

## Immunothérapie génique du cancer : bilan et perspectives

Véronique Leclercq  
Malika Hamdane  
Catherine Bruyns  
Louiza Faïd  
Diamon Gangji  
Thierry Velu

L'immunothérapie génique du cancer repose essentiellement sur des protocoles de transfert de gène dans les cellules tumorales ou fibroblastiques. Le consensus est acquis sur la nécessité d'améliorer le transfert de gène *in vivo* dans les tumeurs. Les approches cherchant à augmenter l'immunogénicité tumorale devraient être associées à une neutralisation des effets immunosuppresseurs de la tumeur. La variabilité antigénique tumorale demeure un écueil important et implique que l'immunothérapie du cancer cible d'emblée plusieurs antigènes tumoraux ou soit utilisée dans d'autres thérapeutiques anticancéreuses. L'emploi des cellules dendritiques génétiquement modifiées reste cependant une perspective majeure du fait de leurs propriétés en tant que cellules présentatrices d'antigène. La voie et le site d'injection, la capacité des cellules dendritiques humaines de migrer vers les organes lymphoïdes périphériques, la quantité de cellules à injecter et le nombre d'injections chez l'homme sont autant de questions encore sans réponse.

### ADRESSES

V. Leclercq : docteur en médecine, chercheur à l'IRIBHN, campus Erasme. M. Hamdane : docteur ès sciences, chercheur à l'IRIBHN, campus Erasme. C. Bruyns : docteur ès sciences, chercheur à l'IRIBHN, campus Erasme. L. Faïd : docteur en médecine, coordinatrice des protocoles de thérapies du cancer, clinique d'oncologie médicale, Unité Erasme-Bordet, Hôpital Erasme. D. Gangji : docteur en médecine, chef de l'unité de chimiothérapie ambulatoire, clinique d'oncologie médicale, Unité Erasme-Bordet, Hôpital Erasme. T. Velu : professeur, docteur en médecine, agrégé de l'enseignement supérieur, chef de la clinique d'oncologie médicale, Unité Erasme-Bordet, Hôpital Erasme. Institut de recherche interdisciplinaire et Service d'oncologie médicale, IRIBHN, Hôpital Erasme, route de Lennik 808, B-1070 Bruxelles, Belgique.

### TIRÉS À PART

T. Velu.

m/s n° 5, vol. 15, mai 99

La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale la singularise et en fait une cible potentielle pour le système immunitaire. Le développement de cancers chez des individus immunocompétents montre que cette immunosurveillance peut être mise en échec, soulignant un aspect particulier des rapports entre système immunitaire et tumeur. Cet aspect fait référence aux mécanismes élaborés par les tumeurs pour échapper aux différents acteurs de l'immunité. Ces mécanismes sont multiples et se situent principalement à trois niveaux : la variabilité antigénique tumorale, l'immunogénicité tumorale et l'interaction de la tumeur avec les effecteurs immuns. La connaissance

de ces mécanismes et l'identification d'antigènes tumoraux ont donné une impulsion à une immunothérapie du cancer de plus en plus sophistiquée dans laquelle la thérapie génique représente un outil de choix. Le défi de l'immunothérapie génique du cancer, qu'elle soit active ou adoptive, est non seulement d'induire ou d'amplifier une réponse immune antitumorale mais aussi de déjouer les mécanismes d'échappement\*.

L'immunothérapie génique adoptive consiste en l'apport d'effecteurs cellulaires antitumoraux génétiquement modifiés, et concerne pour l'essentiel les « lymphocytes T infiltrant les tumeurs » (*tumor infiltrated T lympho-*

\* Voir glossaire, p. 643.

cytes, TIL). Ces TIL se montrent bien plus efficaces *in vivo* dans des modèles expérimentaux que des lymphocytes T activés par l'interleukine-2 (IL-2) (cellules LAK, *lymphocyte activated killer cells*) (*m/s* 1993, n° 6/7, p. 805). Afin d'augmenter leur activation de façon constitutive, ces TIL ont été transduits par le gène de l'IL-2 grâce à un vecteur rétroviral. Dans un protocole de phase I, de tels TIL-IL-2 ont été injectés dans des cavités pleurales de patients atteints de cancers bronchiques avancés avec épanchements pleuraux, et bien tolérés: sur 10 patients traités, l'épanchement pleural ne s'est pas reformé chez 6 patients pendant les 4 (ou > 4) semaines qui suivirent. Chez l'un d'entre eux, la masse tumorale primitive a également régressé [1]. Dans le but, principalement, d'augmenter leur potentiel antitumoral, le transfert du gène du TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) dans des TIL, bien que donnant une faible production de cytokines [2], a également été utilisé dans un protocole pour des cancers avancés: sur 12 patients enrôlés, un cas de rémission partielle a été rapporté [3]. L'emploi des TIL comme véhicule de gène thérapeutique est limité pour de multiples raisons: difficultés rencontrées lors de leur isolement et de leur expansion *in vitro*, comme leur perte de spécificité en raison de l'utilisation de doses importantes d'interleukine-2, et problématique de la faible expression du transgène dans ce type cellulaire.

L'immunothérapie génique active du cancer consiste à administrer des cellules génétiquement modifiées, autologues ou non, qui auront pour fonction de recruter et/ou d'induire *in vivo* des effecteurs immuns antitumoraux. Cette dernière approche a essentiellement recours à la manipulation génétique des cellules tumorales ou des cellules présentatrices d'antigènes, en particulier des cellules dendritiques. Elle nous semble actuellement la plus intéressante car elle permet une grande diversité stratégique. Dans cet article, nous développerons plus particulièrement les approches d'immunothérapie active qui incluent plus de 80% des protocoles d'immunothérapie génique du cancer.

Les principales caractéristiques des protocoles de thérapie génique sont

récapitulées dans les *Tableaux I à IV* (réalisés, à partir de la compilation des données présentées dans la banque *Wiley Genetic Medicine Clinical Trials Database*, <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>). Plus de 1 800 patients ont déjà été enrôlés dans 228 protocoles de thérapie génique du cancer, dont plus de la moitié se fondent sur des stratégies immunes (*Tableau I*). La cible principale est le mélanome malin (*Tableau II*), les rétrovirus sont les vecteurs les plus utilisés (*Tableau III*), et le gène préférentiellement transféré est celui de l'IL-2 (*Tableau IV*). De plus, la cellule génétiquement modifiée est la

cellule tumorale dans la majorité des cas. Bien que la majorité de ces protocoles ne soient que des protocoles pilotes ou de phases I et II, certains résultats cliniques sont disponibles et sont résumés dans le *Tableau V*.

