

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/140077 A1

(43) Date de la publication internationale
24 septembre 2015 (24.09.2015) W I P O | P C T

- (51) **Classification internationale des brevets :**
C12N 5/0786 (2010.01) A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/14 (2015.01)
- (21) **Numéro de la demande internationale :**
PCT/EP2015/05533 1
- (22) **Date de dépôt international :**
13 mars 2015 (13.03.2015)
- (25) **Langue de dépôt :** français
- (26) **Langue de publication :** français
- (30) **Données relatives à la priorité :**
14 52286 19 mars 2014 (19.03.2014) FR
- (71) **Déposants :** UNIVERSITE DE BOURGOGNE [FR/FR];
Cellule de Valorisation, MRI, 64 A rue de Sully, CS
77124, F-21071 Dijon Cedex (FR). **CHU DE DIJON**
[FR/FR]; 1 boulevard Jeanne d'Arc, BP 77908, F-21079
Dijon Cedex (FR).
- (72) **Inventeurs :** BONNOTTE, Bernard; 41 rue de Champ-
maillot, F-21000 Dijon (FR). JANIKASHVILI, Nona; 12
rue Odebert, F-21000 Dijon (FR).
- (74) **Mandataire :** OUDIN, Stéphane; Cabinet Guiu Juris-
patent, 10 rue Paul Thénard, F-21000 Dijon (FR).
- (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, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **États désignés** (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) **Title :** TREATMENT OF INFLAMMATORY AND DYSIMMUNE RESPONSE

(54) **Titre :** TRAITEMENT DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE ET DYSIMMUNITAIRE

(57) **Abstract :** The présent invention relates to a drug and, more particularly, to a drug for treating inflammatory and dysimmune response. The présent invention also relates to a drug for treating graft-versus-host disease. Thus, the présent invention relates in particular to a cell expressing CD33, CD1 lb, CD14, CD163, CD206, HLA-DR, CD44, CD3 1, CCR5 and CD105.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne un médicament et plus particulièrement un médicament pour le traitement de la réponse inflammatoire et dysimmunitaire. La présente invention concerne également un médicament pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte. Ainsi la présente invention concerne notamment une cellule exprimant le CD33, le CD1 lb, le CD14, le CD163, le CD206, l'HLA-DR, le CD44, le CD31, le CCR5 et le CD105.



WO 2015/140077 A1

TRAITEMENT DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE ET DYSIMMUNITAIRE

Domaine technique

La présente invention concerne un médicament et plus particulièrement un médicament pour inhiber ou diminuer la réponse immunitaire et inflammatoire. La présente invention
5 concerne également un médicament pour le traitement des maladies pour lesquelles la réponse immunitaire ou inflammatoire est délétère pour le patient comme la maladie du greffon contre l'hôte, les maladies auto-immunes et les maladies auto-inflammatoires.

10

Technique antérieure

La régulation du système immunitaire et de l'inflammation est un des buts thérapeutiques à atteindre pour éviter la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) et
15 traiter les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires. La GvHD est une complication de la greffe provoquée par la transplantation de cellules hématopoïétiques allogéniques. Actuellement, la stratégie principale pour lutter contre l'apparition de la GvHD ou pour traiter les maladies auto-
20 immunes et auto-inflammatoires consiste à utiliser des immunosuppresseurs (corticoïdes, chimiothérapie) pour induire une immunosuppression générale chez le patient. Toutefois, ces traitements immunosuppresseurs exposent le patient à de possibles infections et à des rechutes de son
25 hémopathie. De nouvelles stratégies sont actuellement à l'étude, notamment l'utilisation de cellules suppressives comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) mais à ce jour l'efficacité de cette thérapie n'a pas été démontrée dans des essais cliniques de phase II/III. Un autre type
30 cellulaire connu sous l'acronyme MDSC (pour "myeloid derived suppressor cells") intervient aussi pour réguler

