



HAL
open science

Cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées pour la guérison du VIH chez les patients atteints d'un lymphome VIH-induit et éligibles à l'autogreffe

Alice Barbiery, Céline Marigny, Rébecca Cohen, Sofia Arnal, Ruben Assaraf, Emma Bergoin, Arthur Bezie, Mark-Alexandre Blaze, Eloi Buck, Cristina Claver Sicilia, et al.

► **To cite this version:**

Alice Barbiery, Céline Marigny, Rébecca Cohen, Sofia Arnal, Ruben Assaraf, et al.. Cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées pour la guérison du VIH chez les patients atteints d'un lymphome VIH-induit et éligibles à l'autogreffe. *Acta discipulorum academiae medicamentariae artis*, 2020, 3, pp.25-32. hal-04352490

HAL Id: hal-04352490

<https://u-paris.hal.science/hal-04352490>

Submitted on 22 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées pour la guérison du VIH chez les patients atteints d'un lymphome VIH-induit et éligibles à l'autogreffe.

Alice BARBIERY, Céline MARIGNY, Rébecca COHEN, Sofia ARNAL, Ruben ASSARAF, Emma BERGOIN, Arthur BEZIE, Mark-Alexandre BLAZE, Eloi BUCK, Cristina Claver SICILIA, Lea COHEN, Aissatou COULIBALY, Lola COVIN SEVRIN, Sixtine DE GUITAUT, Matthieu DEGREZE, Édouard DUPONT, Victor FAURE, Perla GALIMIDI, Noella GROSSI, Dina Habib HANAWY, Marie HUG DE LARAUZE, Manon LOIGNON, Diego Marti Lira KORNFIELD, Emeranne PIERRE, Camille TACQUIN, Lucas BOURHIS, Pierre Axel BRAL, Katia Carvalho ALVES, Antoine LORTET, Eve MATHIEU, Marie-Christine MBADI BAYEBEC, Antoine MONTANARI, Rihanna WILLEMS, Laurent YOUNESS, Haya ZANA, Jordan CHAILLIER, Colin DUFAT, Ines FEHRI, Camille LANCIEU, Katell LEOSTIC, Anis NABTI, Mélanie LY, Louis VIGNERON.

Cet article est une fiction, décrivant une présentation de plan d'entreprise tel qu'il pourrait être réalisé. Si le fonds scientifique est réel, tout le reste n'est qu'un exercice de style — consultez la présentation de l'U. E. I5, en début de numéro, pour plus de détails.

Résumé

Si les stratégies thérapeutiques contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) n'ont cessé d'évoluer ces dernières décennies, proposant aux patients des thérapies toujours plus efficaces, le cas des patients atteints de lymphome induit par le VIH reste un défi thérapeutique. Loin d'être une problématique isolée, les lymphomes constituent une complication majeure de l'infection par le VIH et la deuxième cause de mortalité par cancer dans cette population. Deux priorités s'imposent : la charge virale plasmatique du VIH doit être indétectable tandis que le lymphome, pathologie pouvant engager le pronostic vital, nécessite une prise en charge thérapeutique optimale et similaire à celle proposée chez les patients non infectés par le VIH. Dans le cas de lymphome réfractaire ou résistant aux chimiothérapies, la greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques (CSH) peut être envisagée.

Les patients de Berlin et de Londres représentent aujourd'hui deux preuves vivantes qu'il est possible de guérir du VIH. Ces patients séropositifs au VIH ont présenté une charge virale indétectable après une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques provenant de donneurs préalablement sélectionnés et porteur d'une délétion naturelle, homozygote $\Delta 32$ sur le gène CCR5. Cette mutation confère une résistance des cellules au VIH-1, car le virus ne peut pénétrer et se multiplier dans les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4+ et les macrophages, menant les patients à la guérison. Notre équipe s'appuie sur ces données et saisit l'opportunité offerte par le protocole d'autogreffe pour proposer un médicament de thérapie innovante (MTI) dans l'objectif de guérir du VIH-1 les patients atteints de lymphome VIH-induit, réfractaires ou résistants aux chimiothérapies et éligibles à une autogreffe. L'objectif est d'utiliser une partie des cellules souches prélevées pour l'autogreffe pour les modifier génétiquement afin de les rendre résistantes à l'entrée du VIH-1.

L'objectif de notre travail est de proposer une stratégie de développement d'un médicament de thérapie innovante composé de cellules souches hématopoïétiques (CSH) autologues génétiquement modifiées pour rendre les lymphocytes T CD4+ et les macrophages résistants à l'infection par le VIH-1. Des preuves de concept *in vitro* et *in vivo* ont déjà été publiées sur la modification génétique choisie et des essais cliniques sont actuellement en cours. Nous réaliserons le développement de notre MTI Cellfivent® selon une approche fondée sur le risque.

Contexte

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus ciblant les cellules immunitaires, notamment les macrophages et les lymphocytes T auxiliaires CD4+. La destruction de ces cellules immunitaires entraîne une immunodépression qui

peut conduire au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Il existe deux principaux génotypes de ce virus, le type 1 (VIH-1) et le type 2 (VIH-2), qui se distinguent par leur composition protéique, leur répartition géographique et leur prévalence. Le VIH-1 est prédominant en Europe [1] alors que le VIH-2 sévit principalement en Afrique de l'Ouest [2].

