

**université  
PARIS-SACLAY**

**FACULTÉ DE  
PHARMACIE**

# **UE Libre N° 363 « Innovations diagnostiques et thérapeutiques »**

Francois Fay

Institut Galien Paris-Saclay

[francois.fay@universite-paris-saclay.fr](mailto:francois.fay@universite-paris-saclay.fr)



# Restitution orale des visites de plateformes d'analyse et laboratoires de recherche

## Description :

Le but de cet exercice est de présenter la visite effectuée dans le cadre de L'UL 363. Par groupe, les étudiants devront présenter brièvement le contexte scientifique ainsi que les méthodes observées lors de la visite. Les étudiants devront également trouver un article scientifique présentant une ou plusieurs techniques présentés et expliquer les résultats. Les étudiants devront également présenter les limites et les avantages des techniques utilisées ainsi que leur ressenti personnels.

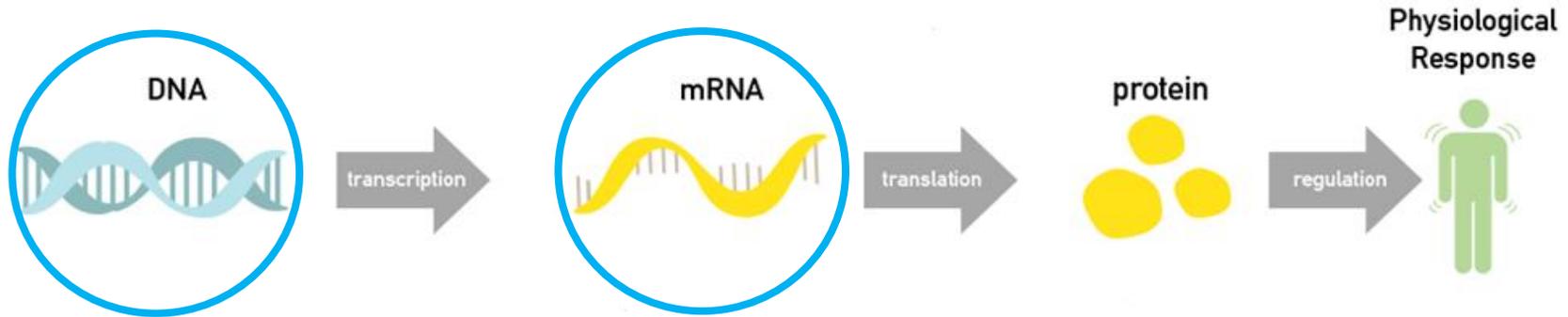
Durée de la présentation : 15 min + 5 min de questions.

## Objectifs d'apprentissage :

- Interpréter, évaluer, résumer et classer des informations scientifiques.
- Appliquer des compétences de présentation scientifique.

Catégorie	Points	Factor	Total	Commentaire
<b>Vue d'ensemble</b> - Présenter le contexte scientifique de la visite - Présenter les scientifiques rencontrés	12345	1.5		
<b>Méthodologies</b> - Présenter les méthodologies observées lors de la visite. - Présenter les points forts et les limites des techniques utilisées	12345	1.5		
<b>Article</b> - Présenter les méthodologies et les résultats présentés dans l'article		1.5		
<b>Conclusion (Libre)</b>	12345	1		
<b>Qualité générale de la présentation</b> - Présenter de manière logique et facile à suivre - Faire preuve de cohérence entre les différents étudiants - Faire des transitions entre les parties	12345	1.5		
<b>Qualité des diapositives</b> - Produire des diapositives précises, concises, organisées et plaisantes - Trouver un équilibre entre texte et image - Référencer toutes les figures utilisées	12345	1.0		
<b>Réponses aux questions</b> - Répondre de manière cohérente - Réfléchir de manière logique et structurée sous la pression - Accepter de ne pas savoir	12345	1		
<b>Communication</b> - Avoir une vitesse de diction appropriée - Faire preuve de confiance en soi - Avoir un contact visuel avec l'audience	12345	1		
				Total: ..... /50

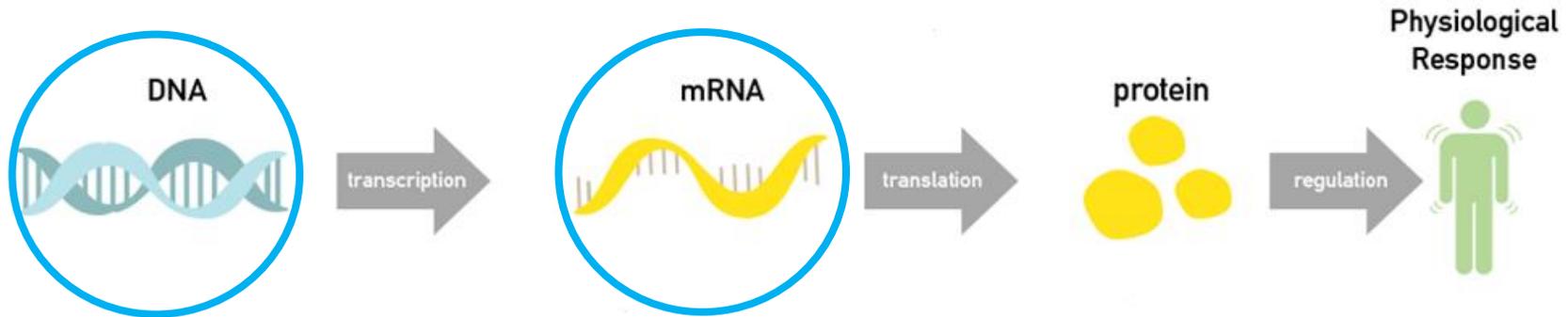
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques



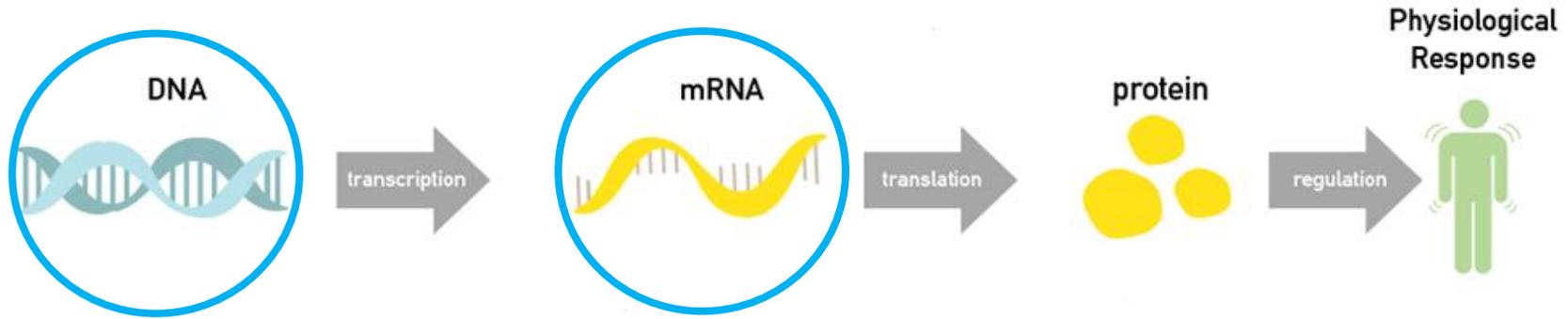
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Liens d'intérêts :

- Contrat recherche Sanofi

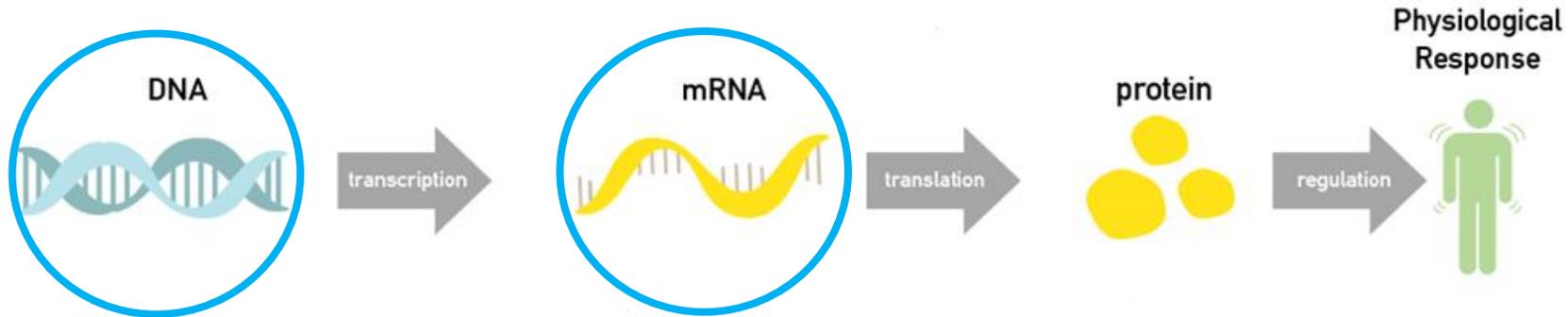


# Acides nucléiques à visées thérapeutiques



# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

- Rajout ADN
- Rajout ARNs
- Autre



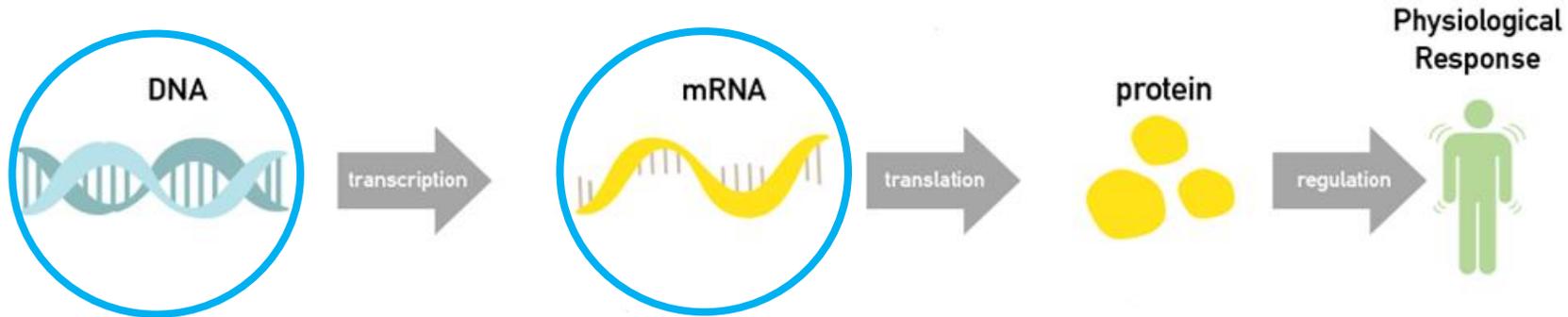
- Supprimer ADN
- Modifier ADN
- Bloquer/modifier traduction

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

- Plasmide
- *Virus*

- ARNm

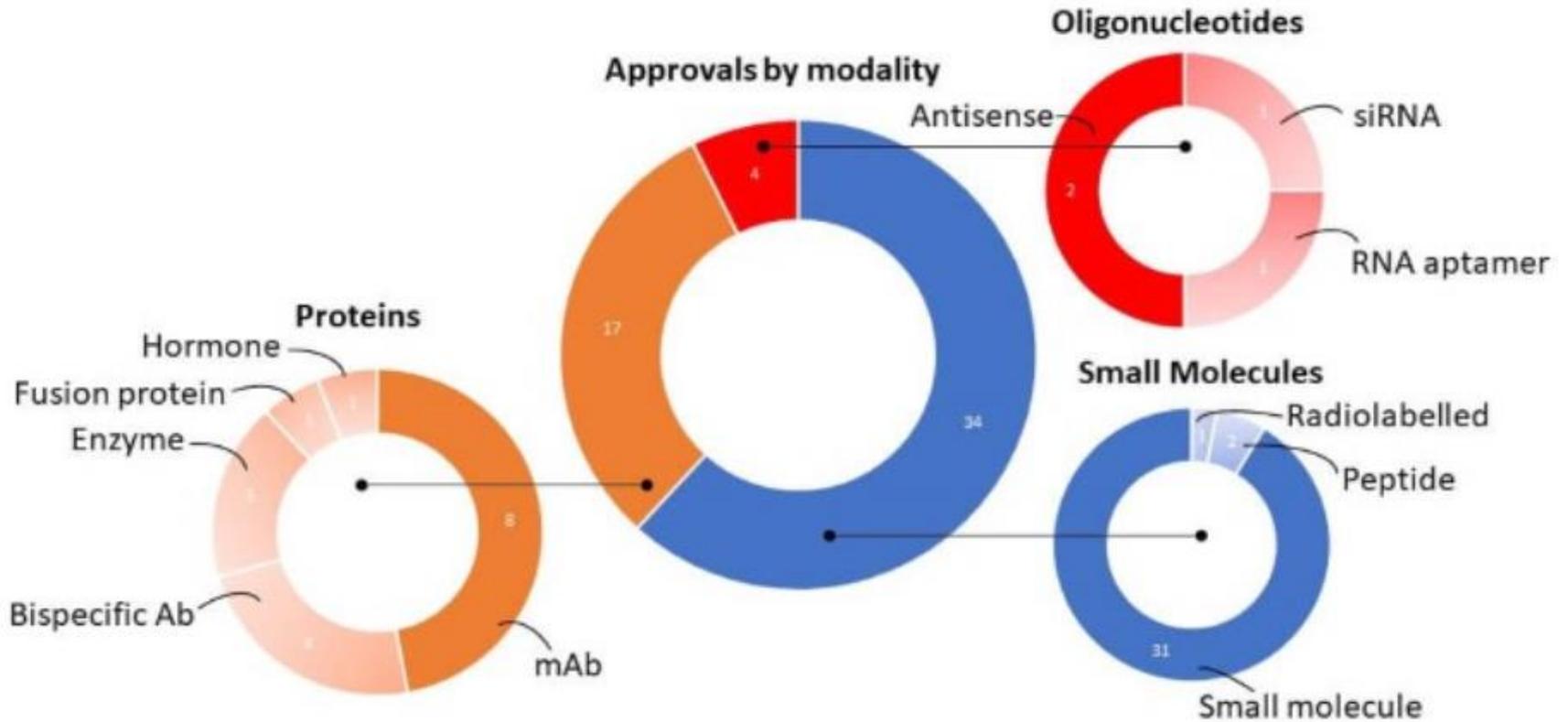
- Aptamères



- *Technologie CRISPR/cas9*

- miRNA / anti-miRNA (*antagomir*)
- siRNA
- ASOs (antisense oligonucleotide)

