

LA SOCIÉTÉ TRANSGÈNE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

Bernard GILLY ¹

Historique

Transgène a été créée en 1979 par des biologistes renommés, les professeurs Pierre Chambon et Philippe Kourilsky, soutenus par un groupe d'investisseurs, pour mettre en œuvre les techniques émergentes du génie génétique dans le cadre de recherches sous contrat avec des groupes industriels dans les domaines de la santé humaine et animale, et de l'industrie agroalimentaire. Dans les années quatre-vingt, sous la direction scientifique du docteur Jean-Pierre Lecocq, Transgène a acquis une expérience considérable en biologie moléculaire et cellulaire, virologie, immunologie et chimie des protéines. Parmi les réussites de Transgène figure la mise au point d'un nouveau vaccin vétérinaire contre la rage utilisant le virus de la vaccine comme vecteur. Ce vaccin, actuellement fabriqué et commercialisé par la société Merial, est disséminé en milieu naturel dans des appâts pour vacciner les animaux sauvages.

En 1992, forte de ses compétences essentielles en matière de transfert de gènes, Transgène a fait évoluer son activité avec l'objectif stratégique de devenir une société biopharmaceutique intégrée, développant et commercialisant des produits de thérapie génique. En 1994, cette stratégie a reçu l'appui de la société TSGH qui a investi 240 millions de francs dans une augmentation de capital de Transgène. Le 26 mars 1998, la société a été admise à la cotation du Nouveau marché et du Nasdaq aux États-Unis. Cette introduction, par voie d'augmentation de capital, a permis de lever 613,5 millions de francs.

Transgène a son siège à Strasbourg. Elle y dispose de laboratoires et d'une unité de production de lots cliniques qui a été construite pour opérer en conformité avec les "bonnes pratiques de fabrication" et les normes américaines (GMP). Transgène et sa filiale américaine emploient 203 salariés équivalents plein temps dont 178 scientifiques, constituant aujourd'hui l'une des plus importantes équipes spécialisées dans la recherche et le développement en thérapie génique.

1. Biologiste. Docteur en bioéconomie. Directeur général de Transgène.

Caractéristiques essentielles de l'activité

Transgène conçoit et développe des technologies et des produits de thérapie génique pour le traitement de maladies héréditaires ou acquises, incurables à ce jour.

Nous estimons que notre plate-forme diversifiée de vecteurs – adéno-virus, virus de la vaccine, rétrovirus, vecteurs cellulaires ou synthétiques – constitue un avantage concurrentiel clé face aux autres sociétés de thérapie génique et que notre capacité à offrir des vecteurs multiples et différenciés, adaptés chacun à une situation clinique différente, nous met en position de pointe pour exploiter les découvertes de la recherche génomique pour le développement de nouveaux traitements de thérapie génique.

Nous utilisons nos technologies de vecteurs pour créer une gamme étendue de produits potentiels pour le cancer, les maladies cardiovasculaires et héréditaires. Nous développons actuellement cinq produits pour le traitement du cancer, dont deux sont en essais cliniques de phase II pour quatre indications cliniques différentes, et trois sont en essais cliniques de phase I. Ces produits comprennent deux vaccins anticancer et trois produits de stimulation du système immunitaire pour traiter différents cancers.

Par ailleurs, d'autres applications de thérapie génique pour les maladies cardiovasculaires (incluant la resténose, l'ischémie périphérique et myocardique), ainsi que les maladies héréditaires (la myopathie de Duchenne et la mucoviscidose) sont actuellement étudiées en recherche clinique. Nous développons également des techniques visant à utiliser les cellules musculaires comme des "fabriques de protéines" pour le traitement d'un nombre important de maladies pour lesquelles des protéines thérapeutiques sont déjà utilisées, comme par exemple l'interféron β pour la sclérose en plaques.

Contexte scientifique

Thérapie génique et recherche génomique

La thérapie génique est une méthode de traitement ou de prévention des maladies qui consiste à transférer des gènes dans les cellules de patients afin de produire des protéines thérapeutiques spécifiques, nécessaires pour combattre ou corriger la maladie visée. Les gènes sont des segments d'acides désoxyribonucléiques (ADN) présents dans chaque cellule, qui fournissent les informations nécessaires pour produire les protéines. Chaque cellule de l'organisme a la capacité de produire les différentes protéines essentielles à la structure, à la fonction et à la croissance cellulaires. La production de la protéine commence dans le noyau de la cellule lorsque le gène est copié. Le procédé dont le résultat est la production de la protéine par les cellules est appelé "expression du gène". L'absence d'un gène ou sa structure défectueuse peut modifier la conformation ou la composition des protéines produites par la cellule,

provoquant ainsi certaines maladies héréditaires telles que la myopathie ou la mucoviscidose, ainsi que d'autres maladies telles que le cancer.

Nous pensons que la thérapie génique sera une méthode de traitement plus sûre, plus efficace et moins coûteuse que les traitements traditionnels. Pour le moment, il existe deux méthodes de traitement qui ont chacune leurs limites. Les traitements traditionnels par administration de médicaments dits "petites molécules de synthèse", s'ils agissent sur les symptômes du patient, ne traitent toutefois pas la maladie et peuvent donc être de longue durée et coûteux. Un traitement traditionnel peut nécessiter des administrations quotidiennes répétées du médicament et peut provoquer des effets secondaires aigus en cas d'utilisation de longue durée, avec le risque supplémentaire que le patient ne respecte pas la posologie. La deuxième méthode de traitement traditionnel est l'injection de médicaments à base de protéines recombinantes. Ces protéines sont produites par des microorganismes génétiquement modifiés, tels que les bactéries, portant le gène correspondant. Contrairement aux petites molécules de synthèse, les médicaments injectables à base de protéines visent à traiter la cause de la maladie. Toutefois, des injections quotidiennes peuvent être nécessaires et le traitement peut provoquer des effets secondaires systémiques. La fabrication de médicaments à base de protéines recombinantes est souvent coûteuse.

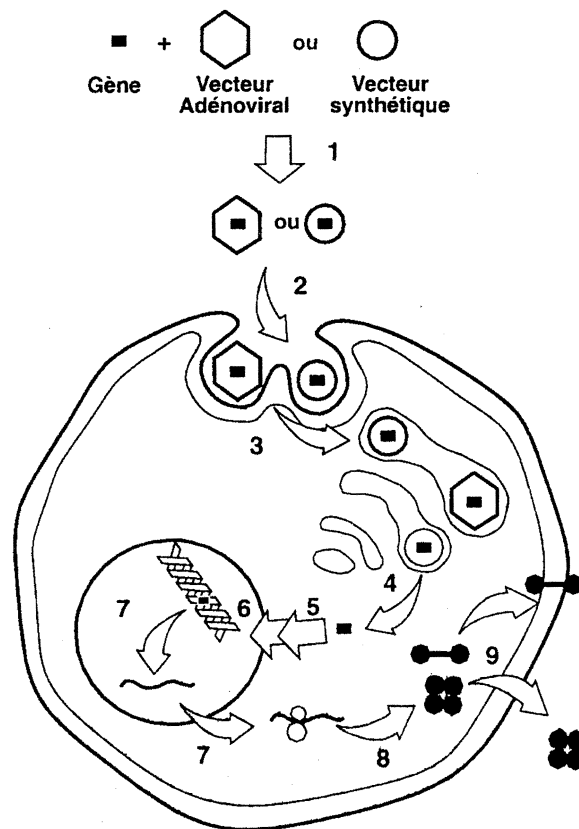
La thérapie génique vise les causes de la maladie et utilise les gènes eux-mêmes comme agents thérapeutiques pour que les cellules du patient expriment directement la protéine thérapeutique nécessaire. Comme ce sont les propres cellules du patient qui expriment la protéine, la thérapie génique peut être administrée moins fréquemment et peut ainsi constituer un traitement moins coûteux que d'autres approches. La production de protéines thérapeutiques au site de la maladie grâce à la thérapie génique peut être moins toxique pour le patient que l'injection répétée de protéines recombinantes. C'est pourquoi nous croyons que la thérapie génique offrira une alternative plus efficace, plus sûre et moins coûteuse, aux traitements traditionnels.

