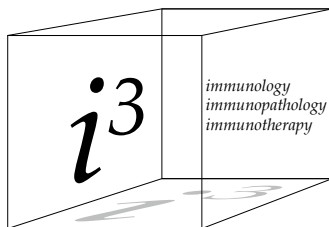


DES Biologie Médicale
Cambodge - septembre 2009

CM6.4
Immunothérapies



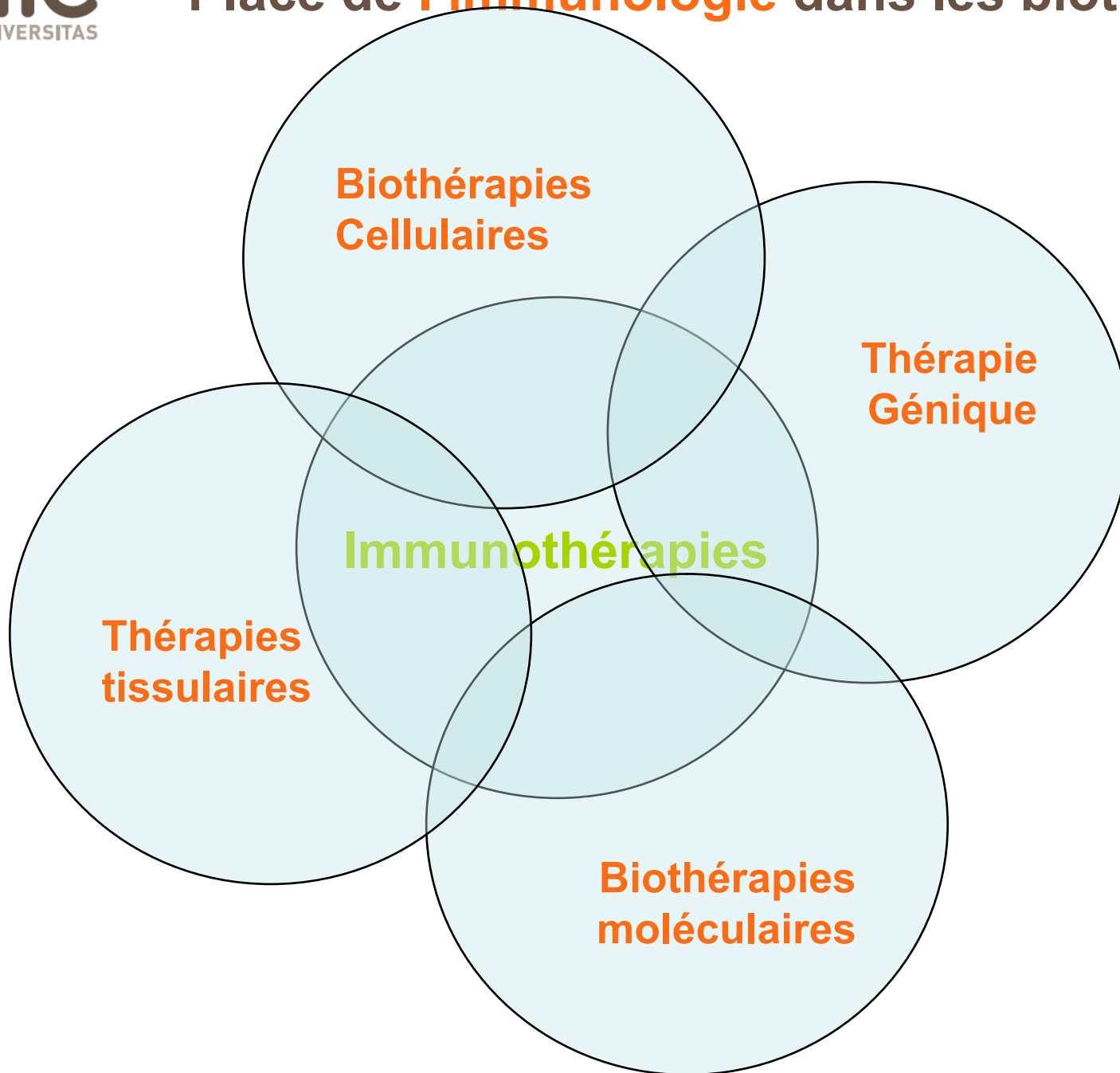
Bertrand Bellier – DES Cambodge 2009

Bertrand Bellier
UPMC CNRS
Immunology Immunopathology Immunotherapy
Pitié-Salpêtrière - Paris - France
bertrand.bellier@upmc.fr

Les **biothérapies** comprennent:

- Les **biothérapies moléculaires**
- Les **thérapies géniques**
- Les **thérapies cellulaires**
- Les **thérapies tissulaires** (greffes de tissus vivants)
- Les thérapies immunologiques ou **Immunothérapies**

Place de l'**immunologie** dans les biothérapies



- Définition:

- Sens strict: Développement d'outils « biologiques » dirigés contre une cible **spécifique de la réaction immunitaire**
- Plus largement, appliqué au développement **d'outils immunologiques à visée thérapeutique**

- Actions des Immunothérapies:

- **Immunostimulation**: activation du système immunitaire
- **Immunosuppression**: suppression du système immunitaire et de l'inflammation

- Types d'Immunothérapies:

- **Immunothérapie adoptive**: injection d'effecteurs (cellules, molécules); substitution du système immunitaire
- **Immunothérapie active**: consiste à intervenir sur le système immunitaire du sujet; par injections de molécules, cellule régulatrices

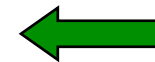
- Les outils

- Cellules du système immunitaire
- Cellules souche, précurseurs des CSI
- Antigènes
- Cytokines
- Anticorps

Intensité Réponse Immunitaire

Agent infectieux

Protection



Infection chronique

Agent non-pathogène

Allergie



Pas de réaction

Grefe

Rejet



Acceptation

Organe (du soi)

Auto-immunité



Tolérance

Tumeur

Immunité anti-tumorale



Cancer

Immunostimulation / Immunosuppression:

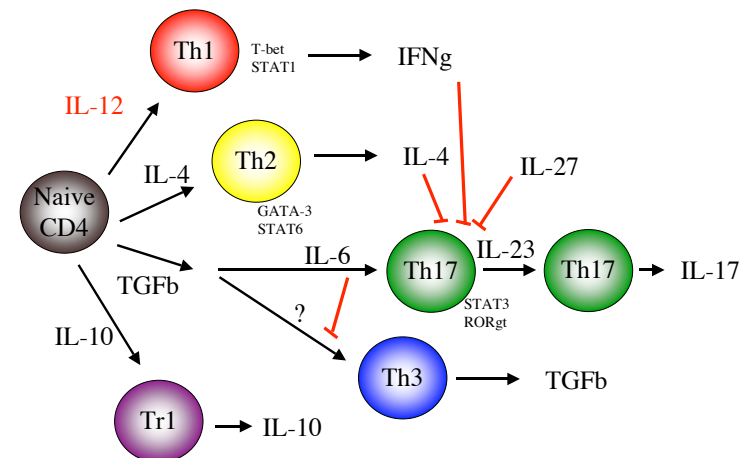
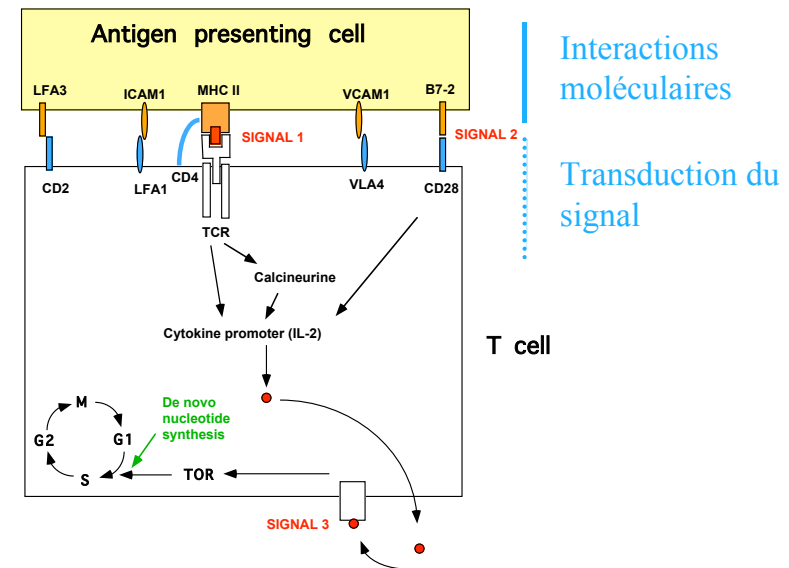
Ag spécifique: action ciblée

non Ag-spécifique: action générale

I. Immunosuppression

Immunosuppression Principes

- Bloquer les réponses immunitaires et/ou limiter les mécanismes inflammatoires
 - Anti-inflammatoires: corticostéroïdes
- Bloquer la stimulation antigénique lymphocytaire:
 - Interactions moléculaires
 - Transduction du signal
- Inhiber l'activation lymphocytaire/ l'expansion clonale:
 - Molécules cytostatiques
 - Système de destruction spécifique et conditionnel (gènes suicide, immunotoxines)
- Stopper ou dévier les fonctions effectrices
 - Suppression cellulaire: Treg, Tr1, Th3, Tgd, NKT, Cytokines
 - Déviation immunitaire: TH-1/-2/-3/-17 ; Cytokines



Immunosuppression non-spécifique

= Immunosuppresseurs « classiques » ou « conventionnels »

1) Anti-inflammatoires

Corticostéroïdes = glucocorticoïdes de la famille des hormones stéroïdes

- agissent via récepteur intracellulaire et déterminent spécifiquement la transcription de certains gènes (cytokines proinflammatoires)
- action sur cellules endothéliales

Activité	Effets
(-) IL1, TNF α , GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5	(-) inflammation
(-) NOS	(-) production NO Limite stress oxydatif
(-) mol d'adhésion	Limite infiltration lymphocytaire
(+) endonucléases	Apoptose lymphocytes activés

2) Inhibiteurs signal d'activation

Cyclosporine A, FK506, Rapamycin :

peptides cycliques hydrophobes se lient aux immunophilines (Rcptr intracytoplasmique) et bloquent la calcineurine

- > interdit la transcription, dépendante du calcium, du gène de l'IL-2 et d'autres cytokines: IL-3, IL-4, IFN γ
- Action ciblée aux cellules activées

3) Molécules cytostatiques

a) Agent alkylant = Cyclophosphamide

Induit des lésion biochimique de l'ADN

bloquant la réplication de l'ADN

Conduit à la mort des cellules en division

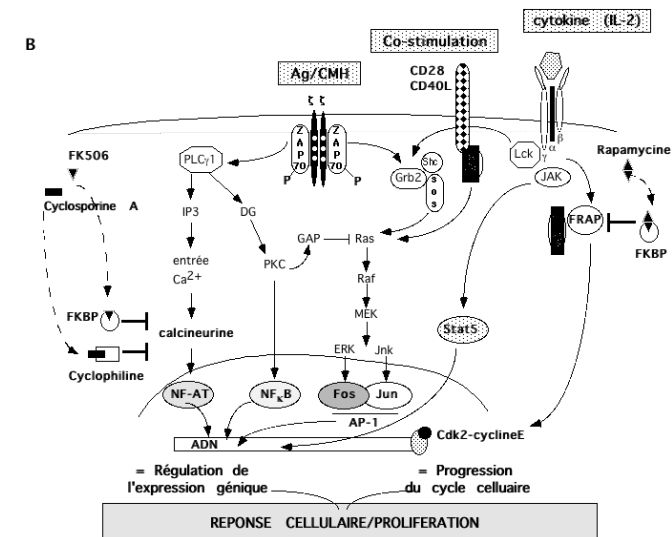
= Antimitotique

b) Antimétabolites: Azathioprine, Méthotrexate

interfèrent avec le métabolisme des purines

MTX inhibe la dihydrofolate réductase impliquée dans la voie de synthèse de la thymidine

