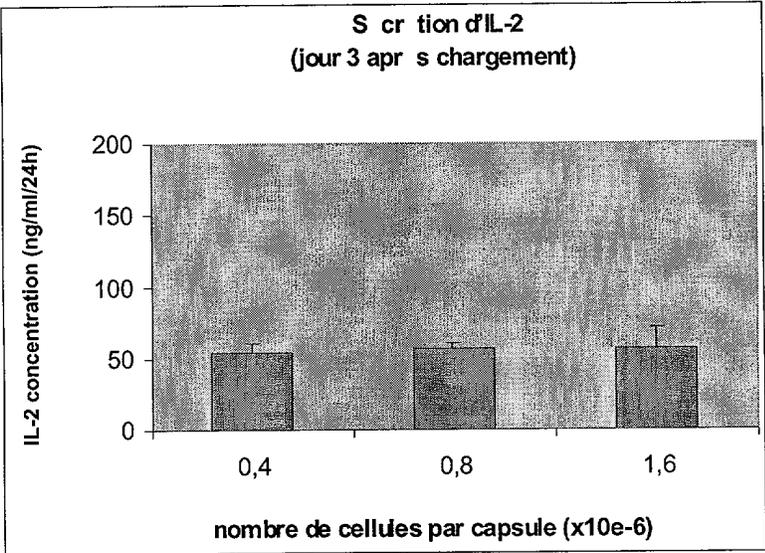


Figure 3

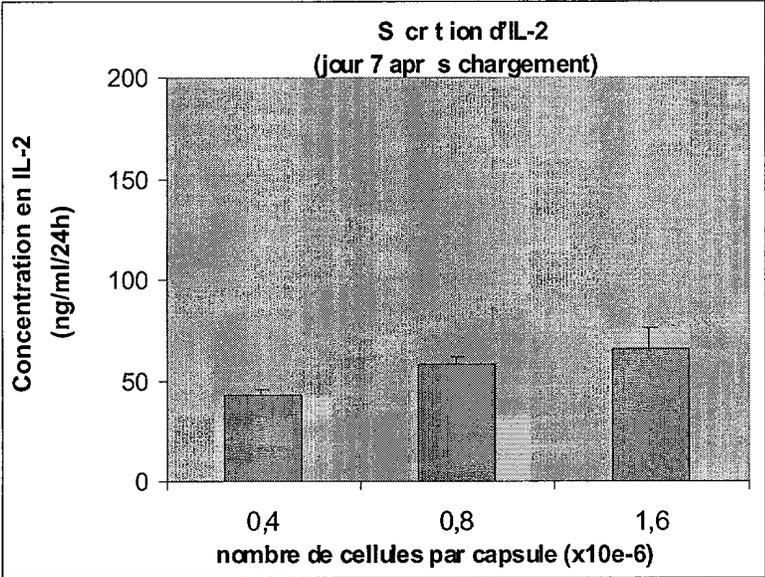
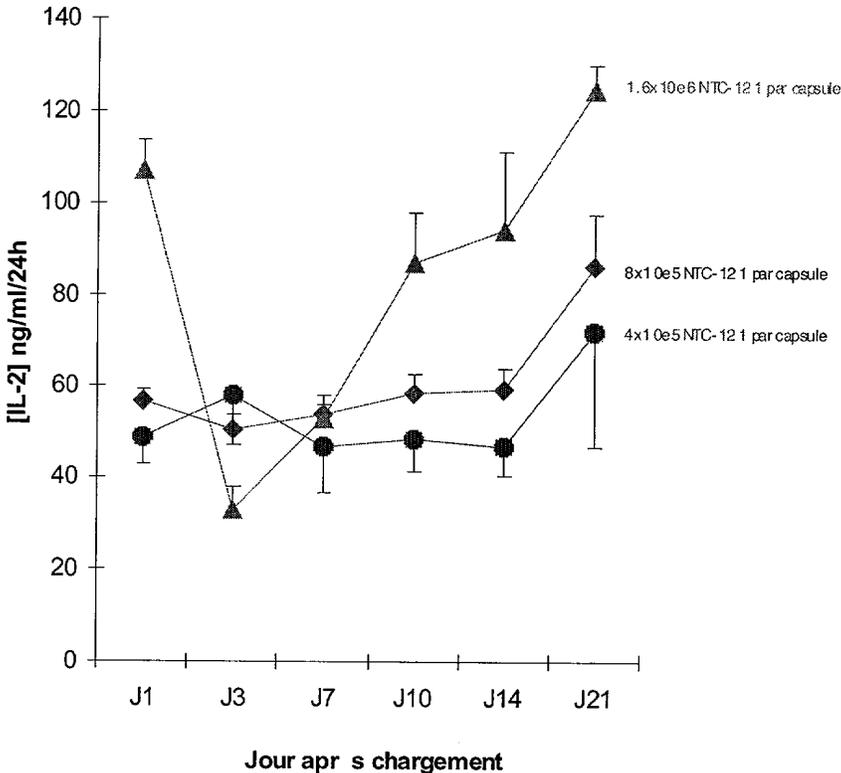


Figure 4

**Production dIL-2: moyenne par type de capsule**



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

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

FA 605126  
FR 0104538

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
X	WO 95 16464 A (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 22 juin 1995 (1995-06-22)  * revendications 1-8 * * page 10, ligne 1-5 * ----	1,12,13, 15,16, 18,19, 21,22	A61K39/00 A61K38/00 A61P35/00
X	WO 98 04282 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 5 février 1998 (1998-02-05) * revendications 1-4,6,9,33 * * page 14, ligne 39 - page 15, ligne 14 * ----	1,2,4, 7-9,12, 13,15-19	
X	WO 94 08601 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 28 avril 1994 (1994-04-28)  * revendications 1-4 * * page 7, ligne 8-14 * -----	1,12,13, 15,16, 18,19, 21,22	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			A61K
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		9 janvier 2002	Peeters, J
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		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	
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			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0104538 FA 605126**

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 09-01-2002  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9516464 A	22-06-1995	CA 2178902 A1	22-06-1995
		EP 0741580 A1	13-11-1996
		JP 9506866 T	08-07-1997
		WO 9516464 A1	22-06-1995
		US 6193970 B1	27-02-2001
		US 5861159 A	19-01-1999
WO 9804282 A	05-02-1998	US 6277368 B1	21-08-2001
		AU 3965597 A	20-02-1998
		EP 0915708 A1	19-05-1999
		WO 9804282 A1	05-02-1998
		US 2001038841 A1	08-11-2001
		US 2001036458 A1	01-11-2001
WO 9408601 A	28-04-1994	AU 5361794 A	09-05-1994
		WO 9408601 A1	28-04-1994
		US 6099846 A	08-08-2000