Les progrès futurs de la thérapie génique dépendront de la recherche génomique (identification de nouveaux gènes) qui implique la cartographie (ou séquençage) des gènes d'un organisme. La recherche génomique vise actuellement à séquencer le génome humain, soit l'intégralité de l'ADN contenu dans une cellule humaine, c'est-à-dire environ 100 000 gènes. Le principal objectif de la recherche génomique est la découverte de l'identification de tous les gènes humains, l'analyse et la découverte de la fonction de ces gènes, ainsi que la compréhension de leurs implications dans les différentes maladies. De nouvelles opportunités pour l'application thérapeutique de gènes apparaissent ainsi au fur et à mesure qu'augmente le nombre des gènes impliqués dans les maladies et identifiés par ces recherches.

Le développement de méthodes de transfert de gènes, sûres, fiables et modulables, est un élément clé de la mise au point de thérapies géniques efficaces. Un gène thérapeutique doit être intégré dans un système de

délivrance (ou "vecteur") qui, associé à ce gène, transportera celui-ci dans les cellules du patient. En raison du nombre potentiellement étendu de gènes à transporter, de la variété des organes et tissus cibles de thérapie génique pour différentes maladies et de l'étendue de l'utilisation potentielle de la thérapie génique, un large éventail de systèmes de délivrance de gènes sera vraisemblablement nécessaire pour le traitement efficace de nombreuses maladies.

Mécanisme simplifié d'une thérapie génique



1. Insertion du gène dans le vecteur.
2. Transfert des vecteurs transportant le gène thérapeutique dans la cellule.
3. Entrée du gène dans la cellule.
4. Dissociation du vecteur et largage du gène dans le cytoplasme.
5. Déplacement du gène du cytoplasme vers le noyau.
6. Entrée dans le noyau.
7. Transcription du gène thérapeutique en ARN messager et transport dans le cytoplasme.
8. Traduction de l'ARN messager en protéine thérapeutique.
9. Sécrétion de la protéine thérapeutique (ex. IL2) ou insertion dans la membrane cellulaire (ex. CFTR).

Importance de la technologie des vecteurs

Nos plates-formes de vecteurs sont conçues pour maximiser les applications potentielles de thérapie génique générées par l'accélération des résultats en provenance de la recherche génomique et pour répondre à la nécessité de disposer de différents systèmes de délivrance élaborés, pour concevoir des produits sur la base de gènes thérapeutiques que cette recherche aura identifiés.

Nous pensons que notre plate-forme technologique de vecteurs présente les avantages potentiels suivants :

- la sécurité. Nous avons développé de nouvelles générations de vecteurs pour chacune de nos principales plates-formes, qui présentent des profils améliorés de sécurité : des vecteurs adénoviraux présentant une inflammation et des risques de réplication réduits, des virus de la vaccine atténués obtenus à partir d'une souche virale incapable de se répliquer dans les cellules humaines et des vecteurs synthétiques incorporant des composés à toxicité réduite.
- la facilité d'administration. Notre technologie se concentre principalement sur l'élaboration de produits en ampoules prêts à l'emploi pour l'administration directe au patient.
- l'efficacité de fabrication. Nos nouvelles générations de vecteurs sont également conçues pour optimiser leur production et nous avons mis au point des procédés de production permettant l'application de méthodes pratiques de culture de cellules et de purifications.

Produits en essais cliniques de phases I et II

Nous avons à présent des produits en essais cliniques de phase I et de phase II. Nous avons cinq produits pour le traitement de cancers, dont deux sont en essais de phase II pour quatre indications cliniques différentes et trois sont en phase I d'essais cliniques.

Accord avec Human Genome Sciences, Inc.

Nous avons un accord de collaboration et de licence avec HGS qui nous donne accès à sa base de données de gènes. Cet accord, le premier de ce genre, nous permet d'identifier en collaboration avec HGS jusqu'à dix gènes présentant un potentiel thérapeutique. Nous testons actuellement trente-cinq gènes dans différents modèles animaux, dans les domaines des maladies cardiovasculaires et du cancer. Aux termes de l'accord, nous pouvons décider nous-mêmes de commercialiser nous-mêmes les produits de thérapie génique obtenus, soit indépendamment, soit en partenariat avec HGS ou avec un tiers. Nous devons payer des redevances à HGS sur les ventes de produits de thérapie génique utilisant leurs gènes. Si nous choisissons de codévelopper des produits de thérapie génique avec HGS, HGS aura les droits de commercialisation pour

l'Amérique du Nord et nous en Europe, et nous nous partagerons la commercialisation dans le reste du monde.

Droits de propriété intellectuelle

Nous avons déposé et continuons à déposer des demandes de brevets pour protéger nos technologies de vecteurs ainsi que les procédés correspondants et d'autres technologies. Au 3 mars 2000, nous détenons onze brevets accordés en Europe et dix-huit aux États-Unis. Nous avons soixante demandes de brevets français et européens désignant la France et quarante sept demandes de brevets américains, dix de ces demandes ayant fait l'objet d'une notification préalable d'accordabilité. Le nombre de demandes de brevets et de brevets montre les progrès significatifs que nous avons accomplis au cours des deux dernières années. En sus de notre portefeuille de brevets protégeant nos procédés et notre technologie, nous avons pris des licences sur des brevets sur l'utilisation de procédés et de technologies de tiers. En dehors de nos accords de collaboration avec HGS et Schering-Plough, nous avons également des accords de collaboration et de licence avec d'autres sociétés, des universités et des instituts de recherche publique.

La technologie des vecteurs

Depuis 1992, nous nous sommes engagés dans la recherche de techniques de biologie moléculaire pour le transfert de gènes et de thérapie génique afin de développer de multiples technologies de délivrance. L'approche de délivrance de gènes la plus utilisée jusqu'à ce jour repose sur les transferts de gènes par les vecteurs viraux dans lesquels des virus modifiés de différents types sont utilisés pour transférer le matériel génétique dans les cellules des patients. Certains virus apparus au cours de l'évolution biologique ont acquis la faculté naturelle de se déplacer et de pénétrer dans les cellules de certains organes et d'y introduire leur ADN dans le noyau. Par exemple, l'adénovirus, l'un des virus qui provoquent un rhume banal, cible de façon efficace une large gamme de cellules et peut être utilisé comme transporteur de l'information génétique.

Des systèmes non viraux de délivrance de gènes sous la forme de composés synthétiques, tels que les composés lipidiques peuvent être également utilisés pour délivrer des gènes à l'intérieur des cellules. Ces vecteurs synthétiques ne contenant aucune protéine virale ne sont pas reconnus en tant qu'éléments étrangers au corps humain et devraient ainsi être moins en mesure d'induire une réponse immunitaire par l'organisme. D'autres modes non viraux de transport de gènes peuvent également être utilisés tels que les lignées cellulaires transfectées avec du matériel génétique et injectées dans les organes cibles où elles produisent les protéines d'intérêt thérapeutique.

Le procédé de transfert de gènes dans les cellules du patient au moyen de ces vecteurs peut être réalisé soit *in vivo* (à l'intérieur du corps) par

l'administration directe de produit au patient, soit *ex vivo* (à l'extérieur du corps) en retirant les cellules des organes cibles du patient, en les cultivant dans des conditions de laboratoire appropriées, en utilisant un vecteur pour introduire le gène fonctionnel dans les cellules et enfin en les réimplantant dans le corps du patient. Chacun de nos produits en développement est destiné à être utilisé *in vivo*. Nous croyons que l'exploitation commerciale de la thérapie génique *ex vivo*, qui repose sur la manipulation en laboratoire des cellules de chaque patient, sera complexe et coûteuse. Pour cette raison, nous avons concentré tous nos efforts de développement sur l'administration *in vivo* de produits standardisés.