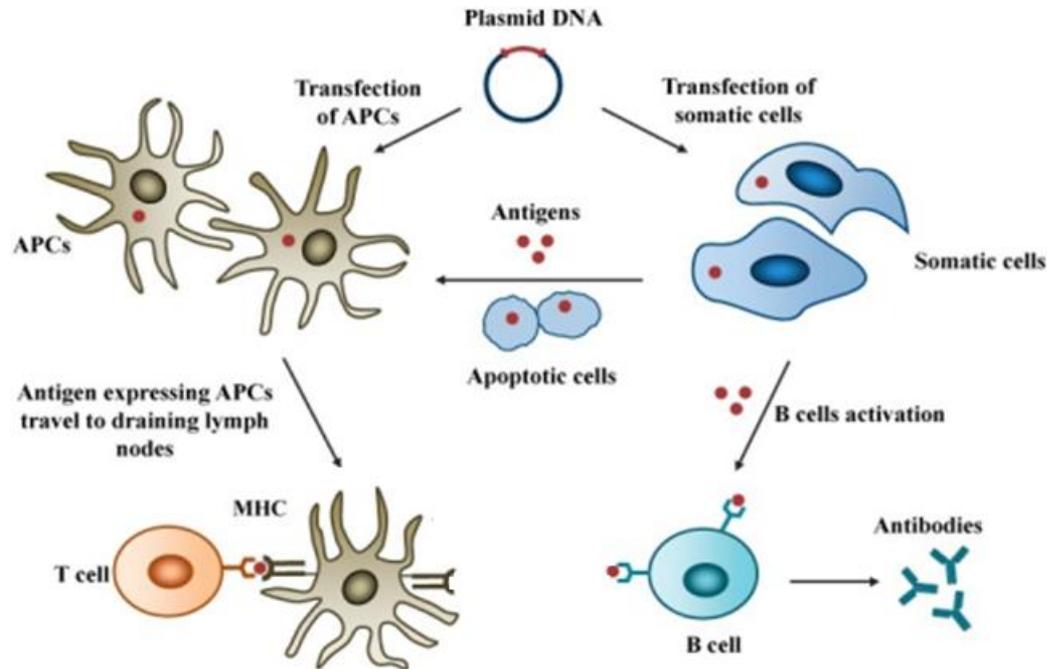
# Biologics in 2023



Adapted from Muller A, 2023 FDA approvals Nature Reviews in Drug Discovery, Jan 2024.

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Vaccins plasmidiques



Plasmide contient gènes codant protéines / peptides spécifiques au pathogène.

Dans APC:

ADN transcrit → peptides sont reconnus comme étrangers

→ peptides sont présentés comme antigène (niveau CMH I)

→ **Réponse immunitaire spécifique**

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Vaccins plasmidiques

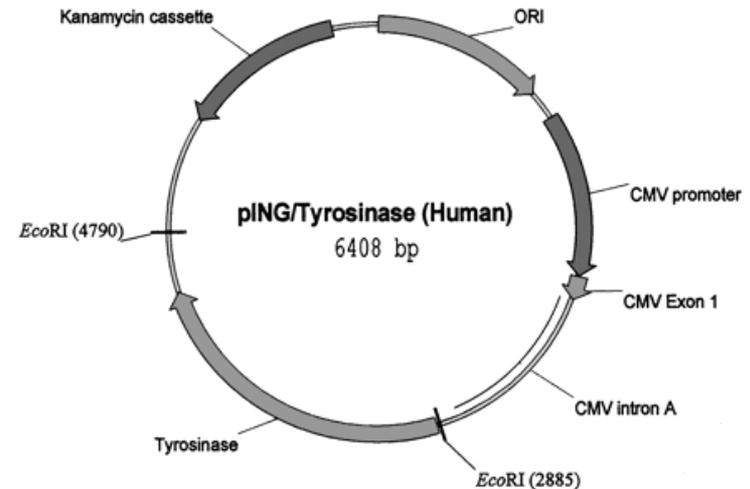
**Table 4. DNA vaccines approved for veterinary use.**

Type	Species	Target	Product/Company	License date/ country	Route of administration	Benefits
<b>Prophylactic vaccine</b>	Horses	West Nile Virus	West Nile-Innovator <sup>®</sup> / Fort Dodge Animal Health	2005 USA	IM <sup>1</sup>	Production of protective antibodies
<b>Prophylactic vaccine</b>	Salmon	Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)	Apex-IHN <sup>®</sup> /Novartis Animal Health	2005 Canada	IM	Stimulation of innate and adaptive immune responses improving the welfare and product yield
<b>Immunotherapy of cancer</b>	Dogs	Melanoma	Oncept <sup>™</sup> /Merial	2010 USA	ID <sup>2</sup> needle-free.	Production of antibodies capable of preventing the progress of the disease and prolonging the animal's life

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Vaccins plasmidiques : Oncept (USDA, EMA)

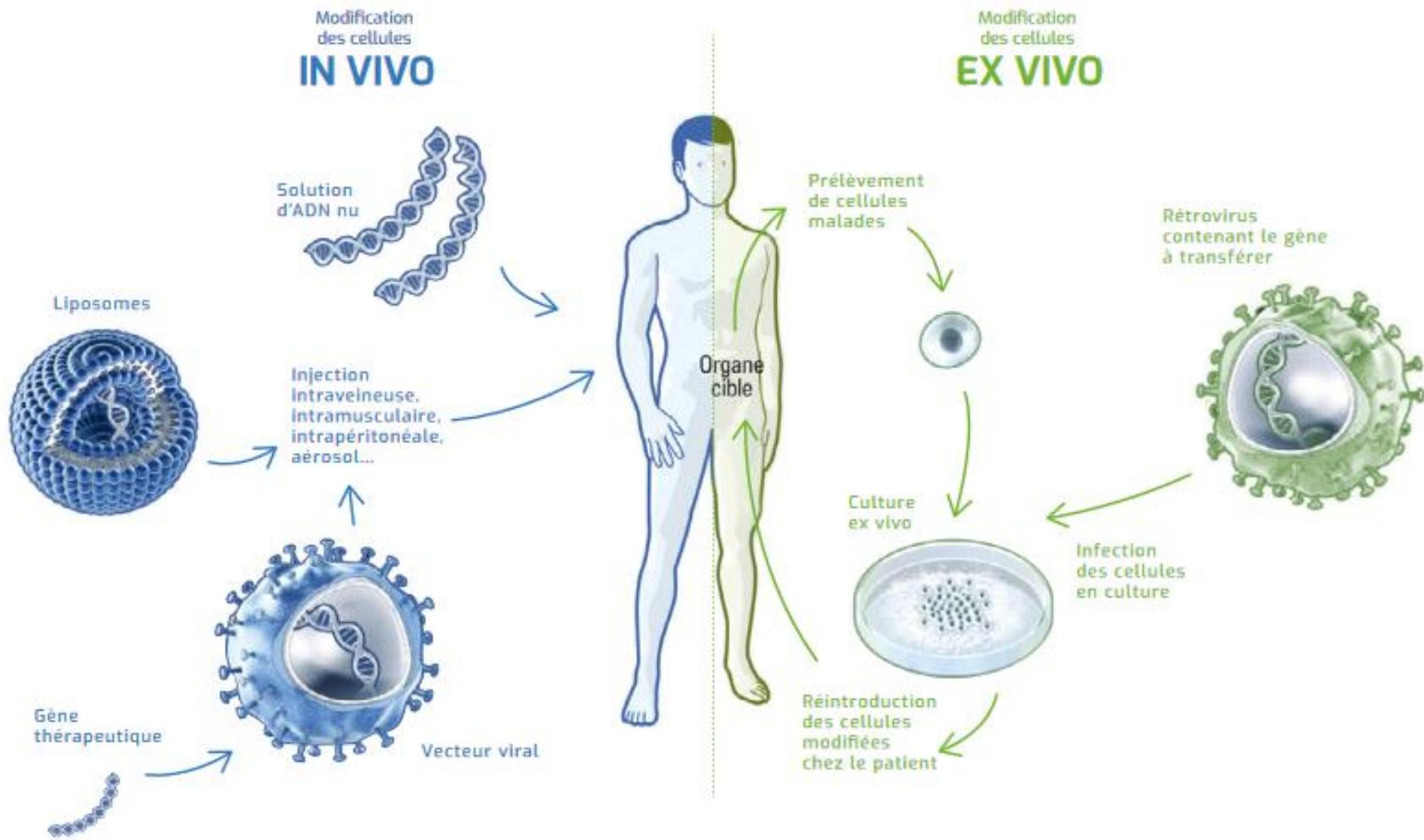
Oncept Melanoma contains a plasmid DNA expressing the gene coding for the human tyrosinase, pINGhT, in an aqueous solution. The principle of xenogeneic DNA vaccination was applied with Oncept Melanoma to overcome immunological tolerance to canine tyrosinase in dogs with melanoma. The xenogeneic (human) tyrosinase protein is foreseen to stimulate in dogs an immune response, cross-reacting with canine tyrosinase protein and canine melanoma cells expressing the canine tyrosinase.



*“The bacterial and plasmid DNA itself contains immunostimulatory sequences that **may** act as a potent immunological adjuvant in the immune response”*

*“DNA is relatively inexpensive and simple to purify in large quantity.”*

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

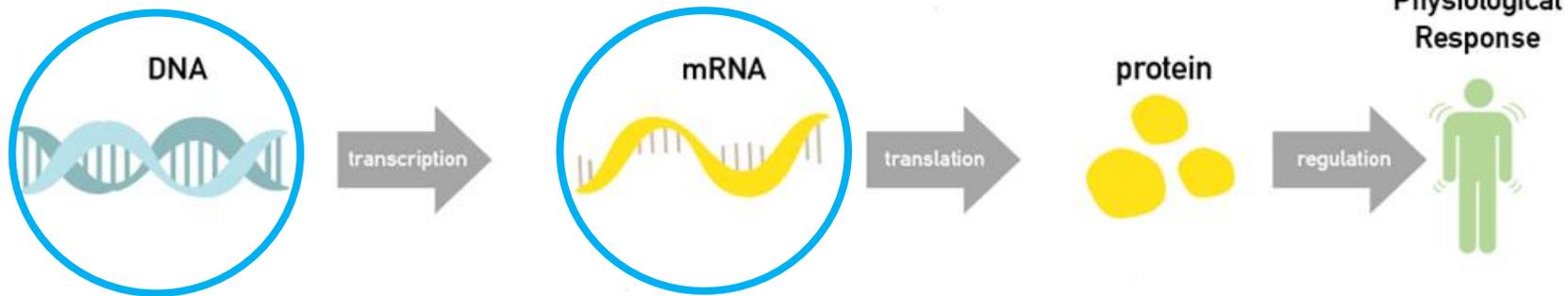


# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

- Plasmide
- *Virus*

## • **ARNm**

- Aptamères



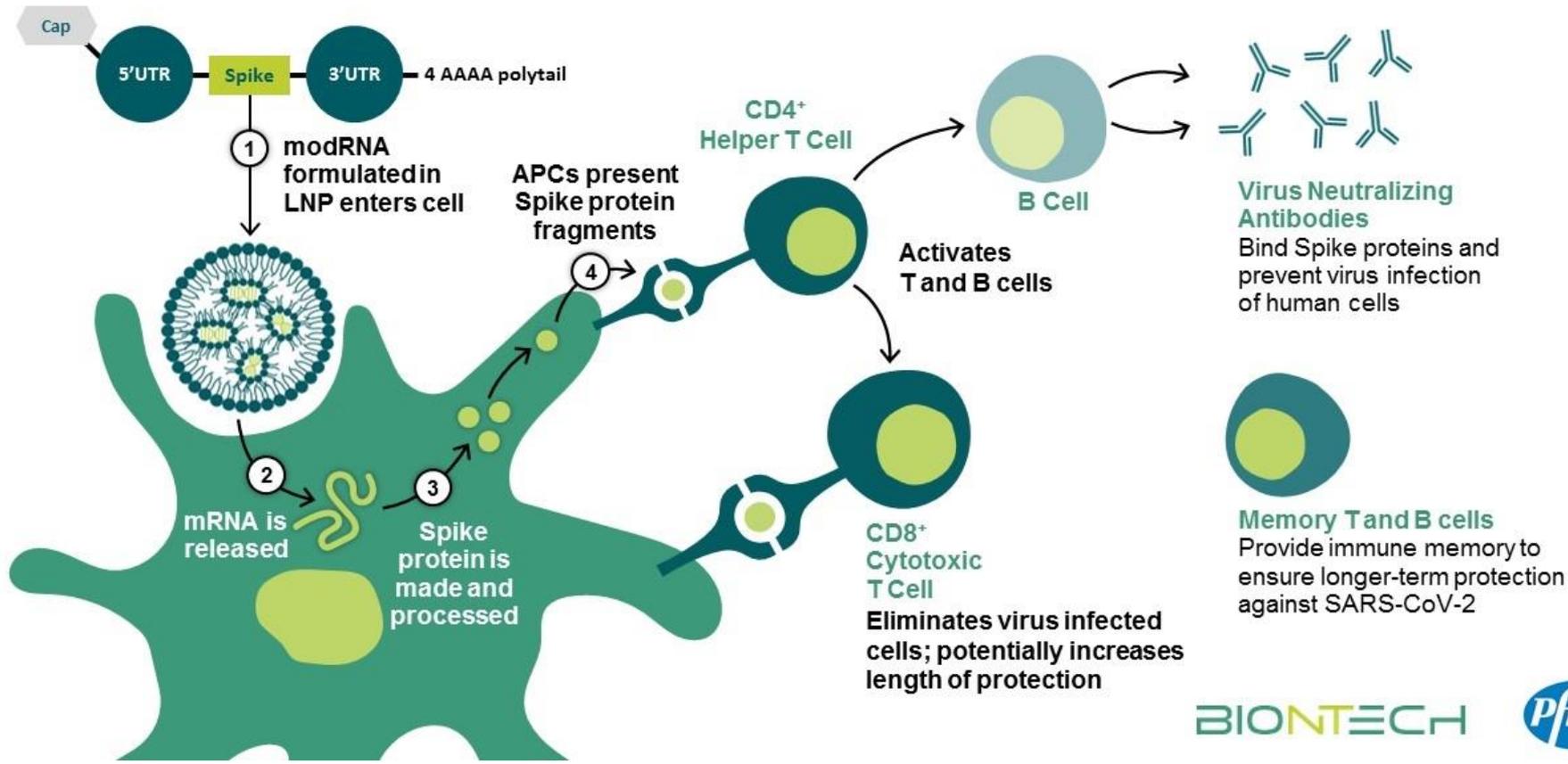
- *Technologie CRISPR/cas9*

- miRNA / anti-miRNA (*antagomir*)
- siRNA
- ASOs (antisense oligonucleotide)

