

Transfert de gènes par adénovirus de grande capacité

Les principaux défauts de l'adénovirus en tant que vecteur de thérapie génique sont sa capacité limitée d'introduction d'ADN exogène et, surtout, sa propension à déclencher chez l'hôte une forte réaction immunitaire, tant humorale que cellulaire (*m/s* n° 10, vol. 11, p. 1371), due à l'expression résiduelle de protéines virales. Les vecteurs de deuxième génération ont été conçus pour réduire cette réponse immune, soit en réexprimant certaines protéines de la région E3 de l'adénovirus comme la protéine gp19K, connue pour s'associer à des antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité et diminuer leur expression à la surface cellulaire [1, 2], soit en mutant un gène de la région E2, ce qui inhibe l'expression des gènes tardifs [3, 4]. Les vecteurs de troisième génération présentent une délétion de certains cadres de lecture ouverts de la région E4 [5, 6]. Si ces vecteurs augmentent significativement la durée d'expression du transgène et réduisent la réponse inflammatoire, ils ne sont néanmoins pas capables d'annihiler la réponse immune. Plus récemment, des vecteurs de quatrième génération quasiment dépourvus de toute séquence codante ont été élaborés, appelés *gutless*. La fabrication de ces vecteurs dépend d'un virus auxiliaire (*helper*) capable de compléter en *trans* les fonctions protéiques indispensables à l'empaquetage et à la réplication du virus thérapeutique. La grande difficulté était alors de produire, à des titres très élevés, le virus d'intérêt et de se débarrasser du virus auxiliaire dans les préparations finales. L'utilisation de la recombinase Cre [7] a permis d'établir un système pouvant produire des vecteurs à des titres élevés et comprenant une très faible quantité de virus auxiliaire contaminant [8]. Dans ce système, en effet, les séquences d'empaquetage du virus auxiliaire sont encadrées par des sites *loxP* et les deux vecteurs adénoviraux

(*helper* et thérapeutique) sont introduits dans des cellules 293 synthétisant la recombinase Cre (*figure 1*). En utilisant ce type d'approche, une équipe américano-canadienne a pu montrer l'expression appropriée et durable *in vivo* d'un fragment de 28 kb contenant le locus $\alpha 1$ -antitrypsine humaine (les deux promoteurs, les exons, les introns assortis du signal de polyadénylation) [9]. Cette expression a été comparée à l'injection intraveineuse équivalente d'un vecteur adénoviral de première génération portant l'ADNc du même gène sous la direction du promoteur d'un

gène d'expression ubiquitaire, celui de la phosphoglycérate-kinase. Alors que l'expression du transgène porté par le vecteur de première génération n'atteint plus que 10 % de sa valeur maximale 10 mois après l'injection, celle du vecteur de grande capacité reste stable et 25 fois plus importante à la même période. Aucune anomalie histopathologique n'est relevée avec le nouveau vecteur, contrairement au vecteur de première génération qui produit des lésions hépatiques déjà fréquemment rapportées dans la littérature. Point étonnant, cependant, en réitérant

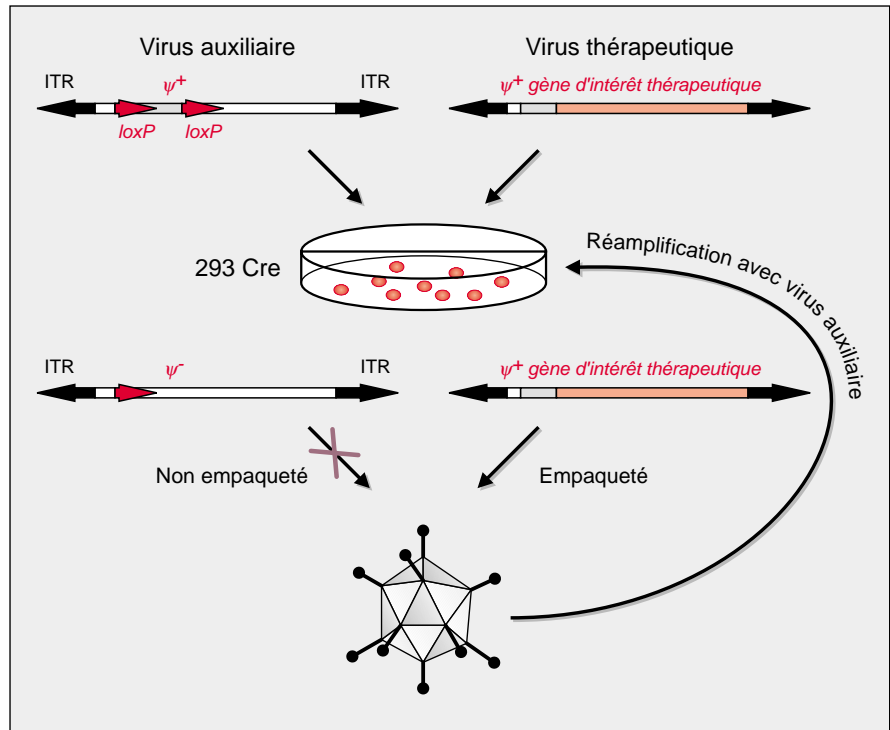


Figure 1. **Transfert de gènes par adénovirus de grande capacité.** La région nécessaire à l'empaquetage du virus auxiliaire est flanquée de deux séquences *loxP* (flèches rouges). L'ADN du virus thérapeutique porte les répétitions terminales inversées (ITR), les séquences d'empaquetage (ψ) et le gène d'intérêt thérapeutique, l'ensemble de ces séquences atteignant la taille habituelle du génome adénoviral. Ces deux séquences sont introduites dans des cellules 293 exprimant la recombinase Cre. Seul le gène d'intérêt thérapeutique pourra être empaqueté et produit dans le surnageant cellulaire. L'augmentation du nombre de passages de ce virus avec le virus auxiliaire permettra d'augmenter le titre du stock viral.