Pour être efficace, un vecteur doit avoir la capacité de

- transporter le gène désiré,
- transférer le gène dans un nombre suffisant de cellules cibles,
- transporter le gène dans le noyau de la cellule cible,
- permettre l'expression du gène pour produire la protéine thérapeutique sur une période suffisamment longue afin d'assurer le succès du traitement.

Un tel vecteur doit également être sûr. S'agissant d'un vecteur viral, le vecteur doit être modifié génétiquement afin de le rendre inoffensif et incapable de se répliquer dans le corps humain. Les vecteurs synthétiques n'ont pas engendré la même préoccupation de sécurité que les vecteurs viraux en raison de l'absence de composants viraux. Cependant, les composants synthétiques peuvent soulever différentes questions de toxicité et d'efficacité et doivent en conséquence être soigneusement évalués avant qu'une sélection ne soit faite en vue du développement pharmaceutique.

Vecteurs adénoviraux

Les adénovirus sont utilisés *in vivo*, en raison principalement de leur capacité à transférer des gènes dans divers types de cellules. Toutefois, les adénovirus dits de première génération présentent un certain nombre d'inconvénients. Nous croyons, cependant, avoir pallié ces inconvénients en développant ou en obtenant des droits sur des nouveaux vecteurs adénoviraux et sur des lignées cellulaires pour leur production. Ces vecteurs comportent de multiples délétions bien précises dans le génome adénoviral, lui conférant les propriétés suivantes :

- diminution substantielle de la toxicité et de la réponse inflammatoire,
- risque minimisé de générer des particules répliquatives durant la production du vecteur,
- niveau élevé et stable de l'expression du gène *in vivo*,
- augmentation de la taille du segment d'ADN pouvant être inséré dans le vecteur.

Afin d'accroître encore les applications potentielles des vecteurs adénoviraux, un de nos programmes de recherche s'attache à modifier la surface du virus au travers de modifications de la protéine d'enveloppe virale (protéine fibre), afin d'obtenir un ciblage spécifique d'un tissu donné. La protéine fibre facilite l'entrée du virus dans la cellule. Nos chercheurs développent actuellement de nouvelles méthodes pour modifier la protéine fibre et rediriger la spécificité du vecteur vers des tissus et des organes définis. Le développement d'un système efficace de ciblage, déjà réalisé au niveau de recherches préliminaires, pourrait permettre de transférer efficacement des gènes thérapeutiques à des cellules cibles, telles que les métastases cancéreuses.

Les vecteurs adénoviraux sont actuellement utilisés dans nos études cliniques par stimulation du système immunitaire pour les cancers rénaux et le mélanome, ainsi que dans les études précliniques sur les maladies cardiovasculaires et dans les programmes de recherche sur les maladies neuromusculaires et la mucoviscidose.

Vecteurs utilisant la vaccine

Les vecteurs utilisant la vaccine, administrés *in vivo*, ont montré une forte capacité à induire une réponse immunitaire contre certains types d'antigènes passagers. Cette capacité de stimulation intense de la réponse immunitaire pourrait être un avantage précieux dans le cadre du traitement de cancers par thérapie génique. Les souches de vaccine couramment utilisées se répliquent après administration aux patients, conduisant à une production limitée de virus à partir des cellules infectées. Bien que ceci ne présente pas un risque pour la plupart des patients, il existe cependant une possibilité de dissémination chez les patients dont le système immunitaire est sérieusement déprimé.

Pour répondre à cette préoccupation, nous avons développé une nouvelle génération de vecteurs à partir de la souche vaccine hautement atténuée (Modified Vaccinia Ankara, MVA). Ayant perdu la capacité de se répliquer dans les cellules humaines ou d'autres mammifères, la souche MVA est par conséquent incapable de provoquer une infection chez l'homme. La souche MVA a déjà été largement testée sur l'homme dans le cadre du vaccin contre la variole et sa fiabilité ainsi que son efficacité ont été démontrées. Cette nouvelle génération de vecteur allie une meilleure sécurité à la capacité d'induire une forte réponse immunitaire contre les antigènes.

Le nouveau vecteur MVA est actuellement utilisé dans nos études cliniques sur les cancers du sein, de la prostate et du col de l'utérus. Nous disposons d'une grande expérience de l'utilisation de ces vecteurs, avec en particulier le développement d'un vaccin vétérinaire contre la rage actuellement commercialisé par Merial.

Vecteurs synthétiques

Nos vecteurs synthétiques utilisent de nouveaux composés synthétiques. Ils sont conçus pour envelopper l'ADN contenant le gène thérapeutique afin de le protéger de la dégradation par les globules blancs du patient. Les composés synthétiques augmentent également le transfert de la combinaison vecteur/gène vers la membrane de la cellule cible en modulant la charge électrique de l'ADN et facilitant ainsi l'entrée de la combinaison dans la cellule cible.

L'un des grands avantages des vecteurs synthétiques est leur souplesse d'utilisation. Par exemple, différents mélanges de lipides et/ou de polymères peuvent être utilisés pour obtenir une charge électrique optimale et adapter la taille des vecteurs en fonction des différentes voies d'administration ou des cellules cibles dans les différents organes. De plus, les vecteurs synthétiques ont la capacité de transporter une quantité de matériel génétique plus grande que d'autres familles de vecteurs, bien que le niveau de transfert de gène soit inférieur aux vecteurs viraux.

Les vecteurs synthétiques, comparés aux vecteurs viraux, devraient également présenter des avantages en termes de sécurité. En particulier, l'absence de protéine virale réduit la possibilité de provoquer une réponse immunitaire contre le vecteur, ce qui permet d'escompter un allongement de la durée d'expression du gène et ouvre la possibilité d'administration répétée plus efficace.

Nous avons identifié et utilisé des composés nouveaux pour le transfert *in vivo* dans le flux sanguin, les muscles et les poumons. S'agissant de transfert dans le flux sanguin, un vecteur comprenant deux nouvelles molécules lipidiques (l'une chargée positivement, l'autre négativement) conduit à des niveaux significativement supérieurs d'expression du gène par rapport aux formulations concurrentes. Pour l'administration dans le muscle, nous avons montré qu'une augmentation de transfert de gène peut être obtenue en ajoutant des composés particuliers dans la formulation. Des conditions similaires ont été définies afin d'augmenter le transfert de gène dans les poumons via la voie intrapulmonaire. Ces vecteurs ne présentent pas de toxicité sur les animaux et certains des composants sont connus pour leur caractère inoffensif chez l'homme. Parce que ces vecteurs n'induisent pas de réponse immunitaire, leur administration peut être répétée. Les vecteurs synthétiques sont ceux développés, entre autre, pour le traitement éventuel de la mucoviscidose ou des maladies cardiovasculaires. Ces vecteurs ont un champ d'application potentiel pour de nombreuses maladies comme la sclérose en plaque et les maladies auto-immunes.

Vecteurs cellulaires

Les vecteurs cellulaires sont utilisés dans nos études cliniques de stimulation du système immunitaire contre le mélanome malin et le

mésotéliome (cancer du poumon souvent lié l'amiante), pour obtenir une production localisée de protéines thérapeutiques.

Les vecteurs sont des lignées cellulaires d'origine simienne (cellule Vero) transfectées avec gène codant pour la protéine thérapeutique de sorte que la protéine soit sécrétée de façon continue. Les cellules Vero ont été modifiées en vue de produire des niveaux élevés d'interleukine 2 ou d'autres cytokines.

Nous pensons que ce type de vecteurs, qui agit localement à la manière d'une pompe cytokine implantée dans la tumeur, est particulièrement bien adapté aux traitements du cancer. En administration répétée, il doit permettre d'obtenir une réponse immunitaire antitumorale efficace, mais diminue le risque lié à la production sur une longue période de cytokine. De surcroît, les cellules Vero sont couramment utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour la fabrication de vaccins. Leur historique toxicologique et réglementaire est donc particulièrement bien documenté.

