

## A propos d'un essai de Phase I de thérapie génique effectué avec un plasmide contenant l'intégralité du gène dystrophine dans la Myopathie de Duchenne/Becker

par Michel Fardeau\*, Serge Braun\*\*, Norma B. Romero\*, J. Y. Hogrel\*, Andrée Rouche\*, Véronique Ortega\*, Brigitte Mourot\*\*, Patrick Squiban\*\*, Olivier Benveniste\*\*\* & Serge Herson\*\*\*

\* Institut de Myologie et Inserm U582, Bâtiment Babinski, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 75651 Paris Cedex 13; \*\* Transgène S.A, 67000 Strasbourg; \*\*\* Département de Médecine Interne, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 75651 Paris Cedex 13. E-mail : m.fardeau@myologie.chups.jussieu.fr

Reçu le 25 janvier 2005

### RÉSUMÉ

Un premier essai de thérapie génique a été réalisé chez des patients atteints de myopathie de Duchenne/Becker, à l'aide d'un plasmide contenant l'intégralité de la séquence codante du gène dystrophine. Cet essai de Phase I était destiné à apprécier le degré de transfection obtenue et à évaluer la tolérance au produit injecté ainsi qu'à l'expression du segment de dystrophine nouvellement synthétisé.

Neuf patients ont été inclus dans l'essai, répartis en trois cohortes de trois. La première cohorte a reçu une injection intramusculaire dans les muscles radicaux de 200 µg, la seconde une injection de 600 µg, et la troisième deux injections à deux semaines d'intervalle de 600 µg. L'inclusion des patients s'est faite de façon séquentielle, après examen des résultats du patient précédent par un comité de pilotage comprenant des experts indépendants. Le plasmide a été retrouvé dans les neuf prélèvements effectués trois

semaines après la première (ou unique) injection. Une expression de la dystrophine exogène a été retrouvée chez 6 patients sur 9. Cette expression a toujours été faible, jusqu'à 6 % de fibres présentant un marquage périphérique complet, et jusqu'à 26 % de fibres présentant un marquage partiel. Les messagers de la dystrophine ont été détectés par une RT-PCR « nichée » dans cinq des six prélèvements présentant des fibres marquées. Il est remarquable de noter qu'aucune réponse immunitaire humorale ou cellulaire vis-à-vis de la dystrophine exogène n'a été détectée. Aucune réaction secondaire locale ou générale n'a été observée.

Ces résultats, modestes mais significatifs, ouvrent la voie à de nouveaux développements en terme de thérapie génique des maladies musculaires humaines, et en particulier dans les myopathies de Duchenne et de Becker.

### SUMMARY About a Phase I gene therapy clinical trial with a full-length dystrophin gene-plasmid in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy

This is the first gene transfer trial in Duchenne/Becker patients. The aim of the study was to provide evidence on transgene expression and safety of the intramuscular administration of a plasmid containing a full-length dystrophin cDNA.

Nine Duchenne/Becker patients, distributed in three cohorts of three patients, were injected into their radial muscles either once with 200 µg (first cohort) or 600 µg (second cohort) or twice, two weeks apart, with 600 µg plasmidic DNA (third cohort). The patients were enrolled sequentially upon evaluation of the data by an independent pilot committee. In the biopsies taken three weeks after the initial injection

from the injected site, the plasmid was detected in all patients. An exogenous dystrophin expression was found in 6/9 patients. The level of expression was low, up to 6 % of weak complete sarcolemmal labelling, and up to 26 % of partial sarcolemmal staining. Dystrophin in RNAs were detected by nested RT-PCR in five out of the six biopsies with exogenous dystrophin-positive fibers. Interestingly, neither humoral or cellular antidystrophin responses were observed. No local or general adverse effects were seen.

This paves the way for future developments in gene therapy in hereditary muscle diseases, and specifically in Duchenne/Becker myopathies.