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Vaccins ARNm

How mRNA vaccines work – training the immune system for a real infection:  
Both parts of the immune system activated against virus



# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Vaccins ARNm

Table 3 | Clinical trials with mRNA vaccines against cancer (As in 2017)

Sponsoring institution	Vaccine type (route of administration)	Targets	Trial numbers (phase)	Status
Antwerp University Hospital	DC EP with TAA mRNA (i.d. or NA) TAA tumor-associated antigen	AML	• NCT00834002 (I) • NCT01686334 (II)	• Completed <sup>206,207</sup> • Recruiting
		AML, CML, multiple myeloma	NCT00965224 (II)	Unknown
		Multiple solid tumours	NCT01291420 (I/II)	Unknown <sup>208</sup>
		Mesothelioma	NCT02649829 (I/II)	Recruiting
		Glioblastoma	NCT02649582 (I/II)	Recruiting
Argos Therapeutics	DC EP with autologous tumour mRNA with or without CD40L mRNA (i.d. or NA)	Renal cell carcinoma	• NCT01482949 (II) • NCT00678119 (II) • NCT00272649 (I/II) • NCT01582672 (III) • NCT00087984 (I/II)	• Ongoing • Completed <sup>209</sup> • Completed; results NA • Ongoing • Completed; results NA
		Pancreatic cancer	NCT00664482 (NA)	Completed; results NA
Asterias Biotherapeutics	DC loaded with TAA mRNA (NA)	AML	NCT00510133 (II)	Completed <sup>210</sup>
BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH	Naked TAA or neo-Ag mRNA (i.nod.)	Melanoma	• NCT01684241 (I) • NCT02035956 (I)	• Completed; results NA • Ongoing
	Liposome-complexed TAA mRNA (i.v.)	Melanoma	NCT02410733 (I)	Recruiting <sup>59</sup>
	Liposome-formulated TAA and neo-Ag mRNA (i.v.)	Breast cancer	NCT02316457 (I)	Recruiting
CureVac AG	RNActive TAA mRNA (i.d.)	Non-small-cell lung cancer	• NCT00923312 (I/II) • NCT01915524 (I)	• Completed <sup>211</sup> • Terminated <sup>200</sup>
		Prostate cancer	• NCT02140138 (II) • NCT00831467 (I/II) • NCT01817738 (I/II)	• Terminated • Completed <sup>151</sup> • Terminated <sup>212</sup>

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Thérapies ARNm

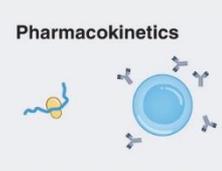
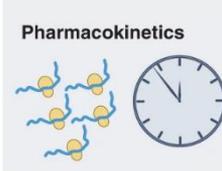
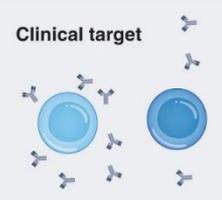
Table 1 | Summary of different classes of potential mRNA therapeutics

Organ of interest	Type of therapy	Disease	mRNA cargo	Delivery frequency
Liver	ERT (endocrine)	Hemophilia A <sup>a</sup>	Factor VIII	Chronic injection
		Hemophilia B <sup>a</sup>	Factor IX	
		Crigler-Najjar syndrome <sup>a</sup>	UGT1A1	
	ERT (intracrine)	Methylmalonic acidemia <sup>a,b</sup>	MMUT	Chronic injection
		Propionic acidemia <sup>a,b</sup>	PCCA/PCCB	
		OTC deficiency <sup>b</sup>	OTC	
		Glycogen storage disease type 1A <sup>b</sup>	Glucose-6 phosphatase	
Gene editing (intracrine)	Transthyretin amyloidosis <sup>a,b</sup>	Cas9/TTR	Single injection	
	Hereditary angioedema <sup>b</sup>	Cas9/KLKB1		
Lungs	ERT (intracrine)	Cystic fibrosis <sup>a,b</sup>	CFTR	Chronic injection
Heart	Regenerative (paracrine)	Heart failure <sup>a,b</sup>	VEGF-A	Single injection
	Antibody (intracrine)	Heart failure <sup>a</sup>	Anti-PLN intrabody	Single injection
Cancer	Immuno-oncology (intra- or endocrine)	Solid tumors <sup>b</sup>	IL-23, IL-36, OX40L IFN-2b, GM-CSF, IL-15 IL-7, CLDN6, IL-12, IL-2	Single injection
		Breast cancer <sup>b</sup>	Anti-HER2, CD40L, CD70, caTLR4	
	Antibody (endocrine)	Solid tumors <sup>b</sup>	Anti-CLDN18.2	Chronic injection
Autoimmunity	Immune tolerization (endocrine)	Autoimmune disorders <sup>b</sup>	HSA-IL2m	Single injection
		Autoimmune encephalomyelitis <sup>a</sup>	MOG <sub>35-55</sub>	Chronic injection
Multiple tissues	ERT (intra- or endocrine)	Fabry disease <sup>a</sup>	$\alpha$ -Gal A	Chronic injection
	Gene editing (intracrine)	Hereditary angioedema <sup>b</sup>	Cas9/KLKB1	Single injection

ERT, enzyme replacement therapy; UGT1A1, UDP glucuronosyltransferase family 1 member A1; MMUT, methylmalonyl-CoA mutase; PCCA, propionyl-CoA carboxylase- $\alpha$ ; PCCB, propionyl-CoA carboxylase- $\beta$ ; OTC, ornithine transcarbamylase; TTR, transthyretin; KLKB1, kallikrein B1; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; VEGF, vascular endothelial growth factor; PLN, phospholamban; IL, interleukin; OX40L, tumor necrosis factor superfamily member 4 (TNFSF4); IFN, interferon; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor; CLDN, claudin; HER2, ERB-B2 receptor tyrosine kinase 2; caTLR4, constitutively active Toll-like receptor 4; HSA, human serum albumin; IL2m, interleukin-2-mutem fusion protein; MOG<sub>35-55</sub>, myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide;  $\alpha$ -Gal A,  $\alpha$ -galactosidase-A. <sup>a</sup>See Supplementary Table 1 for further information. <sup>b</sup>See Supplementary Table 2 for further information.

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

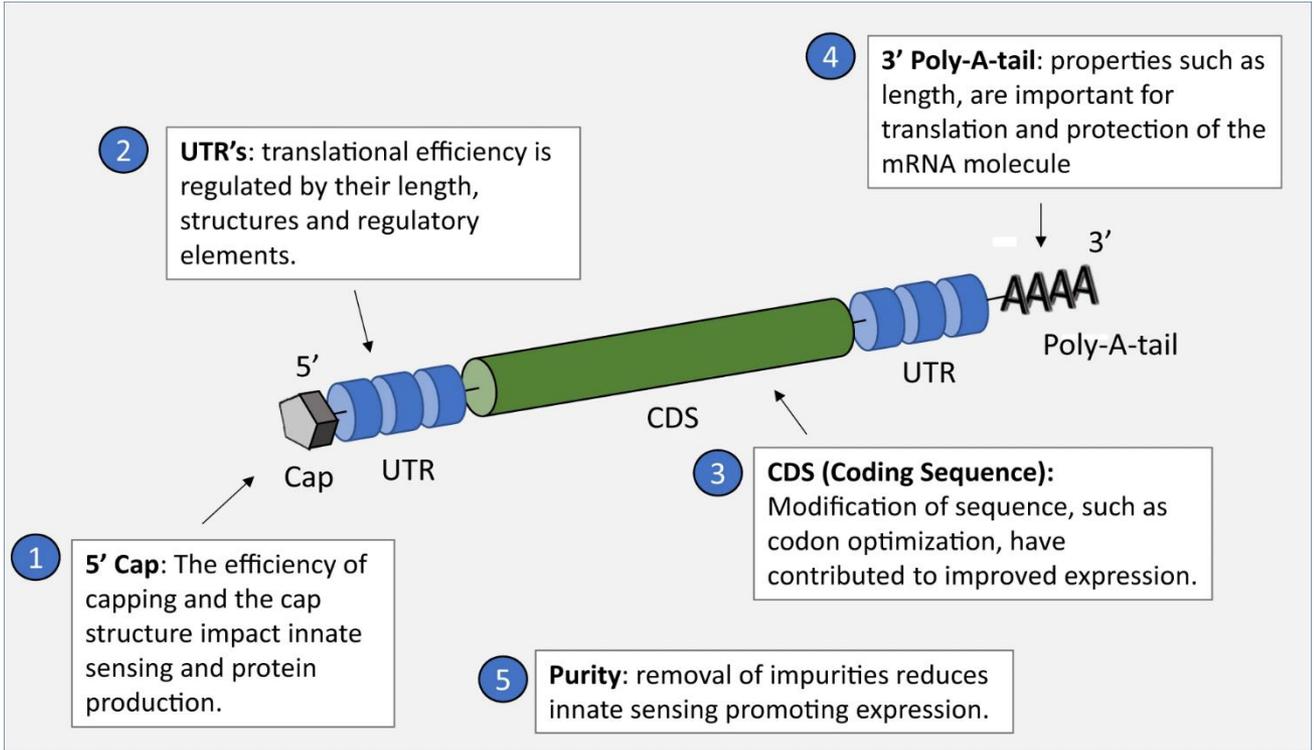
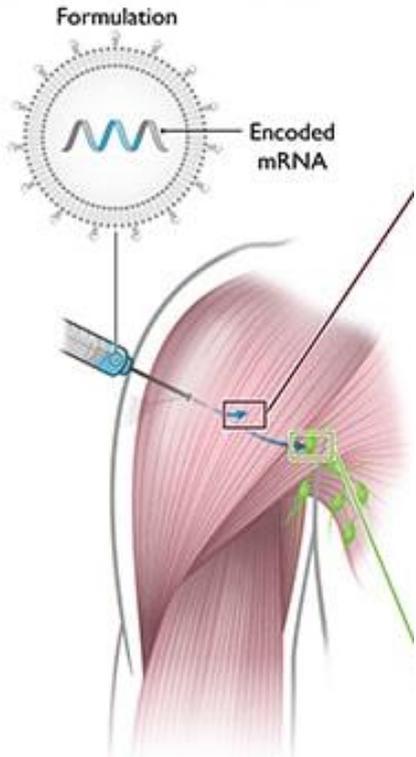
## Thérapies ARNm

Vaccines		Therapeutics	
<b>mRNA</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Low protein expression</li><li>• Immunogenicity favorable</li></ul>	<b>mRNA</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prolonged mRNA stability</li><li>• High protein expression</li><li>• Minimization of immunogenicity</li></ul>
<b>Carrier</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Protection against RNase</li><li>• No tropism necessary</li><li>• Adjuvant immunogenic capacity</li></ul>	<b>Carrier</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Protection against RNase</li><li>• Cell- or tissue-specific tropism</li><li>• Immune cloaking</li></ul>
<b>In vivo delivery</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Local intramuscular delivery</li><li>• Low mRNA dosage</li><li>• Low toxicity risks</li></ul>	<b>In vivo delivery</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Solid organ direct delivery</li><li>• Systemic delivery (liver)</li><li>• High mRNA dosage</li><li>• High delivery efficiency</li><li>• Higher toxicity risks</li></ul>
<b>Pharmacokinetics</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Low protein threshold</li><li>• Effect amplified by the immune system</li></ul>	<b>Pharmacokinetics</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• High protein therapeutic threshold</li><li>• Limited duration of action</li><li>• Chronic delivery</li><li>• Effect repressed by the immune system</li></ul>
<b>Clinical target</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Immune protection</li><li>• Circulating antibodies</li><li>• Immune memory</li></ul>	<b>Clinical target</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Enzyme replacement</li><li>• Solid cancer</li><li>• Tissue regeneration</li><li>• Gene editing</li><li>• Antibody therapy</li></ul>