La disparité de structure influence la sensibilité aux traitements existants et impose l'utilisation de méthodes diagnostiques différentes selon le type de VIH. Le VIH-1 possède un temps de réplication plus court, sa virulence et sa transmissibilité sont plus importantes que celles du VIH-2, c'est pourquoi nous nous concentrerons sur le traitement du VIH-1.

Les sous-types du VIH-1 n'utilisent pas les mêmes voies de fusion cellulaire pour débiter leur cycle d'infection. Le VIH à tropisme R5 se lie au

corécepteur cellulaire CCR5 pour pénétrer dans la cellule tandis que celui à tropisme X4 se lie au CXCR4. Des virus à double tropisme ont été recensés et la grande variabilité génomique du VIH peut induire un changement de tropisme. Cette variabilité peut être à l'origine de résistances médicamenteuses et complique le développement de thérapeutiques antirétrovirales [3]. Un vaccin anti-VIH n'est à ce jour pas encore développé car les anticorps produits par l'organisme infecté ne neutralisent pas convenablement l'agent infectieux et n'offrent ainsi pas de protection optimale [4].

La combinaison de trois médicaments antirétroviraux (ARV) est actuellement la seule thérapie permettant la réduction de la charge virale, la stabilité du taux circulant de lymphocytes T CD4+ et ainsi la restauration de l'immunité. Les trithérapies sont utilisées pour agir à différents niveaux du cycle de réplication virale afin de garantir l'efficacité clinique et de limiter l'apparition de résistances. Cependant, bien qu'elles aient permis une augmentation de l'espérance de vie et une amélioration considérable de la qualité de vie, les trithérapies ne permettent pas d'aboutir à une guérison complète de l'infection par le VIH-1. De plus, malgré les trithérapies, des pathologies induites peuvent se développer. Le VIH est notamment associé à la survenue de nombreux cancers. Parmi eux, le lymphome non hodgkinien (LNH) représente le cancer le plus fréquemment induit par le VIH [7] et est la première cause de mortalité chez les patients séropositifs [5,6]. Par rapport à la population générale, le risque de développer un lymphome non hodgkinien pour une personne infectée par le VIH est multiplié par 200 [8] et dans le cas du lymphome hodgkinien, le risque est multiplié par 20 [8]. Les antirétroviraux, bien qu'ayant diminué l'incidence des lymphomes non hodgkinien, ne protègent que partiellement les patients contre ce risque après plusieurs mois de traitement [7].

Les patients de Berlin et de Londres sont à ce jour les seuls patients considérés comme ayant guéri du VIH, suite à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement de leur hémopathie maligne respective.

Le patient de Berlin était atteint d'une leucémie aiguë myéloïde, pour laquelle il a été traité par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques issues d'un donneur volontaire sain [9] présentant naturellement la délétion homozygote $\Delta 32$ du gène CCR5 qui a permis d'induire une résistance au VIH-1. Dix ans plus tard, le patient de Londres lui aussi porteur du VIH-1 et atteint d'un

lymphome hodgkinien, reçoit à son tour une allogreffe de cellules souches humaines portant la même mutation et présente aujourd'hui une charge virale nulle [10].

Afin de mieux comprendre l'impact de cette délétion initialement présente dans les cellules souches hématopoïétiques des donneurs, il convient d'étudier plus en détail le mécanisme de pénétration du VIH dans les cellules immunitaires.

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des cellules telles que les lymphocytes T CD4+ ou les macrophages nécessite l'action de deux glycoprotéines (gp) d'enveloppe virale : gp-120 et gp-41 (figure 1). La protéine gp-120 se fixe au récepteur membranaire CD4 exprimé à la surface des lymphocytes T auxiliaires. Cette liaison entraîne un changement de conformation de gp-120, qui peut ensuite se lier soit au corécepteur CCR5, soit au corécepteur CXCR4 [11]. La liaison de gp-120 à CCR5 correspond aux virus à tropisme R5 (figure 1-1) et la liaison de gp-120 à CXCR4 correspond aux virus à tropisme X4 (figure 1-2). Il existe également des virus à double tropisme R5 et X4 (figure 1-3). Une fois la liaison avec les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 effectuée, la protéine gp-41 permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire entraînant la pénétration du virus dans les cellules [12].

Les patients de Berlin et de Londres étaient porteurs de VIH-1 à tropisme R5 [9,10] (figure 1-1). Les cellules souches hématopoïétiques reçues dans le cadre de leur allogreffe provenaient de donneurs sains porteurs d'une délétion homozygote ($\Delta 32$) naturelle du gène codant pour le corécepteur CCR5. Une fois greffée, les cellules souches se différencient *in vivo* en lymphocytes T CD4+ et macrophages qui n'expriment pas le corécepteur CCR5 à leur surface. Cette délétion confère alors une immunité naturelle contre le VIH-1 en empêchant la fusion du virus avec la membrane des lymphocytes T CD4+ et macrophages. Ces deux preuves vivantes de guérison

