

## Essais cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose : état des lieux et perspectives

Andrea Pavirani  
Étienne Régulier  
Gabriel Bellon  
Majid Mehtali

La caractérisation du gène *CFTR* et la démonstration *in vitro* que le transfert du gène *CFTR* normal dans des cellules issues de patients atteints de mucoviscidose corrige les anomalies de transport ionique ont encouragé de nombreuses équipes à envisager la thérapie génique comme une voie thérapeutique permettant de s'attaquer à la cause de la maladie. Vingt-six protocoles cliniques ont été à ce jour mis en œuvre dans le monde. Ces protocoles visent à évaluer, soit un mode d'administration particulier du vecteur de transfert de gène, soit un vecteur bien défini. Aujourd'hui, une nouvelle génération de vecteurs moins toxiques et permettant une bonne persistance *in vivo* de l'expression du transgène est disponible. De la même manière, de nouvelles molécules polycationiques ont été récemment développées et sont actuellement en évaluation préclinique. L'avenir de la thérapie génique de la mucoviscidose dépendra du succès de ces développements techniques, mais également de la meilleure maîtrise des méthodologies d'analyse des paramètres électrophysiologiques pulmonaires.

### ADRESSES

G. Bellon : médecin des hôpitaux, professeur des universités. Unité de pneumologie-allergologie-mucoviscidose, Service de pédiatrie, Centre hospitalier Lyon Sud, 69495 Pierre-Bénite Cedex, France. A. Pavirani : directeur scientifique adjoint. E. Régulier : boursier CIFRE. M. Mehtali : chef du département de thérapie génique. Transgène SA, 11, rue de Molsheim, 67082 Strasbourg Cedex, France.

**L**a mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente chez les individus d'origine européenne, affectant en moyenne un nouveau-né sur 2500 [1]. Les manifestations cliniques de la maladie sont dominées par l'atteinte bronchopulmonaire, responsable de plus de 95 % des décès, les autres localisations de la maladie étant le pancréas, l'intestin, le foie, l'appareil génital et les glandes sudoripares. Les manifestations pulmonaires résultent essen-

tiellement d'une accumulation d'un mucus épais difficile à expulser. L'encombrement des bronches et des bronchioles diminue les capacités respiratoires des personnes atteintes et favorise l'infection bactérienne des voies respiratoires. L'incapacité des patients à éliminer ces bactéries piégées dans le mucus entraîne une réponse inflammatoire chronique. La conséquence d'une telle inflammation se manifeste par une destruction progressive et irréversible du tissu pulmonaire, l'ADN géno-

mique libéré par les bactéries et les cellules lysées contribuant également à l'épaississement du mucus et à la progression de la maladie.

Le gène dont le déficit est responsable de la maladie a été identifié dès 1989 [2, 3]. La protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (figure 1) codée par ce gène a été caractérisée comme ayant, entre autres, un rôle de canal pour l'ion chlore (Cl<sup>-</sup>) dans les cellules épithéliales [4]. Une analyse génétique détaillée a permis de révéler que la majorité des altérations du gène CFTR consiste en une délétion d'un unique acide aminé, une phénylalanine, localisée en position 508 sur le premier domaine de fixation à l'ATP de la protéine CFTR [5]. La protéine mutée ainsi produite n'est plus capable de régler correctement le transport des ions Cl<sup>-</sup> après stimulation par l'AMPc, ce qui a pour conséquence une altération du transport cellulaire des molécules d'H<sub>2</sub>O et des ions sodium (Na<sup>+</sup>) [4] et favorise une accumulation de mucus dans les voies respiratoires. Bien que l'amélioration des traitements conventionnels, et surtout une bien meilleure prise en charge des patients, aient permis lors de cette dernière décen-

nie d'augmenter de manière significative l'espérance de vie des malades, la mucoviscidose reste malheureusement une maladie contre laquelle aucun traitement définitif n'est encore disponible. La survie médiane des malades est ainsi aujourd'hui voisine de 30 ans.

La caractérisation du gène CFTR, et la démonstration *in vitro* que le transfert du gène CFTR normal dans des cellules issues de patients atteints de mucoviscidose corrige les anomalies de transport ionique [6] ont encouragé de nombreuses équipes à envisager la thérapie génique comme une voie thérapeutique permettant de s'attaquer à la cause de la maladie, et non plus à ses seules conséquences [7, 8]. Les poumons constituent la cible principale de tels traitements par thérapie génique étant donné que les anomalies digestives sont moins graves et plus facilement maîtrisées par les traitements symptomatiques. Par ailleurs, une modification génétique de toutes les cellules pulmonaires ne devrait pas être requise pour l'obtention d'un effet thérapeutique. En effet, des expérimentations préliminaires *in vitro* ont établi qu'un transfert du gène CFTR dans seulement 10 % d'une population de cel-

lules issues de patients atteints de mucoviscidose permet une correction des paramètres électrophysiologiques de la population cellulaire dans son ensemble. Cette observation est essentielle, car aucun des vecteurs de transfert de gènes actuellement disponibles ne permet de transduire la totalité des cellules pulmonaires, la nature précise des cellules à modifier génétiquement étant par ailleurs encore mal déterminée.

Depuis 1993, plusieurs protocoles cliniques de phase I ont été menés aux États-Unis, en France, au Royaume-Uni et en Suisse [9]. Ces essais cliniques de thérapie génique visent tous à transférer un gène CFTR fonctionnel dans les cellules épithéliales pulmonaires ou nasales de patients atteints de mucoviscidose. Ils diffèrent cependant par la nature du vecteur de transfert de gènes utilisé et par la procédure d'administration. L'attention portée dans de nombreuses études cliniques – non seulement aux poumons mais aussi à la muqueuse nasale – est évidemment liée au fait que cet organe représente un modèle relativement accessible de l'épithélium respiratoire, caractérisé comme ce dernier par une différence de potentiel transépithélial anormale chez les patients atteints de mucoviscidose. Cet article de synthèse a pour objet de dresser un bilan de ces évaluations cliniques et de faire le point sur les limitations actuelles des vecteurs de transfert de gènes, ainsi que sur les améliorations qui pourraient permettre à l'avenir de mieux adapter ceux-ci à une application thérapeutique.

### Recherche clinique en thérapie génique de la mucoviscidose

Vingt-six protocoles cliniques, achevés ou encore en cours, ont été à ce jour mis en œuvre dans le monde (Tableau 1). Ces protocoles visent à évaluer, soit un mode d'administration particulier du vecteur de transfert de gène (instillation nasale, instillation dans les voies aériennes inférieures, aérosolisation), soit un vecteur bien défini (vecteurs adénoviraux, vecteurs dérivés des virus associés aux adénovirus ou liposomes cationiques). Les paramètres analysés systématiquement dans tous ces protocoles sont la sûreté de la procé-