=> Inhibent l'expansion clonale des lymphocytes T activés



Limites des immunosuppresseurs classiques:

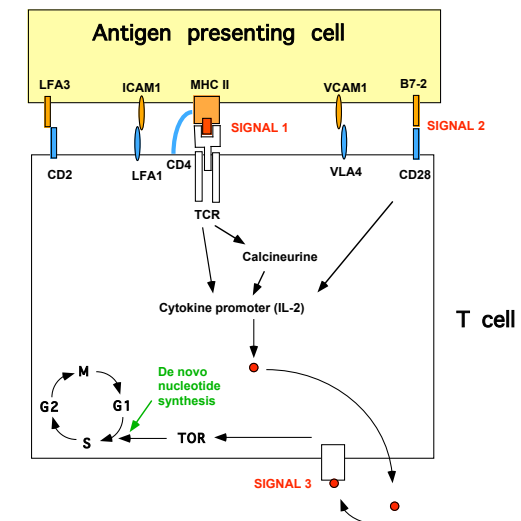
- Risques de toxicité (néphrotoxicité, effets hépatotoxiques)
- Antimitotiques: risque d'aplasie médullaire, risque oncogène
- **Immunosuppression générale**: risque de déficit immunitaire iatrogène, exposant particulièrement aux infections virales chroniques et aux tumeurs

Modalités des immunosuppressions spécifiques

- 1) **Anticorps monoclonaux**: blocages des interactions moléculaires
- 2) Elimination des cellules activées: **Immunotoxines**
- 3) **Cytokines** immunosuppressives
- 4) **Lymphocytes** T régulateurs
- 5) Déviation immunitaire (ex: désensibilisation): **Antigène**

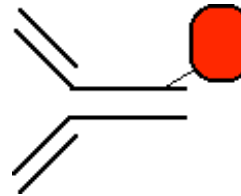
1. Anticorps monoclonaux et thérapies immunosuppressives

- **Elimination des cellules immunocompétentes**
 - Anti-CD3, OKT3 : **Muromomab**. Traitements immunosuppresseurs: Rejet de greffe, Diabète
 - Anti-CD20: **Rituximab**. Déplétion des LyB
 - Anti-CD52: lymphopénie profonde et durable (CD52 sur les lymphocytes T, B, monocytes). **Alemtuzumab**
- **Blocage des molécules de co-stimulation:**
 - Anti-CD28, Anti-CD40L ,CTLA4-Ig (compétition avec CD28 pour B7) : bloquer signal 2
- **Blocage des autres signaux activateurs**
 - Anti-CD25: **Daclizumab**. Antagonistes compétitifs bloquant la liaison de l'IL-2 à son récepteur: bloquer signal 3
 - Anti-cytokines inflammatoires
 - **Infliximab** (Anti-TNF)
- **Blocage de la migration cellulaire**
 - Anti-intégrine $\alpha 4$: **Natalizumab**

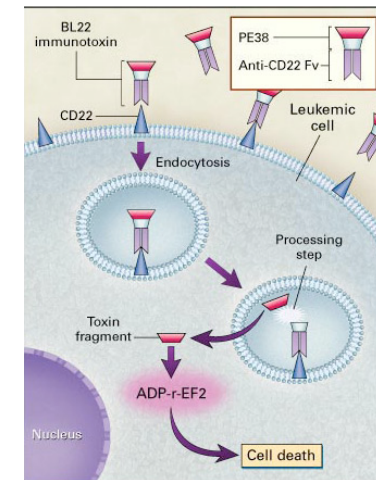


2. Immunotoxines

- **Immunotoxines: AC conjugués**
molécule hybride formée à partir d'un anticorps et d'une toxine protéique
ex: CD3-toxine diphtérique



- **Ac conjugués à des molécules de chimiothérapie**
Ac anti-CD 33+ calichéamicine (gemtuzumab-ozogamicin, Mylotarg®)
 - internalisation de l'Ac conjugué après liaison au CD 33
 - dissociation intra-lysosomale de l'Ac et de la calichéamicine
 - diffusion intra nucléaire de la chimiothérapie
 - liaison à l'ADN responsable de cassures irréversibles double brin: mort par apoptose
- **Ac conjugués à des radio-isotopes: la radio immunothérapie**
 - ^{213}Bi , ^{217}Bi , ^{211}At , ^{225}Ac
 - ^{131}I , ^{90}Y , ^{188}Re : conjugués à l'anti-CD20
 - ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan (Zevalin®)
 - ^{131}I -tositumomab (Bexxar®)



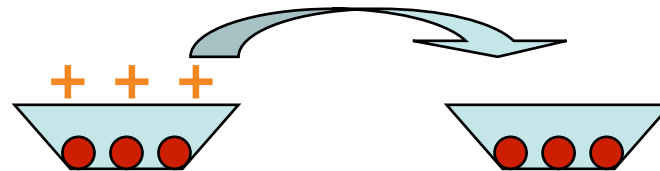
internalisée par les endosomes puis libérée dans le cytoplasme après protéolyse révélant son activité enzymatique ADP-ribosylase. La cible de l'ADP-ribosylase est le facteur EF-2 d'élongation, une petite G-protéine qui permet la translocation du peptidyl-tRNA du site A au site P des ribosomes en présence de GTP.

EF-2 est inactivé, ce qui bloque l'élongation des chaînes peptiques et inhibe de la synthèse protéique cellulaire.

3. Cytokines

- **Cytokines** : molécules polypeptidiques solubles de faible masse moléculaires libérées par de très nombreuses cellules activées au cours des processus immunitaires et inflammatoires. Exercent leur activité biologique à des concentrations très faibles de l'ordre de 10^{-10} mol, grâce à des récepteurs de haute affinité situés à la surface de cellules très variées au sein de l'organisme.
- « Hormones cellulaires »
Protéines de médiation et de régulation de la communication cellulaire

Ex: Découverte de l'IL-2 (Gallo, Science 1976)

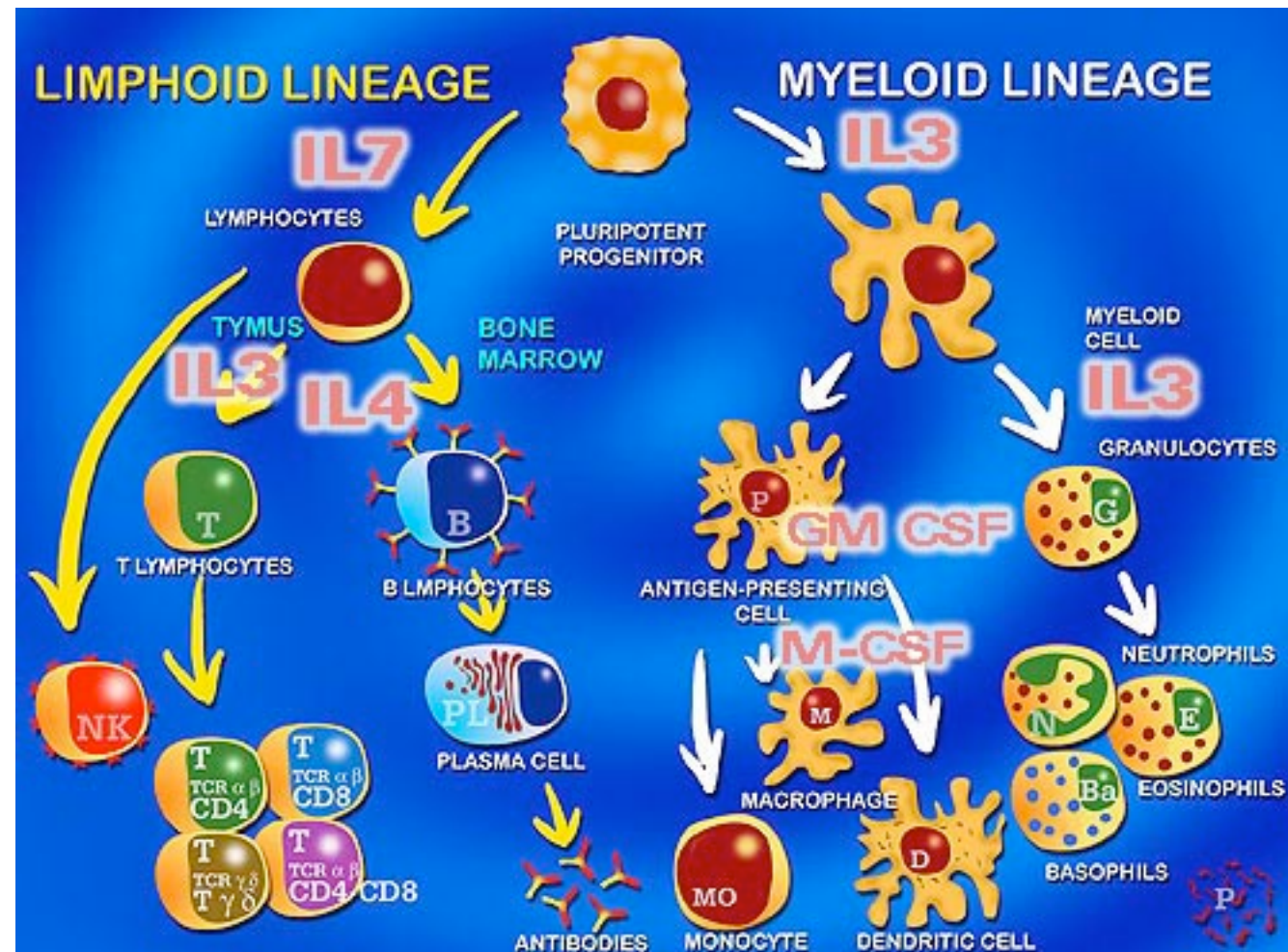


Facteur de croissance des lymphocytes

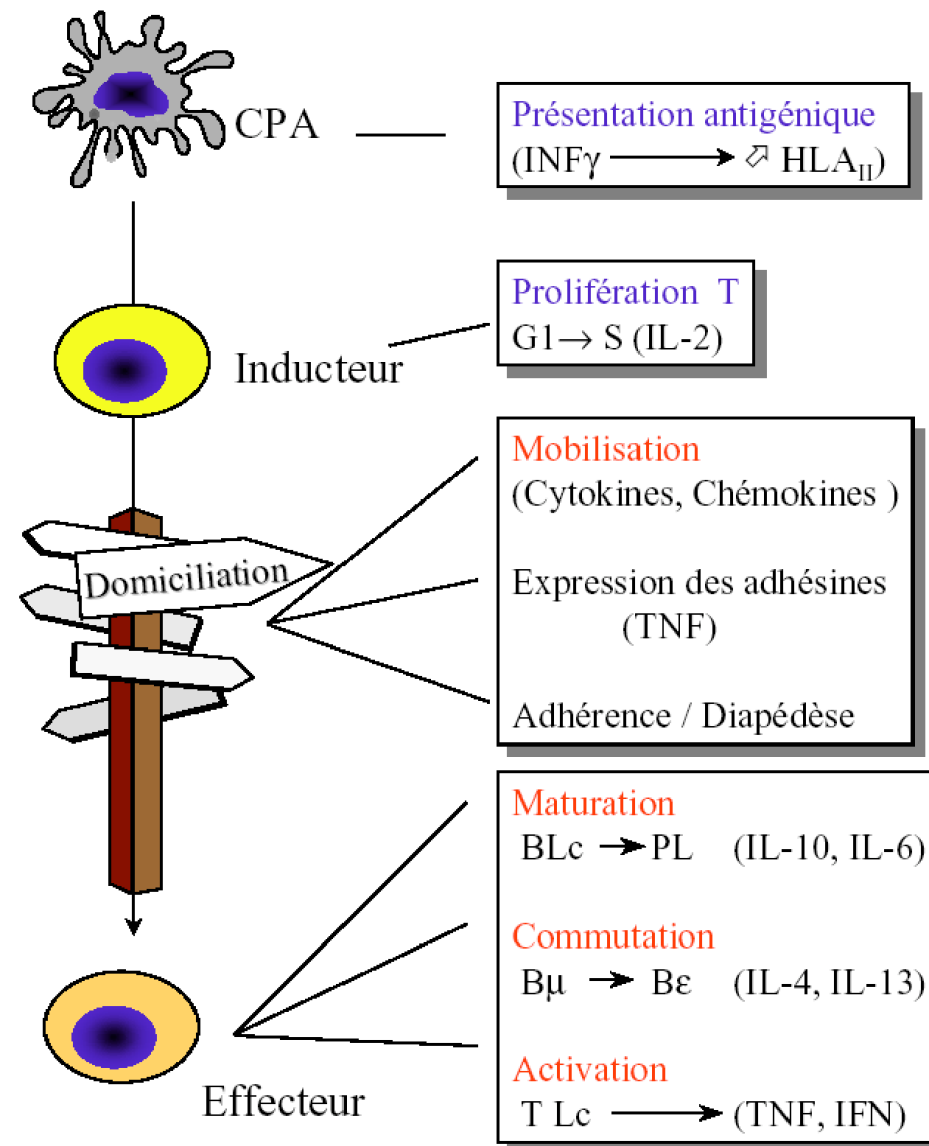
- Protéines sécrétées de 6-60kDa
- Production inductible et transitoire
- Demi-vie brève (1à 3h après injection)
➔ Action transitoire