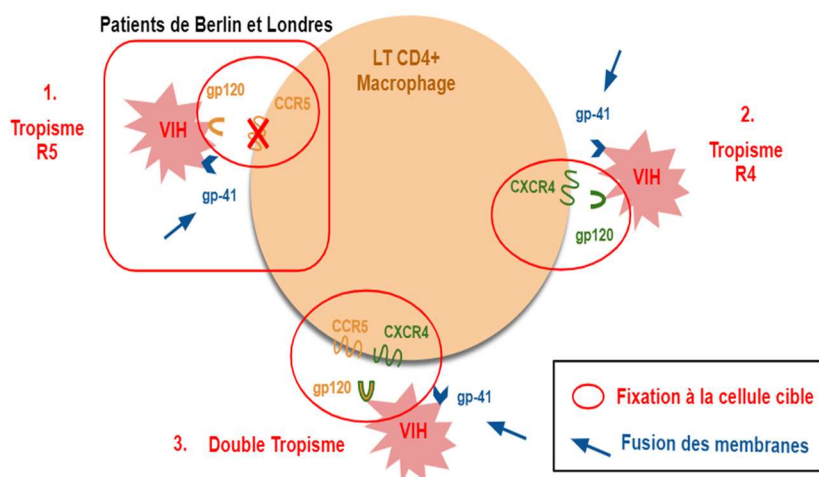


Figure 1 : Schéma du mécanisme de fusion du VIH-1 aux cellules cibles immunitaires avec l'exemple des patients de Berlin et de

du VIH-1 offrent des perspectives thérapeutiques. Cependant, cette mutation naturelle est rare (1 % de la population caucasienne [13]) et ne protège que contre le VIH à tropisme R5. De plus, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques impose de trouver un donneur qui serait à la fois porteur de cette mutation et HLA-compatible avec le patient, ce qui diminue encore la probabilité de trouver un donneur potentiel pour tous les patients atteints de lymphome VIH induit. Ainsi, des stratégies alternatives doivent être envisagées pour tenter de reproduire le mécanisme de résistance naturelle des cellules immunitaires et l'étendre à tous les patients atteints de lymphome induit par le VIH et ultérieurement à tous les patients atteints par le VIH pour leur proposer une cure.

L'objectif de notre projet est de développer un médicament de thérapie innovante (MTI) composé de cellules souches hématopoïétiques autologues, génétiquement modifiées, pour les rendre résistantes à la pénétration du VIH-1. Nous estimons la population cible à environ 40 000 patients VIH-1 positifs atteints de lymphome VIH-induit résistant ou réfractaire aux chimiothérapies et éligibles à l'autogreffe [23,24,25,26].

Choix de notre stratégie de développement

Plusieurs paramètres ont été étudiés afin d'établir le profil de notre candidat MTI.

Choix de la composante cellulaire

Nous avons étudié les différents types de cellules que nous pourrions utiliser pour notre médicament. L'option de modifier génétiquement des cellules différenciées du patient telles que les lymphocytes T CD4⁺ apporterait une résistance aux seuls virus encore présents dans le réservoir viral du patient. Toutefois, ces cellules différenciées sont dénuées de capacité d'auto-renouvellement et ont donc une durée de vie limitée, ce qui ne permettrait pas une réponse au long terme et impliquerait la nécessité de ré-administration du médicament.

La seconde option consisterait à modifier génétiquement les cellules souches hématopoïétiques du patient car, à la différence des lymphocytes déjà différenciés, elles sont dotées d'une capacité d'auto-renouvellement, illimitée *in vivo*, et de différenciation pour redonner l'ensemble des cellules hématopoïétiques [14]. Le renouvellement des cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées ainsi que leur capacité de différenciation en lymphocytes T CD4⁺ résistants permettraient une protection pérenne contre l'infection par le VIH-1 après une administration unique de cellules souches hématopoïétiques modifiées.

L'option d'utilisation de cellules souche de donneurs allogéniques présente la difficulté de

trouver rapidement un donneur sain HLA compatible avec le patient. De plus, la prise en charge des lymphomes non-hodgkiniens et hodgkiniens réfractaires aux chimiothérapies prévoit le recours à l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ainsi, il serait possible de profiter de l'aphérèse réalisée dans le cadre de l'autogreffe, pour récupérer les cellules nécessaires à la fabrication de notre médicament, afin d'éviter d'effectuer plusieurs aphérèses. Enfin, à ce jour il n'existe qu'un faible recul sur la sécurité et l'efficacité des médicaments thérapeutiques innovants allogéniques.

Pour toutes ces raisons, nous avons fait le choix d'utiliser des cellules souches autologues.

La modification génétique

L'inhibition de l'expression de CCR5 a été rapidement envisagée du fait de nombreuses preuves de concept chez l'humain [17]. Cependant, cette stratégie induit une protection contre l'entrée du virus dans les cellules cibles qui n'est fonctionnelle que pour le VIH-1 à tropisme R5, ce qui implique un risque d'inefficacité pour les patients atteints par le VIH-1 à tropisme CXCR4 ou à double tropisme CCR5/CXCR4 ou même en cas de bascule du tropisme CCR5 au tropisme CXCR4 (mécanisme de résistance).