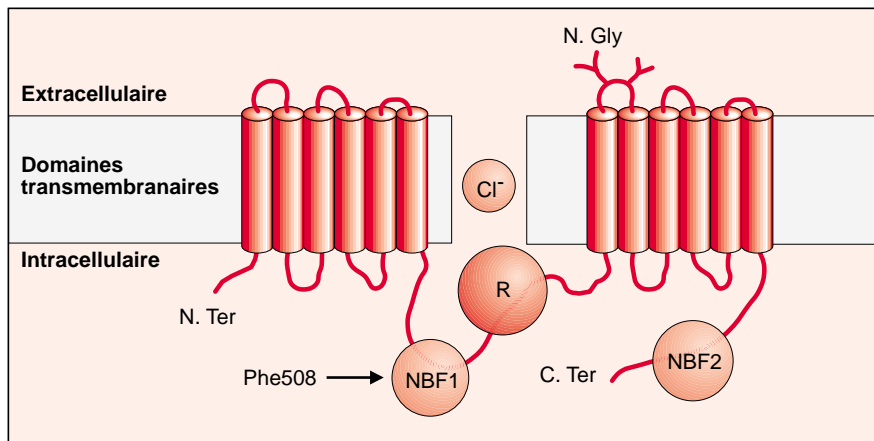


Figure 1. **Structure schématique de la protéine CFTR.** La protéine CFTR, glycosylée dans sa forme mûre (N-GLY), est constituée de deux domaines transmembranaires à six hélices hydrophobes. Elle est également formée, dans sa partie cytoplasmique, de deux domaines hydrophiles (NBF1 et NBF2, nucléotide binding fold) dont le rôle est de fixer l'ATP, et d'un domaine régulateur R pouvant être phosphorylé par des protéine-kinases. Cette phosphorylation a pour conséquence une régulation de l'activité du canal ionique de la protéine. La délétion de la phénylalanine en position 508, identifiée dans près de 70 % des cas de mucoviscidose, est localisée dans le domaine NBF1. Cette mutation bloque la maturation de la protéine CFTR. Les extrémités précises du domaine NBF1, et l'impact de la délétion 508 sur la structure de la protéine CFTR, ont été récemment redéfinies [51].

dure, l'efficacité du transfert du transgène et la persistance de son expression. La correction de la différence du potentiel transépithélial nasal – un paramètre reflétant l'activité de transport ionique – est également mesurée dans certains cas. La première série de résultats publiés rapporte les données d'essais cliniques dans lesquels un vecteur adénoviral recombinant de première génération (dont les gènes viraux *E1* et *E3* ont subi une délétion) [10-13]

ou un liposome cationique associé à un plasmide d'expression du gène *CFTR* [14] ont été administrés dans l'épithélium nasal [10, 12-14] ou dans les poumons [11]. Ces études initiales ont permis de tirer les enseignements suivants: (1) l'administration du gène *CFTR* est en général bien tolérée par les patients, quel que soit le vecteur de transfert de gènes utilisé; seul un patient ayant reçu par bronchofibroscopie  $2 \times 10^9$  unités formant plaques (ufp) du

vecteur adénoviral portant le gène *CFTR* a présenté des effets secondaires systémiques et pulmonaires importants [11], et deux patients ayant été traités par instillation nasale avec  $2 \times 10^{10}$  ufp ont développé une inflammation nasale sans grande traduction clinique, mise en évidence par une augmentation des marqueurs inflammatoires dans les lavages nasaux [13]; (2) une expression du gène *CFTR* a été mise en évidence dans les cellules nasales et

Tableau I  
PROTOCOLES CLINIQUES DE TRANSFERT DU GÈNE *CFTR*

Investigateur principal	Pays	Vecteur (promoteur)	Voie d'administration	Dose(s)	État	Référence
<b>Vecteurs adénoviraux</b>						
G. Bellon	France	Ad5ΔE1, ΔE3 (MLP)	i.n., a.	unique	terminé	[15]
G. Bellon	France	Ad5ΔE1, ΔE3 (MLP)	i.n.	répétées	en cours	
R.C. Boucher/ M.R. Knowles	États-Unis	Ad5ΔE1, ΔE3 (CMV/βactine)	i.n.	unique	terminé	[13]
R.G. Crystal	États-Unis	Ad5ΔE1, ΔE3 (MLP)	i.n., i.b.	unique	terminé	[11]
R.G. Crystal	États-Unis	Ad5ΔE1, ΔE3 (CMV)	s.l.b.	répétées	terminé	[22]
R.G. Crystal	États-Unis	Ad5ΔE1, ΔE3 (CMV)	s.l.b.	répétées	en cours	
H.L. Dorkin	États-Unis	Ad2ΔE1, ΔE4 orf6+ (E1A) (PGK)	i.b.	unique	terminé	[16, 17]
H.L. Dorkin	États-Unis	Ad2ΔE1, ΔE4 orf6+ (E1A) (PGK)	a	unique	en cours	[16, 17]
T. Rochat/S. Suter	Suisse	Ad5ΔE1, ΔE3 (MLP)	i.n.	unique	terminé	
M. Welsh/A.E. Smith	États-Unis	Ad2ΔE1 (E1A)	i.n.	unique	terminé	[10]
R.W. Wilmott/J. Whitsett	États-Unis	Ad5ΔE1, ΔE3 (RSV)	i.n., i.b.	unique	terminé	
J.M. Wilson	États-Unis	Ad5ΔE1, ΔE3 (CMV/βactine)	i.b.	unique	terminé	[22]
J.M. Wilson/C. Robinson	États-Unis	Ad5ΔE1, ΔE4 (CMV/βactine)	i.b.	unique	en cours	
J. Zabner/M. Welsh	États-Unis	Ad2ΔE1, ΔE4 orf6+ (PGK)	i.n.	répétées	terminé	[21]
<b>Vecteurs AAV</b>						
T.R. Flotte	États-Unis	AAV2 (ITR)	i.n., i.b.	unique	en cours	[29]
P. Gardner	États-Unis	AAV2 (ITR)	i.s.m.	unique	terminé	[30]
P. Gardner	États-Unis	AAV2 (ITR)	i.s.m.	unique	en cours	
<b>Vecteurs non viraux</b>						
R.C. Boucher/ M.R. Knowles	États-Unis	pADN/EDMPC-Chol (d.n.d.)	i.n.	unique	en cours	[27]
D.M. Geddes/ E.W.F.W. Alton	Royaume-Uni	pADN/DC-Chol: DOPE (SV40)	i.n.	unique	terminé	[14]
D.M. Geddes/ E.W.F.W. Alton	Royaume-Uni	pADN/GL67: DOPE (CMV)	i.n., a.	unique	en cours	
C.F. Higgins	Royaume-Uni	pADN/DC-Chol: DOPE (RSV)	i.n.	unique	terminé	[23]
C.F. Higgins	Royaume-Uni	pADN/DC-Chol: DOPE (d.n.d.)	i.n.	répétées	en cours	[28]
D. Porteous	Royaume-Uni	pADN/DOTAP (CMV)	i.n.	unique	terminé	[24]
E.J. Sorcher	États-Unis	pADN/DMRIE: DOPE (SV40)	i.n.	unique	terminé	
E.J. Sorcher	États-Unis	pADN/GL67 (CMV)	a.	unique	en cours	
J. Zabner/M. Welsh	États-Unis	pADN/GL67: DOPE (CMV)	i.n.	unique	terminé	[25]

Ad2, Ad5: adénovirus de type 2 et 5; MLP: promoteur majeur tardif de l'adénovirus; CMV: cytomégalovirus; E1A: promoteur de la région précoce 1A de l'adénovirus; PGK: phosphoglycérate kinase; RSV: virus du sarcome de Rous; AAV2: virus associé à l'adénovirus de type 2; ITR: inverted terminal repeat; pADN: ADN plasmidique; EDMPC-Chol: p-ethyl dimyristoyl phosphatidyl choline-cholestérol; d.n.d.: donnée non disponible; DC-Chol: diméthylaminoéthane-carbamoyl cholestérol; DOPE: dioléoyl phosphatidyléthanolamine; SV40: virus des singes 40; GL6: N<sup>4</sup>-spermine cholestéryl-carbamate; DOTAP: N, N, N-triméthyl-2-3-bis [(1-oxo-9 octa decenyl) oxy]-[Z, Z]-1-propanaminium méthyl sulfate; DMRIE: dimyristyloxypropyl-3-diméthylhydroxyéthylammonium bromide; i.n.: instillation nasale; a.: aérosol; i.b.: instillation bronchoscopique; s.l.b.: spray localisé bronchoscopique; i.s.m.: installation aux sinus maxillaires.

bronchiales, mais celle-ci est transitoire; (3) une correction partielle, et de degré variable, du transport de l'ion Cl<sup>-</sup> dans les cellules nasales a été démontrée.