### Antigènes cibles en immunothérapie génique du cancer

L'intervention d'une immunité cellulaire efficace est au cœur de l'immunothérapie du cancer et explique l'importance donnée à l'identification d'antigènes tumoraux, cibles potentielles de lymphocytes T cyto-

Tableau I THÉRAPIE GÉNIQUE DU CANCER		
Stratégie thérapeutique	Nombre de protocoles	Nombre de patients
immune	145	> 1271
non immune	78	> 512
non déterminé	5	> 18
total	228	> 1801

Tableau II CLASSIFICATION DES PROTOCOLES DE THÉRAPIE GÉNIQUE, EN FONCTION DU TYPE DE TUMEUR ET DE LA STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE IMMUNE VERSUS NON IMMUNE			
Types de tumeur	Immune	Non immune	Total
Mélanome	72	1	73
Cancer du sein	20	14	34
Cancer colorectal ou autre	28	3	31
Tumeurs cérébrales	6	23	29
Carcinome rénal	21	0	21
Lymphome non hodgkinien	15	6	21
Cancer de la prostate	10	7	17
Cancer ovarien	5	11	16
Cancer bronchique	10	4	14
Cancer de la tête et du cou	6	4	10
Leucémie	1	8	9
Hépatome et métastase Hépatique	1	5	6
Neuroblastome	5	0	5
Myélome multiple	0	3	3
Mésothéliome	1	2	3
Sarcome	2	0	2
Cancer du col	2	0	2
Cancer de la vessie	0	2	2
Germinome	0	1	1
Méningite carcinomateuse	0	1	1
Cancers divers avancés	11	4	15

Tableau III

## CLASSIFICATION DES PROTOCOLES DE THÉRAPIE GÉNÉRIQUE, EN FONCTION DU TYPE DE VECTEUR ET DE LA STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE IMMUNE VERSUS NON IMMUNE

Types de vecteur	Immune	Non immune	Total
<b>Viral</b>			
Rétrovirus	39	28	67
Adénovirus	15	23	38
Poxvirus	26	0	26
CPR*	0	23	23
Virus herpès	0	1	1
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>75</b>	<b>155</b>
<b>Non viral</b>			
Lipofection	52	2	54
ADN nu	3	3	6
Gene gun	4	0	4
Transfection	4	0	4
Électroporation	2	0	2
Transfert d'ARN	0	1	1
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>6</b>	<b>71</b>

\* CPR: cellules productrices de vecteurs rétroviraux.

toxiques spécifiques. Cette identification s'est faite dans des systèmes autologues dans lesquels les lymphocytes cytotoxiques (CTL) reconnaissent les peptides associés aux molécules de classe I du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Les antigènes définis ainsi au moyen d'outils cellulaires peuvent être classés en cinq groupes [4] en fonction de leur type d'expression tissulaire: (1) les antigènes exprimés uniquement par les cellules tumorales (et au niveau du testicule), mais retrouvés dans différents types histologiques de tumeur; (2) les antigènes de différenciation exprimés dans le tissu normal ou cancéreux; (3) les antigènes résultant de l'expression de gènes mutés (notamment des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur); (4) les antigènes dérivés de virus oncogènes exprimés par certaines tumeurs bien définies; (5) les antigènes ubiquitaires surexprimés dans certaines tumeurs et faiblement exprimés dans certains tissus normaux. Dans les protocoles cliniques, les principaux antigènes tumoraux ciblés sont: l'antigène spécifique de la prostate (PSA) (*m/s 1988, n° 1, p. 61*) dans le cancer prostatique, les antigènes MART-1 et gp100 dans le

mélanome, l'antigène carcinoembryonnaire dans le cancer colorectal, et les antigènes MAGE dans la majorité des types de tumeur solide.

Les essais d'immunisation fondés sur l'injection de lysats tumoraux ou de cellules tumorales, éventuellement génétiquement modifiées avec, par exemple, un gène de cytokine, présentent certains avantages, comme les possibilités d'induire des réponses immunes contre des antigènes multiples et de favoriser ces dernières *via* la stimulation de lymphocytes CD4<sup>+</sup> (*help*). Cependant, ces réponses sont difficilement caractérisables en raison du fait qu'elles sont dirigées contre un mélange d'antigènes mal ou non identifiés et posent des problèmes de reproductibilité. Le souci d'être plus précis, de pouvoir mieux étudier et contrôler la réponse immune induite, et le besoin de standardiser les préparations vaccinales ont incité à une meilleure définition des vaccins antitumoraux. Ce but peut être atteint notamment grâce à l'utilisation d'un nombre défini d'antigènes tumoraux, et à l'identification du (ou des) peptide(s) reconnu(s) pour un antigène donné. Plusieurs peptides ont ainsi pu être identifiés, notamment

pour les haplotypes les plus fréquents\*, ce qui a permis le développement de protocoles d'immunisation antitumorale fondés sur leur injection. Cette stratégie peptidique a le double inconvénient de ne s'adresser qu'aux patients possédant l'haplotype correspondant au(x) peptide(s) inclus dans le vaccin et de ne représenter qu'une partie de l'antigène. Cette limitation peut être dépassée en vaccinant avec l'antigène dans sa totalité, sous forme soit de protéine entière, soit d'ARN messager, soit du gène codant pour cet antigène.

L'injection directe d'ADN « nu » sous la peau ou dans le muscle, éventuellement en présence d'adjuvant, permet d'avoir une expression de tout l'antigène et offre l'intérêt d'éviter les problèmes liés aux réactions immunes antivectorielles. Cette approche de transfert de gène présente néanmoins l'inconvénient d'induire une expression très faible du transgène. Chez l'animal, ce type d'injection confère une protection antitumorale et induit une réponse immune humorale et cellulaire spécifique [5]. Elle ne provoque qu'une faible inflammation locale avec, comme conséquence, un modeste recrutement de cellules impliquées dans la présentation des antigènes codés par l'ADN injecté. Cependant, certaines séquences plasmidiques non codantes, enrichies en dinucléotides CpG non méthylés, semblent favoriser le développement d'une réponse immune de type cellulaire (type Th1) et pourraient permettre d'augmenter le pouvoir immunogène de l'injection d'ADN [6].

Une stratégie alternative est l'injection de gènes codant pour des antigènes tumoraux *via* l'utilisation de vecteurs viraux, tels que ceux dérivés de l'adénovirus ou du poxvirus. Dans un protocole de phase I, l'injection de vecteurs adénoviraux véhiculant les gènes *Mart-1* ou *gp100* à 54 patients a été bien tolérée, mais n'a pas été accompagnée d'immunisation efficace contre ces antigènes, peut-être en raison de la présence, avant traitement, d'une quantité élevée d'anticorps neutralisants dirigés contre des antigènes adénoviraux [7].

\* Voir glossaire, p. 643.