négativement le système immunitaire. Ce sous-type cellulaire est rare ou absent chez les individus en bonne santé et retrouvé en cas de pathologie et notamment en cas de cancer. L'injection de ces cellules a permis chez
5 l'animal de promouvoir la tolérance des greffes après transplantation mais la rareté de ces cellules rend difficile leur utilisation en clinique. La présente invention, propose l'utilisation d'un nouveau sous-type cellulaire de cellules myéloïdes suppressives générées à
10 partir des cellules circulantes isolées du sang des patients et utilisables pour traiter les maladies auto-immunes et auto-inflammatoires et la maladie du greffon contre l'hôte. La présente invention propose également un procédé de préparation, *ex vivo*, de cette population de
15 cellules immunosuppressives .

Résumé de l'invention

Ainsi la présente invention, concerne notamment une cellule exprimant le CD33, le CD11b, le CD14, le CD163, le
20 CD206, l'HLA-DR, le CD44, le CD31, le CD105 et le CCR5 .

Les déposants ont pu générer, *ex vivo* ces cellules, les caractériser par l'étude de l'expression des molécules citées ci-dessus. Les déposants ont pu également montrer l'utilité de ces cellules dans le cadre du traitement de
25 certaines pathologies dont la neutralisation du système immunitaire du patient à traiter est indiquée.

Dans le cadre de la présente invention, le terme «cellule» fait référence à une cellule eucaryote naturelle ou recombinante. Préférentiellement , ladite cellule est une
30 cellule humaine et encore plus préférentiellement ladite cellule dérive d'une cellule souche hématopoïétique . Le terme «dérive» entend signifier que ladite cellule est issue, directement ou indirectement, de la division d'une

cellule souche hématopoïétique . Les différents marqueurs cités dans le cadre de la présente invention sont bien connus de l'homme du métier. De manière préférée, lesdits marqueurs désignent l'un quelconque des isoformes humains desdits marqueurs. La nomenclature CD (pour cluster of differentiation) , notamment utilisée dans le cadre de cette demande, a été proposée et établie par le 1er groupe de travail et conférence internationale sur les antigènes des leucocytes humains, en réunion à Paris en 1982. La nomenclature en question est maintenue par le HCDM et notamment consultable sur le site de l'association (www.hcdm.org) .

Dans le cadre de la présente invention, le terme « exprime » entend indiquer que la cellule selon l'invention produit les protéines citées. Plus particulièrement, lorsque lesdites protéines sont des protéines membranaires , le terme « exprime » signifie que ladite protéine est exprimée à la membrane cellulaire de ladite cellule. Lorsque ladite protéine est une protéine soluble, le terme « exprime » entend signifier que ladite protéine est exprimée vers le domaine extracellulaire.

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, la cellule selon l'invention exprime le CD33, le CD11b, le CD14, le CD163, le CD206, l'HLA-DR, le CD44, le CD31, CD105 et le CCR5 . Selon un mode de réalisation préféré, la cellule selon l'invention n'exprime pas les molécules suivantes le CD1a, le CD80, le CD86, le CD16, le CD56, le CD3, le CD19, le CD66b, le CCR7 et le PDL1 .

Selon un mode de réalisation préféré, la cellule selon l'invention exprime le CCL2, et l'IL-6. Selon un mode de réalisation préféré, la cellule selon l'invention ne n'exprime pas les suivantes l'IL-4, l'IL-5, l'IL-12p70, le

TNF- α , l'IL-1 β , le CCL20, l'IFN γ , le granzyme B, le FasL soluble, le TGF- β .

La présente invention concerne également une cellule selon l'invention pour utilisation comme médicament.

5 L'utilisation possible comme médicament de la cellule selon l'invention a été notamment démontrée dans un modèle expérimental de la maladie du greffon contre l'hôte et peut être étendue à toutes les pathologies où une neutralisation temporaire du système immunitaire peut être souhaitée.