La faisabilité et la sûreté de ces procédures de transfert de gènes ayant été établies durant ces études cliniques initiales, une seconde série d'études cliniques a pu être mise en œuvre afin d'évaluer plus précisément: (1) les avantages et les inconvénients de nouveaux modes d'administration des vecteurs, telle que la nébulisation; (2) la possibilité d'administrer les vecteurs de manière répétée; (3) les avantages et les inconvénients relatifs des vecteurs sélectionnés (Tableau II); (4) l'existence d'un possible impact thérapeutique associé au transfert du gène *CFTR*.

#### Nébulisation du vecteur adénoviral

Le premier protocole clinique mettant en œuvre une nébulisation d'un vecteur adénoviral a été débuté en France en 1994 [15]. Un vecteur de

première génération portant le gène *CFTR* a été administré à 6 patients à une dose maximale de  $5,4 \times 10^8$  ufp. La procédure a été bien tolérée, aucune déviation des paramètres inflammatoires ou immunologiques n'ayant été observée. Plus surprenant cependant, aucune augmentation de la concentration en anticorps dirigés contre le vecteur adénoviral n'a été observée dans le sang ou les lavages bronchoalvéolaires. Bien que la dose virale administrée dans cette étude soit relativement faible pour le poumon entier, une persistance de l'ADN viral et de l'expression du gène *CFTR* transduit a pu être mise en évidence respectivement durant 3 semaines et 15 jours (figure 2). Des résultats semblables ont été obtenus dans une étude ultérieure menée aux États-Unis: l'expression du gène *CFTR* a été détectée chez 4 des 5 patients traités et aucune réponse immunologique dirigée contre le vecteur adénoviral n'a pour le moment été mise en évidence [16, 17]. Bien qu'inattendue et encore inexplicquée, cette absence d'anti-

corps neutralisants vis-à-vis de l'adénovirus est une observation encourageante car elle suggère que de multiples injections du vecteur viral pourraient permettre de maintenir une expression plus prolongée du gène *CFTR*.

#### Administration répétée d'un vecteur adénoviral

La possibilité de procéder à des administrations répétées du vecteur dépendra en premier lieu de l'absence effective chez les patients traités d'une réponse humorale neutralisante vis-à-vis des particules virales. Cependant, l'intervalle optimal requis entre deux injections du vecteur reste indéterminé et dépendra de la persistance des cellules transduites et de la durée d'expression du gène *CFTR*. Si les premières études cliniques indiquent une persistance de l'expression du transgène relativement courte (2 à 3 semaines), les évaluations plus systématiques menées dans divers modèles animaux suggèrent qu'une persistance de plu-

Tableau II  
AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DES VECTEURS DE TRANSFERT DE GÈNES UTILISABLES  
DANS LE CADRE D'UNE THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE

Vecteurs	Avantages	Inconvénients
Vecteurs adénoviraux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- transduction <i>in vivo</i> de cellules quiescentes</li> <li>- persistance <i>in vivo</i> du transgène</li> <li>- fort niveau d'expression du transgène</li> <li>- industrialisation des procédés de production</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- inflammation</li> <li>- administrations répétées (anticorps neutralisants)</li> <li>- confinement des patients</li> </ul>
Vecteurs synthétiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- administrations répétées</li> <li>- transduction <i>in vivo</i> de cellules quiescentes</li> <li>- pouvoir inflammatoire réduit</li> <li>- industrialisation des procédés de production</li> <li>- confinement des patients</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- faible persistance <i>in vivo</i> du transgène</li> <li>- expression transitoire et faible du transgène</li> </ul>
Vecteurs AAV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- transduction <i>in vivo</i> de cellules quiescentes</li> <li>- persistance <i>in vivo</i> du transgène ?</li> <li>- fort niveau d'expression du transgène</li> <li>- pouvoir inflammatoire réduit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- administrations répétées (anticorps neutralisants)</li> <li>- industrialisation des procédés de production</li> <li>- confinement des patients</li> </ul>
Vecteurs lentiviraux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- transduction <i>in vivo</i> de cellules quiescentes ?</li> <li>- persistance <i>in vivo</i> du transgène ?</li> <li>- pouvoir inflammatoire réduit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- immaturité de la technologie</li> <li>- sécurité des vecteurs</li> <li>- industrialisation des procédés de production</li> <li>- confinement des patients</li> </ul>

sieurs mois pourrait être obtenue par un choix judicieux de séquences de régulation contrôlant l'expression de ce transgène, ceci malgré l'induction chez l'animal traité d'une réponse immunitaire dirigée contre les antigènes viraux [18-20]. Deux essais cliniques visant à évaluer, chez l'homme, les avantages et les inconvénients associés à une administration répétée du vecteur, soit par instillation nasale [21], soit par pulvérisation pulmonaire localisée par endoscopie [22], ont été récemment entrepris. Le premier protocole consiste en une administration de doses virales croissantes (comprises entre  $2 \times 10^7$  et  $2 \times 10^{10}$  ufp) avec un intervalle moyen de 44 jours entre les injections. Cette étude a démontré une correction de la différence de potentiel nasal chez quelques patients mais celle-ci ne s'est avérée que partielle et très variable, peut-être en raison de l'induction d'anticorps dirigés contre les particules virales, chez 3 des 6 patients traités [21]. En revanche, dans le second protocole, aucune augmentation significative du taux sérique en anticorps neutralisants vis-à-vis de l'adénovirus n'a été détectée chez les 14 patients ayant reçu dans les poumons 3 injections du vecteur à des doses comprises entre  $3 \times 10^6$  et  $2 \times 10^9$  ufp, à raison d'une injection tous les 3 mois [22]. Cependant, l'expression du gène *CFTR* diminue après la seconde et la troisième administration. La présence d'anticorps anti-adénovirus dans le liquide bronchoalvéolaire n'ayant pas été documentée, une neutralisation immunologique du vecteur dans les voies pulmonaires n'est pas à exclure, mais reste à établir. Bien qu'encore incomplètes et préliminaires, toutes ces études indiquent qu'une administration répétée d'un vecteur adénoviral dans le nez ou dans les voies pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose peut être réalisée. Néanmoins, il semble que l'efficacité de transduction soit progressivement diminuée au fur et à mesure des injections, et le nombre maximal d'injections efficaces reste donc indéfini. La recherche d'une possible «fenêtre thérapeutique» correspondant à l'utilisation de doses virales pouvant transduire efficacement un nombre suffisant de cellules pulmo-