Tableau IV

## CLASSIFICATION DES PROTOCOLES D'IMMUNOTHÉRAPIE GÉNÉRIQUE DU CANCER PAR GÈNE THÉRAPEUTIQUE TRANSFÉRÉ

Gène	Protocoles	Patients
<b>Cytokines</b>		
IL-2	36	> 293
GM-CSF	10	> 115
IFN $\gamma$	5	> 95
IL-4	4	36
IL-12	4	> 32
TNF $\alpha$	2	24
IL-6 / sIL-6R	1	30
<b>HLA ou co-stimulateur</b>		
HLA-B7 / $\beta$ 2m	29	> 384
CD80 (B7-1)	4	65
HLA-A2 ou HLA-B13 ou H-2K(k)	2	19
<b>Combinés</b>		
IL-7 / IL-12 / GM-CSF	3	> 18
IL-12 / CD80 (B7-1)	3	ND
IL-2 / HLA-B7 / $\beta$ 2m	2	9
IL-2 / lymphotactine	2	ND
IL-2 / IL-7	1	17
IL-7 / TK / Hy	1	4
IL2 / IFN $\gamma$	1	0
IL-2 / GM-CSF	1	0
<b>Antigènes</b>		
MART-1	6	98
CEA	10	> 65
gp100	4	52
PSA	4	> 3
HPV	1	ND
Idiotype tumoral	1	ND
<b>Autres</b>		
Chimère du TcR	3	ND
Anti-idiotype spécifique	1	5
Anti-sens (anti-IGF-1)	1	1
Anti-sens (anti-TGF- $\beta$ 2)	1	0
sFv anti-erbB2	1	0
Entérotoxine B Staphylocoque	1	ND

### Transfert de gène dans des cellules tumorales ou fibroblastiques

L'injection de cellules tumorales génétiquement modifiées a pour but de détruire des cellules tumorales non génétiquement modifiées en induisant ou en stimulant une réponse immune antitumorale dirigée contre des antigènes présents à la surface de ces dernières. Cet objectif pourrait être atteint directement

en transformant les cellules tumorales en cellules présentatrices d'antigène ou, indirectement, en favorisant, soit la présentation d'antigènes tumoraux par des cellules présentatrices d'antigène, soit la réponse lymphocytaire effectrice. Le transfert de gène peut se faire, soit *in vivo* par injection du vecteur directement dans la tumeur, soit *ex vivo* par prélèvement des cellules tumorales qui sont d'abord cultivées *in vitro* puis traitées avec le vecteur, irradiées et ré-injectées chez le patient.

Les gènes de cytokine sont largement représentés dans ce type de transfert. Une revue exhaustive des résultats obtenus avec diverses cytokines dans les modèles animaux a été faite par Forni *et al.* [8]. Des modèles murins de thérapie génique utilisant le transfert, dans des cellules tumorales autologues, des gènes codant pour l'IL-2, le TNF $\alpha$ , l'IL-4, l'IL-7, le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), l'IFN $\gamma$  (interféron  $\gamma$ ) ou l'IL-12, ont montré que l'on peut induire des réponses immunes protectrices et thérapeutiques, avec des résultats variables selon le modèle tumoral, le gène de cytokine utilisé et le schéma vaccinal. Parmi tous ces gènes de cytokine, celui codant pour le GM-CSF s'est révélé comme un des plus performants dans l'induction d'une réponse immune thérapeutique [9]. Cette cytokine semble agir en recrutant des effecteurs immuns et en augmentant la présentation d'antigènes tumoraux.

Chez l'homme, la majorité des essais cliniques fondés sur le transfert de gènes de cytokines dans les cellules tumorales ont recours au gène de l'IL-2 (Tableau IV). Parmi les résultats connus, citons une étude portant sur 12 patients à un stade avancé de mélanome qui ont reçu par voie sous-cutanée (4 injections sur 2 mois) des cellules tumorales dérivées d'une lignée mélanomateuse transduite avec le gène de l'IL-2, exprimant par ailleurs les antigènes de différenciation MART-1, gp100 et tyrosinase. La régression de métastases cutanées a été observée chez trois patients, corrélée pour l'un d'entre eux à une augmentation de la fréquence des CTL spécifiques des antigènes du mélanocyte [10]. Dans une autre étude, 20 patients atteints de mélanome furent traités au moyen de cellules tumorales autologues transduites *ex vivo* avec un vecteur rétroviral véhiculant le gène de l'IFN $\gamma$ . La transduction des cellules tumorales a induit une augmentation de l'expression des molécules de classes I et II du CMH à leur surface. Des immunoglobulines (IgG) réactives contre le mélanome autologue et un mélanome allogénique ont été détectées chez 8 patients sur 13 ayant suivi le protocole d'immunisation dans son entièreté. Pour deux d'entre eux, on note la régression

**Tableau V**  
**RÉSULTATS CLINIQUES OBTENUS DANS LE CADRE DE PROTOCOLES**  
**D'IMMUNOTHÉRAPIE GÉNIQUE DU CANCER**

Gène transféré	Vecteur	Type de cancer	Réponse clinique	Remarques	Références
HLA-B7	Liposome	MEL	2/10 réponses de nodules injectés et de nodules à distance	Stimulation d'une réponse locale antitumorale facilitant la production de cellules effectrices	[13]
HLA-B7	Liposome	Métastase hépatique de CCR	6/15 réponses	Induction de CTL antitumoraux	[14]
HLA-B7	Liposome cationique	MEL	6/17 réponses partielles (au moins 25%) + 1/7 réponse complète (nodule unique injecté)		[15]
HLA-A2	Liposome cationique	CBNPC, CO, CC	2/8 réponses complètes, 4/8 réponses partielles	2 pts en RC ont des CTL antitumoraux 3-7 fois plus actifs	[16]
HLA-B13	Liposome cationique	CBNPC, CO, CC, MEL	1/6 réponse partielle		[16]
H-2K (k)	Liposome cationique	CBNPC, CO, CC, MEL	1/5 réponse partielle		[16]
IL-2	TIL, td rétro	CB	6/10 non-réaccumulation d'épanchement pleural (> 4 semaines) 1/10 régression de la tumeur primitive	Injection des TIL transduits dans la cavité pleurale	[1]
IL-2	MEL allo, td rétro	MEL	3/12 régressions de métastases cutanées	1/2 régression corrélée à l'induction de CTL	[10]
IL-2	Cellules Vero xéno transfectées	Tumeurs solides	3/9 régressions de la tumeur injectée 1/9 régression de métastase à distance (pendant > 12 mois) 4/9 maladies stabilisées (3, 7, 7+, 9 mois)	8/9 inductions d'infiltrat lymphocytaire	[20]
IL-2	Fibroblastes allo	MEL		2/2 inductions de CTL et de DTH	[19]
IL-4	MEL allo	MEL	1/6 régression métastatique		[3]
IL-12	MEL auto tf par <i>gene-gun</i>	MEL	0/6 régression, 3/6 stabilisations 1/6 réponse mineure (plusieurs mois)	2/6 inductions de CTL et de DTH	[22]
IL-12	Fibroblastes auto	MEL, CTC	1 régression du site injecté MEL 4 régressions de lésions à distance	Injection intratumorale	[21]
IFN $\gamma$	MEL auto td rétro	MEL	2/13 régressions d'une adénopathie (12, 24 mois) 2/13 régressions transitoires de nodules cutanés	8/13 réponses humorales augmentation CMH I et II sur cell td	[11]
TNF $\alpha$	TIL, td rétro	Tumeurs avancées	1/12 rémission partielle		[3]
GM-CSF	MEL, auto td rétro	MEL	1/21 réponse partielle, 1/21 réponse mixte 3/21 réponses mineures, (> 80%) 3/21 réponses complètes (36+, 36+, 20+)	11/16 destruction tumorale massive (> 80%) associée à réponse humorale et CTL antitumorale	[12]
MART-1 ou gp100	adéno	MEL	1/16 réponse complète (MART-1 seul, sans IL-2)	Injection directe à 54 patients, avec ou sans IL-2	[7]