10 Ainsi, la présente invention concerne également l'utilisation de la cellule selon l'invention pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte, des maladies auto-inflammatoires comme l'artérite giganto-cellulaire (Maladie de Horton), la polyarthrite rhumatoïde,
15 les maladies auto-immunes et le rejet de greffe. La présente invention concerne également une composition comprenant une cellule selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Parmi les vecteurs pharmaceutiquement acceptables on peut citer le sérum
20 physiologique, le PBS, le glucosé 5%, le RPMI.

La présente invention concerne également une cellule selon l'invention pour induire l'augmentation des lymphocytes T CD8 régulateurs.

25 Dans le cadre de la présente invention, le terme « augmentation » fait référence à une augmentation de la prolifération.

La présente invention concerne également une cellule selon l'invention pour induire une inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs.

30 La composition selon l'invention peut comprendre en outre toutes drogues nécessaires dans le cadre du traitement envisagé. Préférentiellement, ladite composition comprend entre 1×10^7 et 1×10^8 cellules par injection et

un nombre d'injections de 1 à 20 injections en fonction de la tolérance et de la réponse.

Les cellules selon l'invention peuvent être injectées chez le patient par toutes les voies connues de l'homme du
5 métier. Parmi celles-ci, la voie intraveineuse est préférée .

La présente invention concerne également un procédé de préparation d'une cellule selon l'invention comprenant les étapes consistant à :

10 - (i) cultiver des monocytes en présence d'IL-6 et de GM-CSF.

- (ii) isoler dans les cellules obtenues à l'issue de l'étape précédente, les cellules exprimant le CD33.

Selon un mode de réalisation alternatif de la
15 présente invention, l'étape (ii) peut être omise.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'étape (i) est réalisé en l'absence de tout autre chemokines, cytokines et facteurs de croissance humain.

20 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention les monocytes sont cultivés à l'étape (i) en l'absence d'IL-4.

Selon un autre mode de réalisation plus préféré de l'invention les monocytes sont cultivés à l'étape (i) en l'absence d'IL-1, d'IL-3, de TNF, de SCF, d'EPO et d'IFN-g.

25 Selon un autre mode de réalisation plus préféré de l'invention les monocytes sont cultivés à l'étape (i) en l'absence d'IFN γ , d'IL-2 et d'une chemokine ou d'une combinaison de chemokines choisies parmi le CCL2, le CCL3, le CCL4, le CCL8 et le CXCL10.

30 Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé selon l'invention ne comprend pas d'étapes supplémentaires .

Les monocytes proviennent préférentiellement du sang périphérique du patient à traiter, ou du sang de volontaires sains allogéniques .

Les monocytes peuvent être obtenus préférentiellement en utilisant 2 techniques, soit après isolation magnétique des cellules exprimant le CD14, soit à partir des cellules CD34⁺ isolées du sang périphérique par tri magnétique puis multipliées lors d'une culture en présence de « CD34 expansion médium » puis différenciées en monocytes lors d'une culture en présence de M-CSF.

- (ii) après 7 jours de culture, isoler par tri magnétique à partir des cellules obtenues à l'issue de l'étape précédente, les cellules exprimant le CD33.

L'homme du métier connaît bien les techniques permettant d'isoler les cellules en fonction de leurs phénotypes. Lesdites techniques utilisent habituellement des anticorps, éventuellement marqués, spécifiques desdits phénotypes puis une technique permettant de séparer les cellules ayant fixé lesdits anticorps des autres cellules.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé de préparation selon l'invention est remarquable en ce que l'étape (ii) consistant à isoler les cellules exprimant le CD33 est réalisée via un trieur de cellules.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé de préparation selon l'invention est remarquable en ce que l'étape (ii) consistant à isoler les cellules exprimant le CD33 est réalisé via des billes magnétiques.