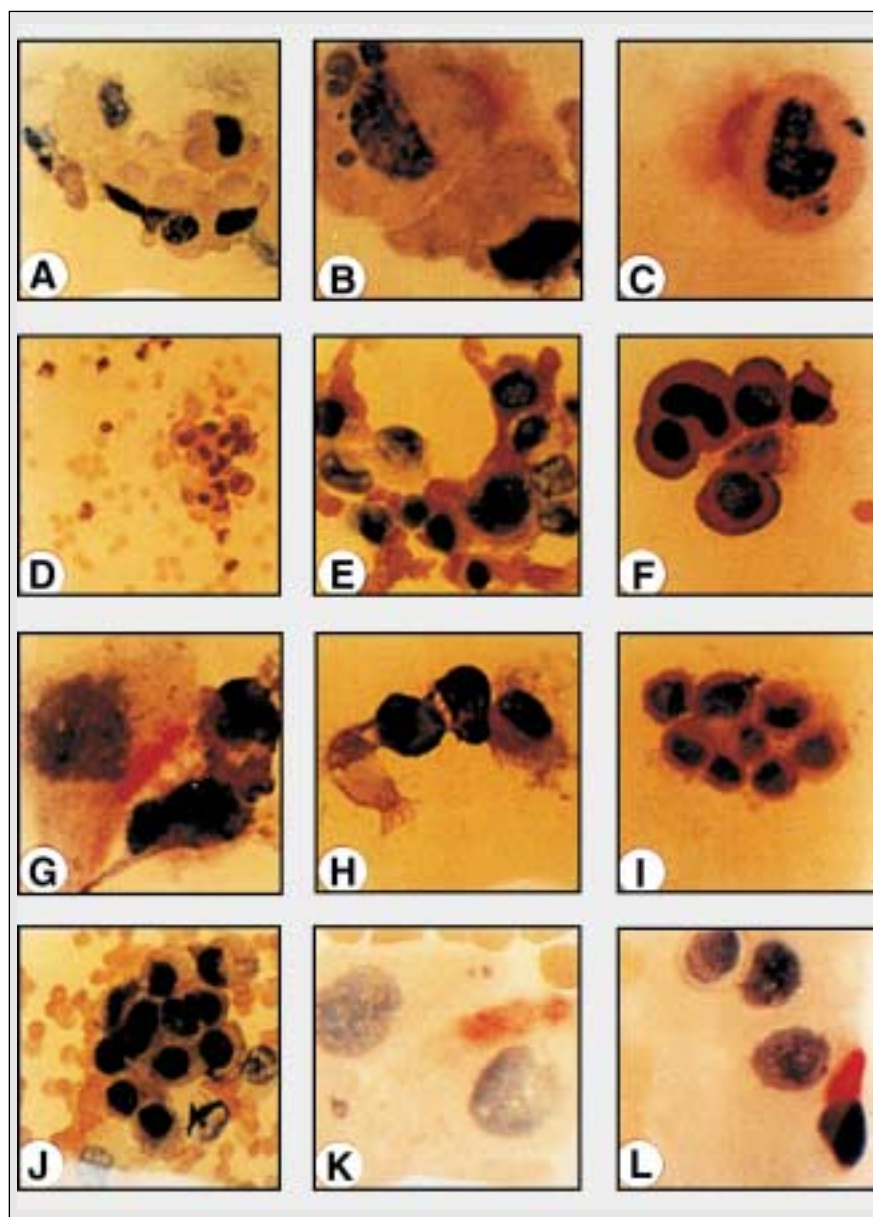


Figure 2. **Détection immunocytochimique de la protéine CFTR dans des échantillons de cellules prélevées par brossages bronchiques effectués sur des volontaires sains ou des patients atteints de mucoviscidose, avant et après nébulisation du vecteur adénoviral recombinant.** Les cellules sont marquées par l'hématoxyline afin de révéler les noyaux en bleu (agrandissement: D, x 200; A, E, F, H, I, J, x 500; B, C, G, K, L, x 1000). La protéine CFTR, de localisation apicale, est marquée en rouge. **A.** Individu sain, en l'absence d'anticorps anti-CFTR. **B, C.** Individu sain, en présence d'anticorps anti-CFTR. **D.** Patient C, avant traitement par transfert de gènes, en l'absence d'anticorps anti-CFTR. **E.** Patient C, avant traitement par transfert de gènes, en présence d'anticorps anti-CFTR. **F.** Patient C, 7 jours après traitement par transfert de gènes, en l'absence d'anticorps anti-CFTR. **G.** Patient C, 7 jours après traitement par transfert de gènes, en présence d'anticorps anti-CFTR. **H.** Patient F, avant traitement par transfert de gènes, en l'absence d'anticorps anti-CFTR. **I.** Patient F, avant traitement par transfert de gènes, en présence d'anticorps anti-CFTR. **J.** Patient F, 7 jours après traitement par transfert de gènes, en l'absence d'anticorps anti-CFTR. **K, L.** Patient F, 7 jours après traitement par transfert de gènes, en présence d'anticorps anti-CFTR.

naires tout en n'induisant qu'une inflammation et une réponse humorale neutralisante modérée est donc à poursuivre.

### Administration de vecteurs non viraux

Si les vecteurs adénoviraux ont initialement été préférés pour les premières applications cliniques, plusieurs protocoles mettant en œuvre des vecteurs non viraux, notamment des lipides cationiques, ont par la suite été proposés. L'attrait de ces lipides cationiques par rapport aux vecteurs viraux réside dans leur facilité de production et d'utilisation, leur moindre immunogénicité, et un meilleur confort pour les patients qui ne sont pas confinés dans des chambres hospitalières à accès limité, comme cela est le cas pour les protocoles mettant en œuvre des vecteurs viraux. Plusieurs formulations de lipides cationiques (DC-Chol, DOTAP, DMRIE, GL67), associés à des plasmides d'expression du gène *CFTR*, ont été testées dans des protocoles cliniques, notamment au Royaume-Uni et aux États-Unis [14, 23-28] (Tableau 1). Tous ces protocoles ont confirmé la bonne tolérance des malades aux complexes lipides cationiques-ADN administrés. Dans certains cas, une correction du comportement électrophysiologique de l'épithélium cellulaire nasal a pu être associée au transfert du gène *CFTR*. Ainsi, Gill *et al.* (Oxford et Cambridge, Angleterre) ont, les premiers, observé une correction partielle du transport de  $\text{Cl}^-$  dans les cellules épithéliales nasales chez 2 des 8 patients traités par un complexe DC-Chol/DOPE-plasmide *CFTR* – cela jusqu'à 15 jours après le traitement – et une expression du gène *CFTR* a été démontrée chez 6 des 8 patients [23]. La démonstration de la correction physiologique des cellules transduites a requis la mise en œuvre par cette équipe d'une technique sophistiquée de mesure de la fonction biologique de la protéine *CFTR* dans des cellules prélevées par brosse nasale : cette technique exploite la propriété des ions  $\text{Cl}^-$  à réduire la fluorescence d'un colorant spécifique (le 6-méthoxy-N(-sulphopropyl)quinolinium ou SPQ), afin de visualiser par microscopie à fluorescence des cellules expri-