*$\alpha$ FP:  $\alpha$ -foeto-protéine; adéno: vecteur adénoviral; auto: cellules autologues; CBNPC: cancer bronchique non à petites cellules; CC: cancer du col; CCR: cancer colorectal; CO: cancer de l'ovaire; CTL: lymphocytes T cytotoxiques; CTC: cancer de la tête et du cou; HEP: hépatome; MéI: mélanome; RC: réponse complète; rétro: vecteurs rétroviraux; tf: transfecté; td: transduit; xéno: cellules xénogéniques.*

d'une adénopathie suivie d'une rechute de la maladie 12 et 24 mois après la fin du protocole de vaccination. Deux patients sans réponse

humorale spécifique ont présenté une diminution transitoire de nodules sous-cutanés [11]. De même, la vaccination de patients atteints de

mélanome au moyen de cellules tumorales autologues transduites avec le gène du GM-CSF a permis de montrer, sur le plan histologique,

une destruction tumorale à 80 % au niveau de métastases pour 11 patients sur 16. Cet effet est corrélé à l'existence d'une réponse humorale et cytotoxique. Néanmoins, cliniquement, sur 21 patients évalués, les nombres de réponses partielles, mixtes, mineures et complètes furent respectivement 1, 1, 3, et 3. Parmi ces trois réponses complètes, associées à de la radiothérapie et de la chirurgie, le recul fut de 36+, 36+ et 20+ mois [12].

Nabel *et al.* ont étudié l'injection *in situ*, dans des lésions de mélanome, d'un complexe ADN-liposome dans lequel le plasmide code pour la molécule de classe I HLA-B7 et pour la  $\beta$ 2-microglobuline chez des patients HLA-B7(-) afin d'instaurer une allo-réaction à l'encontre des cellules tumorales. Une inhibition de la croissance locale de la tumeur est observée pour 2 patients sur 10 traités [13]. Cette stratégie a également été évaluée par injection directe dans des métastases hépatiques, chez des patients atteints de tumeur colo-rectale. L'expression du transgène a été démontrée, de même qu'une réponse cytotoxique. Des régressions tumorales ont été observées chez 6 patients traités sur un total de 15 [14]. Une étude semblable, également fondée sur le transfert direct du gène *HLA-B7* dans des métastases de mélanome, *via* un vecteur lipidique cationique, a permis de démontrer l'expression du transgène dans 97 % des échantillons étudiés, et une régression d'au moins 25 % chez 7 patients traités sur un total de 17 [15]. Une rémission complète a été observée chez un patient ayant une métastase unique. Des réponses partielles et complètes furent également obtenues avec d'autres allèles du CMH de classe I, allogéniques ou xénogéniques, comme cela est décrit dans le *Tableau V* [16].

Une autre façon de mettre à profit l'alloréactivité est d'injecter localement des cellules tumorales allogéniques modifiées avec un gène de cytokine. Cette stratégie a été choisie dans un protocole de transfert du gène de l'IL-4 chez des patients atteints de mélanome métastatique : sur 6 patients traités, 1 rémission métastatique est pour l'instant relatée [3].

Une autre approche est le transfert

du gène de molécules co-stimulatrices comme B7-1 ou B7-2 dans les cellules tumorales, en association ou non avec des gènes de cytokines. Ces molécules co-stimulatrices ne sont généralement pas exprimées sur les cellules tumorales. L'engagement du récepteur des lymphocytes T (TCR) en l'absence de signal co-stimulateur entraîne une anergie lymphocytaire vis-à-vis de l'antigène reconnu, voire l'apoptose du lymphocyte T. Faire exprimer ces molécules par les cellules tumorales elles-mêmes pourrait en faire des analogues de cellules présentatrices d'antigène, capables d'activer les lymphocytes si leurs molécules du CMH présentent effectivement des peptides tumoraux et si elles ne sécrètent pas par ailleurs des molécules immunosuppressives comme l'IL-10.

Parmi les autres stratégies étudiées, dans un modèle murin d'adénocarcinome, la transduction *in vivo* de cellules tumorales Fas(+) ou Fas(-) avec le gène *FasL* a permis d'entraîner, d'une part, l'apoptose des cellules tumorales Fas(+) avec régression tumorale et, d'autre part, une réaction inflammatoire locale ayant un effet antitumoral sur les cellules Fas(-) [17]. L'induction d'apoptose des cellules tumorales est une approche d'autant plus attrayante qu'il vient d'être montré que les cellules dendritiques humaines, au contact de cellules en apoptose, sont capables d'acquiescer et de présenter des antigènes issus des vésicules apoptotiques et, ainsi, de stimuler des lymphocytes T cytotoxiques, spécifiques de ces antigènes [18].

Les diverses approches de transfert génique dans des cellules tumorales sont illustrées dans la *figure 1*. Outre sa lourdeur, un transfert de gène *ex vivo* ne peut être réalisé chez tous les patients, pour des raisons d'accessibilité des cellules tumorales. Cette difficulté peut être contournée, soit par un transfert de gène *in vivo* (à l'aide de vecteurs dont la transduction est plus efficace et le titre plus élevé que ceux dérivés des rétrovirus murins, comme par exemple ceux dérivés de l'adénovirus ou éventuellement des virus adéno-associés [AAV]), soit par l'emploi d'autres cellules autologues comme les fibroblastes. Ces cellules peuvent être obtenues chez tous les patients et sont aisément transduc-

tibles, notamment par des vecteurs rétroviraux. Injectés au niveau de la tumeur, après avoir été génétiquement modifiés, ils peuvent induire une immunostimulation spécifique de manière plus efficace que le transfert direct de gène *in vivo* dans le site tumoral. Chez deux patients porteurs de mélanome, la co-injection de cellules tumorales autologues irradiées et de fibroblastes allogéniques transfectés par le gène de l'IL-2 a permis d'induire des CTL antitumoraux, ainsi qu'une réaction d'hypersensibilité retardée (DTH, *delayed-type hypersensitivity*) [19]. Parallèlement, chez 9 patients porteurs de tumeurs solides, l'injection de cellules xénogéniques Vero transfectées par le gène de l'IL-2 au sein du tissu tumoral a induit une régression de la lésion néoplasique injectée chez 3 patients. De plus, chez un patient porteur d'un sarcome, une régression de plus de 90 % d'une métastase à distance fut observée pendant plus de 12 mois. La maladie a été stabilisée chez 4 autres patients pendant 3, 7, 7+ et 9 mois [20].