Les vecteurs cellulaires peuvent offrir certains avantages par rapport à d'autres types de vecteurs. Nous pensons que leur capacité à produire localement et transitoirement des niveaux élevés d'une protéine permettra d'augmenter l'efficacité thérapeutique tout en éliminant les effets secondaires.

Vecteurs rétroviraux

Les vecteurs rétroviraux permettent un transfert de gène efficace et stable dans les cellules en division. La première génération de ces vecteurs, dérivée du virus de souris Moloney Leukemia Virus (MLV), a néanmoins deux inconvénients qui en limitent l'efficacité de production : premièrement, le risque de génération de virus réplicatifs qui résulte de la recombinaison entre les cellules productrices et le vecteur, et, deuxièmement, la faible efficacité de la production de vecteurs par ces cellules.

Ces problèmes ont été traités dans notre nouveau vecteur rétroviral basé sur un autorétrovirus de souris, le Friend Leukemia Virus (FLV), et sa lignée cellulaire de production. Cette nouvelle génération de vecteur est produite de manière plus efficace que les vecteurs basés sur MLV et nous y avons introduit des séquences d'ADN qui activent la synthèse du rétrovirus par la cellule productrice. Le nouveau vecteur est également conçu pour éliminer le risque de génération de virus réplicatifs et présente un profil de sécurité amélioré par rapport aux vecteurs initiaux.

Le tableau ci-après présente les produits actuellement en développement clinique.

| INDICATION | GÈNE | VECTEUR | STATUT |
|---|---------------------------|---|--|
| VACCIN ANTICANCER | | | |
| Cancer du sein Cancer de la prostate Cancer du poumon | Antigène Mu1 et IL2 | Virus de la vaccine Souche Copenhague Modified Vaccinia Ankara Virus (MVA) | La phase II d'essai clinique du vecteur avec le virus de la vaccine a été achevée. La seconde génération avec le vecteur MVA est entrée en phase clinique au 4 ^e trimestre 99. Le début des essais de phase II avec ce vecteur est prévu pour le 2 ^e trimestre 2000. |
| Cancer du col de l'utérus | Antigènes de HPV16 et IL2 | MVA | Essais cliniques de phase I commencés au 2 ^e trimestre 99 |
| STIMULATION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE | | | |
| Mélanome malin Mésothéliome | IL2 | Vecteurs cellulaires (cellules Vero) | Essais cliniques de phase II devant être achevés au 2 ^e trimestre 2000 |
| Mélanome malin Mésothéliome | IL2 | Adénovirus | Début d'essais cliniques de phase I avec le vecteur de 2 ^e génération prévu d'ici le 2 ^e trimestre 2000 |
| Cancer du sein Mélanome malin | Interféron γ | Adénovirus | Essais cliniques de phase I initiés au 2 ^e trimestre 99 |

Programmes cliniques et traitement du cancer

Le système immunitaire est régulé par une catégorie de protéines dénommées cytokines. La cytokine interleukine 2 (IL2) est responsable de la stimulation des CTL. La cytokine interféron γ a plusieurs fonctions, y compris celle d'obliger les cellules à présenter les antigènes à leur surface, où ils peuvent interagir avec le système immunitaire. L'immunothérapie cherche à stimuler la génération par le système du patient d'anticorps et de CTL pour attaquer les cellules cancéreuses.

Nous avons deux approches pour stimuler le système immunitaire contre le cancer : les vaccins anticancer spécifiques et la thérapie par stimulation du système immunitaire. La thérapie par induction d'une réponse spécifique contre un antigène, au vaccin anticancer, est utilisée dans le cas où l'antigène tumoral est bien identifié et est présent chez de nombreux patients. Le gène codant pour cet antigène est incorporé dans notre produit et il induit une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire contre l'antigène dans tout le corps. Le vaccin ainsi produit peut être administré par voie intramusculaire, comme un vaccin contre la grippe, de façon à provoquer une réaction systémique contre l'antigène étranger.

La thérapie par stimulation du système immunitaire ne requiert pas l'identification d'un antigène spécifique de tumeur mais repose sur la présence chez chaque patient d'antigènes tumoraux uniques. Pour mettre en œuvre cette approche, le gène codant pour une cytokine telle que l'IL2 ou l'interféron γ est injecté directement dans la tumeur. La cytokine peut y stimuler le système immunitaire pour qu'il réagisse à n'importe quel antigène tumoral présent dans l'organisme. Cette approche présente l'avantage de ne pas nécessiter l'identification des antigènes tumoraux spécifiques chez un patient donné, même si son mode d'administration est plus compliqué.

En plus des vaccins contre certains antigènes spécifiques et de notre approche de stimulation du système immunitaire, nos efforts de recherche en immunothérapie concernent de nouvelles approches visant à traiter directement les cellules cancéreuses.

Vaccins anticancer

Notre approche la plus avancée du traitement du cancer utilise des vaccins thérapeutiques dirigés contre des antigènes tumoraux. Récemment, un nombre croissant d'antigènes spécifiques des cellules cancéreuses a été identifié. Ce type de traitement vise à induire une réaction immunitaire cellulaire forte contre ces antigènes tumoraux. Pour ce faire, le gène codant pour l'antigène tumoral est inséré dans un virus de la vaccine, ainsi que le gène de l'IL2 qui permet d'augmenter la capacité du système immunitaire à produire une réponse efficace. Le produit est injecté dans les muscles du patient où l'antigène et l'IL2 sont alors produits. Cette combinaison active les CTL qui peuvent attaquer le cancer dans tout le corps. Les études animales ont montré que l'injection de nos vecteurs issus du virus de la vaccine portant à la fois l'antigène et l'IL2, produit une forte réponse CTL antitumorale spécifique. Nous utilisons actuellement le virus de la vaccine Modified Vaccine Ankara (MVA) comme vecteur pour nos vaccins anticancer. Le virus MVA a démontré sa sécurité d'utilisation dans la vaccination contre la variole et des expériences de laboratoire ont mis en évidence son efficacité dans l'induction d'une réponse immunitaire. Nous avons deux vaccins anticancer en essais cliniques, l'un dirigé contre l'antigène Muc1 du cancer du sein, du cancer de la prostate et d'autres types de cancers, l'autre, contre des antigènes du virus HPV du cancer du col de l'utérus. Si cette approche fait la preuve de son efficacité, d'autres antigènes tumoraux pourraient être utilisés pour générer des produits similaires.

Le vaccin Muc1

Notre premier candidat pour une thérapie par induction d'une réponse immunitaire spécifique concerne l'antigène Muc1. L'antigène Muc1 est normalement présent dans le mucus de glande et est exprimé dans un grand nombre de cellules normales dans le corps humain. Toutefois, dans certaines cellules cancéreuses, Muc1 est exprimé de façon

anormale. Le système immunitaire est capable de distinguer l'antigène anormal, présent uniquement dans les cellules atteintes du cancer. Mucl a été décelé dans les cellules cancéreuses de la majeure partie des patients atteints de cancer du sein, de cancer de la prostate, de cancer du poumon et de différents autres cancers.

Nous avons achevé des essais cliniques de phase I et de phase II avec des patients atteints de cancer du sein et de cancer de la prostate, en utilisant une génération antérieure du vecteur basée sur le virus de la vaccine avec l'antigène Mucl. Les essais ont montré la sécurité et la faisabilité de cette approche. Ils ont également montré la capacité de l'approche Mucl à induire une régression de la tumeur, et ce, sur des patients dont la maladie avait progressé malgré un traitement par chimiothérapie. Au quatrième trimestre 1999, nous avons commencé des essais cliniques avec une formulation améliorée du vaccin Mucl. Cette formulation utilise le virus MVA qui est incapable de se répliquer dans les cellules humaines et qui, de ce fait, ne peut causer d'infection chez l'homme, et qui montre également une stabilité accrue ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'antigène Mucl. Des résultats préliminaires de l'étude de phase I avec ce nouveau produit Mucl ont confirmé la sécurité de cette nouvelle formulation. Des essais cliniques de phase II devraient commencer au second trimestre 2000, sur des patients atteints de cancer du sein, de cancer de la prostate et de cancer du poumon, en Europe et aux États-Unis.