mant la protéine *CFTR* (technique SPQ). Confirmant ces observations, Porteous *et al.* (Édimbourg, Écosse) ont rapporté qu'une administration d'un complexe DOTAP/plasmide *CFTR* permet un transfert génétique détectable chez 7 des 8 patients traités jusqu'à 28 jours après le traitement, et une correction de la différence de potentiel chez 2 patients [24]. Deux études complémentaires ont été menées aux États-Unis et en Angleterre afin d'évaluer un nouveau lipide cationique (GL67/DOPE) administré soit par instillation nasale, soit par instillation nasale suivie d'une aérosolisation dans les voies pulmonaires de volontaires sains ou de patients [25, 26]. Une expression du gène *CFTR* et une correction partielle du transport des ions  $\text{Cl}^-$  a été observée dans la première étude chez les patients traités, mais de manière inattendue, également chez les patients du groupe témoin ayant reçu le gène *CFTR* non complexé au lipide cationique [25]. La seconde étude – la première mettant en œuvre un transfert de vecteur synthétique dans les poumons – a, quant à elle, permis de démontrer l'absence de toxicité d'une aérosolisation du complexe GL67/DOPE-ADN chez des volontaires sains [26] et une tendance à la correction de la différence de potentiel dans les voies aériennes inférieures des patients traités (E. Alton et D. Geddes, communication orale, 11<sup>e</sup> conférence nord-américaine sur la mucoviscidose, Nashville, États-Unis, octobre 1997). Plus récemment, un protocole clinique visant à évaluer un nouveau composé, le lipide EDMPC/cholestérol, administré dans l'épithélium nasal de patients a été initié par Knowles *et al.* à Chappel Hill (MA, USA) [27]. L'absence d'immunogénicité de ces vecteurs lipidiques laisse espérer que la faible efficacité du transfert génétique *in vivo* des vecteurs actuels puisse être partiellement compensée par des administrations répétées. L'intérêt potentiel d'une telle procédure est confirmé par les résultats préliminaires d'une étude actuellement menée en Angleterre chez 12 patients ayant reçu à trois reprises le complexe DC-Chol/DOPE-ADN dans l'épithélium nasal, à raison d'une application locale par mois ; aucune réponse

immunologique dirigée contre le vecteur n'a été mise en évidence et une correction du transport des ions  $\text{Cl}^-$  a été observée chez certains de ces patients [28].

### Administration de vecteurs AAV (adeno-associated virus)

Malgré leur attrait, l'efficacité du transfert génétique des vecteurs synthétiques actuels reste bien inférieure à celle des vecteurs adénoviraux. C'est pourquoi, outre les vecteurs adénoviraux, des vecteurs dérivés des AAV ont été plus récemment développés et évalués en clinique en raison de la capacité de ces virus à infecter *in vivo* des cellules quiescentes. Trois protocoles cliniques ont été mis en route aux États-Unis dans lesquels un vecteur AAV portant le gène *CFTR* a été administré dans l'épithélium nasal et par bronchofibroscopie dans les poumons [29], ou dans les sinus maxillaires de patients après antrostomie [30] (Tableau 1). Aucune toxicité n'a été observée chez les patients traités, et un transfert du gène *CFTR* a pu être mis en évidence dans les deux protocoles, avec une persistance du gène *CFTR* jusqu'à 70 jours après l'administration du vecteur. De plus, une correction de la différence de potentiel dans le sinus a également été rapportée. Un nouvel essai clinique a été récemment démarré par la même équipe, avec un suivi chez les patients traités de la récurrence de sinusite comme marqueur thérapeutique. Si les vecteurs AAV possèdent des avantages spécifiques, dont notamment un pouvoir inflammatoire réduit (*voir plus loin*), les difficultés associées à leur production à grande échelle, et les inconnues persistantes quant à la possibilité d'obtenir chez l'homme une expression du transgène élevée et stable, ne permettent pas aujourd'hui d'entrevoir clairement l'avenir de ces vecteurs pour un traitement de la mucoviscidose. À l'image des vecteurs adénoviraux et des vecteurs synthétiques, une meilleure compréhension des propriétés biologiques et immunologiques de ces vecteurs est indispensable pour la sélection du vecteur le mieux approprié à une telle application humaine.

## Limitations actuelles des vecteurs de transfert de gènes et perspectives d'améliorations

### Les vecteurs adénoviraux

Les vecteurs utilisés dans la quasi-totalité des essais cliniques décrits précédemment sont des vecteurs dits de première génération dans lesquels la région virale E1, essentielle à la réplication, a été délétée et remplacée par la cassette d'expression contenant le gène *CFTR* [31]. Ces vecteurs sont également souvent délétés de la région virale E3, dont la fonction est d'assurer *in vivo* une atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte, mais dont l'absence n'est pas un handicap pour la production virale *in vitro*. Bien que les adénovirus soient théoriquement particulièrement bien adaptés à un transfert de gènes *in vivo* [31], les études précliniques et cliniques décrites précédemment ont mis en évidence plusieurs limitations sérieuses. Ainsi, la toxicité de ces vecteurs de première génération s'est avérée induire chez l'hôte traité une réponse inflammatoire limitant les doses virales pouvant être administrées aux patients. Cette toxicité, couplée au mode d'administration du vecteur (instillation), à la forte dose virale mise en œuvre ( $2 \times 10^9$  ufp), et au volume élevé de la solution virale administrée (20 ml), est probablement à l'origine des sérieux effets secondaires observés chez l'un des patients lors du premier essai clinique de thérapie génique de la mucoviscidose [11]. Le caractère transitoire de l'expression *in vivo* du gène thérapeutique est évidemment également incompatible avec une correction génétique permanente de la maladie. Enfin, l'immunogénicité des particules virales injectées est telle que les efficacités de transduction lors d'administrations répétées du vecteur risquent d'être très fortement réduites.

Ces limitations majeures ont stimulé ces dernières années plusieurs laboratoires universitaires et industriels à étudier dans le détail la biologie des vecteurs recombinants afin de mieux cerner la nature des réponses de l'hôte à ces vecteurs et, sur la base de ces informations, de développer des

vecteurs de nouvelle génération mieux adaptés à un usage clinique. Ces travaux ont révélé que, contrairement à ce qui était généralement admis, la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les antigènes viraux n'est pas assez puissante pour induire une élimination des cellules transduites. En effet, en l'absence de transgène, ou dans le cas où le produit du transgène est non immunogène, les cellules transduites persistent plusieurs mois malgré l'induction d'une réponse cellulaire cytotoxique spécifiquement dirigée contre les antigènes viraux [18-20]. Ainsi, l'administration intratrachéale d'un vecteur de première génération portant le gène *CFTR* humain à des souris C57Bl/6, chez lesquelles, pour des raisons non encore élucidées, la protéine CFTR humaine est immunologiquement tolérée, permet une expression du transgène dans les poumons durant plus de 4 mois, cela malgré l'induction d'une réponse humorale et cellulaire dirigée contre le vecteur adénoviral. Dans le cas contraire, la protéine exprimée par le transgène étant immunogène, deux cas de figures sont possibles : soit cette protéine induit une forte réponse cellulaire cytotoxique entraînant une élimination progressive des cellules transduites, soit elle induit peu ou pas de réponse cytotoxique et une forte réponse humorale, auquel cas les cellules transduites ne sont pas détruites mais le produit du transgène est, en revanche, rapidement éliminé si la protéine est sécrétée [18-20]. Cependant, tous ces travaux ont été menés chez des modèles animaux immunologiquement naïfs pour l'adénovirus humain. La situation est évidemment différente chez l'homme où la majorité des individus est d'ores et déjà séropositive pour l'adénovirus de type 5 : il n'est donc pas exclu que ces personnes, contrairement aux modèles animaux naïfs [18-20], développent, après administration d'un virus recombinant, une réponse immunitaire cellulaire secondaire antivirale qui soit suffisamment puissante pour induire une élimination efficace des cellules transduites. Ce point reste encore à éclaircir.