Le transfert du gène de l'IL-12 dans des fibroblastes autologues qui sont injectés *in situ* dans la tumeur maligne a également été utilisé chez des patients à un stade avancé. Une régression tumorale a été obtenue au niveau du site d'injection chez un patient atteint de mélanome et au niveau d'un autre site chez quatre patients présentant un mélanome ou un cancer de la tête et du cou [21]. Sur 6 patients porteurs d'un mélanome métastatique, l'injection de cellules tumorales transfectées par le gène de l'IL-12 a induit une réponse mineure\* durant plusieurs mois, et trois stabilisations. Deux patients ont développé une réponse d'hypersensibilité retardée vis-à-vis des cellules tumorales autologues, et une importante infiltration par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> a été observée au niveau de métastases [22].

Le transfert d'un gène « suicide » dans une cellule tumorale a montré un effet antitumoral dépendant de la

\* On considère, en oncologie, divers types de réponses : stabilisation, réponse mineure, réponse partielle, réponse complète (définies par des pourcentages de régression), mais cela n'est pas absolu. Ici, à titre d'information, un patient eut une régression de métastases cutanées pendant plus de 3 mois.

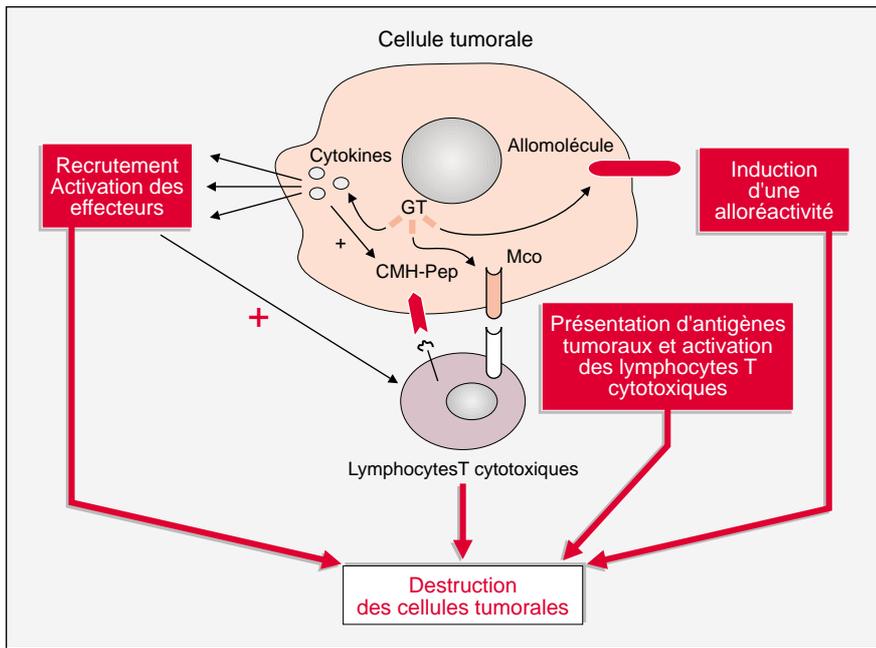


Figure 1. **Modification génétique des cellules tumorales.** Le transfert de gènes de cytokines (IL-2, GM-CSF, IL-12...) a pour but: (1) soit d'augmenter l'expression des molécules de classe I du CMH et, en conséquence, la présentation d'antigènes tumoraux (CMH-Pep) aux lymphocytes T cytotoxiques; (2) soit de recruter et/ou d'activer des effecteurs du système immunitaire tels que les lymphocytes, les monocytes, les cellules dendritiques qui vont eux-mêmes, en retour, pouvoir produire des cytokines et présenter des antigènes tumoraux, amplifiant ainsi la réponse immune. Le transfert simultané de molécules co-stimulatrices permet l'activation des lymphocytes T qui ont reconnu les peptides tumoraux associés aux molécules de classe I. Le transfert du gène d'une allomolécule induit une alloréaction vis-à-vis de la cellule tumorale. L'utilisation de cellules tumorales allogéniques exprimant des antigènes tumoraux est une autre stratégie visant à induire une réaction cellulaire antitumorale. GT: gène transféré; Mco: molécule co-stimulatrice.

réponse immune de l'hôte et, à ce titre, il peut être abordé dans cet article. Le gène transféré dans la cellule (le plus souvent celui codant pour la thymidine kinase du virus *herpes simplex* [HSVtk]) code pour une enzyme capable de transformer un précurseur non toxique (le ganciclovir) en un produit toxique (ganciclovir triphosphaté, dans le cas de HSVtk) pour la cellule. Cette thérapie s'est révélée efficace dans des modèles expérimentaux de gliome chez le rat, bien que de façon non constante [23, 24]. En outre, il a été observé que les cellules tumorales HSVtk- avoisinant les cellules HSVtk+ sont également tuées lors du traitement: il s'agit de l'effet bystander\*.

\* Les cellules tumorales transduites semblent capables de propager leur toxicité aux cellules tumorales voisines. Ce phénomène de toxicité de proximité a été décrit sous le terme anglais de bystander effect.

Initialement décrit *in vitro*, les mécanismes impliqués dans cet effet ont été attribués au passage de dérivés toxiques (phosphorylés) du ganciclovir d'une cellule à l'autre *via* des jonctions *gap*, ainsi qu'à la phagocytose de vésicules apoptotiques de cellules HSVtk+ par des cellules HSVtk-. *In vivo*, en revanche, cet effet semble essentiellement lié à la genèse d'une activité antitumorale d'origine immune. Cette hypothèse est notamment étayée par un modèle animal chez lequel seuls les animaux immunocompétents traités par le système du gène suicide présentent une régression tumorale [25]. Un effet *bystander* à distance est même décrit dans un protocole clinique au cours duquel on observe, chez des patients atteints de mélanome, une régression de métastases après un tel traitement [26]. Le transfert du gène HSVtk dans des cellules tumorales, couplé à

celui d'une cytokine comme l'IL-2, l'IFN $\gamma$ , ou le GM-CSF pourrait encore augmenter l'effet bénéfique observé [27, 28].