Afin d'être efficace sur les VIH-1 indépendamment de leur tropisme et de limiter les risques de résistance, il faudrait que la stratégie de modification génétique prévoit une seconde cible. Le corécepteur CXCR4 étant impliqué dans des processus physiologiques importants (migration des monocytes depuis la moelle), il n'est pas envisageable de modifier son expression ou son fonctionnement en réalisant une délétion [18,19]. Comme expliqué plus haut, la pénétration du virus suppose, après la reconnaissance du récepteur CCR5 ou CXCR4, la fusion avec les protéines gp120 et gp41. Ainsi, une option serait d'inhiber l'étape de fusion en visant une cible commune aux deux tropismes, par l'intermédiaire d'un inhibiteur de gp-41 exprimé par les cellules CD4⁺ [20,21,22]. La protéine gp-41 ne présente aucun rôle physiologique essentiel.

Ces deux modifications génétiques des cellules souches hématopoïétiques du patient peuvent être réalisées par différentes techniques (vecteur viral, plasmide et transfection non virale). La stratégie choisie est l'utilisation d'un vecteur viral, plus précisément un lentivirus. Un lentivirus est un sous-ensemble de rétrovirus, parmi les virus les plus couramment utilisés pour les procédés de modifications génétiques. Le lentivirus peut transduire à la fois les cellules en division et les cellules quiescentes, sans entraîner de réponse immunitaire significative. Ces virus s'intègrent également de manière stable dans le génome de l'hôte, permettant l'expression du transgène à long

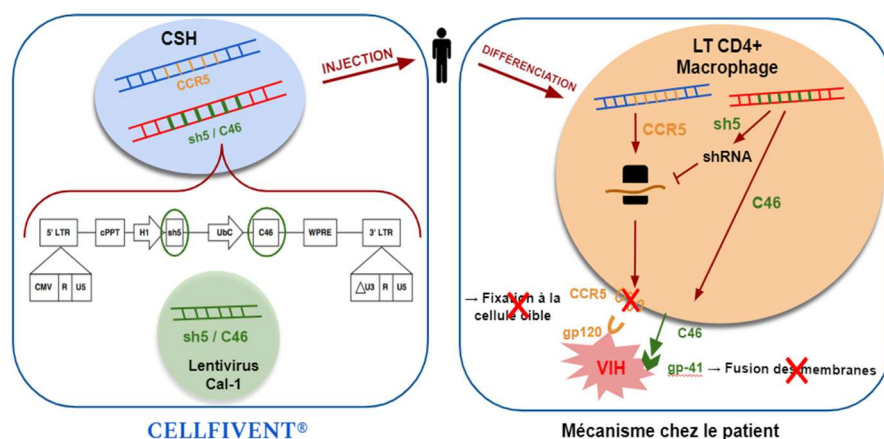


Figure 2 : Stratégie de Cellfivent pour viser les étapes de fusion du VIH dans les cellules au sein du patient

terme et sa transmission aux cellules filles dans le cas de cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées, ce qui en fait un vecteur très intéressant en thérapie génique. Un lentivirus de 3^e génération est ici utilisé en raison de son faible potentiel de mutagenèse insertionnelle qui permet d'accroître la sécurité d'utilisation.

Suite à nos recherches bibliographiques, le vecteur lentiviral choisi pour modifier les cellules souches hématopoïétiques et ainsi produire notre médicament, Cellfivent, est le vecteur Cal-1 [20,21,22]. Il contient deux séquences génomiques (figure 2) : une séquence codant pour un ARN en épingle à cheveux qui inhibe la traduction de la protéine CCR5 (système de *knock-out* du gène CCR5) et une séquence C46 codant pour une protéine exogène C46 qui inhibe gp41 [20,21,22].

Procédé de fabrication de Cellfivent

Toutes les étapes de production, depuis la modification génétique de nos cellules souches hématopoïétiques jusqu'à l'amplification des cellules transfectées, seront réalisées par notre entreprise, au sein d'un établissement pharmaceutique autorisé situé en France.

La première étape pour aboutir à la fabrication du médicament de thérapie innovante consiste à obtenir le « matériel cellulaire de départ » en réalisant la cytophérèse des CSH du patient nécessitant une greffe dans le cadre de son lymphome VIH-induit (figure 3). Cette cytophérèse étant effectuée sur le sang périphérique après mobilisation des cellules médullaire du patient. La fabrication de notre MTI nécessite des quantités

importantes de CSH, ainsi la mobilisation est réalisée avec le facteur de croissance G-CSF associé au Mozobil®. Sur la cytophérèse, un tri cellulaire est ensuite effectuée pour récupérer uniquement les CSH. Les CSH triées sont congelées puis cryopréservées en azote liquide à l'unité de thérapie cellulaire du centre hospitalier. Les cellules cryopréservées, sont maintenant le « matériel de départ » du procédé pharmaceutique de fabrication du MTI et sont transportées jusqu'à notre établissement fabricant.

Les étapes suivantes, qui seront réalisées dans l'établissement de fabrication de la substance active, concernent le procédé de modification cellulaire. Les cellules sont décongelées dans un milieu de culture complété à 5 % par du sérum AB humain. Puis une mise en contact des cellules a lieu avec des microbilles d'activation lymphocytaire [27] pour les préparer à la mise en contact avec le lentivirus (mise en cycle cellulaire).

Le lentivirus est fourni par un sous-traitant, Oxford Biomedica, qui s'occupe de sa production. Après activation des cellules, le lentivirus, est ajouté dans le milieu de culture pour effectuer la transduction des cellules. Enfin, la culture cellulaire s'effectue dans un bioréacteur qui permet une amplification cellulaire automatisée et à grande échelle.