La complexité de l'interaction hôte-vecteur est également illustrée par le fait que le devenir *in vivo* des cellules transduites dépend du transgène

mais aussi de la nature du vecteur adénoviral utilisé. Ainsi, des données récentes indiquent que les cellules transduites par un vecteur adénoviral de nouvelle génération, délété simultanément des régions E1 et E4, mais exprimant un transgène fortement immunogène persistent bien mieux que des cellules transduites par un vecteur délété uniquement de E1 et portant le même transgène. Autre avantage de ces vecteurs de nouvelle génération, leur toxicité est très atténuée [32, 33]. Mais, inconvénient inattendu, le niveau et la stabilité de l'expression du transgène porté par ces vecteurs délétés en E1 et E4 sont fortement altérés [33]. Il est cependant maintenant possible de restaurer cette expression par une inclusion dans ces vecteurs de nouvelle génération d'un des gènes contenu dans la région virale E4, ou mieux, d'une combinaison optimale de certains de ces gènes sans restaurer simultanément la toxicité des vecteurs. Bien que l'extrapolation de ces conclusions à l'homme soit ici encore hypothétique, ces travaux suggèrent qu'un vecteur de nouvelle génération moins toxique et permettant une bonne persistance *in vivo* des cellules transduites peut être mis au point. Cela d'autant plus que, parallèlement à ces vecteurs délétés des gènes de régulation, des vecteurs dépourvus de tous les gènes viraux semblent prometteurs car combinant les avantages des vecteurs délétés des gènes E1 et E4 (moindre toxicité) tout en n'étant pas affectés par les interférences génétiques consécutives à la délétion de la région virale E4 [34].

Si une bonne persistance des cellules transduites peut être atteinte, la mort naturelle de celles-ci, à plus ou moins longue échéance, imposera de procéder à des injections répétées du vecteur afin de transduire les cellules nouvellement formées. Même si des anticorps neutralisants dirigés contre les particules adénovirales n'ont pas été détectés chez la plupart des patients traités lors des premiers essais cliniques, il est fort possible que de tels anticorps soient efficacement induits chez des patients plus jeunes dont le système immunitaire est fonctionnel et la maladie peu évoluée. Seule une immunosuppression transitoire du patient pourrait alors per-

mettre de telles injections répétées [35, 36], mais la nature de l'agent immunosuppresseur et le calendrier du protocole d'immunosuppression restent à préciser, tous deux devant être pratiquement et éthiquement acceptables pour le patient.

### Les vecteurs dérivés des virus AAV

Les vecteurs AAV possèdent des propriétés très spécifiques qui en font théoriquement de bons candidats pour le traitement de maladies chroniques telles que la mucoviscidose. En effet, une étude récente vient de révéler que les vecteurs AAV, contrairement aux autres vecteurs, ne peuvent pas infecter les cellules dendritiques [37], ce qui a pour conséquence de réduire leur pouvoir inflammatoire et de prévenir la stimulation d'une réponse immunitaire dirigée contre le produit du transgène dans le cas où celui-ci est immunogène. Ces propriétés expliquent probablement pourquoi une injection intramusculaire de ces vecteurs permet une expression prolongée des transgènes, cela quel que soit leur pouvoir immunogène intrinsèque [38, 39]. Ces observations sont évidemment importantes dans l'optique d'un traitement de la mucoviscidose car ces vecteurs devraient être bien tolérés par les patients, même à hautes doses virales. De plus, l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre la protéine CFTR devrait être atténuée chez les patients dont la maladie est la conséquence d'une absence totale de protéine CFTR et pour lesquels celle-ci est potentiellement immunogène. Ces extrapolations à l'homme de résultats engendrés essentiellement dans des modèles murins sont évidemment hypothétiques et devront être réexaminées à la lumière des données issues des essais cliniques en cours. Malgré ces propriétés avantageuses, l'utilisation de ces vecteurs souffre toujours de l'absence de modes de production satisfaisants, et de la fréquente contamination des lots viraux par l'adénovirus humain, utilisé comme virus auxiliaire. Si de nouvelles méthodes permettant de se passer de l'adénovirus sont aujourd'hui disponibles [40], leur application à plus grande échelle est difficilement envisageable. Seule la mise au point d'une lignée de complémentation

produisant de manière permanente les protéines adénovirales nécessaires à la réplication du vecteur AAV, et les protéines Rep et Cap du AAV, permettrait d'assurer un développement compatible avec une application clinique. Or, la production d'une telle lignée n'a pas encore pu être réalisée en raison des fortes toxicités de certaines de ces protéines. De plus, l'influence précise des particules adénovirales sur le pouvoir infectieux des vecteurs AAV reste confuse, certains travaux récents ayant démontré que les protéines E1 et E4 de l'adénovirus sont indispensables à la conversion, dans les cellules infectées, de la forme ADN simple brin du vecteur AAV à une forme ADN double brin fonctionnelle capable d'exprimer le gène thérapeutique [41, 42]. Si ces observations controversées sont confirmées, cela indiquerait que toute élimination de l'adénovirus auxiliaire réduirait de manière très significative le pouvoir infectieux des vecteurs AAV et, en conséquence, leur efficacité de transfert de gènes.

### Les vecteurs synthétiques

Bien que l'efficacité de transfert de gènes soit actuellement encore peu satisfaisante, des progrès indéniables ont été réalisés ces dernières années par la production de nouvelles molécules mieux adaptées à des applications *in vivo*. Ainsi, la société Genzyme (Cambridge, MA, USA) a mis au point une nouvelle molécule amphiphile, le GL67, consistant en une molécule de cholestérol liée dans une configuration en «T» à un groupement spermine [43]. Cette molécule, dont l'évaluation clinique est actuellement en cours, permet l'obtention, dans les poumons de souris, d'une expression de CFTR près de 100 fois plus élevée que celle généralement obtenue avec les lipides cationiques précédemment utilisés. Parmi les molécules récemment développées, des nanoparticules engendrées par co-acervation de gélatine et du plasmide d'expression semblent également prometteuses. Des études précliniques menées aux États-Unis par Walsh *et al.* [44] ont en effet démontré que 50 % des cellules pulmonaires de lapins pouvaient être transduites par

une dose faible de 65 µg d'ADN. Le comportement de telles molécules chez l'homme reste cependant à établir. D'autant plus que la susceptibilité des cellules pulmonaires à un transfert de gènes relayé par des vecteurs non viraux reste encore mal connue. Ainsi, les cellules ciliées de l'épithélium pulmonaire, qui constituent l'une des cellules cibles potentielles de la correction génétique, semblent être naturellement réfractaires aux effets des lipides cationiques [45]. Bien que l'épithélium des patients atteints de mucoviscidose puisse être plus susceptible à un tel transfert génétique [46], seules les évaluations cliniques en cours permettront d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Enfin, si les modes d'administration testés à ce jour visaient à délivrer le gène *CFTR* directement dans le nez ou les poumons, un ciblage des cellules pulmonaires après administration systémique du vecteur vient d'être récemment exploré [47]. Dans cette étude, des rats ont été injectés par voie intraveineuse avec un plasmide d'expression d'un gène rapporteur couplé à un ligand peptidique issu de l' $\alpha$ -antitrypsine ( $\alpha$ -AT). Ce ligand permettant une fixation spécifique à un récepteur exprimé dans les cellules épithéliales pulmonaires (récepteur SEC), une expression du gène rapporteur a pu être démontrée dans ces cellules, mais aussi dans les cellules hépatiques. Une telle approche est encore à un stade embryonnaire mais suggère que d'autres voies d'administration du vecteur pourraient être envisagées.