Cytokine et hématopoïèse

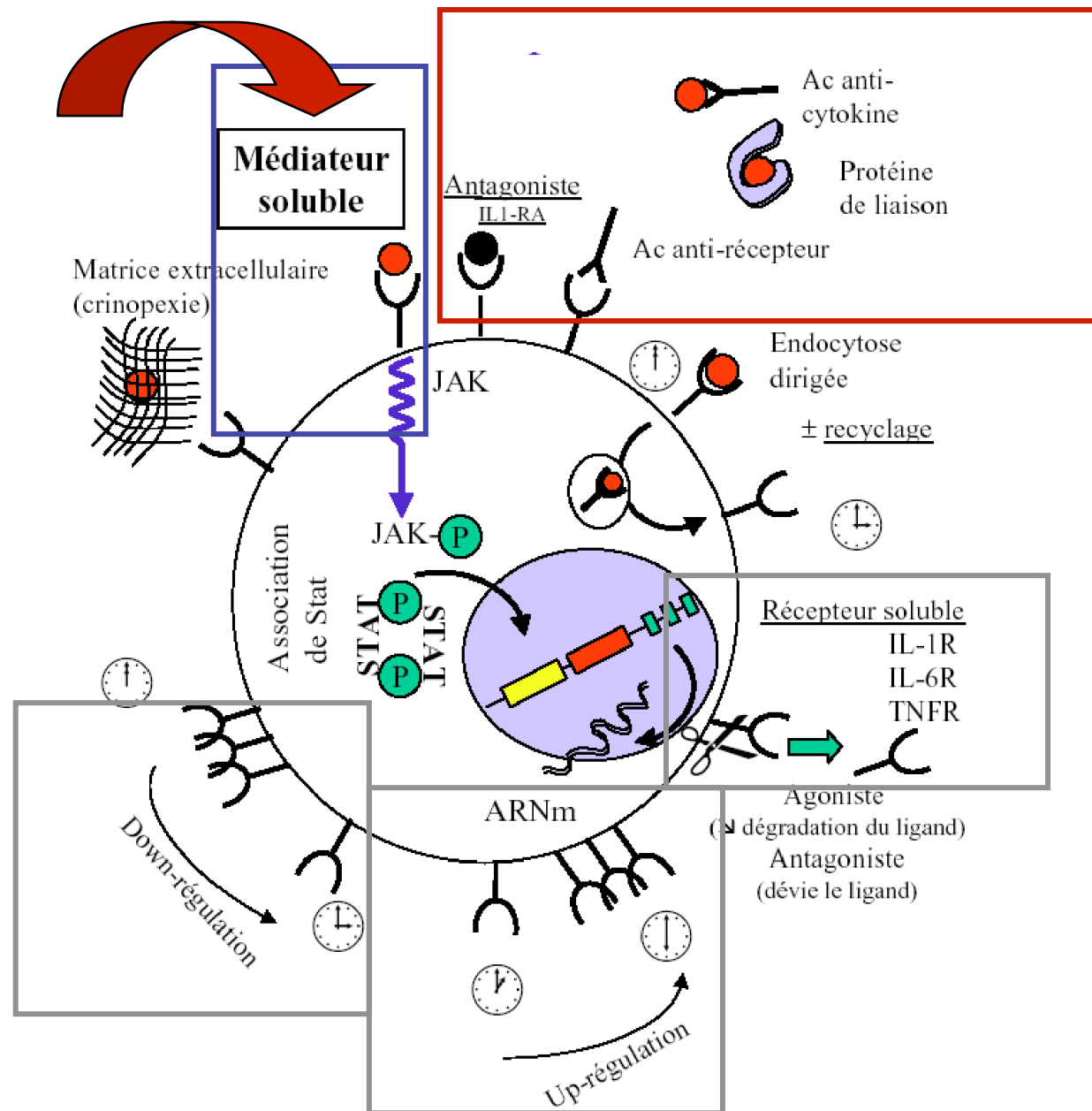
- IL-7 : produite par cellules stromales de MO et Thymus
- IL-3 et Cell Stem Factor (CSF): activation des cellules totipotentes. Différenciation par facteurs spécifiques
 - EPO
 - GM-CSF
- IL-5: Eosino-CSF
- IL-11: plaquettes



Rôle des cytokines au cours de la réponse immunitaire



Cytokines-Récepteurs : les cibles thérapeutiques



Actions thérapeutiques

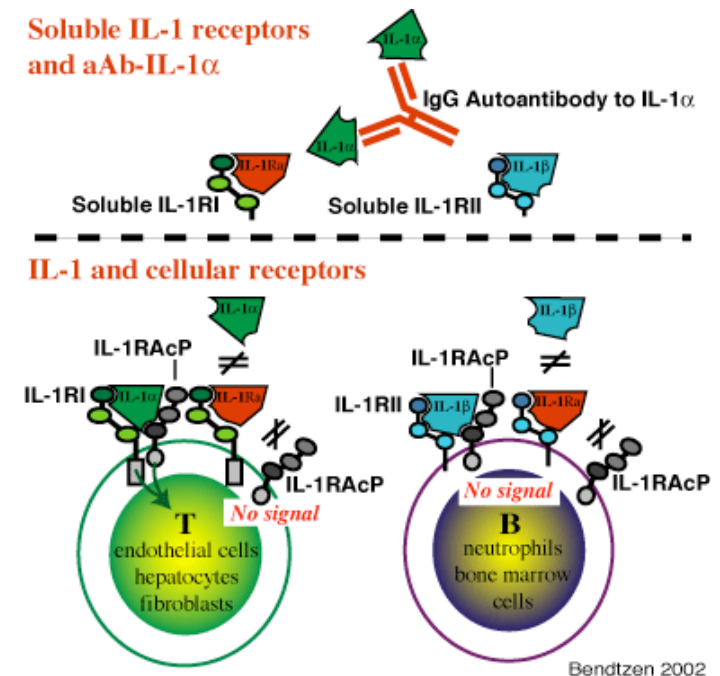
(+) injection de cytokines recombinantes

(-) neutralisation d'une cytokine

- Anticorps monoclonal (Anti-IL6; Anti-TNFa -Polyarthrite rhumatoïde)
- Récepteur soluble anti-TNF

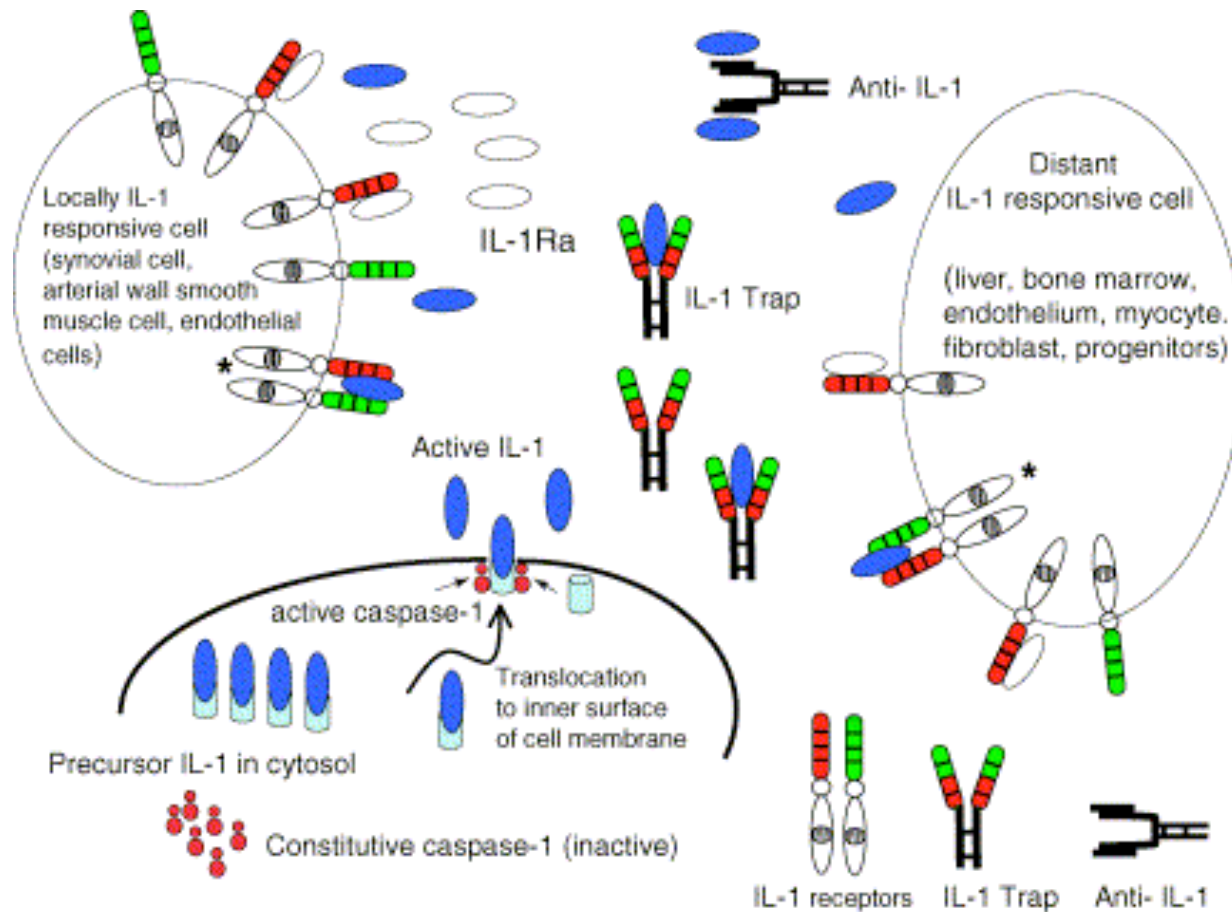
(-) neutralisation du récepteur cytokinique