Les cellules transduites et amplifiées sont ensuite réparties dans des poches plastiques avec une solution de conservation et un agent cryoprotecteur et forment ainsi le produit fini. Le produit fini peut alors être congelé et cryoconservé dans l'azote

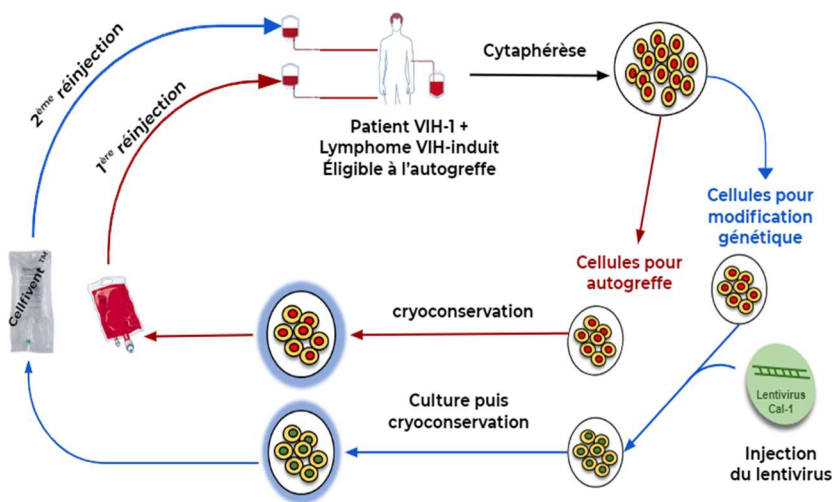


Figure 3 : Stratégie de traitement du lymphome et du VIH chez un patient atteint de lymphome VIH-induit et éligible à l'autogreffe

liquide²⁸. La cryoconservation permet de s'affranchir du délai de stabilité du produit frais et par conséquent faciliter le circuit final du médicament de thérapie innovante avec son transport et sa distribution vers les différentes pharmacies à usages intérieur (PUI) des centres hospitaliers en Europe. L'administration du médicament de thérapie innovante se fait dans un hôpital, qualifié par notre entreprise, après un délai d'au moins 21 jours suivant l'autogreffe prescrite pour guérir le lymphome. Cellfivent® est transporté de notre site fabricant à la pharmacie à usage intérieur du centre hospitalier, où il sera réceptionné, contrôlé, stocké si besoin puis décongelé pour être administré au patient [29].

Dans le cadre de la production de notre médicament de thérapie innovante, le contrôle qualité ne peut s'effectuer par des méthodes classiques de contrôle physico-chimique. Notre médicament étant de nature biologique, il en découle des méthodes de qualification biologique spécifiques qui incluent notamment

- un contrôle de la viabilité, de la quantité et de la phénotypie sur les cellules souches hématopoïétiques réceptionnées et décongelées sur notre site fabricant ;
- des contrôles qualité en cours de production ;
- des contrôles qualité sur le produit fini Cellfivent® parmi lesquels des contrôles phénotypiques, le taux de transduction, de viabilité cellulaire ainsi que des tests fonctionnels [30].

Preuve de Concept

Efficacité biologique démontrée chez la souris

L'équipe de Burke a réalisé une expérience comparant deux groupes de souris humanisées [21] : le groupe contrôle recevant des cellules souches hématopoïétiques humaines non modifiées et le groupe de traitement (Cal-1) recevant des cellules souches hématopoïétiques humaines modifiées par le vecteur Cal-1. Le taux circulant de lymphocytes T CD4+ ainsi que la charge virale du VIH-1 au cours des 14 semaines post infection par le VIH-1 sont ensuite observés dans chaque groupe. Ces paramètres sont ceux utilisés pour le suivi des patients VIH+ et représentent de bons indicateurs de l'efficacité du traitement. L'expérience a montré un taux de LT CD4+ significativement supérieur dans le groupe Cal-1 par rapport au groupe contrôle, à partir de 10 semaines. Ce taux se maintient jusqu'à 14 semaines. Elle a aussi montré un nombre de copie du virus significativement inférieur dans le groupe Cal-1 par rapport au groupe contrôle à partir de 8 semaines et se maintenant stable jusqu'à 14 semaines.

La modification génétique touche les deux tropismes

L'action commune sur les deux tropismes possibles du VIH-1 (tropisme R5 en (a) et tropisme X4 en (b)) de cette approche bi-cible est évaluée en

mesurant *in vitro* la quantité de la protéine virale p24 pendant 12 jours après transfection des cellules par Cal-1. Les cellules traitées par le vecteur Cal-1 relarguent une quantité significativement moins importante de protéines virales que les cellules témoins et ce pour les deux souches considérées, ce qui montre que la modification génétique est active sur les deux tropismes viraux chez la souris [20].

Développement de Cellfivent® selon une approche fondée sur le risque

Akezo est conscient de la nature particulière de sa stratégie. En effet l'utilisation d'un médicament de thérapie innovante soulève des questions auxquelles un plan de développement pharmaceutique classique ne peut répondre. Conformément à la réglementation sur les médicaments de thérapie innovante qui permet d'adapter le développement, compte tenu des spécificités de ces nouveaux médicaments, nous allons utiliser une approche fondée sur le risque (*Risk Based Approach*, RBA) pour structurer notre développement. Le but de l'approche fondée sur le risque est d'établir un profil qui fait la liaison entre les risques potentiellement attribués à l'utilisation clinique du médicament de thérapie innovante et les facteurs de risque qui contribuent à leur apparition, permettant d'établir des plans d'études sur ces risques afin de minimiser et contrôler leur éventuelle survenue. Ainsi, nous développerons nos parties non-cliniques et cliniques pour étudier plus en détails les risques potentiels spécifiques de notre médicament de thérapie innovante.