### Les vecteurs dérivés des lentivirus, une nouvelle classe de vecteurs viraux aux potentialités encore inexploitées

Propriété unique parmi les rétrovirus, les lentivirus peuvent infecter des cellules quiescentes [48, 49]. Cette caractéristique, associée au faible pouvoir inflammatoire naturel des rétrovirus, fait des lentivirus des candidats sérieux pour le développement de vecteurs destinés à des transferts *in vivo* de gènes thérapeutiques dans des cellules en faible prolifération, telles que les cellules épithéliales bronchiques. Évidemment, de tels vecteurs devront être méticuleusement construits afin d'éliminer toute pathogénicité rési-



duelle, tout en conservant leur propriété de transduction de cellules en arrêt de croissance. Bien que les vecteurs actuels ne soient que des ébauches encore mal adaptées à des applications cliniques, les évaluations précliniques en cours dans divers modèles murins confirment l'intérêt potentiel de ces vecteurs pour une transduction *in vivo* de cellules quiescentes [48]. Cependant, Goldman *et al.* (Philadelphie, PA, USA) ont récemment démontré qu'un tel vecteur lentiviral portant le gène *CFTR* ne pouvait transduire les cellules d'une xéno-greffe pulmonaire humaine implantée chez des souris immunodéficientes qu'à la condition que la greffe soit peu ou pas différenciée [49]. Les raisons de cette absence de transduction *in vivo* restent à élucider. Étant donné le caractère très préliminaire de ces développements et de ces évaluations, la place réelle des vecteurs lentiviraux dans la panoplie des vecteurs potentiels pouvant être considérés pour une thérapie génique de la mucoviscidose doit encore être définie.

### **Méthodes d'évaluation des effets biologiques associés au transfert du gène CFTR**

L'objectif final de la thérapie génique de la mucoviscidose est l'amélioration de l'état de santé des patients. Or, si un transfert et une expression du gène *CFTR* ont pu être observés de manière reproductible dans divers protocoles cliniques, on ne dispose pas encore d'argument satisfaisant en faveur d'un effet thérapeutique. L'équipe de EWFM Alton (Londres, Angleterre) a pu démontrer une correction partielle des anomalies de différence de potentiel transépithélial dans les bronches de patients traités par un vecteur synthétique (GL-67) couplé à un plasmide d'expression du gène *CFTR*. Une telle analyse, invasive pour le patient, est d'une mise en œuvre difficile et n'est pas encore maîtrisée par la majorité des équipes [49]. L'analyse de la différence de potentiel transépithélial dans le nez est techniquement plus abordable. Elle reste d'interprétation difficile et n'est que partiellement informative quant aux possibles impacts biologiques dans les poumons. Enfin, il n'est pas

démonstré qu'il existe un parallélisme entre les anomalies électrophysiologiques et le développement de la bronchopathie chronique. D'autres méthodes d'analyse, pratiquées pour la plupart *ex vivo* sur des cellules bronchiques prélevées chez les patients traités (exemple: détermination de la fixation bactérienne aux cellules, analyse par hybridation *in situ* de l'expression du gène *CFTR* transféré) sont en cours de développement pour une approche plus sensible des conséquences biologiques du transfert du gène *CFTR*. Ces méthodes devraient permettre de mieux prévoir les effets thérapeutiques du transfert du gène *CFTR* dans les bronches. *In fine*, seule la surveillance prolongée de l'évolution clinique des patients traités dans des essais de phases II et III permettra de préciser définitivement l'avenir thérapeutique des protocoles de thérapie génique de la mucoviscidose. Ces essais devront concerner des patients jeunes, encore indemnes de lésions bronchopulmonaires fixées.

### **Conclusions**

Les multiples essais cliniques brièvement résumés ici ont engendré une masse d'informations scientifiques et techniques considérable. Ils ont confirmé qu'un transfert direct *in vivo* du gène *CFTR* dans les cellules épithéliales pulmonaires de patients est possible, sans risques majeurs pour le patient. Ce transfert a pu dans quelques cas être corrélé à une correction de paramètres biologiques tels que la différence de potentiel électrique transépithélial. Cependant, dans la grande majorité de ces études, l'expression du gène *CFTR* s'est révélée transitoire et les efficacités de transfert génétique relativement faibles. A cette première vague d'essais cliniques a aujourd'hui succédé une intense activité scientifique visant à améliorer les vecteurs de transfert de gènes. Grâce à ces travaux, les avantages et inconvénients des vecteurs de transfert de gènes sont aujourd'hui bien mieux définis et, dans le cas des vecteurs adénoviraux, une nouvelle génération de vecteurs moins toxiques et permettant une bonne persistance *in vivo* de l'expression du transgène est disponible. De la même manière, de nou-

velles molécules polycationiques permettant un transfert génétique *in vivo* plus efficace ont été récemment développées et sont actuellement en évaluation préclinique. Cependant, aucun de ces vecteurs de nouvelle génération n'a encore fait l'objet d'un développement clinique et il n'est pas possible de prévoir s'ils se révéleront aussi satisfaisants chez l'homme que chez l'animal. L'avenir de la thérapie génique de la mucoviscidose sera donc étroitement dépendant du succès de ces développements techniques, mais également de la meilleure maîtrise des méthodologies d'analyse des paramètres électrophysiologiques pulmonaires. En effet, parmi les équipes impliquées dans les 26 protocoles cliniques de thérapie génique de la mucoviscidose, une seule a pu, à ce jour, mettre en œuvre les techniques sophistiquées d'évaluation des effets biologiques associés au transfert du gène *CFTR* dans les poumons. La récente diffusion de ces technologies est un élément favorable à l'évaluation critique des potentialités thérapeutiques du transfert de gène.

En raison des nombreuses incertitudes scientifiques et techniques décrites dans cet article, il est donc aujourd'hui peu aisé de prédire si un transfert du gène *CFTR* pourra, dans un avenir plus ou moins proche, permettre de traiter efficacement la mucoviscidose. Seule une évaluation clinique rigoureuse des stratégies de thérapie génique les plus prometteuses chez les modèles animaux, associée à l'utilisation de vecteurs dont les propriétés biologiques sont mieux comprises et maîtrisées, permettra de déterminer les potentialités thérapeutiques du transfert de gène. C'est pourquoi il nous paraît aujourd'hui essentiel de poursuivre ces évaluations cliniques afin de tenter d'identifier des protocoles plus à même de s'inscrire dans le cadre d'un réel développement pharmaceutique d'un procédé thérapeutique ■

### **Remerciements**

Nous remercions M. Courtney pour la lecture critique de ce manuscrit. Ce travail a été soutenu en partie par l'Association française de lutte contre la mucoviscidose (AFLM) et l'Association française contre les myopathies (AFM).