## Transfert de gène dans des cellules présentatrices d'antigène

Les cellules présentatrices d'antigène ont pour principale fonction de capter des antigènes et de les présenter aux cellules effectrices du système immunitaire. Elles ont donc un rôle initiateur essentiel de l'immunité acquise. Parmi elles, les cellules dendritiques suscitent beaucoup d'intérêt de par leur capacité à activer des lymphocytes T naïfs. Il est maintenant possible d'obtenir *ex vivo* des cellules dendritiques en grand nombre, à partir de la fraction adhérente des leucocytes mononucléés circulants, cultivée en présence de GM-CSF et d'IL-4 (ou d'IL-13) pendant 7 jours. Chez l'homme, l'injection de cellules dendritiques pulsées avec des peptides dérivés d'antigènes tumoraux induit une réponse antitumorale: (1) diminution du taux sanguin du PSA dans les cancers prostatiques [29]; (2) réponses complètes ou partielles dans les mélanomes [30]. Ces premières études utilisant des cellules dendritiques chargées avec des peptides confirme leur potentiel dans l'immunothérapie du cancer.

L'utilisation d'ARN pour pulser des cellules dendritiques s'est révélée fort efficace pour induire une réponse immune antitumorale chez l'animal [31]. Les cellules dendritiques peuvent également être la cible d'un transfert de gène codant soit pour des cytokines, soit pour des antigènes tumoraux (figure 2). Par rapport à l'utilisation de peptides, cette stratégie devrait présenter l'avantage d'induire une expression plus prolongée de peptides antigéniques, de lever la restriction du CMH, de ne pas nécessiter la détermination préalable de la séquence des peptides antigéniques et de cibler plus efficacement le CMH de classe I tout en gardant la possibilité de présenter des antigènes *via* le CMH de classe II (*help* spécifique). Pour l'instant, il n'y a pas de données cliniques concernant l'utilisation de cellules dendritiques génétiquement modifiées, ce

qui peut s'expliquer par la difficulté de transfecter ou de transduire les cellules dendritiques dérivées des cellules mononucléées du sang avec les vecteurs rétroviraux utilisés initialement. A présent, les meilleurs résultats obtenus font état d'une efficacité de transduction des cellules dendritiques allant jusqu'à 50 % à 70 %, grâce surtout à des vecteurs dérivés d'adénovirus [32].

### Autres stratégies

De nombreuses autres stratégies sont en voie d'élaboration dans plusieurs laboratoires, et ne peuvent être revues ici *in extenso*. Le transfert du gène « suicide » *HSVtk* dans des lym-

phocytes du donneur après allogreffe de moelle est rapporté pour illustrer la richesse de ces stratégies. Ce transfert est réalisé dans le cadre de l'immunothérapie d'hémopathies malignes par greffe de moelle allogénique. L'objectif est d'éliminer *in vivo* des lymphocytes du donneur en cas d'apparition d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVH, *graft versus host*), après injection de ces cellules dans le but de détruire les cellules leucémiques du receveur. Grâce à l'utilisation d'un récepteur tronqué du NGF (*nerve growth factor*), C. Bordignon *et al.* ont pu sélectionner une population de lymphocytes transduits à hauteur de 95-99 % [33]. Après injection de ces cellules, sur les 8 pre-

miers patients traités, une réaction du greffon contre les cellules leucémiques (GVL, *graft versus leukemia*) fut démontrée chez 5 patients, parmi lesquels 3 ont présentée une réponse complète. Une réaction de GVH s'est développée chez 3 patients. Après administration de ganciclovir, chez deux de ces patients, le nombre de ces cellules a chuté à un taux indétectable par PCR (*polymerase chain reaction*), ce qui s'est accompagné d'une régression totale de la GVH. Chez le troisième, la réponse a été partielle. Les auteurs soulignent le fait qu'une telle régression de GVH, obtenue après transfert du gène *HSVtk* et traitement par le ganciclovir, n'a jamais été observée spontanément dans une cohorte de 258 patients traités dans le cadre d'une étude internationale.

### Bilan et perspectives

Au mois de juin 1996, 376 patients avaient été enrôlés dans 60 protocoles d'immunothérapie génique du cancer et des réponses complètes ou partielles étaient décrites pour 15 patients sur 237 [3]. En janvier 1999, plus de 1800 patients ont été inclus dans 228 protocoles de thérapie génique du cancer. Les effets bénéfiques observés dans ces protocoles restent néanmoins modestes et, en tout cas, inférieurs aux espoirs qu'entretenaient certains. De ces résultats est née une vague médiatique négative vis-à-vis de la thérapie génique, qui a suivi de près une première vague positive, qui avait prévu, elle, un effet bénéfique tel qu'il allait bouleverser les attitudes thérapeutiques standards. Ces surenchères sont extrêmement nocives à un domaine qui n'a encore fait que ses premiers pas. L'immunothérapie génique du cancer est le fruit de progrès extrêmement importants situés à la croisée de l'oncologie moléculaire, de l'immunologie et de la génétique moderne. Jamais la recherche fondamentale n'a été aussi proche de la clinique. Les vecteurs utilisés pour transférer les gènes, qu'ils soient dérivés de virus, ou non, constituent un des facteurs-clés dans le succès de la thérapie génique. Ils sont le centre d'une recherche intense, qui peut les façonner à souhait, en modifiant leur composition, leur séquence et, en