- Anti-récepteur
- Agoniste du Rr cytokinique: IL-1Ra

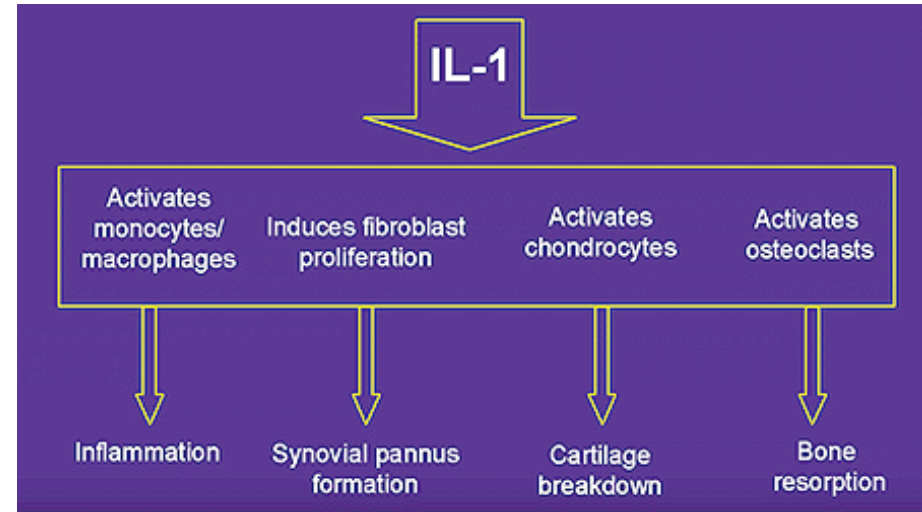
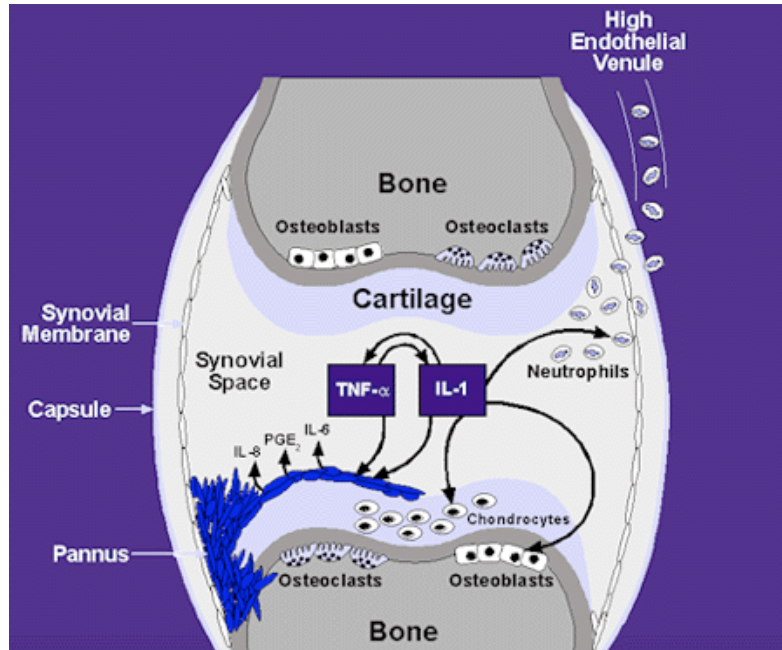


Bloquer l'IL-1 pour limiter l'inflammation

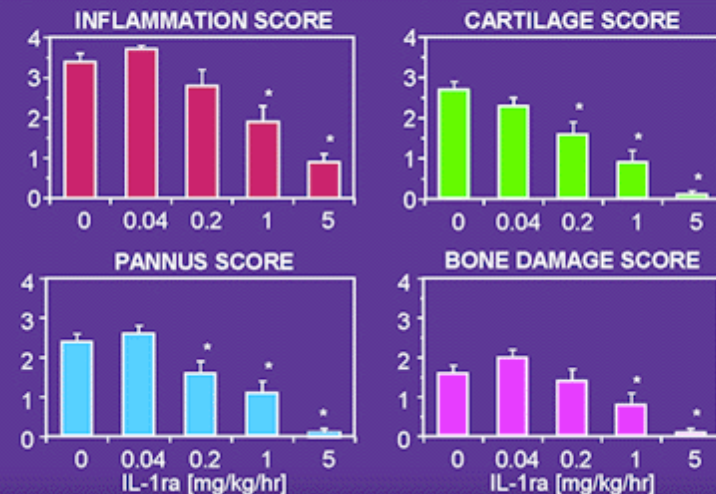
- Interventions thérapeutiques



IL-1: cible thérapeutique de l'arthrite rhumatoïde



Collagen-Induced Arthritis: Treatment Effects on Histological Scores



Bendele et al. Arthritis Rheum 42:498, 1999 p 0.05. 2-tailed t-test to vehicle control

Bloquer le TNF- α pour limiter l'inflammation

- **TNF α :**

- **Produites par M**
- **Sécrété ou en surface**
- **Actions:**
 - Cytotoxicité (Tumor necrosis factor)
 - Recrutement des PN, Mono
 - (+) endothélium: chimiokines
 - Systémique (fièvre)
 - Protéine de phase aigue

- **Anti-TNF α**

- **Anticorps**
- **Récepteurs solubles**
- **Inhibiteurs de synthèse du TNF α**

Anti-TNF α trials

Rheumatoid Arthritis
GVHD
Crohn disease
Lupus Nephritis
Uveitis
Spondylarthropathies
Lumbar spinal fibrosis

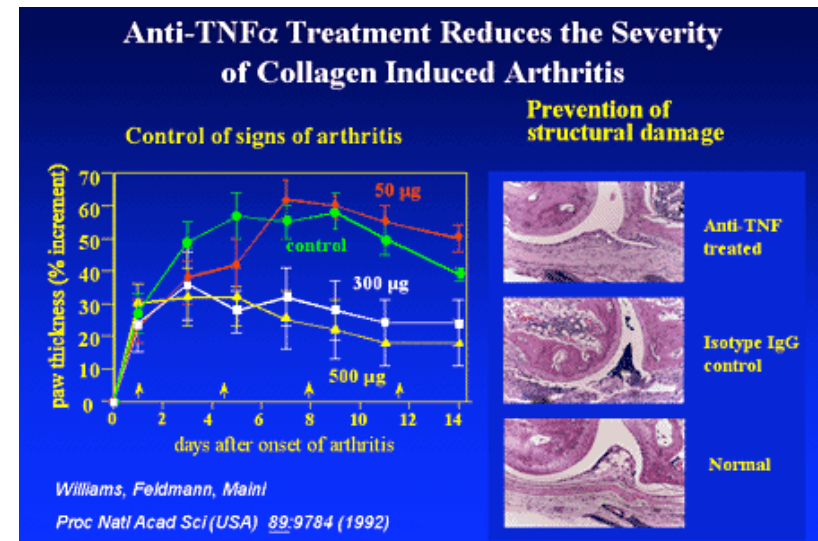
Table 1 | **Protein-based injectable anti-TNF- α therapies in clinical use**

Drug	Status	Biological form
Etanercept	Approved	Soluble TNFR2 coupled to Fc portion of IgG
Infliximab	Approved	Mouse-human chimeric anti-human TNF- α antibody
Adalimumab	Approved	Human anti-human TNF- α antibody
PEG-sTNFR1	Clinical	Pegylated form of soluble TNFR1
CDP-870	Clinical	Pegylated Fab of humanized antibody CDP-571

Fab, fragment antibody binding; Fc, fragment constant; IgG, immunoglobulin G; TNF, tumour-necrosis factor; TNFR1, TNF receptor type I; TNFR2, TNF receptor type II.

Table 2 | **TNF- α synthesis inhibitors in clinical use**

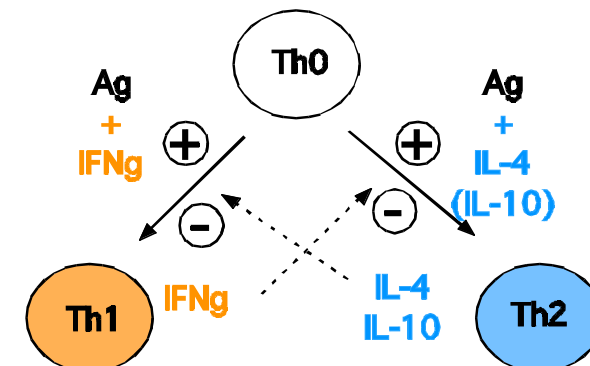
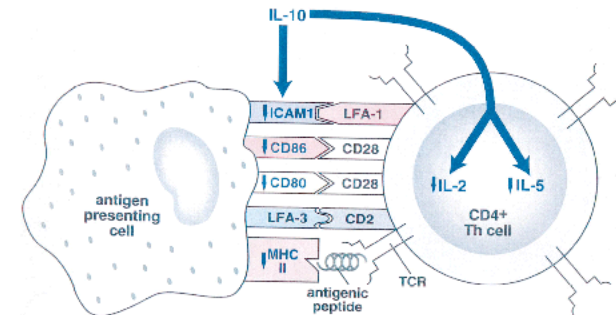
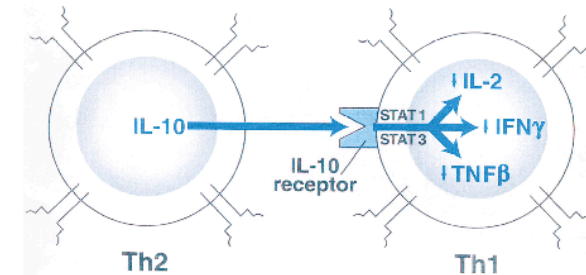
Class of inhibitor	Product	Company	Clinical status
p38 kinases	BIRB796	Boehringer Ingelheim	Phase II
	681323	GlaxoSmithKline	Phase I
	SCIO-469	Scios	Phase II
	SCIO-323	Scios	Phase I
	SB203580	SmithKline Beecham	Discontinued
	VX-702	Vertex	Phase II
	VX-745	Vertex	Discontinued
TACE	TACE inhibitor Marimastat	BristolMyers British Biotech	Phase II Discontinued
Thalomid	Thalidomide	Celgene	Phase III
Rationally designed L-amino acid peptide	RDP58	Sangstat Medical	Phase II