## RÉFÉRENCES

1. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1989: 4926-80.
2. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-65.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
4. Ackerman MJ, Clapham DE. Ion channels – basic science and clinical disease. *N Engl J Med* 1997; 336: 1575-86.
5. Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.
6. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; 347: 1066-73.
7. Curiel DT, Pilewski JM, Albelda SM. Gene therapy approaches for inherited and acquired lung diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 14: 1-18.
8. Pavirani A, Schatz C, Mehtali M. Thérapie génique de la mucoviscidose par transfert adénoviral du gène *CFTR*. *Med Sci* 1996; 12: 25-33.
9. Valère A. Thérapie génique: le point sur les essais cliniques. *Med Sci* 1996; 12: 73-83.
10. Zabner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ. Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell* 1993; 75: 207-16.
11. Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, et al. Administration of an adenovirus containing the human *CFTR* cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat Genet* 1994; 8: 42-51.
12. Hay JG, McElvaney NG, Herena J, Crystal RG. Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal *CFTR* cDNA adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1487-96.
13. Knowles MR, Hohnaker KW, Zhou Z, et al. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1995; 333: 823-31.
14. Caplen NJ, Alton EFWF, Middleton PG, et al. Liposome-mediated *CFTR* gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat Med* 1995; 1: 39-46.
15. Bellon G, Michel-Calemard L, Thouvenot D, et al. Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing *CFTR* to cystic fibrosis patients: a Phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 15-25.
16. Rosenberg M, Jani D, Woodworth L, et al. Immunosurveillance of cystic fibrosis patients undergoing adenovirus-mediated gene transfer. *Pediatr Pulmonol* 1996; (suppl 13): 271.
17. Perricone MA, Morris JE, Pavelka K, et al. Molecular analysis of adenovirus-mediated transfer and expression efficiency of *CFTR* cDNA in individuals with CF. *Pediatr Pulmonol* 1997; (suppl 14): 261.
18. Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM. Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nature Med* 1996; 2: 545-50.
19. Michou AI, Santoro L, Christ M, Julliard V, Pavirani A, Mehtali M. Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther* 1997; 4: 473-82.
20. Lusky M, Christ M, Rittner K, et al. *In vitro* and *in vivo* biology of adenovirus vectors deleted in E1, E1/E2A and E1/E4. *J Virol* 1998; 72: 2022-32.
21. Zabner J, Ramsey BW, Meeker DP, et al. Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1996; 97: 1504-11.
22. Harvey V, Sikand V, Brion P, Kaner RJ, Crystal RG. Repeat administration of Ad*CFTR* to the airway epithelium of individuals with cystic fibrosis is well tolerated and associated with minimal systemic humoral immunity. *Pediatr Pulmonol* 1997; (suppl 14): 258.
23. Gill DR, Southern KW, Mofford KA, et al. A placebo-controlled study of liposome-mediated gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 1997; 4: 199-209.
24. Porteous DJ, Drin JR, McLachlan G, et al. Evidence for safety and efficacy of DOTAP cationic liposome mediated *CFTR* gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 1997; 4: 210-8.
25. Zabner J, Cheng SH, Meeker D, et al. Comparison of DNA-lipid complexes and DNA alone for gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia *in vivo*. *J Clin Invest* 1997; 100: 1529-37.
26. Chadwick AL, Kingston HD, Stern M, et al. Safety of a single aerosol administration of escalating doses of the cationic lipid GL-67/DOPE/DMPE-PEG<sub>5000</sub> formulation to the lung of normal volunteers. *Gene Ther* 1997; 4: 937-42.
27. Knowles MR, Noone PG, Hohnaker K, et al. A double-blind, placebo controlled, dose ranging study to evaluate the safety and biological efficacy of the lipid-DNA complex GR213487B in the nasal epithelium of adult patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 249-69.
28. Southern KW, Hyde SC, Fitzjohn EM, et al. Repeated nasal administration of liposome-mediated *CFTR* gene transfer reagents; the clinical and immunological consequences. *Pediatr Pulmonol* 1997; (suppl 14): 265.
29. Flotte T, Afione S, Beck S, Allen S, Daifuku R, Schwiebert E, Conrad C, Reynolds T, Wetzel R, Taylor G, Rosenstein BJ, Zeitlin PL, Carter BJ, Guggino WB. Phase I trial of AAV-*CFTR* gene transfer in adult CF patients with mild disease. *Pediatr Pulmonol* 1996; (suppl 13): 275.
30. Wagner JA, Reynolds T, Moran ML, et al. Efficient and persistent gene transfer of AAV-*CFTR* in maxillary sinus. *Lancet* 1998; 351: 1702-3.
31. Trapnell BC. Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 1993; 12: 185-99.
32. Gao GP, et al. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol* 1996; 70: 8934-43.
33. Dedieu JF, Vigne E, Torrent C, et al. Long term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J Virol* 1997; 71: 4626-37.
34. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, et al. 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.
35. Kay MA, Meuse L, Gown AL, et al. Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4lg enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4686-91.
36. Christ M, Lusky M, Stoeckel F, et al. Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol letters* 1997; 57: 19-25.
37. Jooss K, Yang Y, Fisher KJ, Wilson JM. Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle cells. *J Virol* 1998; 72: 4212-23.
38. Xiao X, Il J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue in immunocompetent mice by adeno-associated-virus vector. *J Virol* 1996; 70: 8098-108.
39. Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, et al. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14082-7.
40. Ferrari FK, Xiao X, McCarty D, Samulski RJ. New developments in the generation of Ad-free, high-titer rAAV gene therapy vectors. *Nat Med* 1997; 3: 1295-7.
41. Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. Second-strand synthesis is a rate limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 1996; 70: 3227-34.
42. Fisher KJ, Gao GP, DeMatteo R, Burda JF, Wilson JM. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 1996; 70: 520-32.
43. Lee ER, Marshall J, Siegel CS, et al. Detailed analysis of structures and formulations of cationic lipids for efficient gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 1701-17.

## RÉFÉRENCES

44. Walsh S, Beck S, Rubenstein R, Zeitlin P, Flotte T, Leong K. Simultaneous delivery of drugs and genes by gelatin nanospheres. *Pediatr Pulmonol* 1997; (suppl 14) : 255.
45. Fasbender A, Zabner J, Zeiher BG, Welsh MJ. A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Ther* 1997; 4: 1173-80.
46. Leigh MW, Kylander JE, Yankaskas JR, Boucher RC. Cell proliferation in bronchial epithelium and submucosal glands of cystic fibrosis patients. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 605-12.
47. Ziady A, Ferkol T, Perlmutter D, Davis P. *In vivo* delivery of exogenous genes to the airway by targeting the serpin-enzyme complex (SEC) receptor. *Pediatr Pulmonol* 1997; (suppl 14) : 269.
48. Naldini L, Blomer U, Gallay P, *et al.* *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7.
49. Goldman MJ, Lee PS, Yang JS, Wilson JM. Lentivirus vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 2261-8.
50. Alton EFWF, Chadwick SL, Smith SN, Pastorino U, Scallan M, Geddes DM. Lower airway potential differences measurements in non-CF and CF subjects. *Pediatr Pulmonol* 1996; (suppl 13) : 276.
51. Annereau JP, Stoven V, Bontems F, *et al.* Une approche de la mucoviscidose par modélisation de la structure du premier domaine fixant les nucléotides (NBF1) de CFTR. *CR Acad Sci Paris Life Sci Ser III* 1997; 320: 113-21.

## Summary

### Gene therapy for cystic fibrosis : present status and perspectives

Since the cloning of the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in 1989, cystic fibrosis has been a privileged target disease for gene therapy approaches. At present 26 clinical protocols involving *CFTR* gene transfer to airways have been completed or are ongoing. Three types of vectors have been used: adenovirus, adeno-associated virus and cationic lipids/plasmid complexes. Vector preparations have been administered to the nose (instillation), to the maxillary sinus (instillation) and to the lung (bronchofibroscopy, aerosol, endoscopic local spray). Doses were single or repeated. A part from few exceptions no adverse effects have been recorded so far. These trials have generated a great amount of information in terms of biological efficiency. They demonstrated the feasibility of an *in vivo* transfer and expression of the *CFTR* gene to the airway epithelium with in certain cases correction of functional parameters. They have also shown some

limitations in the delivery systems (*e.g.* transient CFTR expression, modest number of transduced cells, inflammatory response to adenoviral vectors) and have addressed new questions to which we should answer in the next clinical trials (*e.g.* type of target cells?, number of cells to be corrected to obtain therapeutic efficacy?, novel functional and clinical markers to define such therapeutic efficacy?). All this has been perceived by several laboratories which have undertaken major efforts to better understand the biology of the vectors for gaining improvements in their safety, efficiency and production profile and to develop new assays for evaluating *CFTR* gene delivery and correction. New generation of adenovirus, AAV and synthetic vectors are now ready for the clinic, while novel vectors with potentially improved characteristics are under active development (*e.g.* lentivirus-derived vectors, adenovirus vectors deleted from all coding viral regions).

## TIRÉS À PART

M. Mehtali, A. Pavirani.