L'étape (i) consistant à cultiver des monocytes en présence d'IL-6 et de GM-CSF peut être mise en œuvre dans les conditions de culture habituellement utilisées pour ce type de cellules. Préférentiellement, les cellules sont maintenues à 37°C et 5% de CO₂ dans un milieu de culture adéquat. Préférentiellement ledit milieu de culture est du

RPMI1640. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé de préparation selon l'invention est remarquable en ce que l'IL-6 présent dans le milieu de culture à l'étape (i) est compris entre 5 et 15ng/ml et tout à fait préférentiellement entre 8 et 12ng/ml. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé de préparation selon l'invention est remarquable en ce que le GM-CSF présent dans le milieu de culture à l'étape (i) est compris entre 5 et 15ng/ml et tout à fait préférentiellement entre 8 et 12ng/ml. La concentration de GM-CSF et d'IL-6 indiquée est la concentration initiale dans le milieu de culture au moment de sa mise en contact avec les cellules. Avantageusement, ledit milieu de culture est renouvelé régulièrement tous les 2 ou 3 jours. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé de préparation selon l'invention est remarquable en ce que l'étape (i) est effectuée pendant une période comprise entre 4 et 10 jours et tout à fait préférentiellement de 7 jours. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le procédé de préparation selon l'invention est remarquable en ce que l'étape (i) est effectuée à 37°C.

Description des modes de réalisation

25 Matériel et méthodes

- Préparation des cellules selon l'invention

Les cellules mononucléaires du sang périphérique ont été isolées chez des donneurs sains ou chez les patients à traiter en utilisant 2 techniques. La première technique consiste à réaliser une centrifugation du sang périphérique sur gradient de Ficoll, récupérer les PBMC (pour cellules mononucléées du sang périphérique), puis isoler les monocytes par tri magnétique en utilisant l'anticorps anti-

CD14 couplé à une bille magnétique. La seconde consiste à isoler du sang périphérique les cellules exprimant le CD34 par tri magnétique, puis à cultiver ces cellules en présence de milieu favorisant leur multiplication (CD34 expansion médium), puis à les différencier en les cultivant en présence de M-CSF.

Les monocytes ont été ensuite cultivés à une concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml dans du RPMI1640, supplémentés par 10% de Sérum de veau fœtal, 10ng/ml de GM-CSF et 10ng/ml d'IL-6 pendant 7 jours, le milieu étant renouvelé tous les 3 jours. Les cellules selon l'invention ont été ensuite purifiées, après marquage avec un marqueur spécifique du CD33, via un trieur de cellule.

15 - Test de prolifération cellulaire

Des lymphocytes T, des lymphocytes T CD4+CD25- et des lymphocytes T CD4+CD25+ ont été marquées par le kit "Cell trace Violet cell prolifération kit" (Cell Trace, Carlsbad, CA). Les cellules marquées sont cultivées en présence de billes recouvertes d'anti CD3/anti CD28 (Dynabeads, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) avec ou sans les cellules selon l'invention. La prolifération des lymphocytes T a été détectée par cytométrie en flux.

25 - Analyse morphologique

L'analyse morphologique des cellules selon l'invention a été effectuée après un marquage Wright /Giemsa .

- Dosage des Cytokines

30 La concentration en IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 et TGF- β a été déterminée dans le surnageant de culture des cellules cultivées par la technique ELISA.

- Modèle animal de la maladie du greffon contre l'hôte

Des souris NOD/SCID/IL 2RYC^{-/-} (Jackson Laboratory), âgées de 8 à 12 semaines, ont reçu en intraveineux des cellules mononucléées du sang périphérique (20.10⁶ cellules par souris) avec ou sans cellules selon l'invention (5.10⁶ cellules par souris). Le mélange des cellules est fait juste avant l'injection. La détection des signes de maladie du greffon contre l'hôte a été réalisée tous les 3 jours en aveugle.

- Analyse histologique des lésions de la maladie du greffon contre l'hôte

Les organes prélevés sur les souris traitées ont été fixés dans du formaldéhyde et inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5µm sont réalisées et colorées à l'éosine et à l'hématoxyline.

Résultats

Les cellules ainsi obtenues appelées HuMoSC ont les caractéristiques physiques, phénotypiques et fonctionnelles comme décrit ci-dessous.