Cytokines immunosuppressives

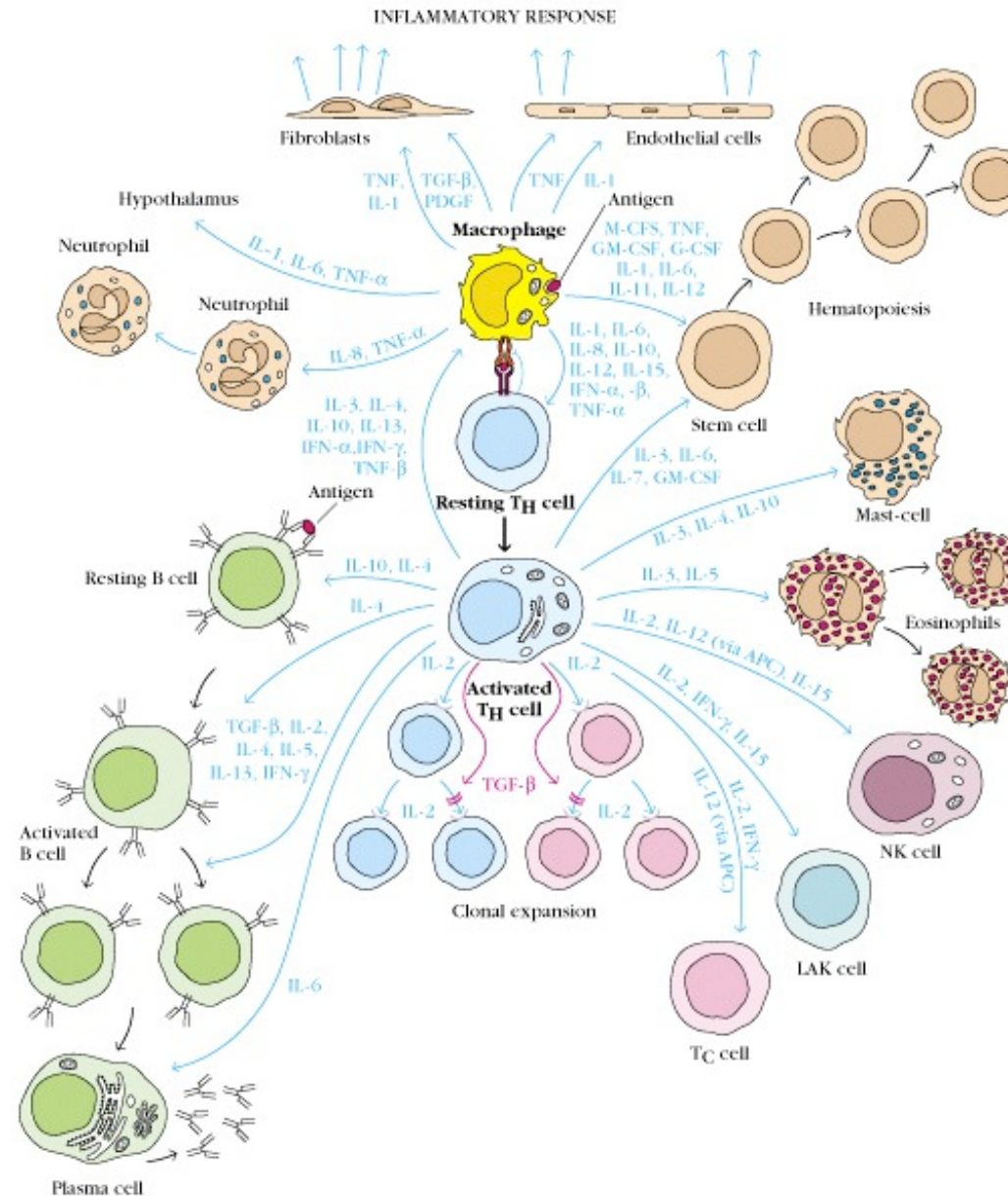
IL-10, TGFb

- **Production**
 - IL-10: Mono, Macro, LyB, LyT Tr1
 - TGFb: tout type cellulaire, Th3
- **Actions:**
 - Inhibition de production des cytokines pro-inflammatoires
 - Inhibition activité microbienne du Macro, PNneutro
 - Induit baisse d'expression MHC II et B7, ICAM-1
- **Génération de Lymphocytes suppresseurs:**
 - Treg induits: Tr1
 - Th3
- **Cytokines anti-Th1:**
 - IL-10
 - IL-4



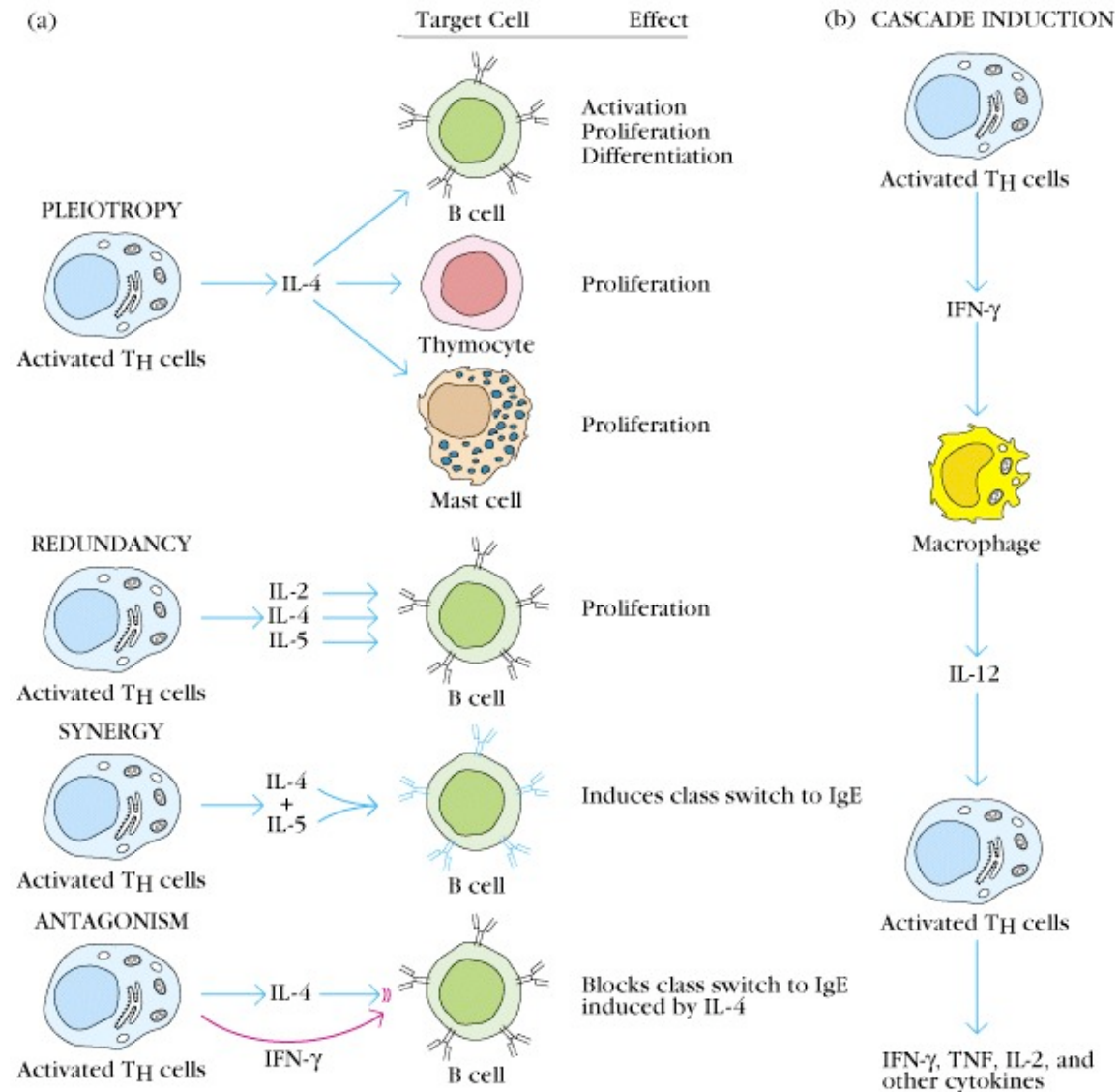
Complexité du réseau cytokinique: ex: réponse inflammatoire

Quelle cible ?



Complexité du réseau cytokinique: Actions multiples

- **pleioïtrope**



- **redondante**
- **synergique**
- **antagoniste**

4. Thérapies cellulaires immunosuppressives Lymphocytes T supresseurs

- **Ly T supresseurs:**
 - Définis par leur fonction
 - Plusieurs populations :

Treg naturels CD25^{hi}

Tr1=IL-10⁺,

Th3=TGFβ⁺

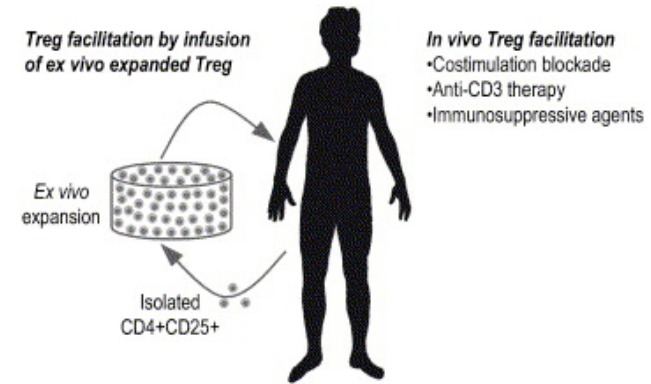
- **Principe des Immunothérapies**
 - Changer le ratio Teff/Treg

	Th1	Th2	Th3	Tr1	CD25 ^(high)
Interferon gamma	++++	–	+/-	+	+/-
IL-4	–	++++	+/-	–	+/-
TGF-beta	+/-	+/-	++++	++	+/-
IL-10	–	++	+/-	++++	+/-
Growth	IL-2	IL-2/IL-4	IL-4/TGF-β	IL-10, Ifnα	IL2+++
B helper	IgG2a	IgG1/IgE	IgA	–	–
Suppression	Th2	Th1	Th1 ou 2	Th1	Th1 or 2
Proliferation	+++			+/- (IL-15)	IL-2
Affinity for self	+/-	+/-	+	+ ?	+++++

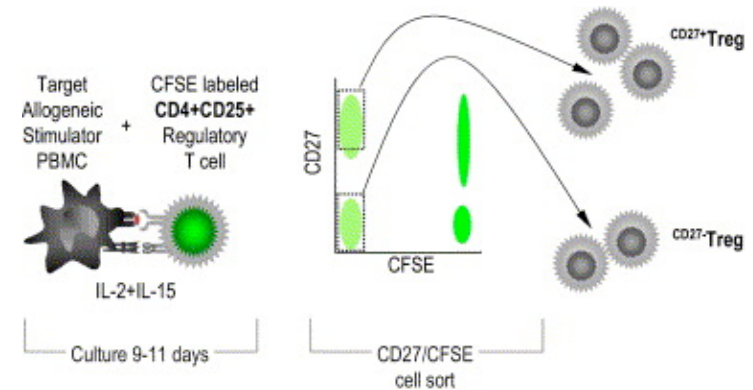
Treg en Immunothérapie

- **Génération des Treg**
 - Amplification des Treg naturels
 - Induction de T suppresseurs
- **Rapport Effecteurs/Reg:**
 - Quantités
 - Thérapie précoce
- **Induction in situ (bloquer costim) vs Transfert adoptif**
- **Action Ag-spécifique ?**
- **Application lors des protocoles de:**
 - Transplantation d'organe, LyT reg du donneur
 - Transplantation de MO
 - MAI

« Polyclonal »



« Ag-spécifique »



II. Immunostimulation

Intensité Réponse Immunitaire

Agent infectieux

Protection

Infection chronique

Agent non-pathogène

Allergie

Pas de réaction

Grefe

Rejet

Acceptation

Organe (du soi)