Depuis l'identification des gènes dont les altérations sont responsables des myopathies de Duchenne et de Becker, et de la protéine – la dystrophine – déficiente dans ces affections, de nombreux essais ont été mis en œuvre sur les modèles murins et canin de ces myopathies pour tenter de compenser cette déficience. De multiples voies ont été explorées : greffes de myoblastes, transfert génique à l'aide de différents vecteurs viraux contenant une mini- ou une microdystrophine, manipulations géniques à l'aide d'antibiotiques ou d'oligonucléotides antisens, surexpression d'un gène codant pour une protéine homologue (l'utrophine), injection de cellules souches. Toutes ces voies sont actuellement activement poursuivies.

La possibilité de transduire les fibres musculaires squelettiques par la simple administration d'un plasmide contenant la séquence codante du gène dystrophine a été initialement montrée par J. Wolff *et al.* (1990). Cette technique a sur les autres techniques de transfert les avantages de pouvoir accommoder l'intégralité de la séquence codante du gène dystrophine (14 Kb), d'être moins immunogène qu'un vecteur viral, de ne pas s'intégrer dans le génome et donc de ne pas présenter, *a priori*, de risque oncogène, et de rester active sur une longue période. Cette technique peut déjà bénéficier des avantages d'une production industrielle.

Par voie locale, intramusculaire, son efficacité est limitée : sur les souris dystrophine-déficientes *mdx* et *mdx<sup>5cv</sup>*, les taux de transfection peuvent atteindre 20 à 25 % des fibres musculaires : sur le Chien GRMD, ces taux sont beaucoup plus bas, de l'ordre de quelques %, et les résultats beaucoup plus variables que chez la Souris. De plus, comme toutes les autres techniques, elle doit faire face aux contraintes liées à la tolérance immunitaire vis-à-vis d'une protéine nouvellement synthétisée, et au volume musculaire à transduire pour parvenir à un bénéfice fonctionnel pour le patient. Sur ce dernier point, les résultats obtenus récemment (Zhang *et al.*, 2001) sur les modèles animaux par administration intra-artérielle du plasmide sont très encourageants.

L'ensemble de ces données a conduit à entreprendre sur des patients atteints de dystrophie de Duchenne ou de Becker un essai de Phase I destiné à tester l'efficacité, l'éventuelle toxicité, et la tolérance immunitaire de l'administration d'un plasmide contenant l'intégralité de la séquence codante du gène dystrophine.

## MÉTHODOLOGIE

Le plasmide utilisé (TG 5001) est dérivé d'*Escherichia coli* pBR322 ; il contient le  $\phi$ DNA intégral du gène dystrophine (Dickson *et al.*, 1991), sous un promoteur cytomegalovirus IEI ; l'intron 1 de l'HMG-CoA reductase et un signal de polyadenylation SV40 sont immédiatement situés en amont et en aval de ce  $\phi$ DNA. Le plasmide a été amplifié, purifié, contrôlé et produit par la Société Transgène.

Les études toxicologiques ont été conduites sur la Souris par CIT (Evreux, France) jusqu'à des doses de

900  $\mu$ g/kg, et les études de biodistribution et dissémination par Phoenix International Preclinical Service Europe (les Oncins, France).

Neuf patients volontaires ont été sélectionnés sur la base d'une identification génétique complète de leur délétion génique, celle-ci devant autoriser la caractérisation du segment de dystrophine correspondant à cette délétion par un, ou mieux deux anticorps, produits et fournis par G. Morris (Romero *et al.*, 2002). Ces neuf patients ont été répartis en trois cohortes, la première recevant une injection unique de 200  $\mu$ g, la seconde une injection unique de 600  $\mu$ g et la troisième deux injections de 600  $\mu$ g à 15 jours d'intervalle. Le prélèvement biopsique a toujours été effectué trois semaines après la première ou unique injection.

Chez les patients, le territoire retenu pour l'administration intramusculaire a été celui des muscles radicaux de l'avant-bras, devant avoir conservé un volume suffisant pour permettre un prélèvement biopsique d'environ 500 mg ; les injections intramusculaires initiales (ou unique) ont été faites sous contrôle de la vue, après incision cutanée, sans ouverture de l'aponévrose. La seconde injection (3<sup>ème</sup> cohorte) a été effectuée à l'aide d'une aiguille Botox permettant le recueil d'un signal électromyographique attestant la position intramusculaire de la pointe de l'aiguille avant l'injection.