Développement non-clinique

Le développement non-clinique de Cellfivent® s'appuiera sur une approche fondée sur le risque et évaluera ainsi deux critères de jugements principaux : la sécurité et la non-efficacité.

Il est à noter que certaines données de sécurité *in vitro* et de non efficacité *in vivo* ont déjà été collectées dans la preuve de concept concernant le vecteur lentiviral Cal-1. En effet, l'équipe de recherche s'intéressant à cette approche s'est assurée que le remaniement génétique n'altérerait pas les capacités fonctionnelles des cellules souches hématopoïétiques, notamment leur potentiel de différenciation vers les différentes lignées hématopoïétiques [22].

Les résultats présentés montrent l'absence de différence significative du taux des cellules nucléées totales (CD45+), des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et cytotoxiques (CD8+) entre les souris contrôles et les souris Cal-1. La modification effectuée préalablement à l'injection ne compromet donc pas la capacité de différenciation des cellules transduites par le vecteur Cal-121.

De plus, le risque mutagène de ce vecteur a été recherché en exposant les cellules souches hématopoïétiques à de fortes concentrations de vecteur. Les scientifiques ont calculé la capacité de recolonisation *in vitro* des cellules après transduction, par le biais d'un critère appelé la fréquence de *replating* par nombre de copies du vecteur, et l'ont comparé à celle obtenue par l'usage de deux virus connus pour leur capacité à induire des phénomènes d'immortalisation cellulaire et faisant office de contrôles positifs. Une fréquence élevée témoigne d'une immortalisation des cellules. Le vecteur Cal-1 montre une fréquence plus de 10 fois inférieure à celle obtenue avec les témoins, ce qui est en faveur d'un faible pouvoir mutagène.

Pour compléter ces données, des études non-cliniques supplémentaires devront être réalisées *in vitro* avec des cellules CD34+ humaines transduites par le vecteur Cal-1 et *in vivo* sur différents modèles animaux : la souris BLT en raison de son système immunitaire humanisé et le chimpanzé, seule espèce animale pouvant être infectée par le VIH-1.

Dans le cas de Cellfivent®, les études pharmacocinétiques classiques d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion ne sont pas applicables. Cependant, la biodistribution de Cellfivent sera évaluée *in vivo* au cours d'études pivots.

Concernant la sécurité d'emploi, différentes études seront réalisées. Un test d'immunogénicité est effectué car la protéine C46 (issue de l'expression du transgène) est une protéine exogène et pourrait donc induire une réponse immunitaire inappropriée chez l'hôte. De plus, des études sur le risque pro-inflammatoire de ces modifications génétiques des cellules souches hématopoïétiques seront réalisées en mesurant notamment différents marqueurs de l'inflammation : interféron γ , TNF α et interleukine 6.

Comme évoqué plus haut, le potentiel mutagène de Cal-1 risque de favoriser l'immortalisation des cellules et d'induire l'apparition de tumeurs, il est donc particulièrement important d'étudier ce risque selon différents critères : *in vitro*, tests d'immortalisation cellulaire en comparaison à un autre vecteur rétroviral, tests sur l'apoptose et recherche de la présence de lentivirus compétent pour la réplication (RCL) [32] ; *in vivo*, risque de mutagenèse insertionnelle [32] et risque d'intégration hors cible du vecteur.

Enfin certains tests présents lors d'un développement classique ne peuvent être réalisés dans le cadre du développement de Cellfivent, notamment des études de carcinogénèse ou la toxicité sur la reproduction [31,32].

Concernant la non-efficacité, différents risques sont à étudier, notamment le risque de non

expression à long terme des séquences génomiques transduites, le risque de perte des capacités fonctionnelles des cellules souches hématopoïétiques et bien sûr le risque de non efficacité d'éradication du VIH-1.

Grâce aux résultats obtenus pendant la phase non-clinique, nous pourrions demander l'autorisation de réaliser des phases cliniques dans différents pays de l'Union européenne via la soumission d'un unique dossier de demande d'autorisation d'essais cliniques, sur le portail de l'EMA.

Développement clinique

De par la nature de Cellfivent®, le développement clinique ne pourra suivre strictement les règles d'un développement classique. En premier lieu, comme pour les médicaments anticancéreux, le médicament expérimental ne peut pas être administré à des volontaires sains pour des raisons éthiques. Ainsi, le développement clinique se scindera en une phase I/II incluant environ 20 patients et une phase III incluant 100 patients. Plusieurs centres seront désignés dans différents pays de l'Union européenne pour accueillir les patients de l'étude. L'ouverture de ces centres se fera au fur et à mesure de l'inclusion des patients.

Il s'agira d'une étude ouverte et à simple bras. La phase I/II évaluera la faisabilité et la sécurité du traitement. L'efficacité du traitement sera évaluée en critère secondaire.