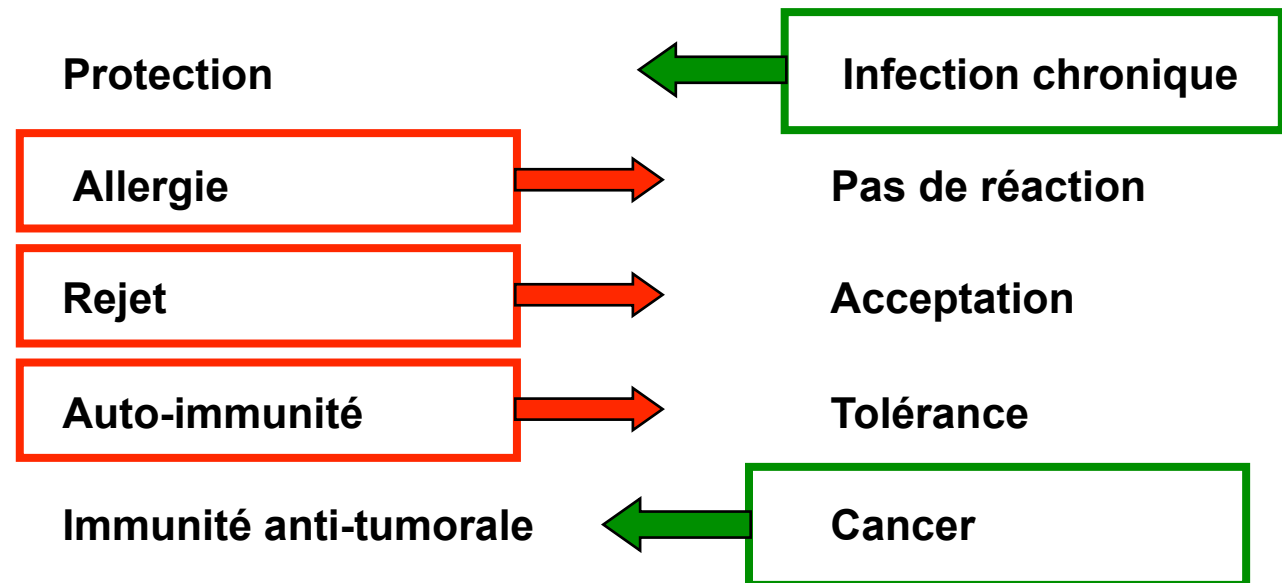
Auto-immunité

Tolérance

Tumeur

Immunité anti-tumorale

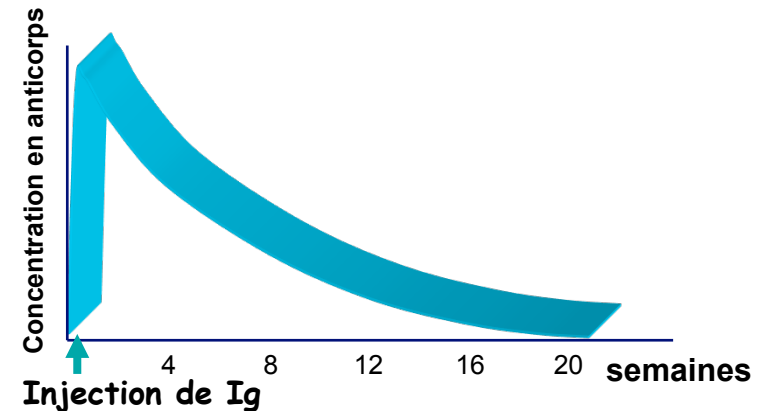
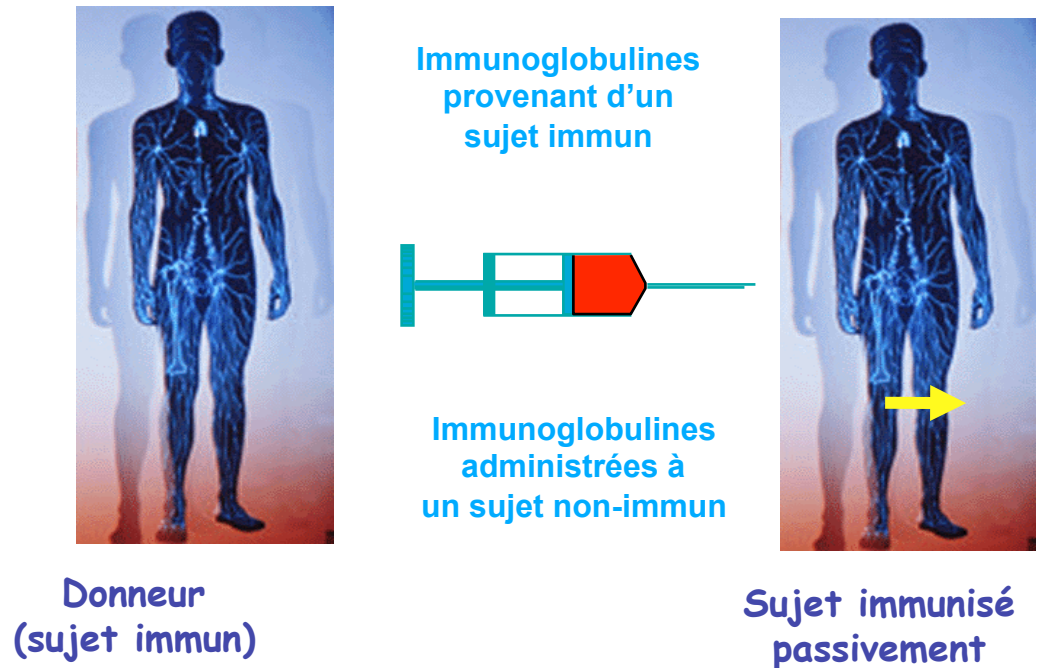
Cancer



- **Passif:**
 - **Sérothérapie**
 - **Thérapie cellulaire**
- **Actif:**
 - **Vaccination, Immunisation thérapeutique**
 - **Potentialisation de l'activation lymphocytaire**
 - **Stimulation hématopoïèse, lymphopoïèse**

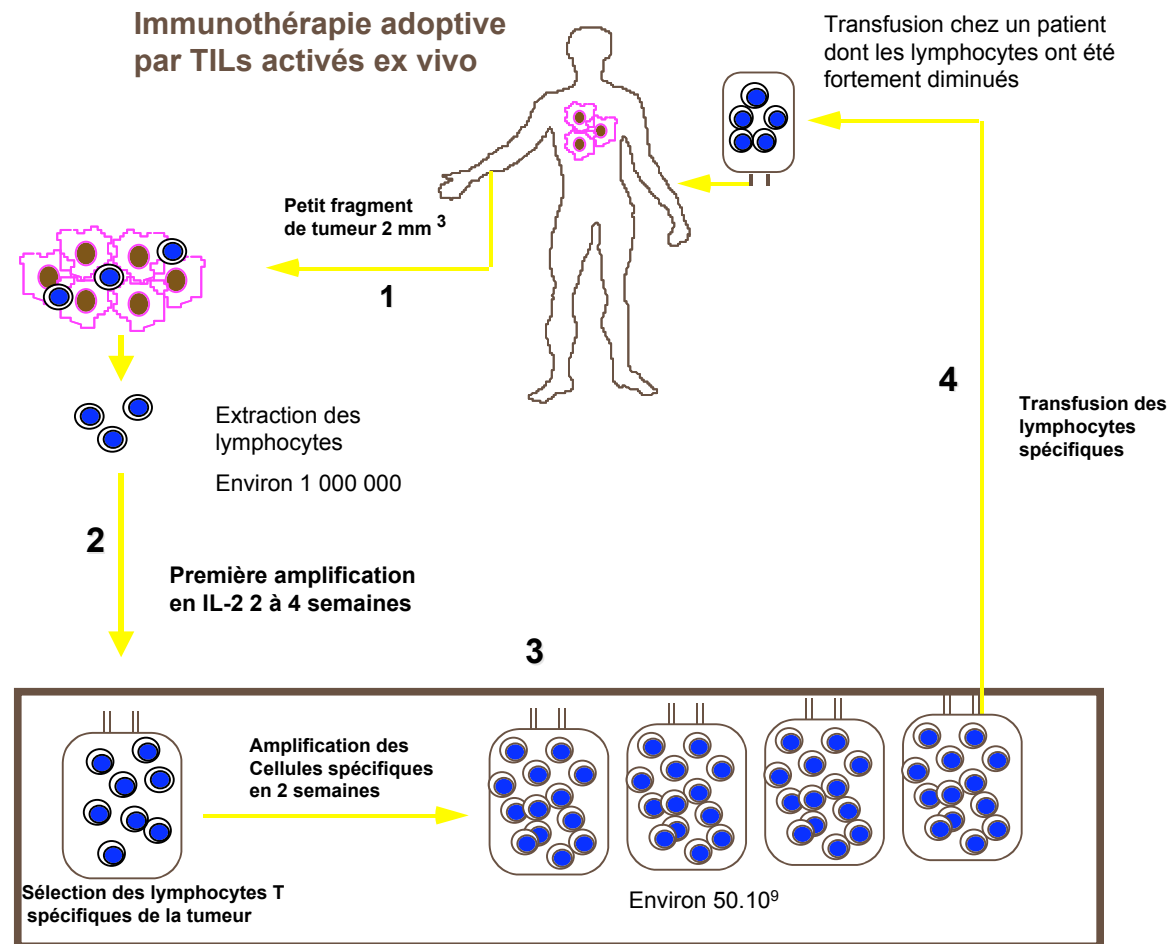
1. Sérothérapie

- Administration d'un sérum immunisant d'origine animale ou humaine
- Cas d'urgence (action immédiate)
- **Avantage:**
 - Protection immédiate
- **Limites:**
 - Protection de courtes durée
 - Coût élevé
 - Sécurité contestée

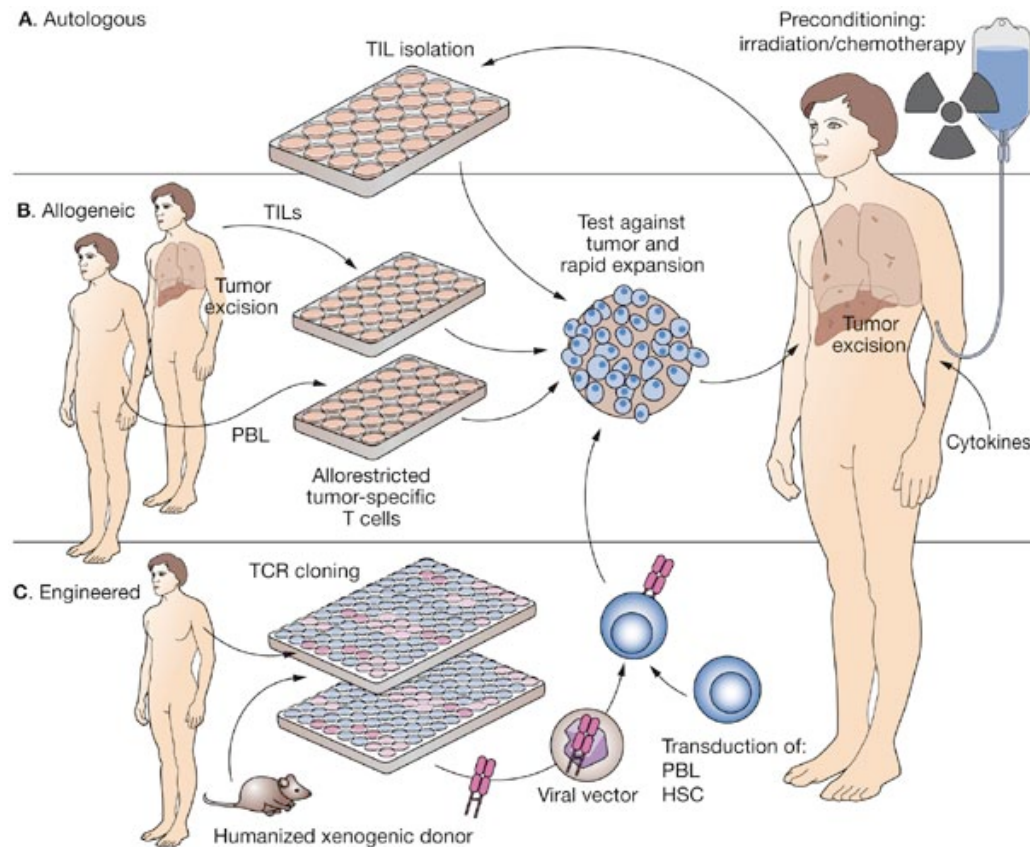


2. Immunostimulation adoptive

- Transfert des cellules effectrices
- TIL: Tumor-Infiltrating Lymphocytes
- Lympho T extraits des tumeurs, réactivés in vitro (IL-2), réinjectés