*Pb: Chronic delivery may induce activation of innate immunity*

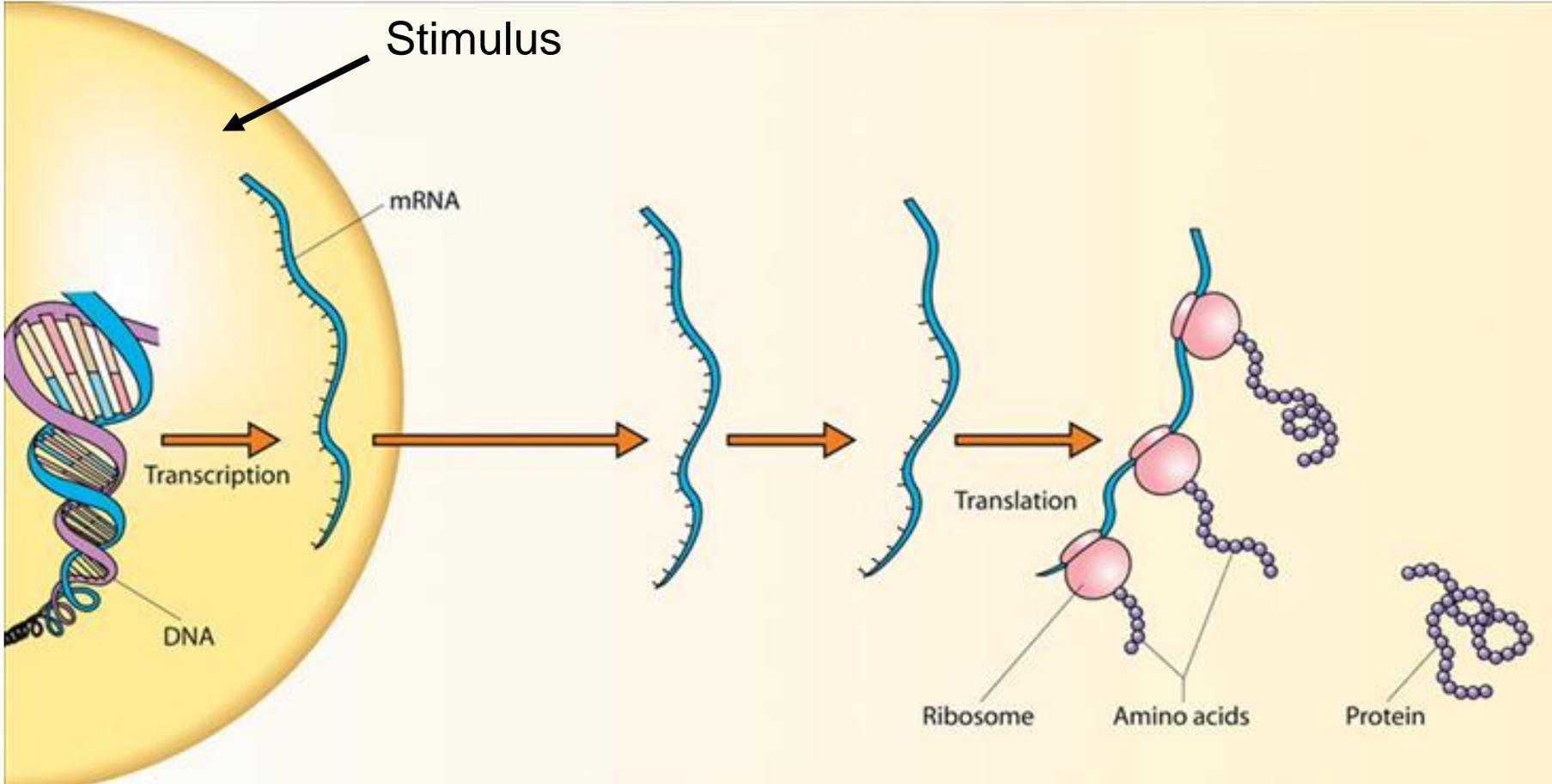
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Thérapies ARNm



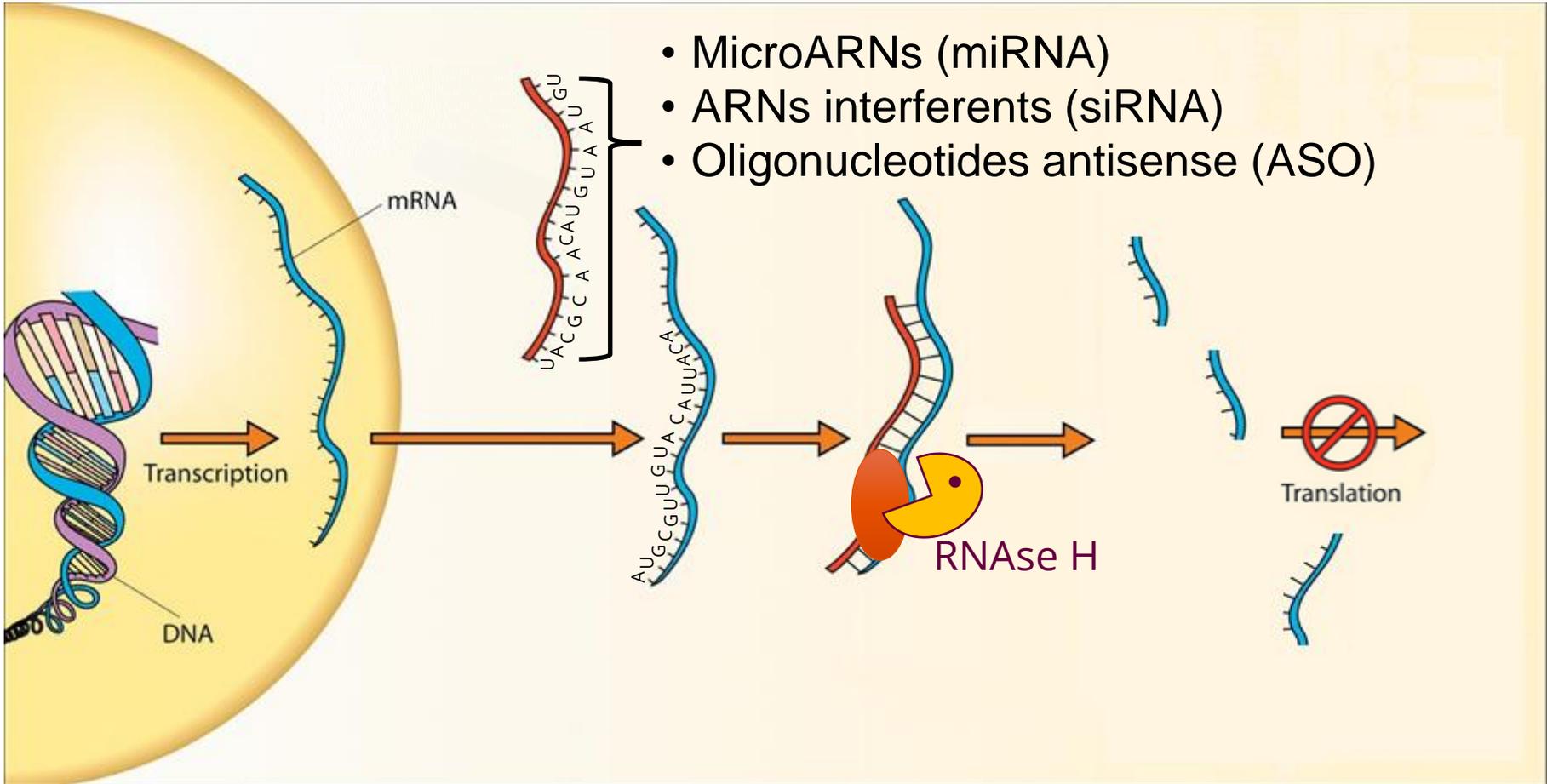
Moderna  
Nicholas A. C. Jackson et al, npj Vaccines 5 (2020)

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques



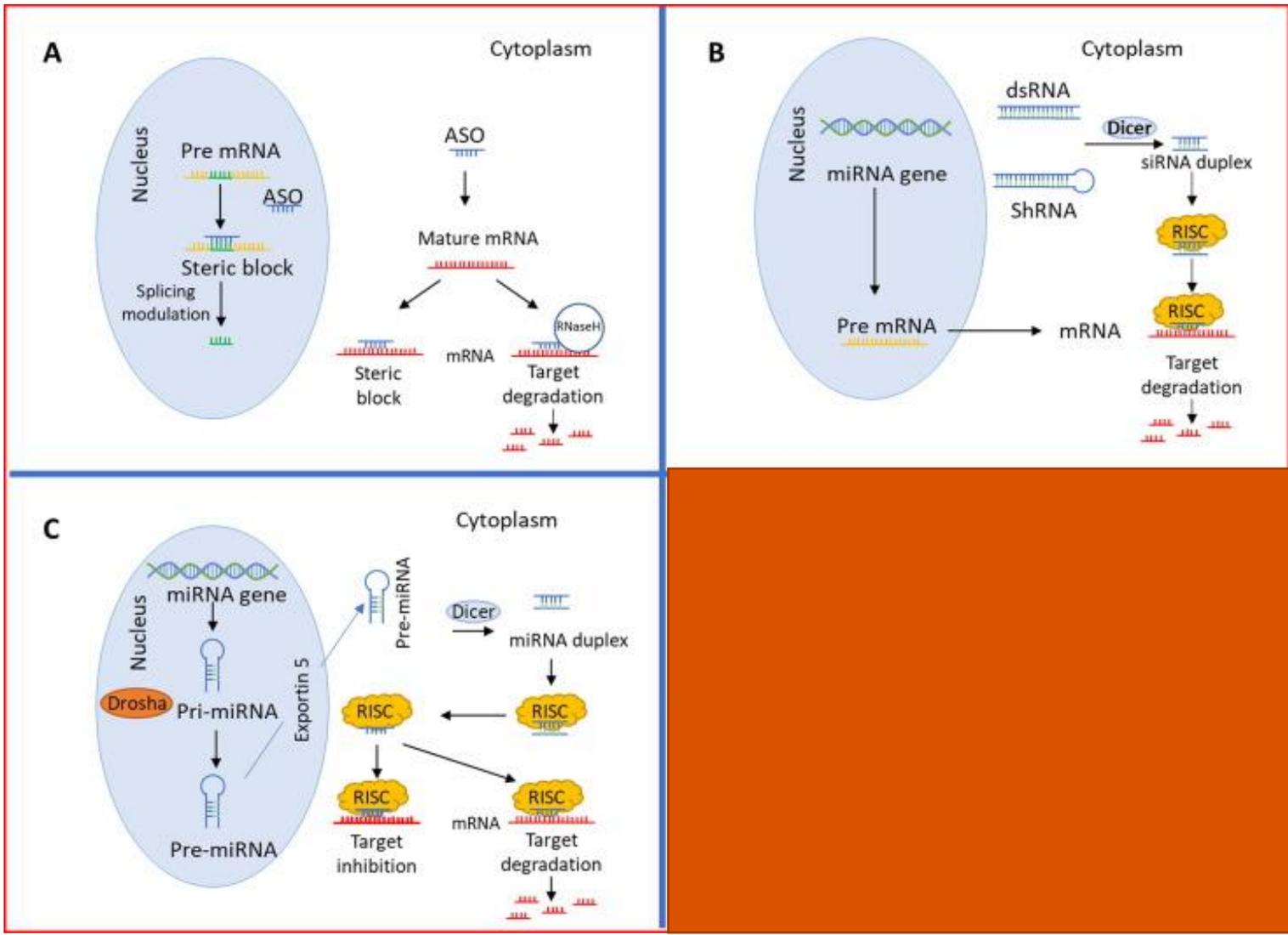
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## ARNs interférents



# Nucleic acids as Therapeutics

## ARNs interferences



# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

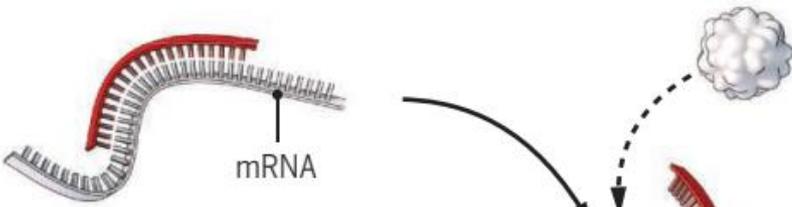
## ASOs

### Reducing pathological protein expression

Antisense oligonucleotides (ASOs) are small, single-stranded DNAs that can bind specific RNA sequences on precursor messenger RNAs (pre-mRNAs) and mRNAs. The resulting RNA-DNA hybrid can induce ribonuclease H1 (RNase H1) degradation of the targeted RNA, modulation of splicing, or blockade of translation.

#### Target mutations

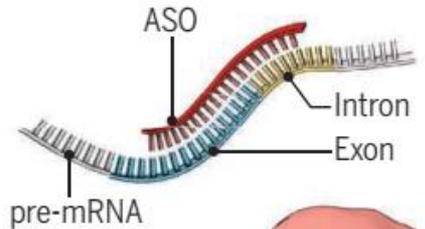
ASOs can target RNA transcripts that produce disease-causing proteins.



RNase H1 degrades RNAs in DNA-RNA hybrids

#### Target splice sites

Unique sequences at splice sites in pre-mRNAs can allow ASOs to modulate RNA splicing.