Cancer du sein

Le cancer du sein sera détecté chez plus de 180 000 femmes aux États-Unis en 2000 et causera le décès de plus de 40 000 patientes, ces chiffres étant très similaires en Europe. Le cancer du sein est actuellement traité par chirurgie ou par radiothérapie. Au cours des trente dernières années, des progrès significatifs ont été réalisés grâce au diagnostic plus précoce du cancer et grâce à la thérapie hormonale ainsi qu'à la chimiothérapie. Néanmoins, malgré ces progrès, le pronostic reste sombre pour les patientes atteintes de cancer du sein métastatique. La mise au point des nouvelles approches, capables de prévenir le développement des tumeurs ou de traiter des tumeurs métastatiques, reste un objectif majeur.

Notre version initiale du vaccin Mucl a été évaluée dans un essai clinique de phase II avec 31 patientes présentant des cancers du sein métastatique. Des résultats de cet essai ont été présentés au Symposium international sur le cancer du sein en décembre 1999. Dans cet essai, deux patientes ont présenté une réduction de plus de 50 % de la taille de leur cancer métastatique, malgré l'échec de leurs traitements traditionnels précédents. Sur la base de ces résultats positifs, nous comptons entreprendre en 2000 des essais sur un nombre étendu de patientes atteintes de cancer du sein avec le vaccin MVA-Mucl.

Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate sera diagnostiqué chez plus de 180 000 hommes aux États-Unis en 2000 et causera le décès de plus de 30 000 patients, ces chiffres étant également très similaires en Europe. Comme pour le cancer du sein, le traitement des tumeurs de la prostate nouvellement diagnostiquées repose sur la chirurgie et la radiothérapie. Bien que l'utilisation répandue d'un test sanguin de détection de l'antigène spécifique du cancer de la prostate (PSA) ait permis de pratiquer un diagnostic précoce chez de nombreux hommes, et bien que la thérapie hormonale permette de prolonger temporairement la survie des patients, la mortalité due au cancer de la prostate a continué d'augmenter légèrement au cours des cinquante dernières années. De nouvelles approches, moins toxiques, pour une population de patients plutôt âgés, sont donc nécessaires.

Nous avons réalisé un essai clinique de phase I/II avec 16 patients présentant un taux élevé de PSA mais ne montrant par ailleurs aucun signe de cancer métastatique. L'indication préliminaire d'un effet antitumoral a été observée, le taux de PSA de l'un des patients étant redevenu normal pendant plus d'un an. Nous prévoyons de réévaluer ces résultats au début de l'année 2000 avec la nouvelle version de vaccin Mucl en administrant le vaccin en traitement unique et en injection avec un autre stimulant immunitaire.

Cancer du poumon et autres cancers

L'antigène Mucl est également exprimé dans d'autres types de tumeurs, de la même façon que dans le cancer du sein et dans le cancer de la prostate. Si l'efficacité de notre approche vaccin anticancer peut être montrée chez les patients atteints d'un cancer du sein ou de la prostate, la même stimulation immunitaire devrait vraisemblablement être obtenue dans ces autres types de cancer.

Pendant la réalisation des essais cliniques de phase II avec le nouveau vaccin Mucl sur des cancers du sein et cancers de la prostate, nous prévoyons d'inclure au moins un essai clinique sur des patients atteints de cancer du poumon "non à petite cellule" (responsable de plus de 120 000 morts par an aux États-Unis). Si des résultats positifs sont obtenus dans un de ces types de cancer, nous envisagerons d'étendre le programme vaccin Mucl à d'autres tumeurs.

Le vaccin HPV

Notre second produit de thérapie par stimulation spécifique contre un antigène utilise un virus de la papillome (HPV) spécifique au sous-type HPV16. L'infection par HPV est transmise sexuellement et est mise en cause dans le cancer du col de l'utérus et les modifications précancéreuses

du col. Le cancer du col de l'utérus est diagnostiqué chez plus de 130 000 femmes chaque année aux États-Unis et en Europe et est responsable de près de 15 000 décès par an. Plus de 90 % des femmes atteintes de cancer du col de l'utérus ont été infectées par l'HPV et plus de 60 % d'entre elles l'ont été par l'HPV16. Les infections à HPV sont plus répandues dans les pays en voie de développement et le cancer du col de l'utérus y est donc plus fréquent.

La pratique du frottis permet de diagnostiquer le cancer du col de l'utérus à des stades très précoces. Dans ces cas de détection précoce, la chirurgie locale est efficace chez pratiquement toutes les patientes. Lorsque le cancer s'étend, une chirurgie plus importante ou une radiothérapie sont nécessaires pour traiter la maladie et la proportion de femmes développant à terme un cancer métastatique s'accroît. Le traitement du cancer du col de l'utérus métastatique consiste en une chimiothérapie qui peut temporairement réduire la maladie mais ne la guérit pas. L'utilisation d'un vaccin anticancer pourrait être bénéfique aux patientes atteintes aux différents stades de la maladie, non seulement pour traiter les métastases, mais également pour empêcher la rechute après chirurgie ou radiothérapie ou encore pour empêcher l'apparition d'un cancer chez les femmes infectées par l'HPV16. Trois essais cliniques de phase I avec notre vaccin HPV, dans lesquels seront inclus à terme environ 27 patientes, ont commencé aux États-Unis et en Europe en 1999 et se poursuivent en 2000.

Thérapie par stimulation du système immunitaire

En plus de la thérapie par induction d'une réponse immunitaire spécifique à un antigène, notre approche de traitement du cancer vise également à obtenir des réponses immunitaires cellulaires dirigées directement contre la tumeur, dans différents types de cancers.

La thérapie par stimulation du système immunitaire est fondée sur le fait que des antigènes tumoraux sont présents dans toutes les tumeurs, même si la plupart de ces antigènes ne sont pas identifiés. Dans cette approche, notre produit portant le gène d'une cytokine appropriée est directement injecté dans la tumeur. Les cytokines ont été choisies en raison de leur capacité reconnue de stimuler le système immunitaire. L'injection provoque la transfection du gène dans les cellules tumorales et la cytokine correspondante est alors produite localement dans la tumeur. La stimulation locale du système immunitaire peut ainsi attaquer et éliminer le cancer, à la fois au site d'injection et à des sites éloignés dans le corps. Notre stratégie de thérapie par stimulation du système immunitaire est axée actuellement sur les gènes de l'IL2 et de l'interféron γ et la production locale des cytokines correspondantes.

Interleukine 2

L'interleukine 2 (IL2) est connue pour avoir un effet de stimulation cellulaire (des cellules CTL) et systémique (ensemble du système immu-

nitaire). L'administration intraveineuse d'IL2 a montré l'induction de réponses antitumorales chez des patients atteints de mélanome métastatique et de carcinome rénal. Bien que le nombre de patients ayant bénéficié de ces traitements ait été limité, des réponses, parfois complètes et de longue durée, ont été observées chez certains d'entre eux. Malheureusement l'administration par voie intraveineuse d'IL2 est associée à une toxicité aiguë, ce qui en limite notablement l'efficacité clinique. En administrant le gène de l'IL2 dans la tumeur avec un vecteur approprié, la production de la protéine se fait localement et la toxicité peut ainsi être réduite.

Pour notre programme de thérapie par stimulation de système immunitaire avec l'IL2, nous évaluons deux différents types de vecteurs, un vecteur non viral cellulaire (la lignée cellulaire Vero) et un adénovirus. Le vecteur optimal sera sélectionné en fonction des résultats obtenus dans chacune de ces approches.