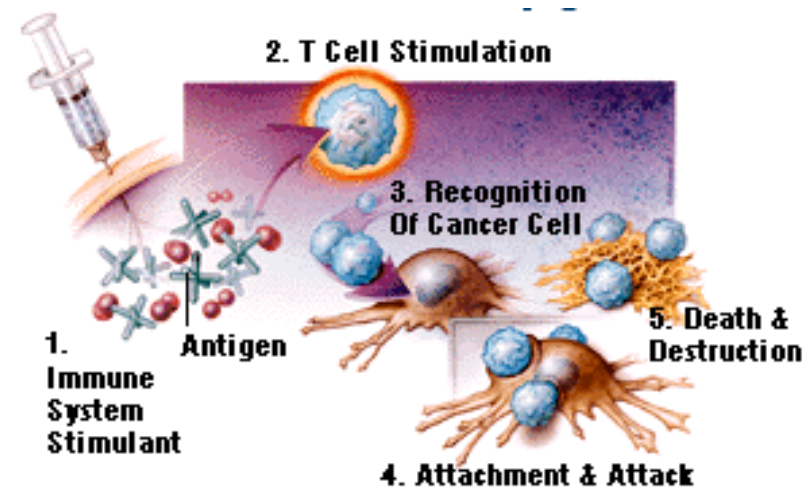
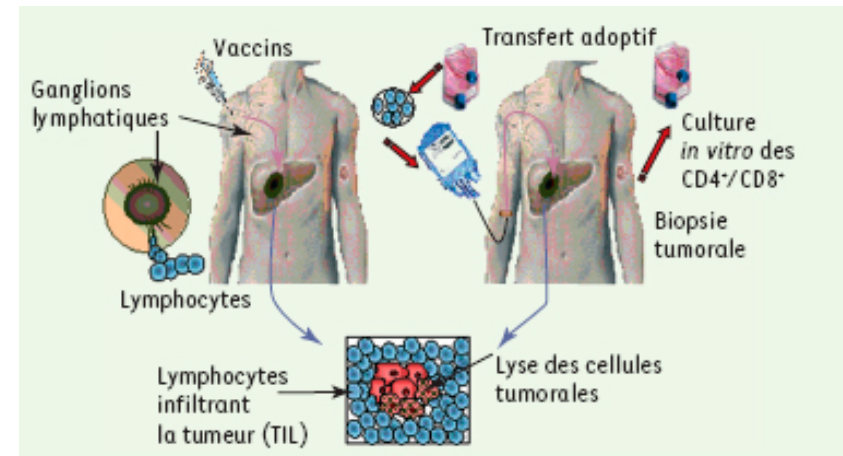
Autres modalités d'immunothérapies passives



- Possible applications of adoptive cell transfer using a preconditioning lymphodepleting regimen consisting of chemoradiotherapy and the use of different types of donor T cells in conjunction with administration of exogenous cytokines (A). The approach used by Dudley *et al.* in their recent trial¹⁷ Autologous TILs were isolated from the tumor samples harvested from the patient, tested, expanded and reinfused. (B) The allogeneic cells transferred into the patient could be derived from TILs harvested from another patient (a good responder to autologous adoptive cell transfer) or generated *in vitro* from peripheral blood lymphocytes of an allogeneic healthy donor and selected for their ability to recognize tumor epitopes in the context of the recipient's major histocompatibility complex. (C) Effector T cells generated by gene therapy methods using lentiviral or retroviral vectors. TCR sequences can be derived from either allogeneic or xenogenic sources.^{109, 112} In the case of xenogenic source, donor animals must express human restriction element (i.e. human leukocyte antigen allele presents in the patient) in order to be able to recognize human antigens on human tissues. Xenogenic donors have a T-cell repertoire not influenced by negative selection against human self-peptide; thus, it may be easier to generate cells with high-avidity TCR for human tumor antigens. In the case of an allogeneic donor a clone expressing a TCR reactive against the patient's tumor can be generated either *in vitro* from a healthy donor (i.e. allogeneic allorestricted tumor-specific T cells) or from the TILs of another patient (see B). After isolation of tumor-reactive cells, the TCR is cloned and inserted into a viral vector and used to transduce either autologous or allogeneic PBL, peripheral or cord blood HSC,¹¹³ or even an immortalized T-cell line; the cells are then selected, matured and expanded as needed, and reinfused. In all these scenarios it is also possible to further manipulate cells before transfer by genetic means. This process may include insertion of sequences encoding for cytokines (e.g. interleukins 2 or 15), adhesion molecules, antiapoptotic or suicide genes, and so on.¹⁰⁸ Abbreviations: HSC, hematopoietic stem cells; PBL, peripheral blood lymphocytes; TCR, T-cell receptor; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte.

3. Vaccination ou Immunisation thérapeutique

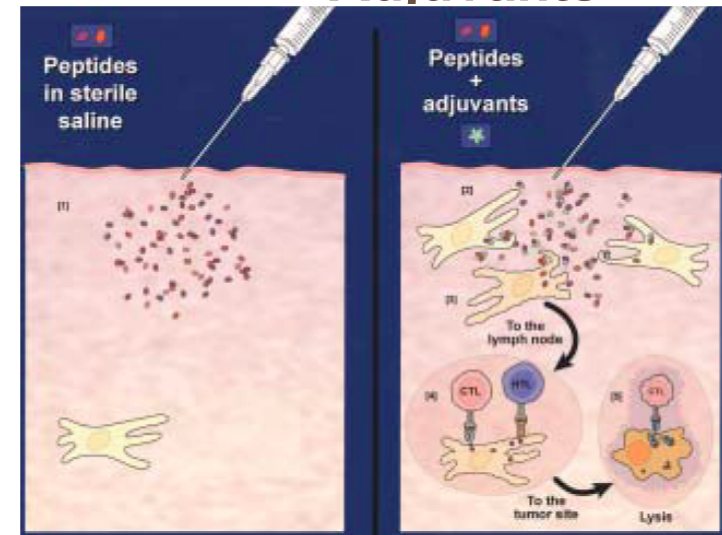
- **Objectifs:**
 - Déclencher une réponse effectrice «primaire » Ag-spécifique
 - Générer une mémoire immunologique
- **Modalités;**
 - **Injection d'antigènes**
 - Injection de lysats tumoraux
 - Injection de peptides TAA
 - **Immunostimulation - levée de tolérance**
 - Injection d' adjuvants seuls
 - Cytokines
 - BCG, virus: 1960; tumeur vessie BCG mais efficacité limitée: 25%
 - Levée d'anergie
 - Cytokine
 - Molécules de costimulation



- « **adjuvare** » : aider, assister
- Substance capable d'augmenter la réponse immune dirigée contre un Ag administré simultanément.
- Multiples / classification complexe (selon mode d'action - effets)

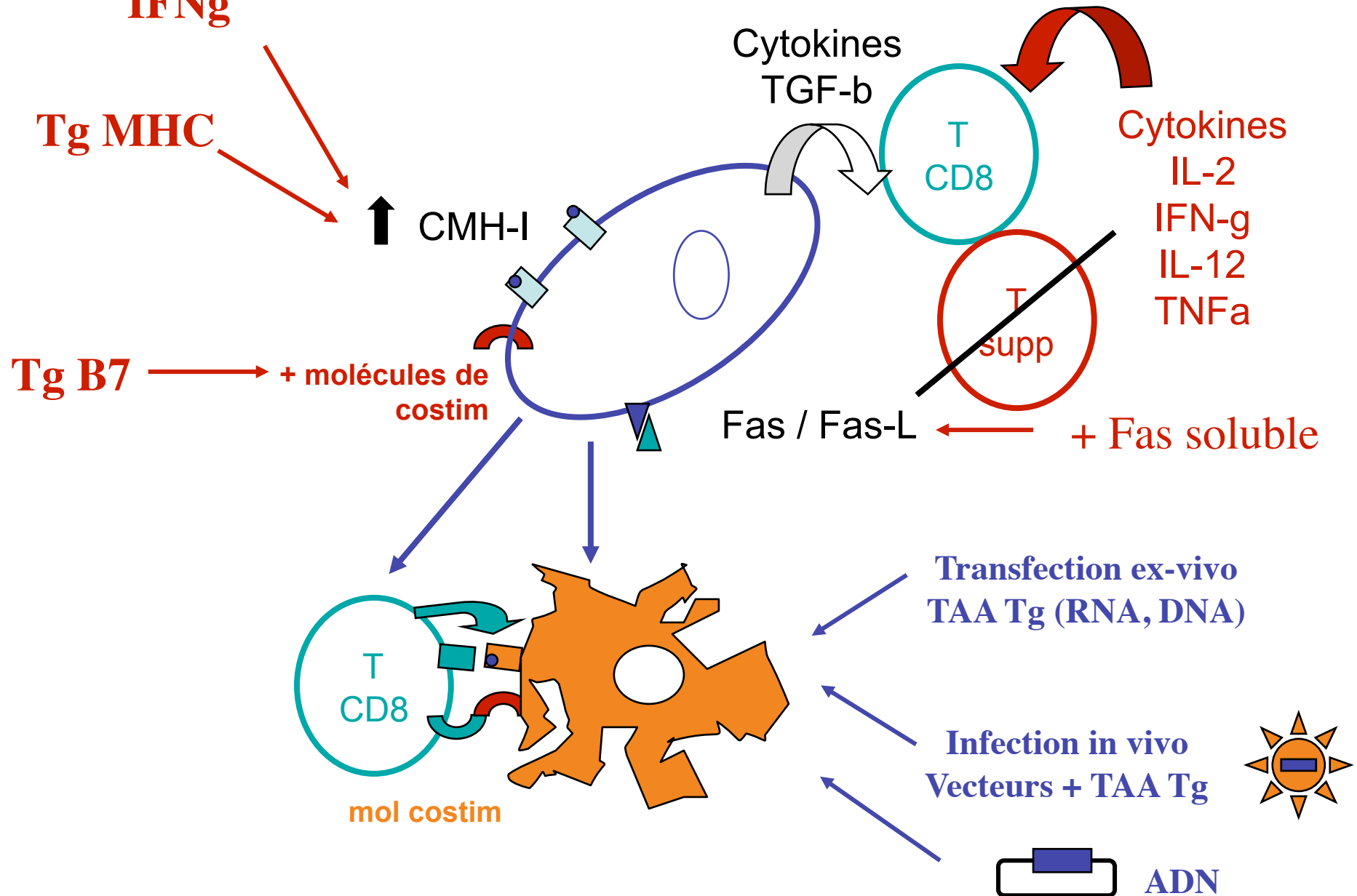
- **Adjuvants huileux :**
 - émulsion eau-huile, **IFA** (Adjuvant Incomplet de Freund), **MF59**
- **Adjuvant minéraux :**
 - Précipité insoluble; **Alum** (Hydroxyde ou Phosphate d'Alu)
- **Constituants bactériens:**
 - Mycobactérie inactivée (Mycob tuberculosis) ou constituants (Mycob bovis, BCG) : **CFA**
- **Toxines bactériennes**
 - Toxine cholérique (CT) ou ss-u B purifiée (**CTB**), Toxine pertussique (PT)
- **Oligodésoxynucléotides CpG**
 - Séquence ADN bactérien non-méthylée (**ODN CpG**) ; interaction avec TLR-9

Adjuvants



- **Saponines**
 - Agent tensioactifs ; **Quil-A®**
- **ImmunoStimulating COMplexes (ISCOM)**
- **Adjuvants vésiculaires**
 - Bicouche lipidique, **liposomes** - **virosomes**
- **Cytokines**
 - Médiateurs des RI: **IL-2, IL-12, IFN-g, GM-CSF**
- **Imidazoquinolones**
 - **Imiquinod**, Interaction Rr des APC, Σ cytokines
- **Polysaccharides**
 - Dextrans, glucanes, perméabilisent les muqueuses

Potentialisation de la réponse immunitaire cas des immunothérapies anti-tumorales