Les risques principaux de sécurité sont l'oncogenèse insertionnelle et la possibilité de la formation d'un rétrovirus compétent pour la réplication, ceux-ci seront minimisés lors de la conception de la construction lentivirale et lors du processus de fabrication [26].

À la différence d'un médicament issu de la chimie, l'effet dose ne pourra être étudié pour Cellfivent®, mais il faudra rechercher la dose (quantité) de cellules à administrer pour obtenir un effet thérapeutique. Cette recherche de dose se fondera sur un calcul effectué à partir de données de la littérature [33]. Finalement, la dose de Cellfivent® à injecter sera comprise entre $7,5 \times 10^5$ et $2,0 \times 10^6$ cellules par kilogramme. Cependant, les doses réelles de cellules CD34+ à administrer dépendent du nombre de cellules récoltées par aphérèse et d'autres paramètres de fabrication qui varient selon les patients et qui ne permettent donc pas d'imposer une quantité fixe de cellules-médicament à injecter, mais plutôt une dose cible avec une quantité minimale.

Pour contrôler l'efficacité antivirale du MTI, les patients seront suivis pendant 2 ans et continueront à l'être 15 ans après l'administration. Six mois après l'injection, une évaluation de la charge virale, qui doit être inférieure à 50 copies/ml, et du nombre de cellules CD4+, qui doit être supérieur à $250/\text{mm}^3$, sera réalisée afin de déterminer si les patients doivent

continuer à prendre leur traitement antirétroviral ou peuvent l'arrêter [26].

Accès au marché

Au vu de la population ciblée et de l'absence de thérapie semblable sur le marché, nous envisageons de demander la désignation de « médicament orphelin ». Ainsi, Cellfivent® obtiendrait plusieurs avantages comme l'exclusivité commerciale européenne pendant 10 ans ainsi que des réductions d'honoraires et des subventions, d'autant plus qu'Akezo est une petite entreprise (SME). Ce MTI offre une opportunité de guérison aux patients traités grâce à une unique injection et permet de répondre à un enjeu majeur de santé publique. Ces caractéristiques justifient le coût important du médicament qui seraient compris entre 400 000 et 450 000 euros.

Conclusion

Notre stratégie est de développer un médicament de thérapie innovante avec les cellules du patient qui cible deux étapes majeures de la fusion du VIH. Ce médicament de thérapie innovante a donc pour objectif de guérir du VIH-1 les patients

atteints d'un lymphome VIH induit et éligibles à l'autogreffe.

Le développement de ce médicament de thérapie innovante repose sur des preuves de concept qui ont été établies *in vitro* et *in vivo* chez les souris humanisées comme vu ci-dessus. Cellfivent® consisterait en la réinjection de cellules souches hématopoïétiques modifiées génétiquement par un lentivirus lv sh5/C46 (Cal-1) permettant l'inhibition de la traduction du corécepteur CCR5 ainsi que l'inhibition de la fusion membranaire par l'expression de gp-41. Ces deux cibles visent l'étape de fusion du virus à la fois de tropisme R5 et X4 permettant la guérison d'une plus large population de patients.

L'efficacité ainsi que la sécurité d'emploi seront étudiées au travers de différentes études dans l'indication précédemment évoquée.

Lorsque nous aurons le recul pour mesurer l'impact de Cellfivent®, nous pourrions alors nous tourner vers de nouveaux marchés, en particulier l'Amérique et l'Asie, mais aussi vers une indication élargie : d'abord vers des patients séropositifs atteints d'autres hémopathies malignes, puis vers l'ensemble des patients résistants aux traitements antirétroviraux.

Références

- 1 Sung Yong PARK et coll. « HIITE: HIV-1 Incidence and Infection Time Estimator ». *Bioinformatics* 2018, vol. 34 n° 12, p. 2046-2052
- 2 *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : recommandations du groupe d'expert, sous la direction du Pr Philippe MORLAT et sous l'égide du CNS et de l'ANRS : diversité du VIH-1*, 2016
- 3 Francesco R. SIMONETTI & Mary F. KEARNEY. « Review: Influence of ART on HIV Genetics ». *Current Opinion in HIV and AIDS*, janvier 2015, vol. 10 n° 1, p. 49-54.
- 4 Karl STEFIC, Mélanie BOUVIN-PLYEY, Martine BRAIBANT & Francis BARIN. « Impact of HIV-1 Diversity on Its Sensitivity to Neutralization », *Vaccines*, juillet 2019, vol. 7 n° 3, p. 74.
- 5 Mathias BRUYAND, Rodolphe THIÉBAUT, S. LAWSON-AYAYI, P. JOLY, J.-L. PELLEGRIN et coll. « Immunodépression, réplication virale et risque de lymphome malin non hodgkinien chez les patients infectés par le VIH (Cohorte ANRS CO3 Aquitaine, 1998-2006) », *La Revue de médecine interne*, décembre 2008, vol. 29 supplément 3, p. S296.
- 6 Charlotte LEWDEN et coll. « Causes of Death among Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Adults in the Era of Potent Antiretroviral Therapy: Emerging Role of Hepatitis and Cancers, Persistent Role of AIDS ». *International Journal of Epidemiology*, février 2005, vol. 34 n° 1, p. 121-123.
- 7 O. KIRK et coll. « Non-Hodgkin Lymphoma in HIV-Infected Patients in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy ». *Blood*, décembre 2001, vol. 98 n° 12, p. 3406-12
- 8 J. REURE & N. MOUNIER. « Management of HIV-associated lymphoma », *Correspondances en onco-hématologie*, mai-juin 2013, vol. 8 n° 3.
- 9 Jori SYMONS et coll. « Dependence on the CCR5 Coreceptor for Viral Replication Explains the Lack of Rebound of CXCR4-Predicted HIV Variants in the Berlin Patient ». *Clinical Infectious Diseases*, août 2014, vol. 59 n° 4, p. 596-600
- 10 Ravindra K. GUPTA et coll. « HIV-1 Remission Following CCR5Δ32/Δ32 Haematopoietic Stem-Cell Transplantation ». *Nature*, 2019, vol. 568 n° 7751, p. 244-248
- 11 Tatsuo SHIODA et coll. « Macrophage and T Cell-Line Tropisms of HIV-1 Are Determined by Specific Regions of the Envelope Gp120 Gene ». *Nature*, janvier 1991, vol. 349 n° 6305, p. 167-169.
- 12 W. WEISSENHORN et coll. « Atomic Structure of the Ectodomain from HIV-1 Gp41 ». *Nature*, mai 1997, vol. 387 n° 6631, p. 426-430.
- 13 Anuroopa GUPTA & Harish PADH. « The global distribution of CCR5 delta 32 polymorphism: role in HIV-1 protection ». *BMC Infectious Diseases*, mai 2012, vol. 12 supplément 1.
- 14 Jun SEITA & Irving L. WEISSMAN. « Hematopoietic Stem Cell: Self-Renewal versus Differentiation ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, décembre 2010, vol. 2 n° 6, p. 640-653