Le prélèvement musculaire a été débité entièrement en coupes sériées faites au cryostat selon un protocole défini pour permettre la caractérisation immunocytochimique de la dystrophine, la recherche du plasmide par PCR, des messagers de la dystrophine par RT-PCR « nichée » et la recherche d'éventuelles anomalies inflammatoires interstitielles (Romero *et al.*, 2002). Parallèlement, la recherche d'anticorps antidystrophine était effectuée dans le sérum, ainsi que la recherche d'une réponse immunitaire cellulaire contre la dystrophine par Elispot.

La force musculaire des muscles radiaux était évaluée par un ergomètre spécifique (mesure du couple isométrique d'une contraction volontaire maximale) avant et après injections et prélèvement biopsique.

Le protocole avait été approuvé par les différentes instances réglementaires et avait reçu l'autorisation du CCP-PRB du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (n° 6-2000). Les patients avaient été informés oralement et par écrit du déroulement du protocole et leur consentement recueilli. Les neuf patients sélectionnés ont suivi l'intégralité du protocole. Un seul patient, initialement volontaire, ne s'est pas présenté avant le début du protocole. Enfin, l'inclusion des patients s'est faite de façon séquentielle, les principaux résultats d'un patient étant recueillis avant l'approbation de l'inclusion du patient suivant par le Comité de Pilotage.

## RÉSULTATS

1. Le plasmide a été retrouvé dans les neuf prélèvements effectués, et dans toutes les coupes où il a été recherché.

TABLE I. – Quantité de fibres musculaires positives pour la dystrophine exogène après injection du plasmide TG 5001.

Patient #	Nombre de fibres examinées	Nombre et % de fibres partiellement marquées	Nombre et % de fibres complètement marquées
1	255	0 (0 %)	0 (0 %)
2	84	14 (16 %)	1 (0,8 %)
3	103	3 (3 %)	2 (2 %)
4	138	0 (0 %)	0 (0 %)
5	151	0 (0 %)	0 (0 %)
6	310	80 (26 %)	20 (6 %)
7	153	8 (5 %)	3 (2 %)
9	117	7 (6 %)	6 (5 %)
10	140	9 (7 %)	3 (2 %)

2. Une expression de la dystrophine à l'aide des anticorps marquant le segment délété a été retrouvée dans 6 prélèvements sur 9 (2/3 dans la première cohorte, 1/3 dans la deuxième cohorte et 3/3 dans la troisième cohorte) (Tableau I). L'expression a toujours été faible et n'a été détectée que sur une petite proportion de fibres musculaires : 0,8 à 6 % de fibres montrant un marquage sur toute leur périphérie, 2 à 26 % ne montrant qu'un marquage sarcolemmique partiel (Fig. 1). Occasionnel-

lement le marquage a pu être retrouvé sur les coupes sériées. Ces résultats ont été corroborés par la détection des transcrits de la dystrophine exogène par RT-PCR « nichée » dans cinq des six prélèvements dans lesquels des fibres marquées étaient détectées (cette recherche n'a pas été faite dans le 6<sup>ème</sup> prélèvement par manque de matériel).

3. Il n'a pas été détecté d'anticorps contre le plasmide, ni de réponse humorale ou cellulaire contre la dystrophine nouvellement synthétisée.

4. Aucune réaction locale ou générale significative n'a été enregistrée à l'administration du plasmide. Les tests fonctionnels n'ont pas montré de différence de dérivation significative de la force musculaire entre côté injecté et non-injecté.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ces résultats confirment la possibilité d'obtenir chez les patients atteints de myopathie de Duchenne et de Becker une expression de dystrophine nouvellement synthétisée après administration d'un plasmide contenant la séquence codante du gène dystrophine. Les niveaux d'expression obtenus sont certainement modestes ; ils sont du même