l'expérience dans une lignée murine immunodéficiente (lignée *Rag-1*), les auteurs ont obtenu une chronologie d'expression tout à fait comparable à celle des souris immunocompétentes avec, toutefois, un niveau d'expression supérieur. Dans ce cas, l'analyse des foies des souris ayant reçu l'adénovirus de première génération révèle une réponse biphasique débutant par une prolifération hépatocytaire à 3 jours, une morphologie normale à 2 semaines et une atteinte équivalente à celle des souris immunocompétentes à 6 et 12 semaines. Il semble donc qu'un autre mécanisme que la réponse immune cytotoxique puisse rendre compte de l'atteinte hépatique et de la chute de l'expression du transgène au cours du temps par les vecteurs classiques. Il existe certainement au moins un effet cytotoxique direct des protéines virales à la dose injectée de 2.10^{10} pfu, effet dont est en tout cas dépourvu le vecteur à grande capacité qui a, décidé-

ment, toutes les qualités requises : titres produits élevés, faible toxicité, persistance à long terme du transgène qui est alors exprimé sous la dépendance de son promoteur naturel! Néanmoins, la présence estimée à 0,1% du titre infectieux de virus *helper* dans la préparation du stock adénoviral sera probablement jugée encore trop élevée pour donner à ce type de vecteur le label des vecteurs d'essai clinique.

H.G.

1. Lee MG, Abina MA, Haddada H, Perricaudet M. The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1-, E3-adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector. *Gene Ther* 1995; 2: 256-62.
2. Sester M, Burgert H. Conserved cysteine residues within the E3/19K protein of adenovirus type 2 are essential for binding to major histocompatibility complex antigens. *J Virol* 1994; 68: 5423-32.
3. Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Gonczol E, Engelhardt JF, Wilson JM. Inactivation of E2A in recombinant adenoviruses improves the prospect

- for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; 7: 362-9.
4. Engelhardt JF, Ye X, Doranz B, Wilson J. Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6196-200.
 5. Armentano D, Sookdeo CC, Hehir KM, Gregory RJ, Saint George JA, Prince GA, Wadsworth SC, Smith AE. Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing E4 deletion. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1343-53.
 6. Krougliak V, Graham FL. Development of cell lines capable of complementing E1, E4 and protein IX defective adenovirus type 5 mutants. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1575-86.
 7. Viville S. Recombinaison homologue: nouveaux vecteurs, nouvelles perspectives. *Med Sci* 1995; 11: 735-46.
 8. Parks RJ, Chen L, Anton M, Sankar U, Rudnicki MA, Graham FL. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13565-70.
 9. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved *in vivo* gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet* 1998; 18: 180-3.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Les progrès dans la libération prolongée de protéines en thérapeutique.** De nombreuses protéines font actuellement partie de l'arsenal pharmacologique : anticorps monoclonaux, facteurs de croissance, cytokines, récepteurs d'hormones... Et ce nombre ne peut que croître avec le développement des connaissances physiopathologiques. Or, en thérapeutique, l'administration de protéines pose un problème difficile. Elles ne sont, souvent, assimilables ni par voie digestive, ni par voie transdermique. La perfusion, justifiée pour un usage épisodique, est une astreinte non acceptée de façon régulière; des injections répétées sont également astreignantes; la destruction rapide dans l'organisme de produits dont la demi-vie est brève *in vivo*, et qui sont souvent chimiquement instables, exige en outre une dose cumulative trop élevée, avec des pics potentiellement toxiques. C'est dire l'intérêt que présenteraient des méthodes de libération prolongée, dont des chercheurs américains,

appartenant aux groupes Alkermes et Amgen, rapportent les développements [1]. Le problème est toujours de maintenir l'intégrité de la protéine pendant son encapsulation dans les co-polymères biodégradables, pendant son stockage, et après son administration. Une série de procédés sont en cours de réalisation. Plutôt que par des systèmes d'émulsion, la meilleure intégrité de la protéine semble atteinte en milieu solide anhydre, après atomisation et lyophilisation. A la libération, la stabilité semble liée au maintien du pH aux environs de 6, pendant la dégradation du polymère et même avant la lyophilisation pour éviter l'agrégation de la protéine et respecter sa stéréochimie. Des traces de Cu^{2+} , d'antioxydants, de chélateurs seraient protectrices. Quels sont les avantages de ces techniques difficiles, et encore en cours d'élaboration? Des essais faits sur le singe rhésus avec des protéines déjà utilisées en thérapeutique, interféron et hormone de croissance, en montrent au moins

deux. Elles permettent, par injection mensuelle et non plus quotidienne, le maintien permanent de la concentration dans la fenêtre thérapeutique, ni trop, ni trop peu. Mais elles permettent aussi une réduction de la dose cumulative d'environ quatre fois: on le vérifie, par exemple, dans le cas de l'hormone de croissance, en mesurant les quantités qui maintiennent l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) au taux désiré de 5ng/ml [2]. L'intérêt est donc évident quand il s'agit de produits potentiellement toxiques, et/ou extrêmement coûteux. Ces techniques, qui miment la libération naturelle, seraient particulièrement utiles quand la demi-vie d'un produit est très courte, qu'il présente une toxicité systémique, ou qu'il est difficile de le diriger vers sa cible, surtout si une administration *per os* s'avérait efficace.

- [1. Putney SD, Burke PA. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 153-7.]
 [2. Johnson OFL, et al. *Nat Med* 1996; 2: 795-9.]