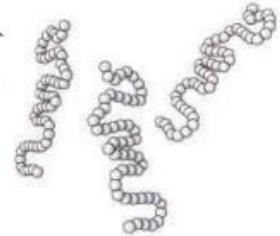
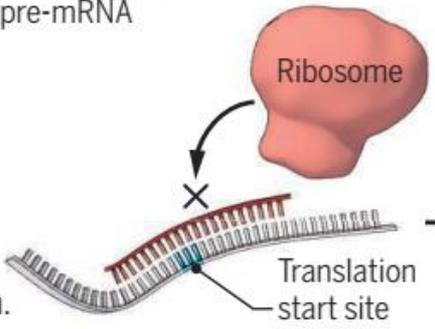


#### Reduced protein amounts

Targeted degradation of RNA or modulation of splicing or translation reduces the expression of disease-causing proteins.

#### Target translation start sites

ASOs can selectively target translation start sites in mRNAs, which prevents protein translation.



↓ Pathological protein production

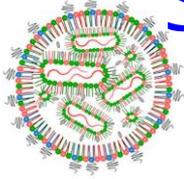
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## ASOs

No.	ASO Drug	Approval Year	Indication	Mechanism	Ref.
1	Fomivirsen (Vitravene®)	1998	Cytomegalovirus (CMV) retinitis	Downregulate the gene encoding CMV immediate-early 2 protein	[9,10]
2	Mipomersen (Kynamro®)	2013	Familial hypercholesterolemia (FH)	Downregulate the gene <i>APOB</i> encoding apolipoprotein B	[11,12]
3	Eteplirsen (Exondys 51®)	2016	Duchenne muscular dystrophy (DMD)	Rescue the expression of dystrophin through exon-51 skipping of the mRNA of <i>DMD</i> gene	[13–16]
4	Nusinersen (Spinraza®)	2016	Spinal muscular atrophy (SMA)	Increase the production of the survival motor neuron (SMN) protein by exon-7 inclusion of the mRNA of <i>SMN2</i> gene	[17–20]
5	Inotersen (Tegsedi®)	2018	Hereditary transthyretin (TTR) amyloidosis	Downregulate the gene <i>TTR</i> encoding transthyretin	[21,22]
6	Golodirsen (Vyondys 53®)	2019	DMD	Rescue the expression of dystrophin through exon-53 skipping of the mRNA of <i>DMD</i> gene	[23]
7	Viltolarsen (Viltepso®)	2020	DMD	Rescue the expression of dystrophin through exon-53 skipping of the mRNA of <i>DMD</i> gene	[24]
8	Casimersen (Amondys 45®)	2021	DMD	Rescue the expression of dystrophin through exon-45 skipping of the mRNA of <i>DMD</i> gene	[25]

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

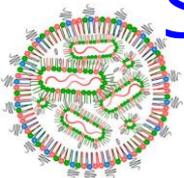
## SiRNA : Patisiran (Onpattro)



- FDA/EMA 2018: Amylose héréditaire à transthyréline (TTR)
- SiRNA contre TTR mRNA dans des LPNs

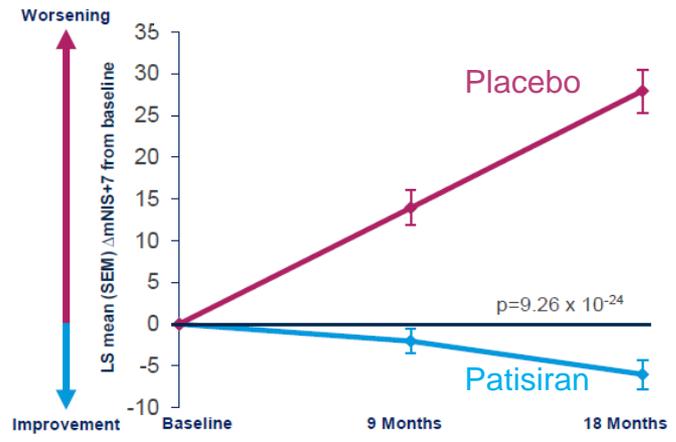
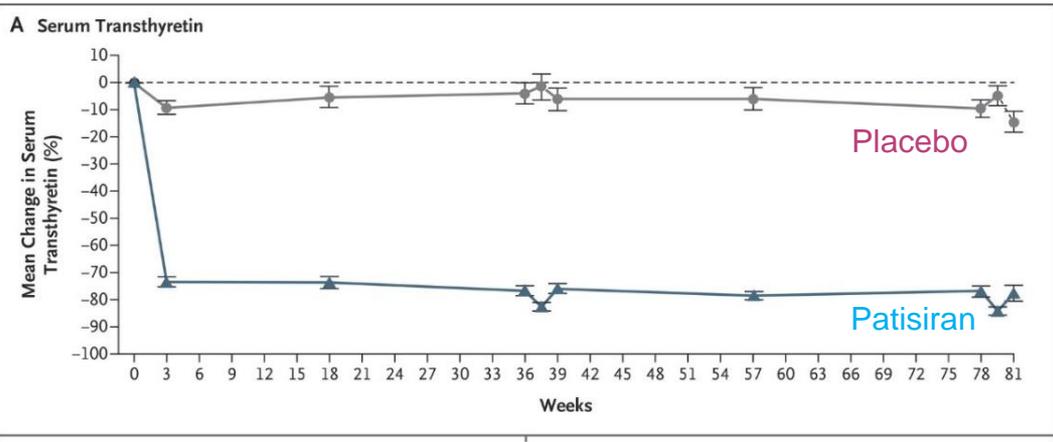
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## SiRNA : Patisiran (Onpattro)



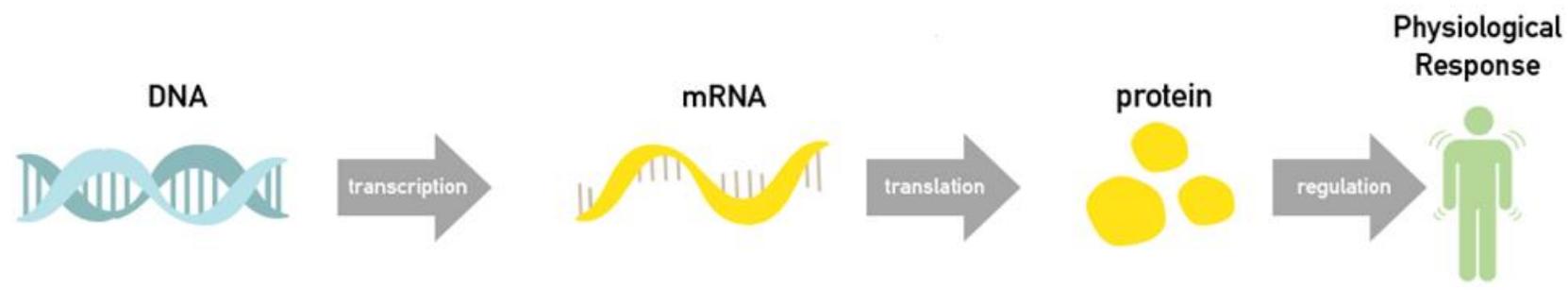
- FDA/EMA 2018: Amylose héréditaire à transthyréline (TTR)
- SiRNA contre TTR mRNA dans des LPNs

⊖ Transthyréline produide      ⊖ fibrilles amyloïdes      ⊖ Signes cliniques



# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

- Rajout ADN
- Rajout ARNs
- **Autres**

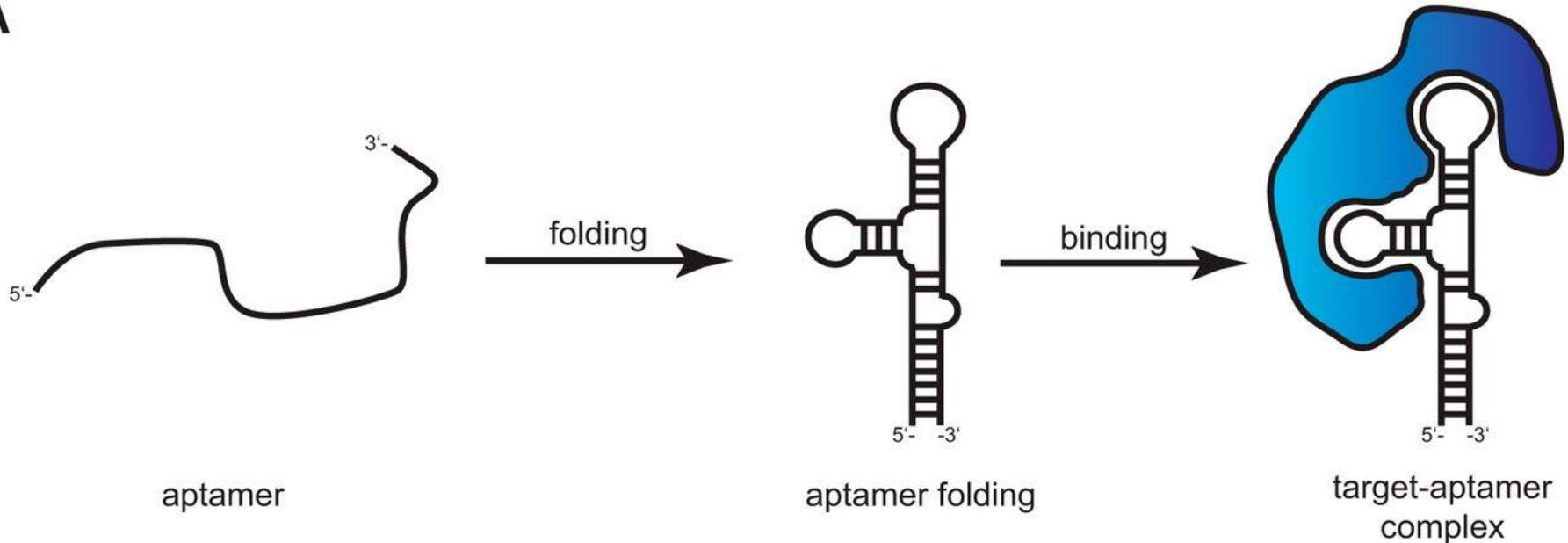


- Supprimer ADN
- Modifier ADN
- Destruction ARNs

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Aptamères

A

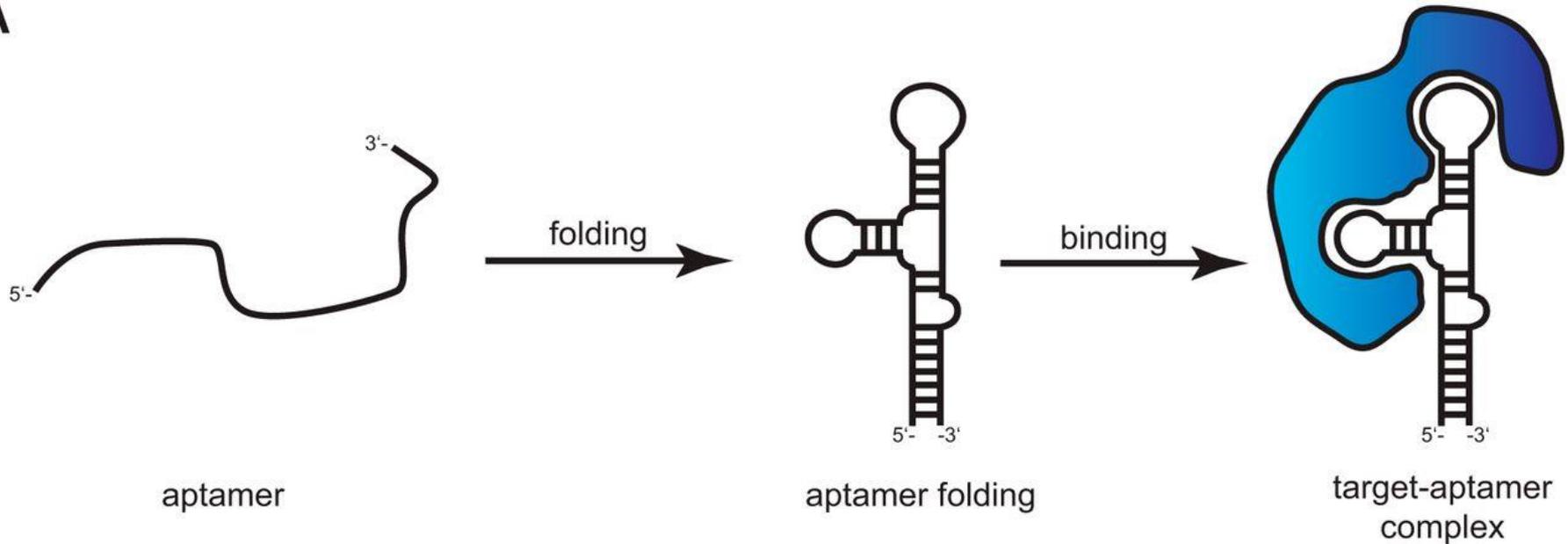


- **Oligonucléotides ADN ou ARN simple brin de 15-60 b capables de se lier avec une haute affinité à des ligands**
- **Ligands** : de toutes tailles, simples ou complexes : acides nucléiques, protéines, composés organiques, organismes (virus, bactéries)...