Les études réalisées avec le produit Vero IL2 lors d'essais cliniques de phase I ont confirmé la sécurité de la production locale d'IL2 et ont montré que celle-ci pouvait avoir un effet antitumoral et ce, même à des sites distants de l'injection. Un essai clinique de phase II avec ce produit est en voie d'achèvement, avec 28 patients atteints de mélanome métastatique, une forme souvent mortelle de cancer de la peau, et de mésothéliome, une forme rare de cancer du poumon souvent provoquée par l'amiante. Cet essai devrait être terminé au second trimestre 2000. Nous pensons que les résultats de nos essais avec Vero IL2 montreront la sécurité et l'efficacité potentielle de l'approche de stimulation du système immunitaire.

Nos chercheurs ont également achevé la construction d'un vecteur adénoviral de nouvelle génération pour la thérapie par stimulation du système immunitaire par IL2. Cette nouvelle version utilise un promoteur amélioré qui devrait augmenter substantiellement l'IL2 produite dans chacune des cellules cancéreuses dans lesquelles le gène de l'IL2 est transfecté. Nous envisageons de commencer des essais cliniques de phase I avec cette nouvelle version du produit au cours du deuxième ou du troisième trimestre 2000. Ces essais porteront sur des patients atteints de tous types de cancers. Si la sécurité du produit est confirmée dans ces premiers essais, les essais suivants se concentreront sur des cancers particuliers en fonction des résultats des essais cliniques de phase I qui devraient permettre de restreindre le nombre d'indications de traitement.

Interféron γ

L'interféron γ est une des cytokines les plus importantes en raison de ses effets multiples sur le système immunitaire. L'un de ses effets majeurs est sa capacité à faire exprimer les antigènes anormaux ou étrangers sur la membrane externe des cellules, où ils peuvent être attaqués par le système immunitaire. L'interféron γ administré par voie systémique sous

sa forme de protéine a été testé chez des patients atteints de cancers métastatiques du rein et de mélanomes malins. L'interféron γ utilisé seul n'a pas d'activité anticancéreuse dans ces indications. Cependant, nos travaux ont montré que lorsque le gène de l'interféron γ est exprimé localement dans une tumeur en association avec le gène de l'IL2, l'efficacité de l'IL2 est augmentée de façon significative. Cette capacité à augmenter l'efficacité de l'IL2 et, potentiellement, l'efficacité immunitaire d'autres traitements contre le cancer est une raison majeure justifiant l'évaluation de ce produit en essais cliniques.

Notre second produit de stimulation du système immunitaire utilise un vecteur adénoviral contenant le gène de l'interféron γ . Les essais cliniques de phase I commencés en 1999 se poursuivent. Des résultats préliminaires ont confirmé la sécurité de cette approche, tant en termes d'administration du produit, que d'absence de toxicité due à la production d'interféron γ dans la cellule. La suite du développement clinique de ce produit se concentrera sur son utilisation en association avec d'autres formes d'immunothérapie.

Nos programmes de recherche

En plus de nos produits actuellement en développement dans le traitement du cancer, nous croyons que la thérapie génique est une approche qui présente des avantages pour traiter beaucoup d'autres maladies. Avec notre large plate-forme de vecteurs et l'accès continu à de nouveaux gènes provenant des bases de données génomiques, dont celles de Human Genome Sciences, nous pensons que nous sommes particulièrement bien armés pour développer nos produits, seuls ou en collaboration avec d'autres et ce, dans de nombreuses maladies. Les nouveaux domaines dans lesquels nous travaillons concernent les maladies cardiovasculaires et la délivrance de protéines thérapeutiques pour des indications larges et variées. Nous travaillons également sur de nouvelles approches du traitement du cancer. Afin d'identifier et d'évaluer de nouvelles opportunités

- nous avons établi des liens avec des consultants reconnus dans chaque domaine cible,
- nous explorons la possibilité d'établir des collaborations avec des laboratoires reconnus dans des domaines clés,
- et nous acquérons en cas de besoins des gènes candidats ou des technologies.

Nos programmes de recherche préclinique se concentrent sur différentes maladies comme présenté dans le tableau ci-après qui résume ces programmes.

| Indication | Gène | Vecteur | Statut |
|--------------------------------------|--|-----------------------------------|---|
| Resténose | Gène HGS | Adénovirus Vecteur synthétique | Recherche préclinique |
| Ischémie périphérique et myocardique | Facteurs angiogéniques | Adénovirus Vecteur synthétique | Recherche préclinique |
| Cancer | FCU1 | Adénovirus | Recherche préclinique |
| Cancer | Gènes HGS | Adénovirus | Recherche préclinique |
| Myopathie de Duchenne | Dystrophine | Adénovirus Vecteur synthétique | Phase I devant débiter au 1 ^{er} semestre 2000 |
| Mucoviscidose | Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) | Adénovirus Vecteur synthétique | Recherche préclinique |

Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont les principales causes de mortalité dans les pays développés. Les vecteurs adénoviraux spécifiques d'un tissu ainsi que les vecteurs synthétiques peuvent offrir de nouvelles voies pour traiter les maladies cardiovasculaires par la thérapie génique. Nous avons initié des programmes de recherche visant à développer de nouvelles approches pour traiter deux types de maladies cardiovasculaires : la resténose et l'ischémie périphérique et myocardique.

La resténose

L'athérosclérose est une maladie dégénérative des artères qui se caractérise par la colonisation des parois des vaisseaux sanguins par des cellules étrangères, conduisant à l'accumulation de collagène et de calcium et entraînant une rigidité et une réduction du diamètre des vaisseaux. Cette situation peut évoluer jusqu'à l'infarctus du myocarde ou la gangrène. Les patients souffrant de maladies coronariennes sont fréquemment traités par angioplastie. Cette procédure consiste à insérer un ballonnet à l'intérieur du vaisseau sanguin afin de le dilater. Plus récemment, cette procédure a été modifiée par l'ajout de dispositifs destinés à maintenir ouverte la portion de l'artère obturée. Dans 30 % à 50 % des procédures faisant appel à l'angioplastie, une resténose (recontraction des artères) survient dans les six mois. Il n'y a pas de thérapie efficace disponible pour le traitement de cet état de santé. Transgène estime que l'adénovirus amélioré ainsi que les vecteurs synthétiques pourraient être utilisés en association avec des gènes de HGS comme traitements potentiels.

Ischémie périphérique et myocardique

Les maladies vasculaires aboutissent à la réduction de l'apport sanguin aux tissus et il peut en résulter une ischémie chronique (tissus

endommagés par le manque d'oxygène) en particulier au niveau du cœur (ischémie myocardique) et dans les membres inférieurs (ischémie périphérique). Les stratégies de traitement sont limitées, en particulier pour les patients souffrant de maladies chroniques et qui ne sont pas éligibles aux traitements standard tel que le pontage ou l'angioplastie. La découverte récente de gènes impliqués dans l'angiogenèse (la croissance de néovaisseaux) a permis l'émergence d'un nouveau produit stimulant la croissance des néovaisseaux afin d'apporter l'oxygène aux tissus ischémiés. Le transfert de gènes par l'administration de vecteurs directement dans la zone ischémisée est probablement un moyen très efficace pour apporter un facteur de croissance angiogénique.

Nous avons développé à la fois des vecteurs adénoviraux et synthétiques qui délivrent des gènes pour ces applications. Ces vecteurs sont utilisés pour évaluer l'efficacité de toute une série de gènes angiogéniques dans un modèle de lapin pour ce qui concerne l'ischémie périphérique et dans un modèle de porc pour l'ischémie myocardique (en collaboration avec l'hôpital Henri Mondor, Créteil). Dans le même temps, nous travaillons en collaboration avec HGS afin d'identifier de nouveaux gènes induisant la croissance de vaisseaux sanguins.