- Caractère physique des cellules selon l'invention

Après coloration par le colorant Wright /Giemsa, les HuMoSC apparaissent comme une population homogène de cellules mononucléées de grande taille à cytoplasme basophile.

- Phénotype des cellules selon l'invention

Les cellules selon l'invention ont un phénotype CD33⁺CD11b⁺CD14⁺CD163⁺CD206⁺ HLA-DR⁺CD44⁺CD31⁺CD105⁺ CCR5⁺, et expriment faiblement le CCR6.

Les cellules selon l'invention n'expriment pas le CD1 α , le CD80, le CD86, le CD16, le CD56, le CD3, le CD19 et le CCR7 .

5 - Effet des cellules selon l'invention sur la prolifération des lymphocytes T

Des lymphocytes T autologues stimulés ont été co-cultivés avec les cellules selon l'invention avec un ratio de 2 lymphocytes T/cellules selon l'invention. Il a été
10 constaté que les lymphocytes T, stimulés co-cultivés avec les cellules selon l'invention, prolifèrent moins que les lymphocytes T cultivés seuls. Une analyse séparée des lymphocytes T a montré que la prolifération des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes T CD8+ était également inhibée
15 par les cellules selon l'invention. Par ailleurs, l'effet antiprolifératif des cellules selon l'invention est également observé sur les Lymphocytes T autologues et sur les lymphocytes T allogéniques . Les lymphocytes T co-cultivés avec les cellules selon l'invention n'expriment
20 pas le marqueur CD25+ contrairement aux lymphocytes T cultivés seuls. L'analyse des surnageants de culture des différents échantillons a permis de mettre en évidence que les cellules selon l'invention bloquent la production de cytokine pro-inflammatoire (INF- γ et TNF- α) par les
25 lymphocytes T. Ainsi les cellules selon l'invention sont remarquables en ce sens qu'elles bloquent l'activation cellulaire et la prolifération cellulaire des lymphocytes T CD4+ et CD8+, autologues et allogéniques et leur sécrétion de cytokines.

30

- L'effet suppressif des cellules selon l'invention dépend de STAT3

L'effet suppressif des cellules selon l'invention ne dépend pas de contacts directs de cellules à cellules mais d'un ou plusieurs facteurs solubles. Le prétraitement des cellules selon l'invention par un inhibiteur de la forme phosphorylée de STAT3 entraîne la perte de l'effet suppressif, la diminution de la sécrétion de CCL2 et d'IL-6 sans interférer avec la viabilité des cellules selon l'invention.

10 - Les cellules selon l'invention protègent de l'apparition de la maladie du greffon contre l'hôte

Les souris ayant reçu des cellules du sang périphérique humain développent les signes cliniques de la maladie du greffon contre l'hôte entre 20 et 30 jours après l'injection et meurent avant le 50ème jour après l'injection. Au contraire, les souris ayant reçu une co-injection de cellules du sang périphérique humain avec les cellules selon l'invention ne présentent que de faibles signes de la maladie du greffon contre l'hôte et survivent à cette injection. En particulier les lésions histologiques de GvHD au niveau hépatique sont nettement diminuées dans le groupe qui a reçu les cellules selon l'invention.

25 - Effet des cellules selon l'invention sur les lymphocytes T régulateurs.

Les lymphocytes T-régulateurs représentent une population de cellules suppressives capables de promouvoir la tolérance spécifique d'allo-antigènes.

30 Les souris ayant reçus les cellules selon l'invention présentent une quantité plus importantes de lymphocytes T CD8+ exprimant FoxP3 comparativement aux souris contrôles.

Les mêmes résultats ont été observés in vitro après co-culture d'une population totale de lymphocyte T avec les cellules selon l'invention.

REVENDICATIONS

1 - Cellule **caractérisée** en ce qu'elle exprime le CD33, le CD11b, le CD14, le CD163, le CD206, l'HLA-DR, le CD44, le CD31, CD105, et le CCR5 .