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Aptamères

A



Avantages par rapport anticorps :

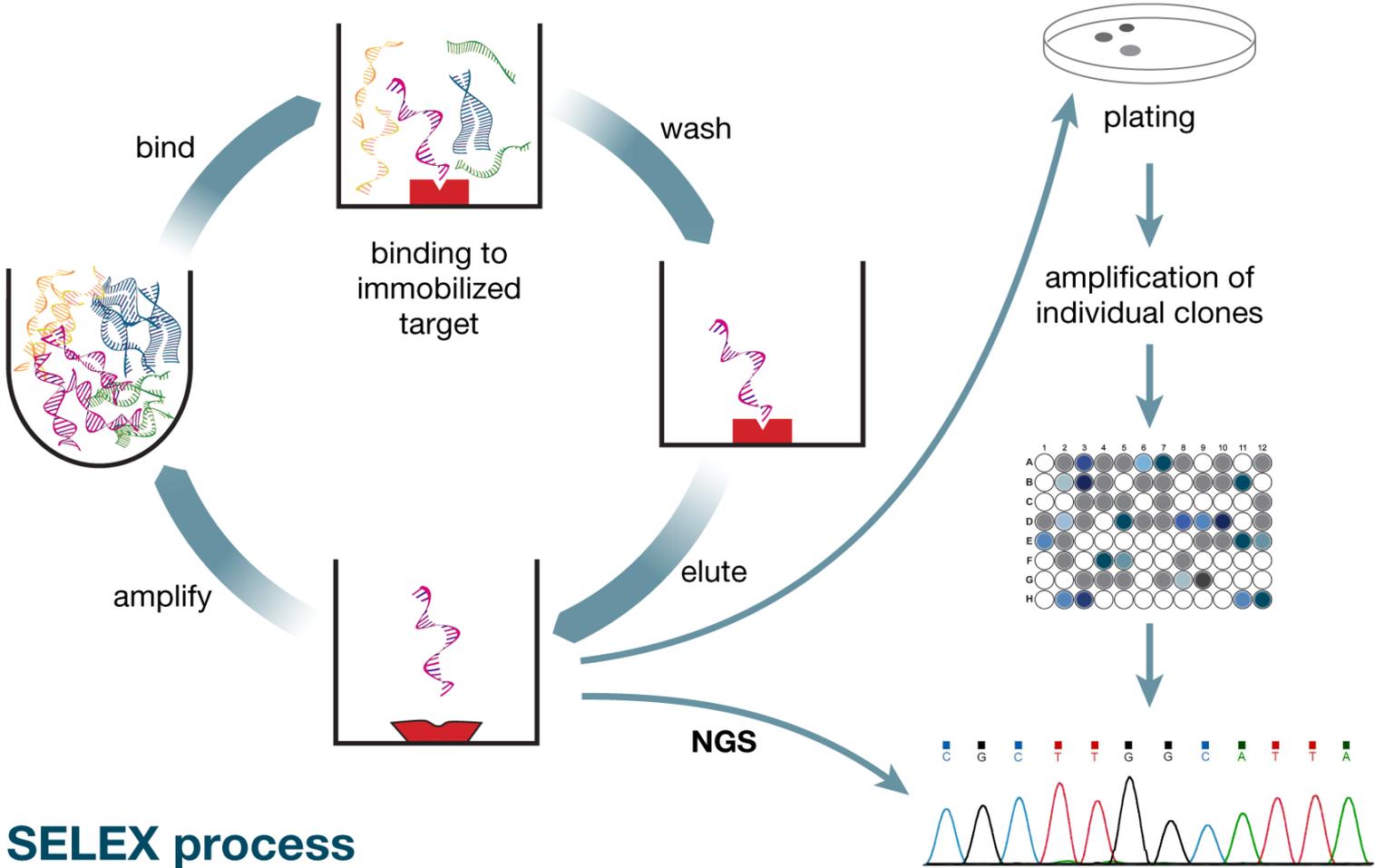
- **Affinité** de liaison élevée
- Faciles à manipuler in vitro, **stables**
- **Moins immunogènes, moins toxiques**
- **Coûts** de production plus faibles

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Aptamères

- Sélection *in vitro* itérative : méthode SELEX

ssRNA or ssDNA Library



The SELEX process

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Aptamères : Macugen

### Mécanisme d'action

Le pegaptanib est un oligonucléotide modifié pégylé qui se lie avec une haute spécificité et affinité au facteur de croissance vasculaire endothélial extracellulaire (VEGF<sub>165</sub>) en inhibant son activité. Le VEGF est une protéine sécrétée qui induit une angiogenèse, une perméabilité vasculaire et une inflammation, tous ces facteurs étant considérés comme contribuant à la progression de la forme néovasculaire (humide) de la DMLA.



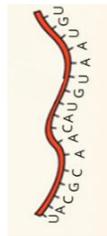
*Approuvé FDA 2004, EMA 2005*

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

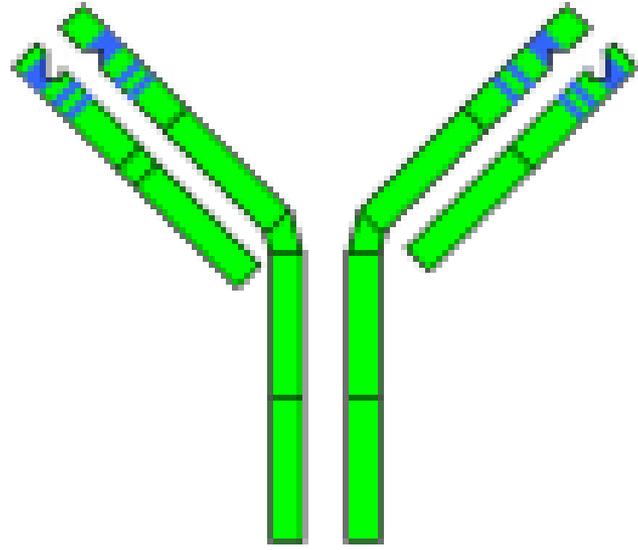
## Barrières



Aspirine 0,18 kda



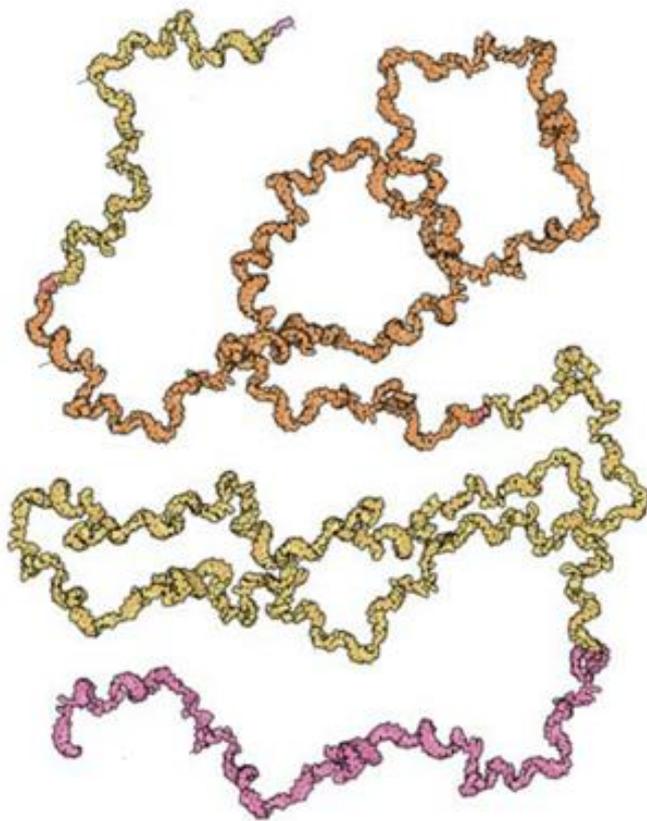
RNAi ~ 10 kDa



Anticorps 150 kda

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Barrières



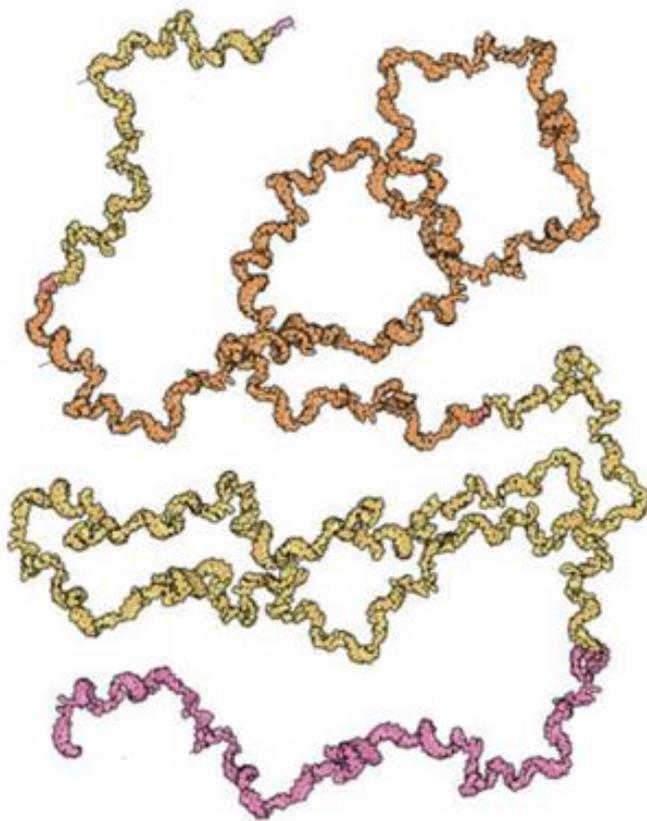
Aspirine 0,18 kda

mRNA ~400 kDa

Anticorps 150 kda

# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

- Non stable dans le corps
- Ne rentre pas naturellement dans les cellules



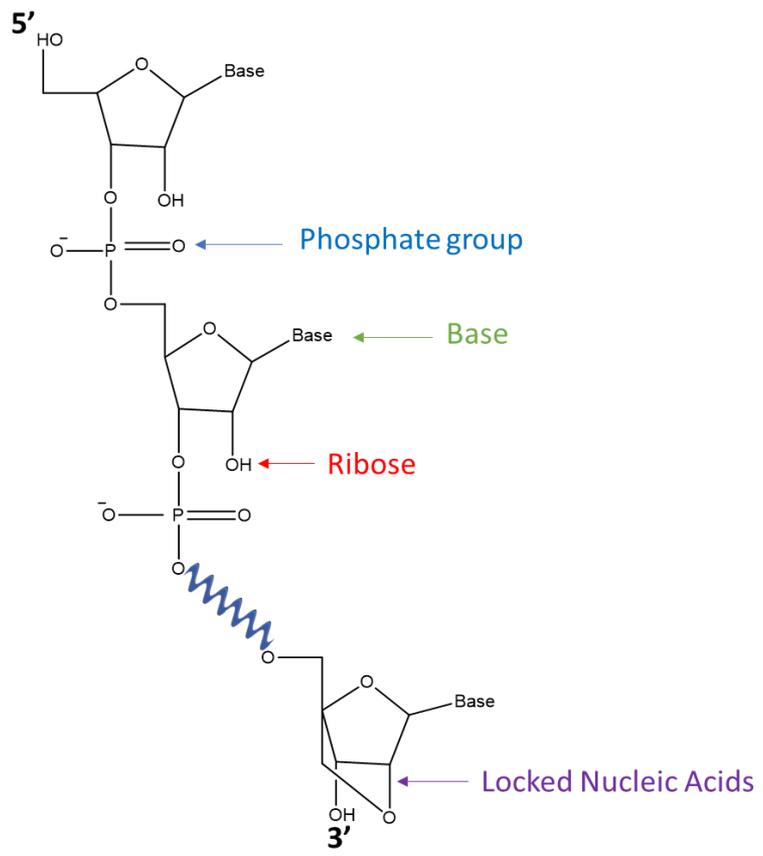
Aspirine 0,18 kDa

mRNA ~400 kDa

Anticorps 150 kDa

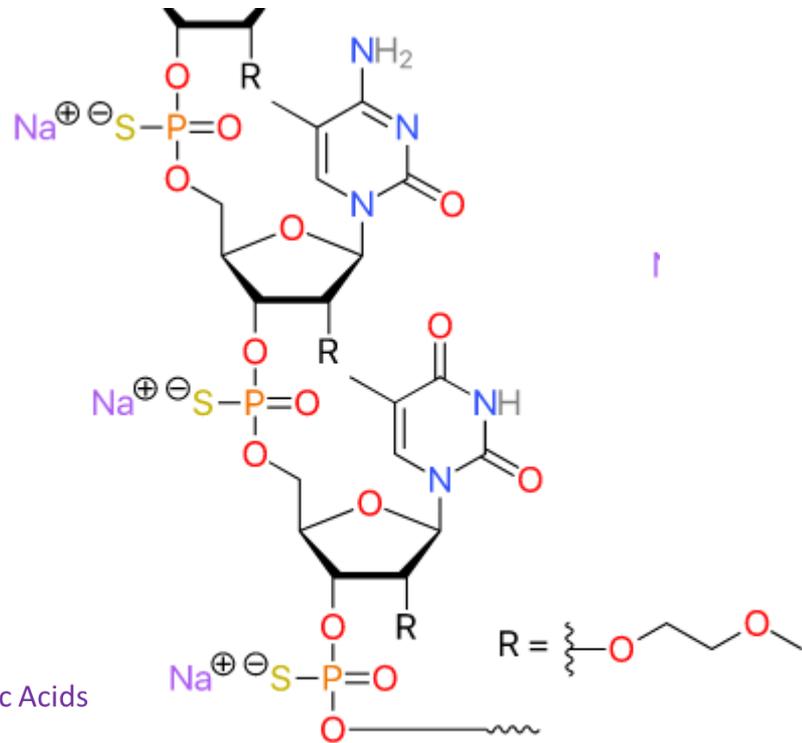
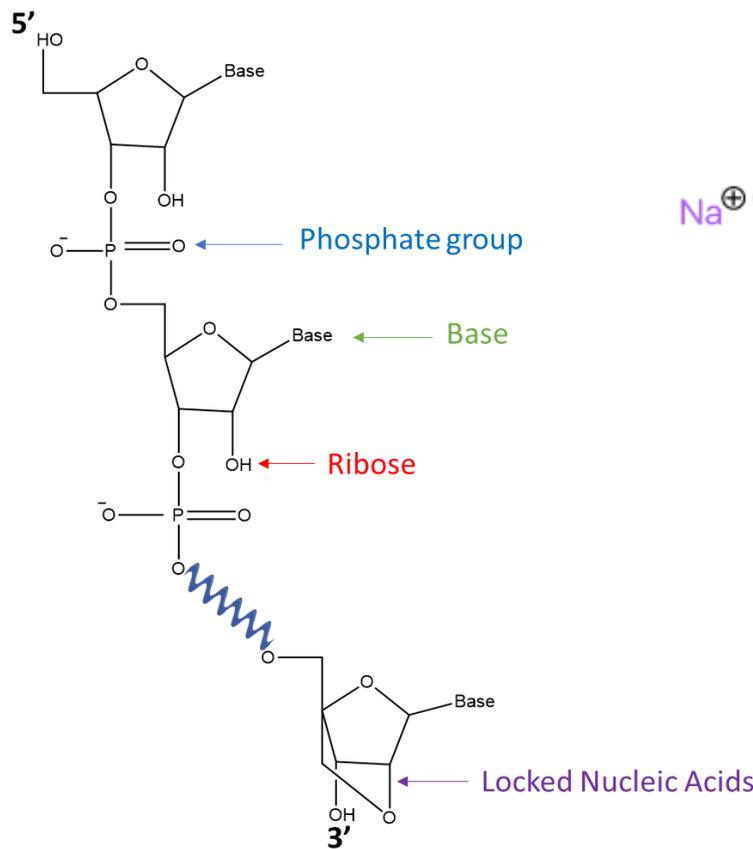
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Modifications possibles



# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## ASO : nusinersen (Spinraza)

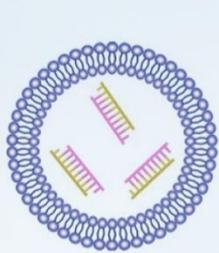


Spinraza is an 18-mer oligonucleotide: where the 2'-hydroxy groups (OH) of the ribofuranosyl rings are replaced with methoxyethyl groups and the phosphodiester internucleotide linkages are replaced with phosphorothioate diester internucleotide linkages.

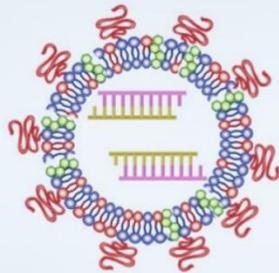
# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

## Vectorisation

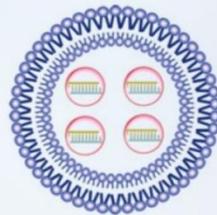
## Lipid-based nanoparticles



Liposome

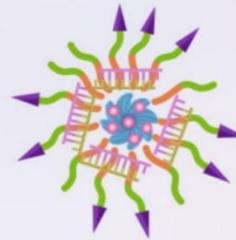


LNP

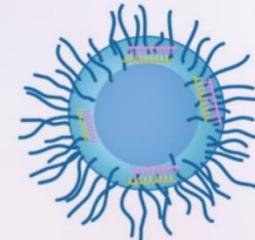


Lipopolyplex

## Polymer-based nanoparticles



Polymeric NPs

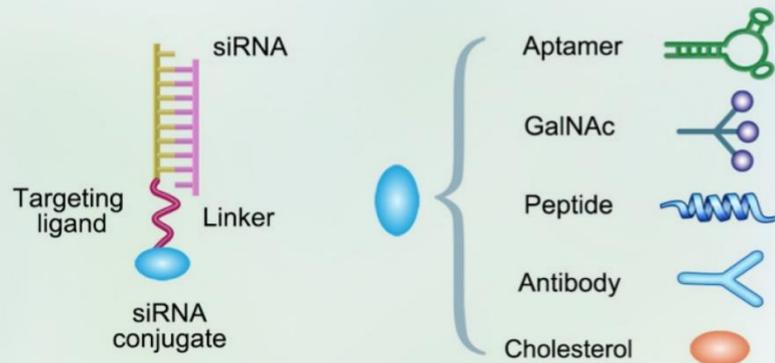


Polymeric micelles

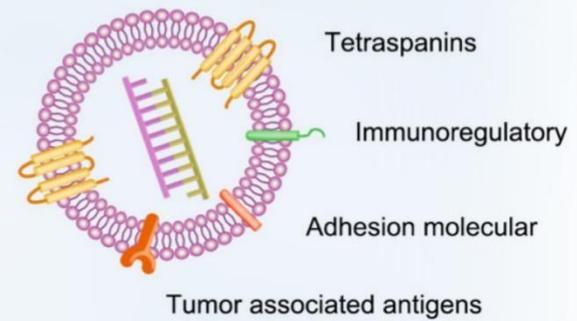


Dendriplex

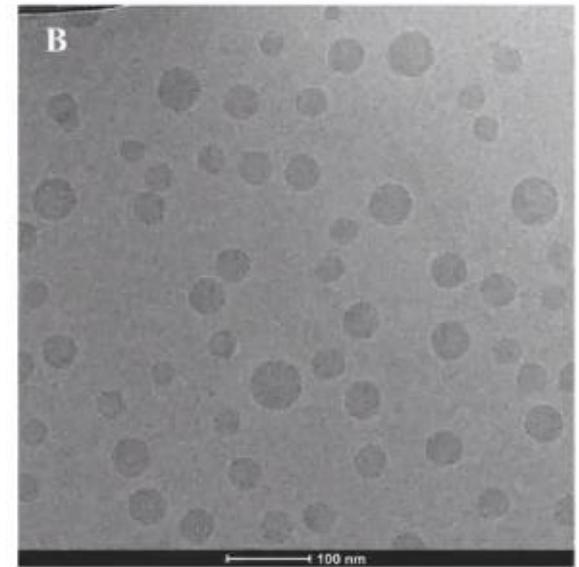
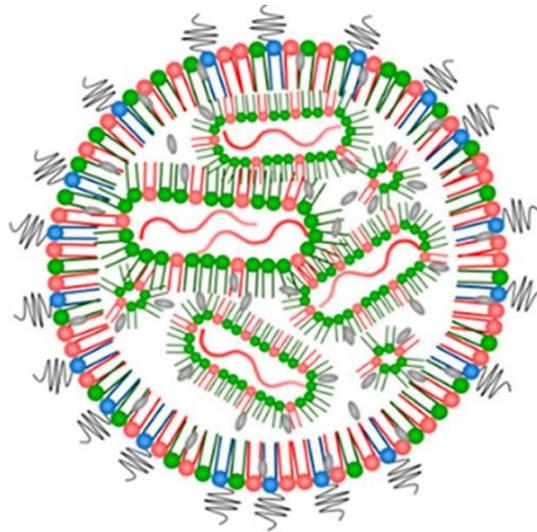
## siRNA-ligand conjugates

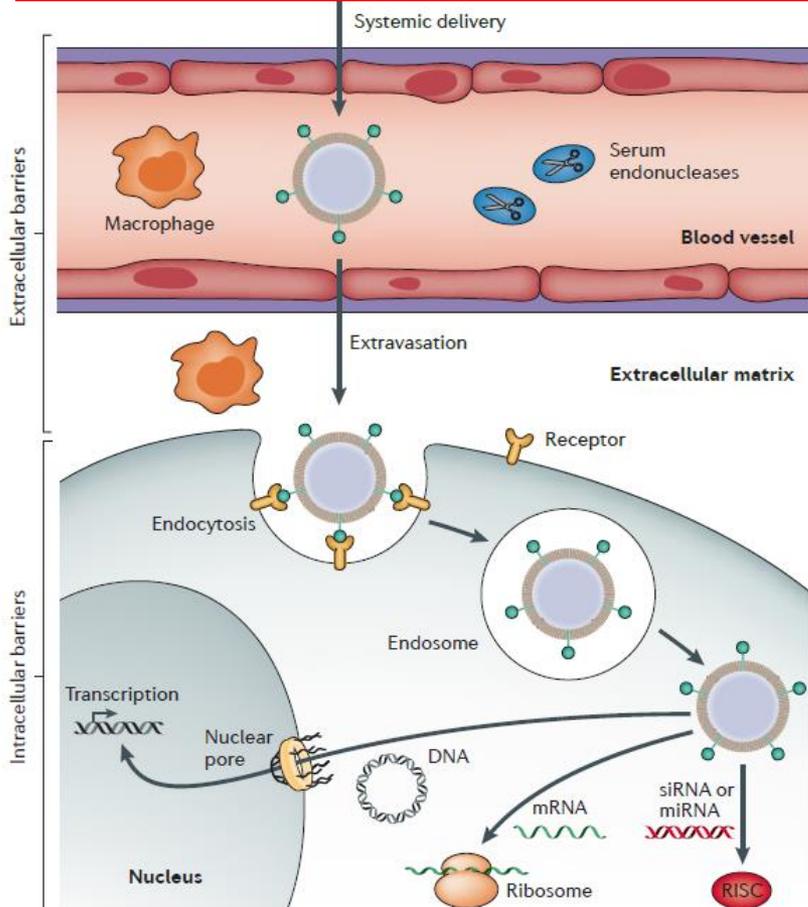
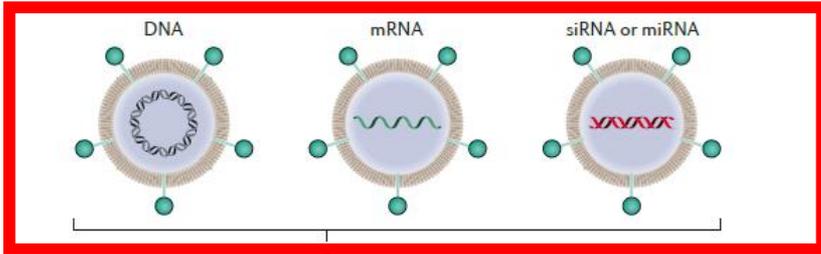


## Exosomes



	≈ molar lipid ratio (%)
Ionizable lipid 	50
DSPC 	10
DMG-PEG 	1,5
Cholesterol 	38,5
SiRNA 	6 N/P molar ratio