4. Ajout de molécules immunostimulatrices

a) Signal 1: Allomolécule

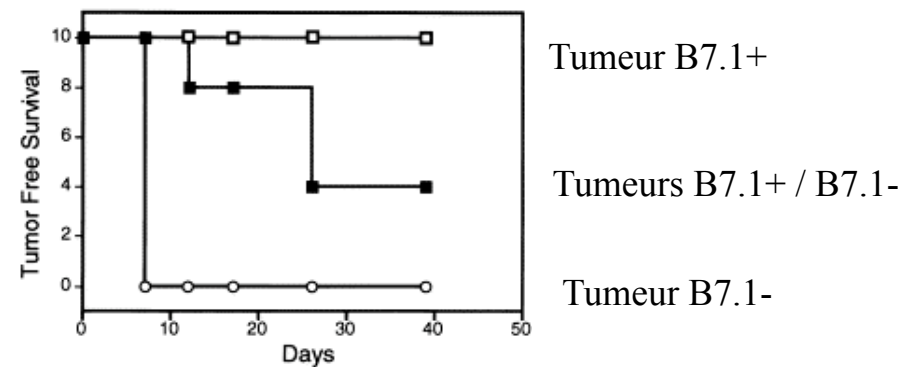
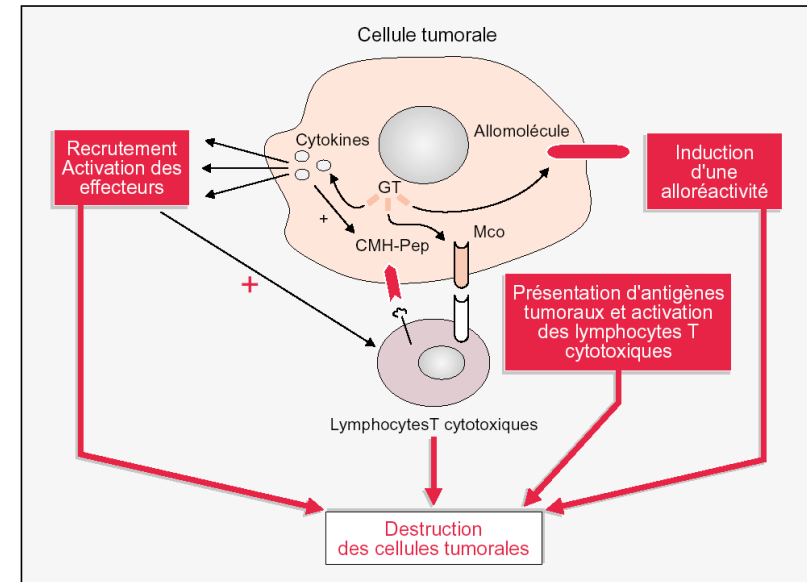
Réponse allogénique >>
Fréquence de lyT allo

b) Signal 2: Molécules de costimulation

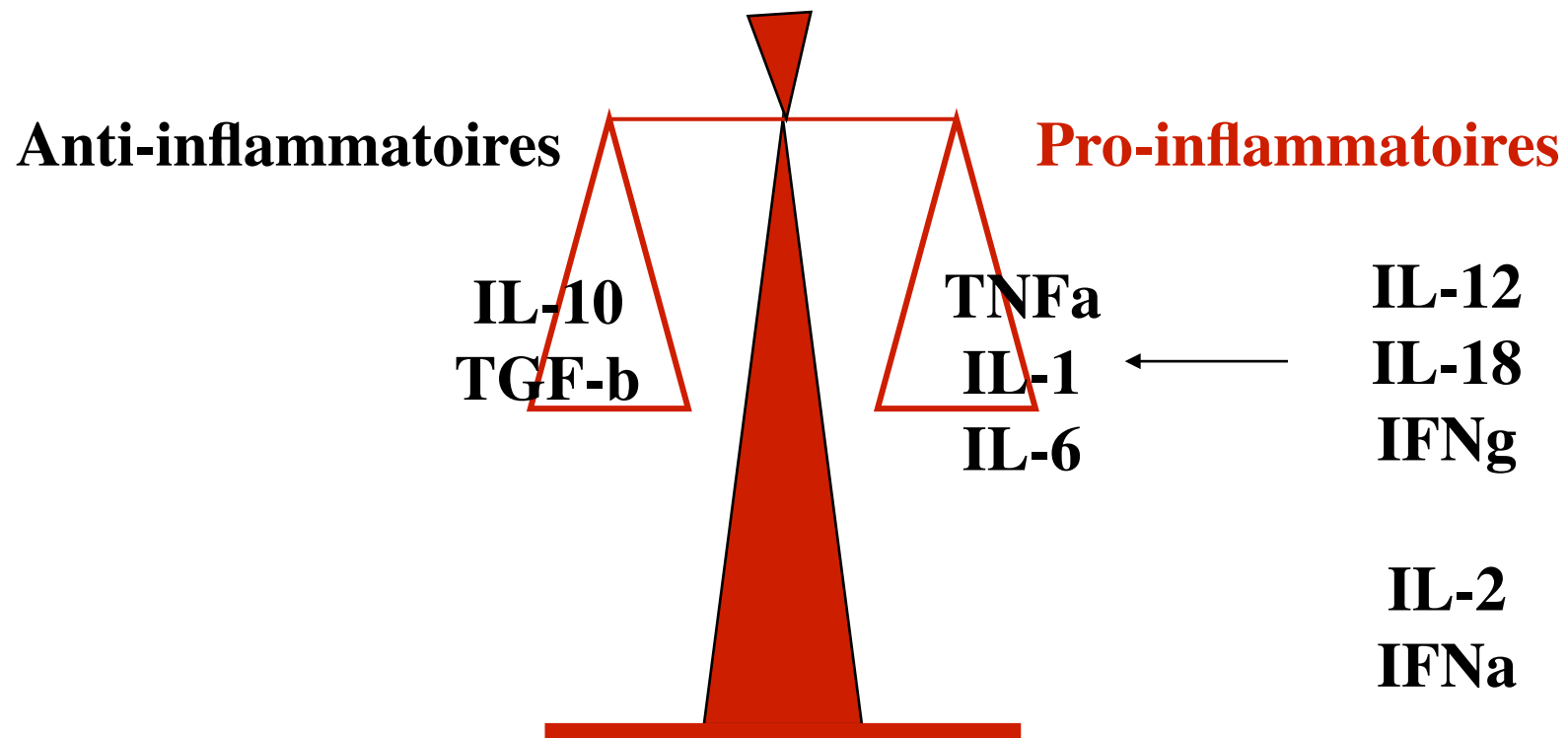
Transfection des cellules tumorales par les
gènes de molécule de co-stimulation B7
Tumeur = APC

c) Signal 3: Cytokines

Favorise activation lymphocytaire initiale
Amplification phase effectrice de la RIC et RIH
Switch des Ig
Maintien de la mémoire immunologique



Cytokines pro-inflammatoires



Production des cytokines recombinantes

- Clonage gène
- Systèmes d'expression
 - E.Coli, baculovirus, levure, CHO
 - Problème de glycosylation
- Techniques de purification
- Cytokines AMM: IL-2, IFN, EPO, GM-CSF, ...
- Intérêt stratégique et économique remis en question par de nombreuses compagnies industrielles
Importance des biotech's
- Développement des kits de détection

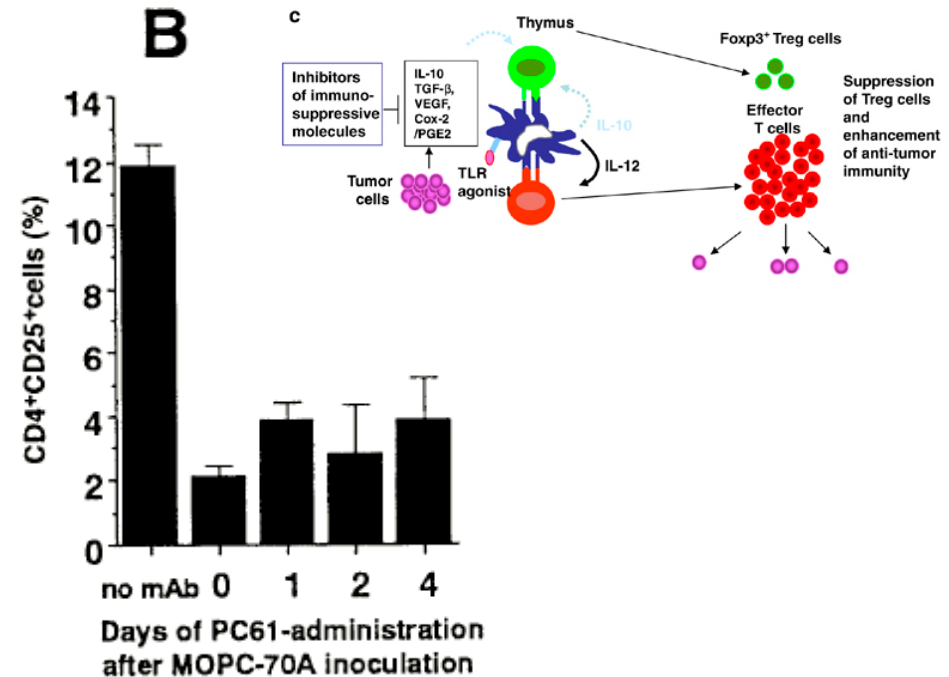
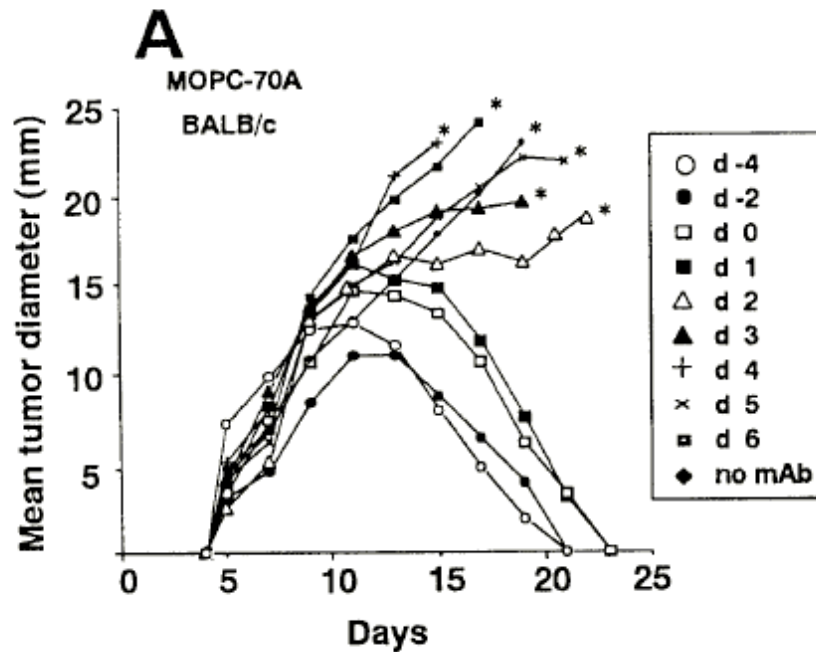
CLONED CYTOKINES

TNF- α (1989)	TGF β 2 (1993)
IL-1- α (1990)	TGF β 3 (1988)
IL-1- β (1993)	AMCF-II (1992)
IL-2 (1991)	IL-12 (1997)
IL-4 (1993,1994)	IL-15 (1998)
IL-6 (1991,-1994)	GSC-F (1995)
IL-8 (1994,1992)	VEG-F (1995)
TGF β 1 (1992)	GM-CSF (1995)



5. Bloquer l'immunosuppression

- Elimination des LyT reg (CD4+ CD25+)
 - In vivo : Anticorps anti-CD25
 - Ex vivo
- Bloquer l'activité suppressive des Treg



Efficacité thérapeutique de l'immunostimulation: stratégies combinées

Stimulation de la RI	Stratégie
Reconstitut° Syst imm	GMO, ThG Cytokines : GM-SCF
Présentation Ag	APC: DC matures Ag particuliers
Activation lymph	Mol costim B7.1, B7.2 Cytokines: IL-12, 18
Phase Effectrice	Cytokines: IL-2, IFNg
Limiter la suppression	Bloquer mol suppressives Déplétion des T reg (CD4+ CD25+)
Maintien immunité	Rappels Ag Cytokines IL-15