5 2 - Cellule selon la revendication précédente **caractérisée** en ce qu'elle n'exprime pas une ou plusieurs molécules choisies dans le groupe comprenant le CD1a, le CD80, le CD86, le CD16, le CD56, le CD3, le CD19, le CCR7 et le PDL1.

10

3 - Cellule selon l'une des revendications précédentes **caractérisée** en ce qu'elle exprime une ou plusieurs molécules choisies dans le groupe comprenant le CCL2 et l'IL-6.

15

4 - Cellule selon l'une des revendications précédentes pour utilisation comme médicament.

5 - Cellule selon l'une des revendications
20 précédentes pour le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte, des maladies auto-inflammatoires, de l'artérite giganto-cellulaire (Maladie de Horton), de la polyarthrite rhumatoïde, des maladies auto-immunes et du rejet de greffe.

25

6 - Cellule selon l'une des revendications précédentes pour induire l'augmentation des lymphocytes T CD8 régulateurs.

7 - Cellule selon l'une des revendications précédentes pour induire une inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs.

5 8 - Composition comprenant une cellule selon l'une des revendications 1 à 7 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable .

9 - Procédé de préparation d'une cellule selon l'une
10 des revendications 1 à 7 comprenant l'étape consistant à :
- (i) cultiver des monocytes en présence d'IL-6 et de GM-CSF.

10 - Procédé de préparation d'une cellule selon la
15 revendication 9 comprenant les étapes consistant à :
- (i) cultiver des monocytes en présence d'IL-6 et de GM-CSF.

- (ii) isoler dans les cellules obtenues à l'issue de l'étape précédente, les cellules exprimant CD33.

20

11 - Procédé de préparation selon l'une des revendications 9 à 10 **caractérisé** en ce que les cellules dérivant d'au moins une cellule hématopoïétique sont des PBMC.

25

12 - Procédé de préparation selon l'une des revendications 10 à 11 **caractérisé** en ce que l'étape consistant à isoler dans les cellules exprimant CD33 est un trieur de cellules.

30

13 - Procédé de préparation selon l'une des revendications 10 à 11 **caractérisé** en ce que l'étape

consistant à isoler dans les cellules exprimant le CD33 est réalisé via des billes magnétiques.

14 - Procédé de préparation selon l'une des
5 revendications 9 à 13 **caractérisé** en ce que l'IL-6 présent dans le milieu de culture à l'étape (i) est compris entre 5 et 15 ng/ml .

15 - Procédé de préparation selon l'une des
10 revendications 9 à 14 **caractérisé** en ce que le GM-CSF présent dans le milieu de culture à l'étape (i) est compris entre 5 et 15 ng/ml.

16 - Procédé de préparation selon l'une des
15 revendications 9 à 15 **caractérisé** en ce que l'étape (i) est effectuée pendant une période comprise entre 4 et 10 jours.