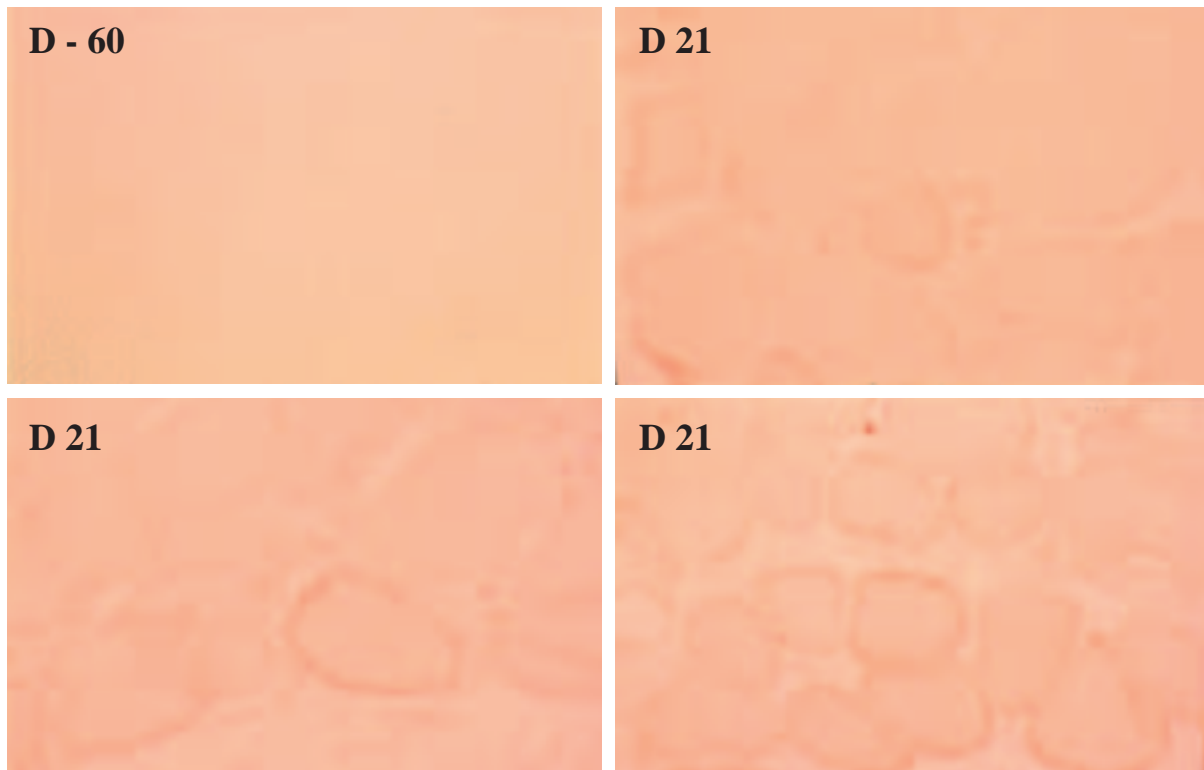


FIG. 1. – Détection en immunoperoxydase de la dystrophine exogène dans les biopsies musculaires effectuées chez le patient n° 9 à D60 (biopsie contrôle) et à D21, soit trois semaines après l'injection plasmide-dystrophine. Anticorps Manex 47-48 de Glenn Morris (le patient était porteur d'une délétion des exons 45 à 53).

Présence de sections de fibres musculaires tantôt complètement, tantôt seulement partiellement marquées à leur périphérie. Grandissement d'origine :  $\times 160$ .

ordre de grandeur que ceux obtenus dans les tests préliminaires sur les modèles animaux murins et canin.

Il est remarquable de noter qu'aucune réaction immunitaire adverse, humorale ou cellulaire, n'a été enregistrée, ni contre le plasmide injecté, ni contre le segment de dystrophine nouvellement synthétisé. Une telle réaction antidystrophine avait cependant été observée dans les modèles murins après administration de dystrophine humaine (Braun *et al.*, 1999, 2000), comme elle avait également été notée après greffe de myoblastes hétérologues (Skuk *et al.*, 2004). Cette absence de réaction immunitaire peut être rapprochée de la très faible posologie utilisée. Néanmoins de telles réactions ont été observées avec d'aussi faibles posologies, en particulier dans les procédés utilisés pour vaccination par voie intramusculaire (Wang *et al.*, 1998).