Cancer

En plus de nos produits actuellement en développement tels que décrits ci-dessus, nos efforts de recherche dans le domaine du cancer sont orientés vers d'autres approches de thérapie génique dont le but est de tuer les cellules cancéreuses ou de bloquer leur croissance. Nos chercheurs ont utilisé un nouveau gène suicide (gène dont la protéine est toxique pour les cellules dans certaines conditions) qui consiste en une fusion de deux gènes provenant de la levure. Nous pensons que ce nouveau gène dénommé FCU1 est plus toxique pour les cellules tumorales que les gènes concurrents actuellement en recherche clinique. De plus, dans le contexte de notre partenariat avec HGS, un certain nombre de gènes candidats ont été identifiés en raison de propriétés suggérant des applications potentielles en thérapie génique dans le domaine du cancer. Ces gènes sont évalués dans un certain nombre de tests et de modèles animaux, seuls et en combinaison avec d'autres gènes.

Maladies héréditaires

Il a été montré que de nombreuses maladies héréditaires sont causées par une mutation d'un gène particulier. Une telle mutation provoque l'absence de production de protéines ou d'une protéine anormale et par conséquent altère la fonction biologique correspondante. Les progrès récents permettent l'identification de ces mutations et des gènes responsables de diverses maladies génétiques. Dans ces conditions, la thérapie génique apparaît comme un traitement possible de la maladie par l'insertion d'une copie du gène normal.

Myopathie

La myopathie de Duchenne est la maladie génétique des muscles du squelette la plus courante, avec une fréquence de 1 pour 3 500 naissances chez les garçons, soit environ 40 000 cas aux États-Unis et en Europe Occidentale. Cette maladie est due à une mutation du gène de la dystrophine, une protéine nécessaire au bon fonctionnement des cellules musculaires. L'absence de dystrophine fonctionnelle conduit, dans la myopathie de Duchenne, à une dégénérescence des muscles et au décès chez l'enfant. Différents organes sont affectés, y compris le cœur, le diaphragme et la masse musculaire, rendant difficile l'apport du gène thérapeutique.

Nous menons actuellement un programme de recherche visant à mettre au point des approches de thérapie génique et cellulaire pour la myopathie de Duchenne, avec le soutien de l'Association française contre les myopathies (AFM) qui contribue à son financement. Un des premiers objectifs consiste à démontrer chez les patients que le transfert du gène thérapeutique compense le gène défectueux et conduit à une correction fonctionnelle dans un muscle isolé. Les résultats de recherche montrent que le transfert local du gène de la dystrophine peut être réalisé dans les modèles de souris et chiens myopathes. Les autorités réglementaires françaises nous ont autorisés à initier un essai de recherche clinique de phase I au premier semestre 2000 afin d'évaluer la capacité du gène normal de la dystrophine à corriger la fonction défectueuse chez l'homme. En dernier lieu, le traitement ultime de la myopathie de Duchenne exigera une administration efficace du gène aux cellules musculaires critiques, en particulier le cœur et le diaphragme.

Mucoviscidose

La mucoviscidose est l'une des maladies génétiques les plus courantes. Elle est provoquée par une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) entraînant des sécrétions anormales qui conduisent à une accumulation de mucus, à des problèmes respiratoires de plus en plus graves, ainsi qu'à des infections entraînant une inflammation chronique. Elle touche, aux États-Unis et en Europe occidentale, une naissance sur 2 500. Les patients atteints de mucoviscidose ont une espérance de vie moyenne de 29 ans. 66 000 patients sont atteints de mucoviscidose aux États-Unis et en Europe occidentale.

Certaines caractéristiques de la mucoviscidose, telles que la nature des tissus affectés, l'inaccessibilité de l'épithélium bronchique, de même que l'absence de traitement, la désignent logiquement pour l'application de technologies de thérapie génique. Notre approche pour le traitement de la mucoviscidose associe un vecteur adénoviral à un gène CFTR normal destiné à compenser le gène défectueux du patient. Bien que le travail clinique réalisé avec cette approche ait démontré le transfert et la persistance du gène CFTR, un produit de thérapie génique efficace

demandera de nouvelles améliorations au niveau du vecteur pour être utilisé en clinique. Pour atteindre cet objectif, notre travail de développement est concentré à la fois sur les vecteurs adénoviraux et les vecteurs synthétiques. Nous conduirons de nouvelles études cliniques lorsque le vecteur sélectionné aura été optimisé.

Technologie de délivrance de protéines

Notre plate-forme de vecteurs adénoviraux et synthétiques peut être utilisée pour amener des protéines dans le sang. Le gène correspondant est administré dans les cellules musculaires (vecteurs synthétiques) ou hépatiques (vecteurs adénoviraux). Les cellules transduites peuvent alors sécréter la protéine thérapeutique dans le sang. Cette technologie pourrait bénéficier de la thérapie génique et représenter une alternative intéressante aux traitements utilisant des protéines recombinantes. Les avantages potentiels de cette approche innovante comprennent :

- des administrations moins fréquentes en raison d'un meilleur profil pharmacocinétique,
- un risque réduit de réponse immunitaire et d'effets secondaires en raison d'une moindre variation de la concentration protéique dans le sang,
- une plus grande efficacité en raison de cette stabilité de la concentration protéique.

Les applications de cette technologie peuvent être larges : elles comprennent l'administration éventuelle d'interférons, de facteurs de croissance, de facteurs de coagulation et d'anticorps monoclonaux. Dans des travaux préliminaires, nous avons montré la faisabilité de cette technologie sur des modèles animaux atteints de sclérose en plaques, par l'administration intramusculaire d'un gène exprimant l'interféron β .

Concurrence

Transgène est confrontée à une concurrence intense et accrue provenant de sociétés de thérapie génique. Des sociétés pharmaceutiques et biotechnologiques poursuivant d'autres approches de traitement de maladies, y compris des maladies que nous étudions, font également partie des concurrents. Dans certains cas, la concurrence à laquelle nous sommes confrontés peut provenir de produits déjà commercialisés ou à des stades plus avancés de développement clinique que nos produits. La thérapie génique est une méthode nouvelle qui n'a pas encore fait ses preuves. Bien qu'il n'y ait actuellement pas de traitement efficace des maladies sur lesquelles nous travaillons, d'autres méthodes de traitement, telles que les petites molécules de synthèse, sont des traitements reconnus, et d'autres, telles que les thérapies protéiques, pourraient constituer des produits concurrentiels. Nous pensons que pour être concurrentiels, nous devons avoir des produits sûrs, efficaces, faciles à administrer et rentables. Nous devons également accéder à des réseaux

de distribution et obtenir la prise en charge des coûts de nos produits par les assurances de santé. Nous nous attendons à rencontrer des concurrents disposant de ressources bien plus importantes que les nôtres pour développer des produits, accéder à des distributeurs, et ayant une plus grande expérience dans les discussions avec les autorités en vue d'obtenir le remboursement des produits.

Nous avons des concurrents pour chacun de nos vecteurs et de nos produits et en particulier pour les adénovirus, les rétrovirus, le virus de la vaccine, les vecteurs cellulaires et synthétiques, auxquels s'ajoutent d'autres vecteurs comme les adénovirus associés, ainsi que dans le domaine de la thérapie génique *in vivo* plus généralement. Nous faisons face également à une concurrence sur certaines approches thérapeutiques particulières que nous développons. Bien que nous pensions que notre portefeuille de vecteurs puisse nous donner un avantage compétitif, des concurrents pourraient chercher à adopter notre stratégie de familles de vecteurs multiples et plus généralement de thérapie génique *in vivo*.