17 - Procédé de préparation selon l'une des
20 revendications 9 à 16 **caractérisé** en ce que l'étape (i) est effectuée à 37°C.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/055331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0786 A61K35/14 A61K35/12
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) onto both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification System followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal , BIOSIS, Séquence Search , EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>A KAROLINA PALUCKA ET AL: "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages", NATURE IMMUNOLOGY, vol. 1, no. 6, 1 December 2000 (2000-12-01) , pages 510-514, XP55183659, United States DOI : 10.1038/82763 Retrieved from the Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1101873></p> <p style="text-align: center;">----- -/- .</p>	1-17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Spécial catégories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 22 May 2015	Date of mailing of the international search report 08/06/2015
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Zuber Perez , C
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/055331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIDETSUGU MITANI ET AL: "Acti vity of interl euki n 6 in the differenti ati on of monocytes to macrophages and dendri tic cel ls", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol . 109, no. 2, 1 May 2000 (2000-05-01) , pages 288-295 , XP055183960, ISSN: 0007-1048, DOI : 10.1046/ j.1365-2141.2000.02020.x the whol e document	1-17
A	----- EP 2 617 434 A1 (ESTEVE LABOR DR [ES] ; FUNDACIO PRIVADA INST DE RECERCA DE LA SIDA CAIX) 24 July 2013 (2013-07-24) the whol e document en parti cul ier abstract paragraphs [0008] - [0017] , [0071] - [0082] claims 1-23 ; figures 1-6; exampl es 1-3	1-17
A	----- wo 2013/127976 A1 (ESTEVE LABOR DR [ES] ; FUNDACIO PRIVADA INST DE RECERCA DE LA SIDA CAIX) 6 September 2013 (2013-09-06) the whol e document en parti cul ier abstract page 3, line 1 - line 15 page 14, line 7 - line 14 page 17, line 19 - page 22, line 3 claims 1-25 ; figures 1-6; exampl es 1-5	1-17
A	----- wo 2010/099576 A1 (SYDNEY WEST AREA HEALTH SERVIC [AU] ; SAKSENA NITIN KUMAR [AU] ; WANG BI) 10 September 2010 (2010-09-10) the whol e document en parti cul ier abstract page 2, line 20 - page 7, line 27 page 26, line 3 - page 27, line 3 claims 1-39 ; figures 1, 2; exampl es 1-4	1-17
A	----- wo 2013/010998 A2 (FUNDACIO INST D INVESTIGACIO BIOMEDICA DE BELLVITGE IDI BELL [ES] ; ARAN) 24 January 2013 (2013-01-24) the whol e document en parti cul ier abstract page 3, line 9 - page 4, line 23 page 32, line 26 - page 36, line 21 claims 1-27 ; figures 1-20; exampl es 1-18	1-17
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/055331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 866 115 A (KANZ LOTHAR [DE] ET AL) 2 February 1999 (1999-02-02) the whole document en part icul ier abstract col umn 2, line 51 - col umn 4, line 46 cl ai ms 1-18; fi gure 1; exampl es 1-7 -----	1-17
A	US 2013/195818 AI (SENJU SATORU [JP]) 1 August 2013 (2013-08-01) the whol e document -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2015/055331
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2617434	A1	24-07-2013	EP 2617434 A1 24-07-2013
			WO 2013107854 A1 25-07-2013

WO 2013127976	A1	06-09-2013	CA 2865952 A1 06-09-2013
			CN 104244975 A 24-12-2014
			EP 2819696 A1 07-01-2015
			US 2015125489 A1 07-05-2015
			WO 2013127976 A1 06-09-2013

WO 2010099576	A1	10-09-2010	NONE

WO 2013010998	A2	24-01-2013	AU 2012285852 A1 06-02-2014
			CA 2841994 A1 24-01-2013
			EP 2557089 A2 13-02-2013
			EP 2731963 A2 21-05-2014
			JP 2014523252 A 11-09-2014
			US 2014309158 A1 16-10-2014
			WO 2013010998 A2 24-01-2013

US 5866115	A	02-02-1999	AU 688897 B2 19-03-1998
			AU 2302495 A 10-11-1995
			CA 2187770 A1 26-10-1995
			DE 4412794 A1 14-12-1995
			EP 0755439 A1 29-01-1997
			JP H09511903 A 02-12-1997
			US 5866115 A 02-02-1999
			WO 9528479 A1 26-10-1995

US 2013195818	A1	01-08-2013	US 2013195818 A1 01-08-2013
			WO 2012043651 A1 05-04-2012

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2015/055331

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12N5/0786 A61K35/14 A61K35/12
 ADD.
 Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE
 Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal , BIOSIS, Séquence Search , EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>A KAROLINA PALUCKA ET AL: "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages" , NATURE IMMUNOLOGY, vol . 1, no. 6, 1 décembre 2000 (2000-12-01) , pages 510-514, XP55183659 , United States DOI : 10.1038/82763 Extrait de l'Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1101873></p> <p style="text-align: center;">----- -/- .</p>	1-17

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

<p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>	<p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>
---	--