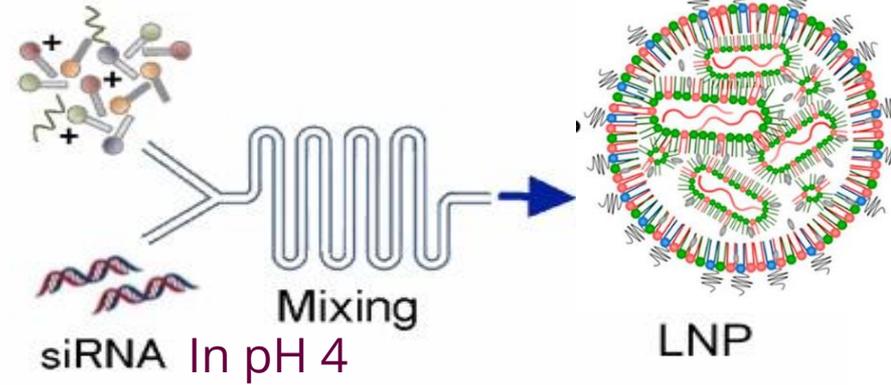




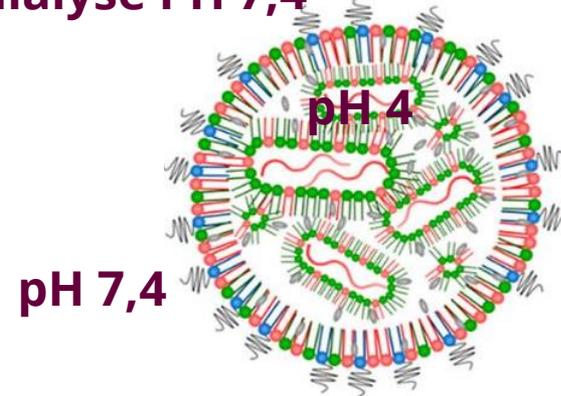
## LNP

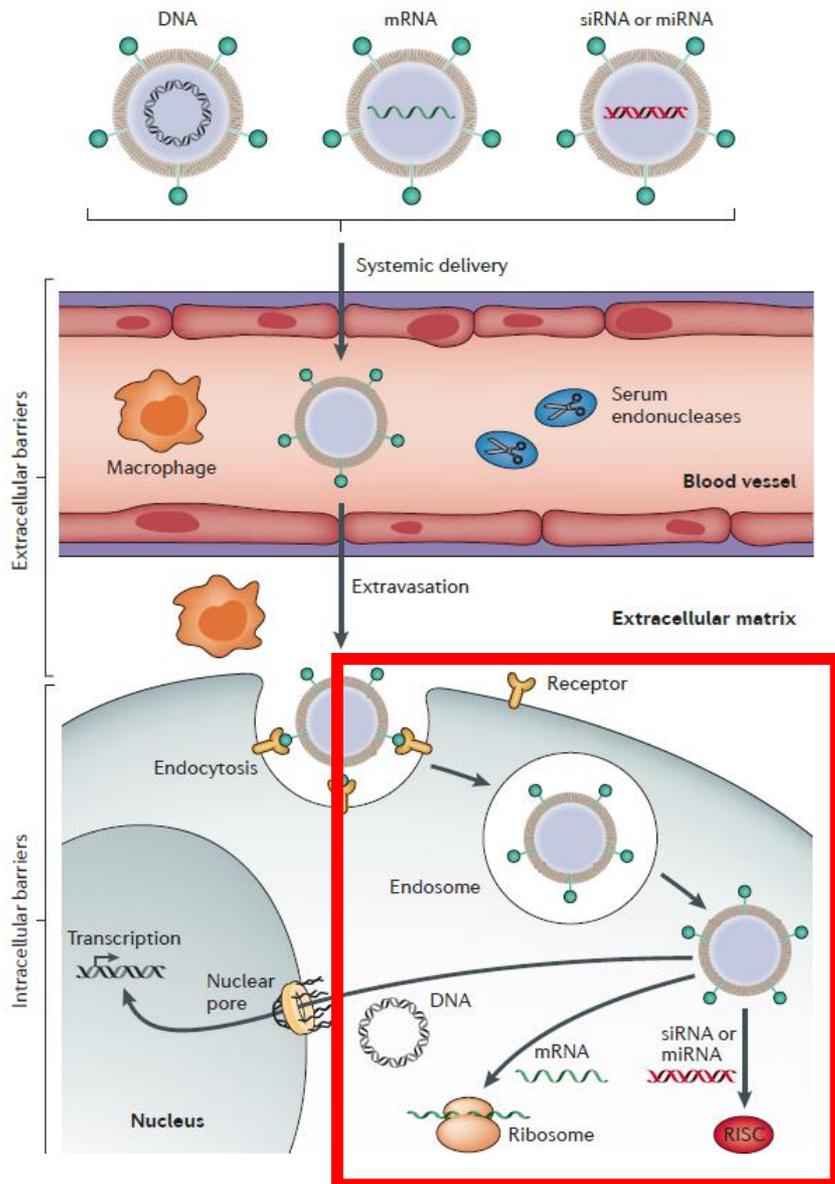
### 2) mixing

Lipids in Ethanol

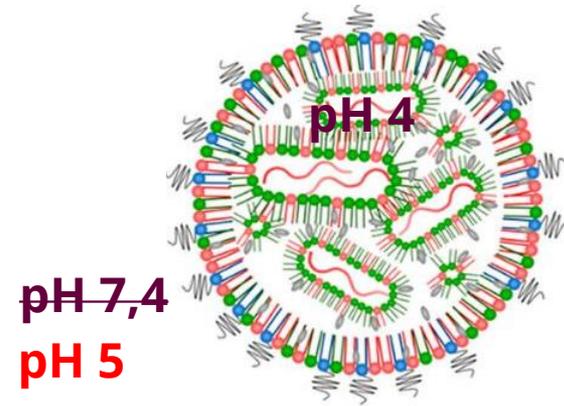
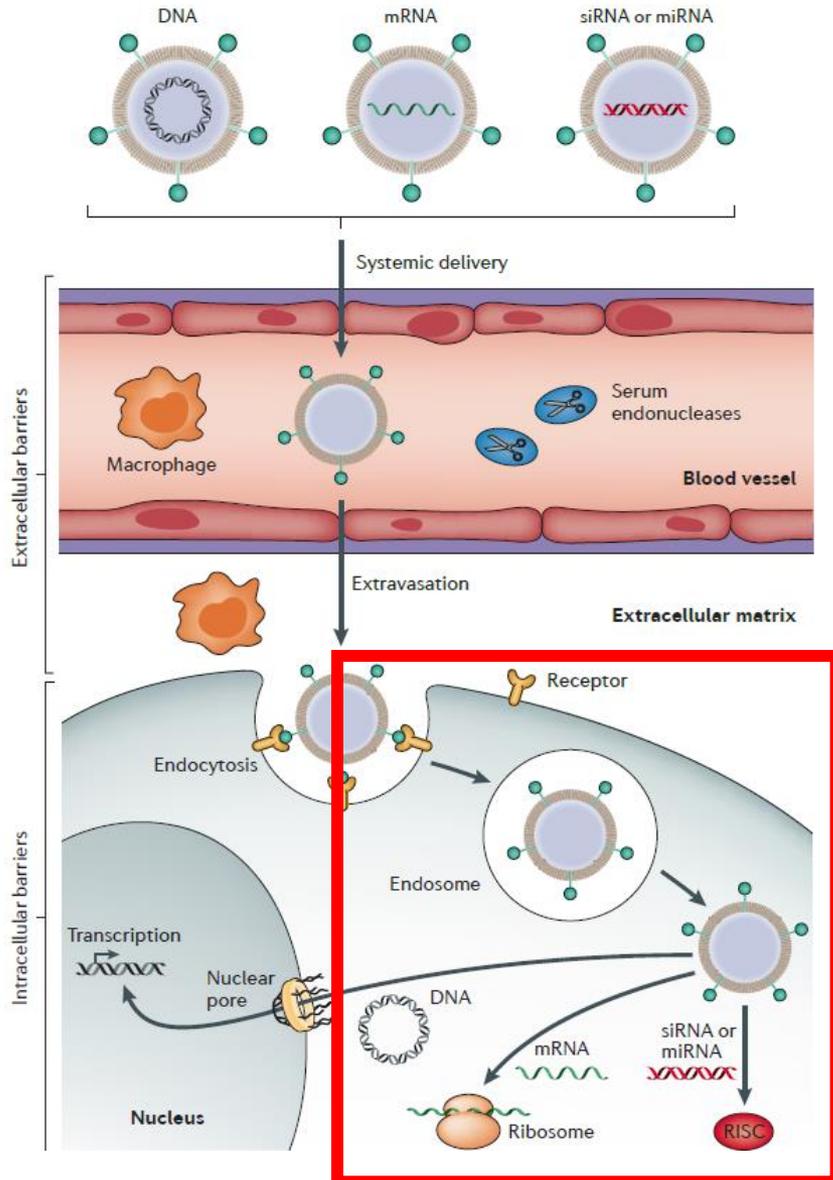


### 2) dialyse PH 7,4

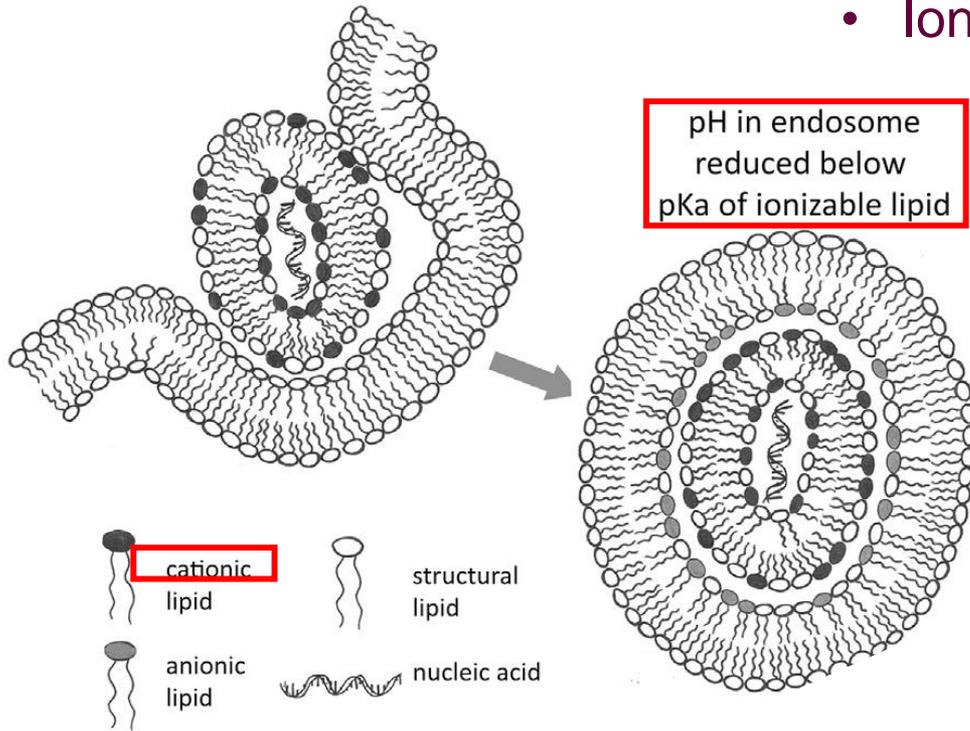




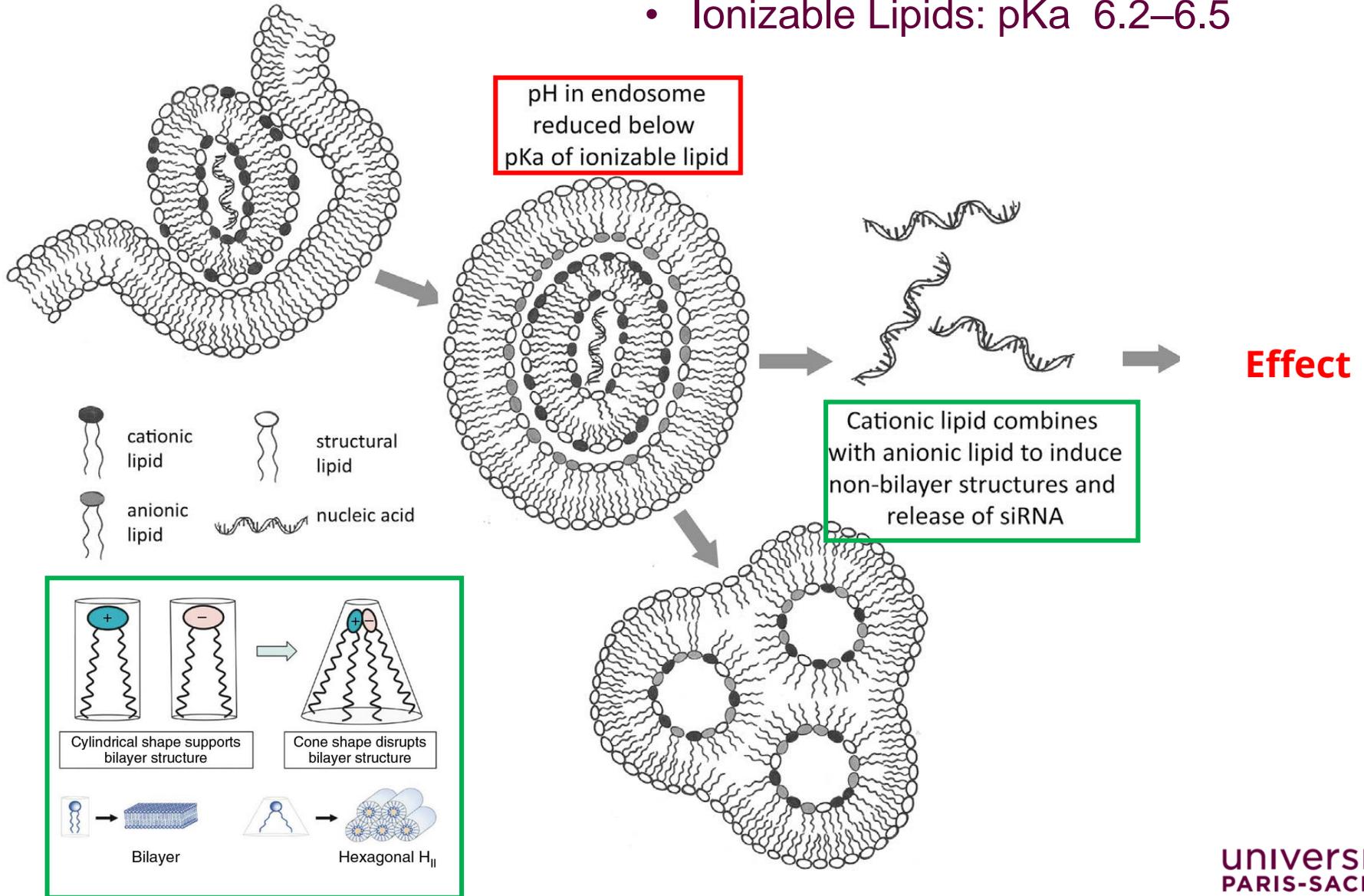
- Ionizable Cationic Lipids: pKa 6.2–6.5



- Ionizable Lipids: pKa 6.2–6.5

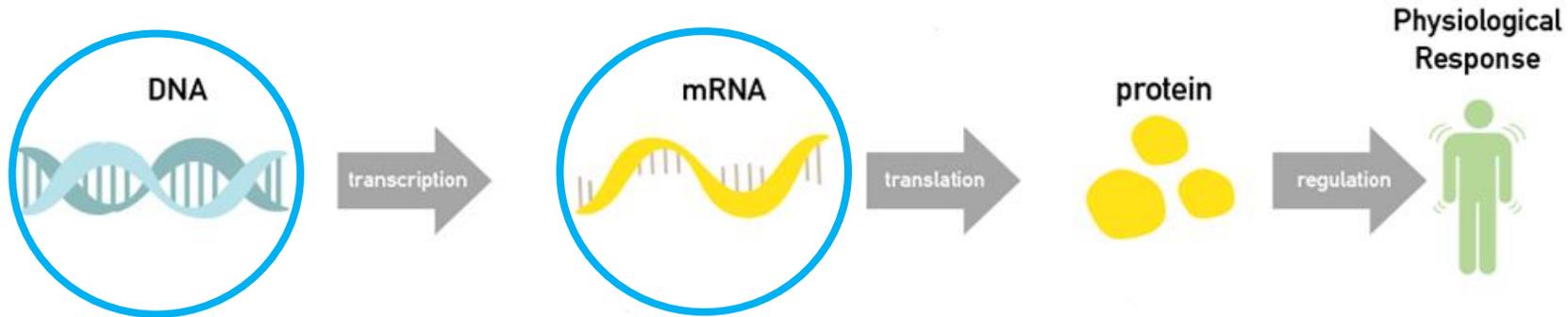


- Ionizable Lipids: pKa 6.2–6.5



# Acides nucléiques à visées thérapeutiques

- Rajout ADN
- Rajout ARNs
- Autre



- Supprimer ADN
- Modifier ADN
- Bloquer/modifier traduction