Ces résultats encouragent à poursuivre l'utilisation de tels plasmides dans un but thérapeutique, avec plusieurs axes de progrès potentiels : amélioration du plasmide par l'utilisation d'un promoteur muscle spécifique ; augmentation des doses utilisées ; administration du plasmide par voie systémique, artérielle ou veineuse ; les résultats expérimentaux actuels laissent en effet entrevoir des taux de transfection compatibles avec l'obtention d'un bénéfice fonctionnel.

**Remerciements.** – Les premiers remerciements s'adressent aux patients qui ont accepté de participer à cet essai, ainsi qu'à l'ensemble du personnel du Service de Médecine Interne et de l'Institut de Myologie/AFM de l'Hôpital de la Salpêtrière qui les ont pris en charge.

En dehors des signataires de cette note, de nombreux médecins, chercheurs, ingénieurs et techniciens de la Société Transgène (Christine THIOUDELLET, Christophe ESCOT), de l'Institut de Myologie et de l'Inserm U582 (Bruno EYMARD, Christine PAYAN, Michelle ROUMANE, Philippe BOZIN), du Service de Médecine Interne (Aurore CHOQUEL), du Service d'Anesthésiologie (Lise LEJEAN) et du Service de Neurochirurgie (Anne-Laure BOCH) de l'Hôpital de la Salpêtrière. De nombreux collègues ont participé ou suivi cet essai, en particulier Annie BAROIS, Jean-Claude KAPLAN, France LETURCQ, Dominique RECAN, Valérie MOLINIER-FRENCHEL, Jean-Gerard GUILLET, David KLATZMANN, Glenn MORRIS et George DICKSON.

Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'Association Française contre les Myopathies (AFM).

## BIBLIOGRAPHIE

- Braun S., Thioudellet C., Perraud F., Escricou C., Claudepierre, M. C., Homann H., Lusky M., Mehtali M., Bischoff R. & Pavirani A., Gene transfer into canine myoblasts. *Cytotechnology*, 1999, 30, 181-189.
- Braun S., Thioudellet C., Rodriguez P., Ali-Hadji D., Perraud F., Accart N., Balloul J. M., Halluard C., Acres B., Cavallini B. & Pavirani A., Immune rejection of human dystrophin following intramuscular injections of naked DNA in mdx mice. *Gene Ther.*, 2000, 7, 1447-1457.
- Dickson G., Love D. R., Davies K. E., Wells K. E., Piper T. A. & Walsh F. S., Human dystrophin gene transfer: production and expression of a functional recombinant DNA-based gene. *Hum. Genet.*, 1991 88, 53-58.
- Romero N. B., Benveniste O., Payan C., Braun S., Squiban P., Herson S. & Fardeau M., Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part II: clinical protocol. *Neuromusc. Disord.*, 2002, 12 (Suppl. 1), S45-S48.
- Romero N. B., Braun S., Benveniste O., Leturcq F., Hogrel J. Y., Morris G. M., Barois A., Eymard B., Payan C., Ortega V., Boch A. L., Lejean M., Thioudellet C., Mourot B., Escot C., Choquel A., Recan D., Kaplan J.-C., Dickson G., Klatzmann D., Molinier-Frenckel V., Guillet J.-G., Squiban P., Herson S. & Fardeau M., Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.*, 2004, 15, 1065-1076.
- Skuk D., Roy B., Goulet M., Chapdelaine P., Bouchard J. P., Roy R., Dugre F. J., Lachance J. G., Deschenes L., Helene S., Sylvain M. & Tremblay J. P., Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol. Ther.*, 2004, 9, 475-482.
- Wang R., Doolan D. L., Le T. P., Hedstrom R. C., Coonan K. M., Charoenvit Y., Jones T. R., Hobart P., Margalith M., Ng J., Weiss W. R., Sedegah M., de Taisne C., Norman J. A. & Hoffman S. L. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science*, 1998, 282, 476-80.
- Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. & Felgner P. L. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247, 1465-1468.
- Zhang G., Budker V., Williams P., Subbotin V. & Wolff J. A., Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.*, 2001, 12, 427-438.