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
22 mai 2015	08/06/2015

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Zuber Perez , C
--	--

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>HIDETSUGU MITANI ET AL: "Acti vity of interl euki n 6 in the differenti ati on of monocytes to macrophages and dendri tic cel ls", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol . 109, no. 2, 1 mai 2000 (2000-05-01) , pages 288-295 , XP055183960, ISSN: 0007-1048, DOI : 10.1046/ j .1365 -2141 .2000 .02020 .x le document en enti er</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
A	<p>EP 2 617 434 A1 (ESTEVE LABOR DR [ES] ; FUNDACIO PRIVADA INST DE RECERCA DE LA SIDA CAIX) 24 jui llet 2013 (2013-07-24) le document en enti er en parti cul ier abrégé alinéas [0008] - [0017] , [0071] - [0082] revendi cati ons 1-23 ; figures 1-6; exempl es 1-3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
A	<p>wo 2013/127976 A1 (ESTEVE LABOR DR [ES] ; FUNDACIO PRIVADA INST DE RECERCA DE LA SIDA CAIX) 6 septembre 2013 (2013-09-06) le document en enti er en parti cul ier abrégé page 3, ligne 1 - ligne 15 page 14, ligne 7 - ligne 14 page 17, ligne 19 - page 22, ligne 3 revendi cati ons 1-25 ; figures 1-6; exempl es 1-5</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
A	<p>wo 2010/099576 A1 (SYDNEY WEST AREA HEALTH SERVIC [AU] ; SAKSENA NITIN KUMAR [AU] ; WANG BI) 10 septembre 2010 (2010-09-10) le document en enti er en parti cul ier abrégé page 2, ligne 20 - page 7, ligne 27 page 26, ligne 3 - page 27, ligne 3 revendi cati ons 1-39 ; figures 1, 2 ; exempl es 1-4</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
A	<p>wo 2013/010998 A2 (FUNDACIO INST D INVESTIGACIO BIOMEDICA DE BELLVITGE IDI BELL [ES] ; ARAN) 24 janvi er 2013 (2013-01-24) le document en enti er en parti cul ier abrégé page 3, ligne 9 - page 4, ligne 23 page 32, ligne 26 - page 36, ligne 21 revendi cati ons 1-27 ; figures 1-20 ; exempl es 1-18</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
	-----	-/--

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 5 866 115 A (KANZ LOTHAR [DE] ET AL) 2 février 1999 (1999-02-02) le document en entier en particulier abrégé colonne 2, ligne 51 - colonne 4, ligne 46 revendications 1-18; figure 1; exemples 1-7</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17
A	<p>US 2013/195818 A1 (SENJU SATORU [JP]) 1 août 2013 (2013-08-01) le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2015/055331

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 2617434 A1	24-07-2013	EP 2617434 A1	24-07-2013
		WO 2013107854 A1	25-07-2013

WO 2013127976 A1	06-09-2013	CA 2865952 A1	06-09-2013
		CN 104244975 A	24-12-2014
		EP 2819696 A1	07-01-2015
		US 2015125489 A1	07-05-2015
		WO 2013127976 A1	06-09-2013

WO 2010099576 A1	10-09-2010	AUCUN	

WO 2013010998 A2	24-01-2013	AU 2012285852 A1	06-02-2014
		CA 2841994 A1	24-01-2013
		EP 2557089 A2	13-02-2013
		EP 2731963 A2	21-05-2014
		JP 2014523252 A	11-09-2014
		US 2014309158 A1	16-10-2014
		WO 2013010998 A2	24-01-2013

US 5866115 A	02-02-1999	AU 688897 B2	19-03-1998
		AU 2302495 A	10-11-1995
		CA 2187770 A1	26-10-1995
		DE 4412794 A1	14-12-1995
		EP 0755439 A1	29-01-1997
		JP H09511903 A	02-12-1997
		US 5866115 A	02-02-1999
		WO 9528479 A1	26-10-1995

US 2013195818 A1	01-08-2013	US 2013195818 A1	01-08-2013
		WO 2012043651 A1	05-04-2012