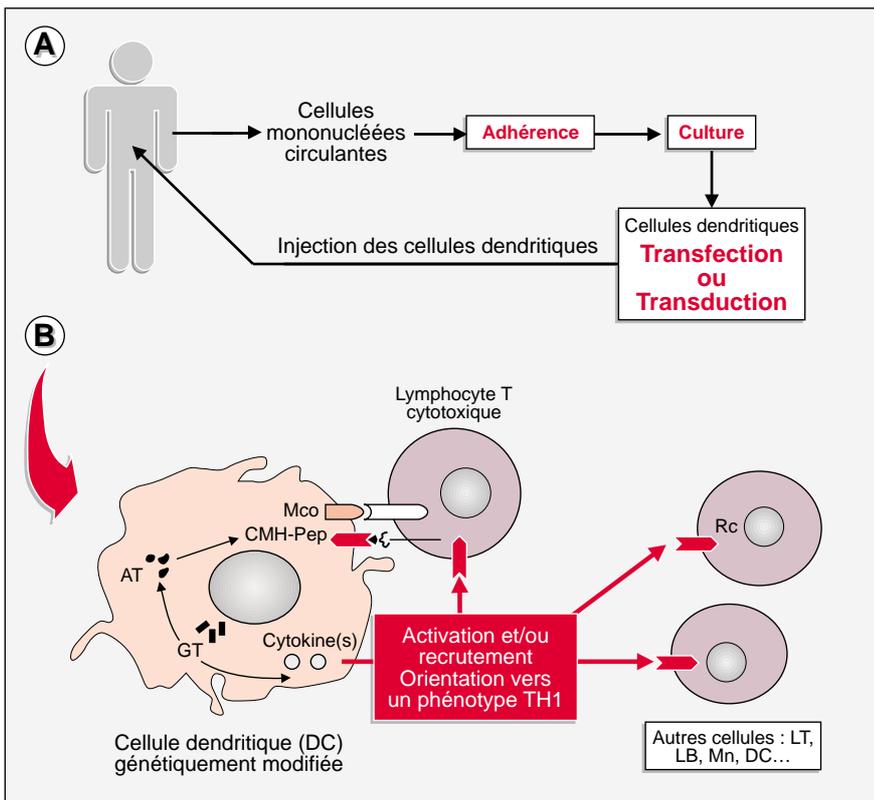


Figure 2. **Utilisation de cellules dendritiques génétiquement modifiées.** A. Les cellules mononucléées circulantes du patient sont isolées et la fraction adhérente est cultivée pendant 7 jours *in vitro* en présence d'IL-4 (interleukine-4) et de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) en milieu synthétique. Les cellules dendritiques ainsi produites sont alors transfectées ou transduites avec le (ou les) gène(s) thérapeutique(s) puis injectées au patient. B. L'introduction de gènes d'antigènes tumoraux permettra la présentation de peptides tumoraux par ces cellules qui sont capables de stimuler des lymphocytes T naïfs. Le transfert de gènes de cytokines vise à amplifier la réponse induite ou à l'orienter vers un phénotype antitumoral. AT: antigènes tumoraux; GT: gènes transférés; CMH-Pep: molécule de classe I du CMH présentant un peptide tumoral; Mco: molécule co-stimulatrice; Rc: récepteur cytokinique; LT: lymphocyte T; LB: lymphocyte B; Mn: monocyte.

particulier, en incorporant les caractéristiques de tel ou tel virus en fonction du but recherché. Ces modifications peuvent avoir comme objectif, soit de cibler l'expression du transgène au niveau de certains tissus en incorporant des séquences spécifiques régulatrices de l'expression ou en modifiant leur enveloppe, soit de contrôler la réplication du transgène, ou la potentielle propagation d'un vecteur viral. Cette recherche doit s'accompagner d'une recherche clinique de qualité, qui doit essayer de répondre à des questions pertinentes, qu'elles soient de nature biologique ou clinique. Dans ce contexte, il est important de tenir compte des spécificités propres aux protocoles de traitement biologique du cancer, en particulier d'immunothérapie, et donc de ne pas simplement transposer toute la « machinerie » des protocoles de chimiothérapie, notamment en ce qui concerne les critères stricts associés aux protocoles de phases I et II, ou le type de patients à inclure.

A l'exception d'un seul protocole de phase III, tous ces essais sont des protocoles pilotes, de phases I ou II. Des réponses biologiques et cliniques ont été décrites (résumées dans le Tableau V), mais le nombre relativement faible de patients enrôlés dans chacun de ces protocoles, et la grande diversité des stratégies étudiées, rendent une évaluation globale difficile. L'existence de ces réponses montre que ces traitements peuvent induire un effet anti-tumoral, ne serait-ce même que transitoire. Ces résultats, obtenus dans le cadre d'essais cliniques débutés il y a moins de 10 ans, restent donc encourageants si l'on tient compte de la complexité biologique des cancers et de la réponse immune qui y est associée, et du fait que les patients enrôlés ont généralement une masse tumorale importante et un système immunitaire déficitaire. L'immunothérapie génique pourrait se montrer plus efficace chez des patients à fort risque de rechute après traitement à visée curative, ou porteurs d'une masse tumorale réduite, en particulier en traitement adjuvant.

A ce jour, les protocoles cliniques utilisent des vecteurs viraux dans près de 70 % des cas et se caractérisent par une absence de toxicité clinique majeure. Les effets secondaires

décrits, liés au transfert de gène, se limitent à une réaction locale parfois douloureuse au site d'injection et à de la fièvre (surtout après injection de vecteurs adénoviraux). Cependant, il faut rester prudent quant au suivi à plus long terme, notamment en ce qui concerne les risques de mutagenèse d'insertion avec l'emploi de vecteurs rétroviraux (risque minime étant donné l'absence de virus sauvage, et *a priori* moindre que celui associé à l'utilisation de molécules cytotoxiques mutagènes). D'autres effets secondaires peuvent apparaître, mais sont plus la conséquence de l'expression du transgène, comme par exemple des réactions inflammatoires induites par certaines cytokines codées par les transgènes, ou des fonctions des cellules utilisées, comme par exemple les risques d'induction d'auto-immunité avec les cellules dendritiques.

L'immunothérapie génique du cancer repose actuellement sur des protocoles de transfert de gène dans les cellules tumorales ou fibroblastiques. Dans ce cadre, le consensus est acquis sur la nécessité d'améliorer le transfert de gène *in vivo* dans les tumeurs. Des stratégies visant à cibler les vecteurs vers certains types cellulaires et à augmenter la spécificité d'expression du transgène sont également élaborées. Les approches cherchant à augmenter l'immunogénicité tumorale devraient être associées à une neutralisation des effets immunosuppresseurs de la tumeur. La variabilité antigénique tumorale reste un écueil important et implique que l'immunothérapie du cancer cible d'emblée plusieurs antigènes tumoraux, ou soit utilisée, peut-être en alternance, dans d'autres thérapeutiques anticancéreuses comme la chimiothérapie ou des traitements anti-angiogéniques. L'emploi des cellules dendritiques reste cependant une perspective majeure du fait de leur propriétés en tant que cellules présentatrices d'antigène. La modification génétique des cellules dendritiques avec des gènes de cytokines et/ou d'antigènes tumoraux pourrait permettre d'orienter la réponse immune antitumorale vers un phénotype Th1. Des questions telles que la voie et le site d'injection, la capacité des cellules dendritiques humaines de migrer vers les organes lym-

phoïdes périphériques, la quantité de cellules à injecter et le nombre d'injections chez l'homme sont autant de questions qui restent encore sans réponse ■

\* GLOSSAIRE \*

**Mécanismes d'échappement :** la variabilité naturelle des antigènes tumoraux se traduit par des différences dans leur expression au niveau de la tumeur primitive et des métastases. Au cours des protocoles de vaccination, cette variabilité peut conduire à la sélection de cellules tumorales n'exprimant pas l'antigène vaccinal. Pour être efficaces, ces protocoles devraient donc cibler plus d'un antigène. La faible immunogénicité tumorale peut résulter d'une diminution, voire d'une perte de l'expression des antigènes tumoraux, ou d'une altération qualitative ou quantitative, soit des protéines intervenant dans le traitement intracellulaire des antigènes, soit des molécules du CMH nécessaires à la présentation des peptides à la surface cellulaire. La tumeur peut aussi agir par diverses voies sur les effecteurs du système immunitaire, comme par exemple par sécrétion de substances inhibitrices, par induction de cellules suppressives, par expression membranaire de molécules inhibitrices, ou par induction d'apoptose.