Propriété intellectuelle Stratégie

Notre succès commercial dépendra, en partie, de notre capacité à obtenir des brevets, en France, en Europe, aux États-Unis et ailleurs dans le monde, pour assurer la protection de nos vecteurs, produits, procédés et technologies de thérapie génique, y compris des produits résultant de l'association de vecteurs avec des gènes thérapeutiques. Nous recherchons donc, à chaque fois que cela est possible, la protection de nos vecteurs (y compris pour les travaux en cours sur les nouveaux développements), produits, procédés ou technologies pour leurs applications en thérapie génique, notamment les maladies sur lesquelles nous travaillons, telles que les cancers, la mucoviscidose, les maladies cardiovasculaires et la myopathie. Nous cherchons également à étendre notre portefeuille de vecteurs et de produits en accédant, au moyen de collaborations ou d'accords de licence, à des gènes ou d'autres éléments, procédés ou technologies sur lesquels des tiers pourraient avoir des droits.

Brevets et demandes de brevets

Nous avons déposé, et continuons de déposer, de nombreuses demandes de brevets pour couvrir différents aspects de nos activités (vecteurs adénoviraux, vaccinaux, rétroviraux et synthétiques et leurs méthodes de préparation et d'administration). Au 3 mars 2000, dans le domaine de la thérapie génique, nous avons soixante demandes en instance d'examen en France (y compris les demandes européennes désignant la France), et quarante-sept demandes en instance aux États-Unis, dont dix, essentiellement dans le domaine de la technologie des vecteurs, ont reçu une notification d'accordabilité (étape précédant la délivrance du brevet). À

cette même date, nous avons onze brevets européens et dix-huit brevets américains accordés. Certaines de ces demandes ont été déposées conjointement avec des collaborateurs extérieurs, personnes morales ou physiques, et les brevets qui en seront issus seront donc détenus en copropriété avec ces collaborateurs. Nous considérons que nos demandes de brevets couvrent, dans certains cas, des technologies importantes pour la commercialisation future des produits et bénéficient de dates de priorité antérieures à celle de concurrents. Toutefois, en raison de la longueur des procédures d'examen des demandes, notamment dans le domaine des biotechnologies, la date de décision de délivrance ou de rejet d'une demande ne peut être déterminée. Il n'y a pas non plus de certitude qu'une demande particulière donnera lieu à un brevet ni, si un brevet est accordé, que sa portée conférera à la société un avantage compétitif, ou qu'il ne sera pas contesté ou contourné.

Autres droits de propriété

Nous recourons également dans nos programmes de thérapie génique à des savoir-faire, procédés de fabrication, ou des informations technologiques confidentielles qui ne sont pas brevetables. Pour protéger ces éléments nous nous appuyons sur des engagements de confidentialité avec nos employés, nos consultants et certains de nos cocontractants, bien qu'il ne puisse y avoir de garantie quant à l'efficacité d'une telle protection.

Production

Nous sommes dotés d'une unité de production de lots cliniques. Opérationnelle depuis 1995, c'est l'une des premières unités construites pour fabriquer des produits de thérapie génique en Europe. Cette unité nous donne la capacité de produire nos propres vecteurs de qualité clinique pour conduire les essais cliniques de phase I et de phase II. Nous réaliserons des investissements au cours de l'année 2000 pour être en mesure de conduire des études cliniques de phase III et assurer le lancement de notre vaccin anticancer MVA Mucl.

Parallèlement au développement de nos procédés de production, nous avons développé notre propre expertise dans le domaine du contrôle qualité (QC) et de l'assurance qualité (QA). Nous disposons d'un laboratoire de contrôle qualité dédié, mitoyen de l'unité de production, qui comprend différentes zones pour la virologie, la bactériologie, la biologie moléculaire et la biochimie. Notre objectif est de réaliser en interne la grande majorité des contrôles *in vitro* sur le produit final et sur les produits intermédiaires. Le laboratoire de contrôle qualité fonctionne conformément aux règles de bonnes pratiques de laboratoire. L'ensemble de notre unité (production et contrôle) a été inspecté par les autorités françaises. Les spécifications de nos produits et les procédures opératoires pour le contrôle de nos produits ont été acceptées par différentes autorités réglementaires nationales, dont la FDA.

Notre système d'assurance qualité a été conçu pour satisfaire les exigences réglementaires de qualité et sécurité de produits pharmaceutiques à usage humain. Le personnel de l'assurance qualité est chargé du respect des bonnes pratiques de fabrication et de contrôle ; il effectue des audits réguliers de notre système afin de vérifier qu'il est conforme à l'évolution de la réglementation applicable.

Nous pensons que cette unité de production, ainsi que plus de 55 personnes impliquées dans des activités de développement, production, assurance qualité et contrôle qualité, médicales et réglementaires, nous permettent de fonctionner de manière autonome afin de transformer le fruit de la recherche scientifique en produits pharmaceutiques pour les essais cliniques et pour les phases initiales de commercialisation.

Nous pensons que nous avons des capacités suffisantes pour mener à bien les études cliniques jusqu'à la fin des phases III et assurer le lancement de notre vaccin cancer MVA Mucl.

Par ailleurs, nous devons construire ou avoir accès à une unité industrielle à un coût significatif afin de fabriquer nos produits à une échelle commerciale. Nous avons commencé à explorer différents lieux d'implantation d'une telle unité. Dans le cadre de cette unité de production, nous devons obtenir l'autorisation des autorités réglementaires et nous serons soumis à des inspections de nature à confirmer la conformité avec les bonnes pratiques de fabrication.

Aspects réglementaires

Réglementations gouvernementales

La recherche et le développement, les tests précliniques, les essais cliniques, les installations, la fabrication et la commercialisation des produits thérapeutiques ont vocation à être soumis à une réglementation très complète élaborée par de nombreuses autorités gouvernementales aux États-Unis, en France ou dans d'autres états membres de l'Union européenne, ou dans d'autres pays. L'Agence européenne d'évaluation des médicaments, l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, la Food and Drug Administration (FDA), et des agences comparables dans d'autres pays imposent le respect de conditions rigoureuses pour la fabrication et la commercialisation des produits comme ceux que nous développons, notamment leur soumission à des tests précliniques et cliniques, ainsi qu'à d'autres procédures d'approbation préalables à la mise sur le marché. La thérapie génique étant une technologie relativement nouvelle qui n'a pas fait l'objet d'une expérimentation à grand échelle sur l'homme, les contraintes réglementaires applicables aux produits qui en sont issus sont délicates à identifier et sont susceptibles de faire l'objet de réglementations supplémentaires considérables. Ces obligations peuvent avoir pour effet une extension conséquente des délais dans la mise en œuvre des essais cliniques et la procédure d'approbation réglementaire, d'une manière générale.

La thérapie génique a fait l'objet d'une attention particulière de la part des médias et des autorités de santé à la suite du décès d'un patient volontaire dans un essai clinique à l'université de Pennsylvanie utilisant un vecteur adénoviral. Cet essai portait sur une administration à une dose très élevée du vecteur, par la voie intrahépatique. Dans nos essais cliniques, nous n'administrons pas de telles doses, pas plus que nous n'utilisons la voie intrahépatique. Différentes autorités de santé enquêtent encore sur les causes de cet accident. À ce jour, la réaction des autorités réglementaires ne laisse pas présager d'actions susceptibles de freiner nos développements, mais nous prévoyons qu'une plus grande attention sera portée à nos essais cliniques. L'intensification éventuelle des processus de revue réglementaire qui pourrait en résulter pourrait retarder la commercialisation de nos produits.

La réussite commerciale de nos produits dépendra essentiellement de l'acceptation par le public de l'utilisation des thérapies géniques pour la prévention ou le traitement des maladies humaines. Les réactions du public pourraient être influencées par des réclamations tendant à affirmer que les thérapies géniques ne sont pas sûres. De même, notre réussite commerciale dépend de l'accueil que le public et le corps médical réserveront à nos produits. Une réaction négative du public à la thérapie génique pourrait renforcer la réglementation nationale et les exigences d'étiquetage et pourrait également réduire la demande pour tout produit que nous sommes susceptibles de développer.