- 15 ALD n° 30, *Lymphomes non hodgkiniens de l'adulte*. Haute Autorité de Santé, mars 2012
- 16 D-28 *Devenir des patients infectés par le VIH en rémission complète d'un lymphome non Hodgkinien (NHL) ou d'une maladie de Hodgkin (HL)*. EM-Consulte, consulté en décembre 2019 : <https://www.em-consulte.com/article/259050/d-28-devenir-des-patients-infectes-par-le-vih-en-r>
- 17 Maria PINO et coll. « Progress in Achieving Long-Term HIV Remission ». *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2018, vol. 13 n° 5, p. 435-445
- 18 K. TACHIBANA et coll. « The Chemokine Receptor CXCR4 Is Essential for Vascularization of the Gastrointestinal Tract ». *Nature*, juin 1998, vol. 393, n° 6685, p. 591-594
- 19 Y. R. ZOU et coll. « Function of the Chemokine Receptor CXCR4 in Haematopoiesis and in Cerebellar Development ». *Nature*, juin 1998, vol. 393, n° 6685, p. 595-599
- 20 WOLSTEIN et coll. « Preclinical Safety and Efficacy of an Anti-HIV-1 Lentiviral Vector Containing a Short Hairpin RNA to CCR5 and the C46 Fusion Inhibitor ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, janvier 2014, vol. 1 p. 11
- 21 Bryan P. BURKE et coll. « Engineering Cellular Resistance to HIV-1 Infection *In Vivo* Using a Dual Therapeutic Lentiviral Vector. » *Molecular Therapy Nucleic Acids*, janvier 2015, vol. 4, p. E236.
- 22 Marianne DELVILLE et coll. « Safety of CD34+ Hematopoietic Stem Cells and CD4+ T Lymphocytes Transduced with LVsh5/C46 in HIV-1 Infected Patients with High-Risk Lymphoma ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, juin 2019, vol. 13, p. 303-309.
- 23 *HIV/AIDS Surveillance in Europe 2018*, 2018, consulté en octobre 2019 : <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/hivaids/publications/2018/hivaids-surveillance-in-europe-2018>
- 24 *Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH : recommandations du groupe d'expert sous la direction du Pr Philippe Morlat et sous l'égide du CNS et de l'ANRS : infection VIH-2, diversité VIH-1*, 2016
- 25 Lawrence D KAPLAN. « HIV-related lymphomas: Epidemiology, risk factors, and pathobiology. » Août 2019
- 26 Clémentine SARKOZY & Laurie H. SEHN. « Management of Relapsed/Refractory DLBCL ». *Best Practice & Research Clinical Haematology*, septembre 2018, vol. 31, n° 3.
- 27 Brian Nankervis et coll. « Optimizing T Cell Expansion in a Hollow-Fiber Bioreactor ». *Current Stem Cell Reports*, 2018, vol. 4 n° 1, p. 46-51
- 28 Kathlyn Hornberger et coll. « Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Assays, Cryoprotectant Agents, and Technology to Improve Outcomes ». *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, juin 2019, vol. 46 n° 3
- 29 Patrick M. Younan et coll. « Positive selection of mC46-expressing CD4+ T cells and maintenance of virus specific immunity in a primate AIDS model. » *Blood*, juillet 2013, vol. 122 n° 2, p. 179-187
- 30 *European Medicines Agency, Committee for Advanced Therapies. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells*, 13 avril 2012
- 31 *Strimvelis. European Medicines Agency*, septembre 2018, consulté en janvier 2020 <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/strimvelis>
- 32 *Zynteglo. European Medicines Agency*, mars 2019, consulté en janvier 2020 <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zynteglo>