**Haplotypes :** chaque peptide antigénique est présenté par une molécule bien définie du CMH, codée par un des allèles de ces gènes du CMH extrêmement polymorphes. Alors que les efforts se sont concentrés dans un premier temps sur l'identification de peptides présentés par des molécules du CMH de classe I (reconnus par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>), des travaux plus récents identifient des peptides présentés par des molécules du CMH de classe II (reconnus par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) et en principe capables de fournir une « aide » (help) spécifique lors de l'induction de réponses immunes cytotoxiques. Plusieurs peptides ont ainsi pu être identifiés, notamment pour les allèles du CMH de classe I, les plus fréquents, comme par exemple les allèles A1, A2 et B44 (fréquences respectives de 26 %, 49 % et 24 % dans la population) pour les gènes Mage-1 ou Mage-3.

## RÉFÉRENCES

1. Tan Y, Xu M, Wang W, *et al.* IL-2 gene therapy of advanced lung cancer patients. *Anticancer Res* 1996; 16: 1993-8.
2. Rosenberg SA. Immunotherapy and gene therapy of cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 5074-9.
3. Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 21-39.
4. Van den Eynde BJ, Van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 684-93.
5. Irvine KR, Rao JB, Rosenberg SA, Restifo NP. Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases. *J Immunol* 1996; 156: 238-45.
6. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, *et al.* Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 1997; 3: 849-54.
7. Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, *et al.* Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1894-900.
8. Forni G, Cavallo F, Consalvo M, *et al.* Molecular approaches to cancer immunotherapy. *Cytokines Mol Ther* 1995; 1: 225-48.
9. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3539-43.
10. Arienti F, Sule SJ, Belli F, *et al.* Limited antitumor T cell response in melanoma patients vaccinated with interleukin-2 gene-transduced allogeneic melanoma cells. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1955-63.
11. Abdel WZ, Weltz C, Hester D, *et al.* A phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gamma gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer* 1997; 80: 401-12.
12. Soiffer R, Lynch T, Mihm M, *et al.* Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13141-6.
13. Nabel GJ, Gordon D, Bishop DK, *et al.* Immune response in human melanoma after transfer of an allogeneic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15388-93.
14. Rubin J, Charboneau JW, Reading C, Kovach JS. Phase I study of immunotherapy of hepatic metastases of colorectal carcinoma by direct gene transfer. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 1385-99.
15. Stopeck AT, Hersh EM, Akporiaye ET, *et al.* Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 341-9.
16. Hui KM, Ang PT, Huang L, Tay SK. Phase I study of immunotherapy of cutaneous metastases of human carcinoma using allogeneic and xenogeneic MHC DNA-liposome complexes. *Gene Ther* 1997; 4: 783-90.
17. Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13862-7.
18. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I restricted CTLs. *Nature* 1998; 392: 86-9.
19. Mackensen A, Veelken H, Lahn M, *et al.* Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by immunization with autologous tumor cells and interleukin-2 gene transfected fibroblasts. *J Mol Med* 1997; 75: 290-6.
20. Jantschkeff P, Bongartz G, Dietrich PY, *et al.* Phase I study of cytokine-transfected xenogeneic cells (Vero-IL-2) in patients with metastatic solid tumors. *J Mol Med* 1997; 75: B31.
21. Lotze MT, Zitvogel L, Campbell R, *et al.* Cytokine gene therapy of cancer using interleukin-12: murine and clinical trials. *Ann NY Acad Sci* 1996; 795: 440-54.
22. Sun Y, Jurgovsky K, Moller P, *et al.* Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Gene Ther* 1998; 5: 481-90.
23. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; 256: 1550-2.
24. Cool V, Pirote B, Gerard C, *et al.* Curative potential of herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in rats with 9L gliosarcoma. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 627-35.
25. Vile RG, Nelson JA, Castleden S, Chong H, Hart IR. Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component. *Cancer Res* 1994; 54: 6228-34.
26. Klatzmann D, Cherin P, Bensimon G, Boyer O, Coutellier A, Charlotte F, Boccaccio C, Salzmann JL, Herson S. A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase «suicide» gene therapy for metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2585-94.
27. Santodonato L, D'Agostino G, Santini SM, *et al.* Local and systemic antitumor response after combined therapy of mouse metastatic tumors with tumor cells expressing IFN-alpha and HSVtk: perspectives for the generation of cancer vaccines. *Gene Ther* 1997; 4: 1246-55.
28. Paillard F. Cancer gene therapy annual conference 1997: trends and news. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 283-6.
29. Murphy G, Tjoa B, Ragde H, Kenny G, Boynton A. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 1996; 29: 371-80.
30. Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, *et al.* Vaccination of melanoma patients with peptide - or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4: 328-32.
31. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1996; 184: 465-72.
32. Westermann J, Aicher A, Pezzutto A. Dendritic cells for somatic gene therapy: recent results. *Cancer Res* 1998; 144: 70-7.
33. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, *et al.* HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 1997; 276: 1719-24.

## Summary

### Gene immunotherapy of cancer: overview and perspectives

New biological cancer treatments are based on specific immunotherapy including cell and gene therapies. Although attempts are made to develop adoptive immunotherapy of cancer, through for example the genetic modification of tumor infiltrating lymphocytes, the major hopes are located in the active immunotherapy of cancer, also designated «vaccine» strategies. More than 1 800 patients have been included in 228 clinical trials based on gene therapy of cancer, with more than half based on immune strategies. The major target of these immunotherapeutic trials are patients with melanoma, and viral vectors have been used in more than 50 % of them. The therapeutic strategies are based on the transfer of genes such as those coding for cytokines (mainly interleukin-2), HLA allo-molecules, costimulatory molecules, or antigens, used either alone or in combination. These transfers have been performed *ex vivo*, mostly in autologous or allogeneic tumor cells, but also in fibroblasts or lymphocytes, and also *in vivo*, by direct injection of the vectors intratumorally or subcutaneously. Other strategies are developed, as, for example, the successful transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in allogeneic lymphocytes to control graft-versus-host disease (GVHD) after injection of these cells for immunotherapy of patients with leukemia, in order to induce a graft versus leukemia reaction (GVL). Some clinical and biological responses have been reported. These first results are very encouraging for a field which is only in its infancy. Never molecular basic and clinical researches have been so close. Major efforts have to be spent not only on basic research, but also in clinical research, with the development of high quality clinical trials. that because they have their own requirements, should not be designed as chemotherapeutic trials.