



HAL
open science

Stratégies thérapeutiques pour l'application clinique des ARN interférents

E. Fattal

► **To cite this version:**

E. Fattal. Stratégies thérapeutiques pour l'application clinique des ARN interférents. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2020, 204, pp.1088 - 1097. 10.1016/j.banm.2020.06.013 . hal-03493848

HAL Id: hal-03493848

<https://hal.science/hal-03493848>

Submitted on 16 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Stratégies thérapeutiques pour l'application clinique des ARN interférents*

Novel therapeutic strategies for clinical applications of interfering RNA

Elias Fattal

Professeur de Pharmacie Galénique et Biopharmacie

Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Galien Paris Sud, 92296, Châtenay-Malabry, France.

elias.fattal@universite-paris-saclay.fr

*Séance du 29 septembre 2020

Résumé : La régulation de l'expression des gènes a soulevé de nombreux espoirs pour la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il en est ainsi des petits ARN interférents (ARNi) capables de moduler l'expression d'un grand nombre de gènes. Cependant, malgré leur potentiel, les ARNi sont peu stables dans les fluides biologiques. De plus, ces molécules hydrophiles et chargées négativement doivent être chimiquement modifiées ou vectorisées pour pouvoir pénétrer au sein des cellules cibles et atteindre le cytoplasme afin d'induire l'inhibition génique. Des modifications chimiques ont été apportées aux structures de base des ARNi qui, malheureusement, favorisent les effets hors cible. Des conjugués lipidiques adressés vers le foie ou encore des nanotechnologies lipidiques à tropisme hépatique sont les plus avancés en clinique. La présente revue se concentre sur ces différentes stratégies et met en relief des approches nouvelles et prospectives pour adresser les ARNi vers d'autres tissus de l'organisme que le foie.

Summary: The regulation of gene expression has raised many hopes for the discovery of new therapeutic strategies. This is the case of small interfering RNA (siRNA), that can modulate the expression of various genes. However, despite their potential, siRNA are unstable in biological fluids. Moreover, due to their hydrophilicity and overall negative charge, these molecules must be chemically modified or addressed by nanotechnologies to be able to penetrate target cells and reach the cytoplasm to induce gene inhibition. Chemical modifications have been made to the basic structure of siRNA which have unfortunately been accompanied by off-target effects. Lipid conjugates addressed to the liver or lipid nanotechnology with liver affinity are the most advanced systems in the clinic. This review focuses on these different strategies and highlights new and prospective approaches to address siRNA to other tissues of the body than the liver.

MOT CLES : ARN interférents ; Conjugué galactosylé ; liposomes ; nanoparticule lipidique

KEYWORDS: Small interfering RNA; galactosylated conjugate; liposomes; lipid nanoparticle

INTRODUCTION

L'avancée des connaissances en épigénétique a permis la découverte de nouvelles approches thérapeutiques telles que les inhibiteurs des histones-désacétylases ou ceux de la méthylation de l'ADN très actifs dans le traitement des leucémies. La découverte des petits ARN non codants a aussi représenté une percée considérable pour l'utilisation des acides nucléiques dans la régulation de l'expression des gènes. Dans ce domaine, et jusque dans les années 1990, les recherches avaient uniquement porté sur les oligonucléotides antisens [1]. La découverte plus récente des petits ARN non codants a ouvert un champ considérable pour manipuler artificiellement l'expression des gènes par l'utilisation de plusieurs stratégies dont celle des petits ARNs interférents (ARNi), bien plus efficaces que les oligonucléotides antisens. Ils font à ce jour l'objet de nombreuses études cliniques [2].

Les microARN (miARN), qui sont des petits ARNs naturels, représentent également des cibles thérapeutiques potentielles. En effet, les miARN constituent une classe de petites molécules d'ARN endogènes non codantes qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes ayant un impact sur la différenciation, la prolifération et la survie des cellules [3]. Ainsi, l'expression aberrante de miARN serait impliquée dans de nombreuses pathologies. Si les miARN subissent une perte d'expression, la séquence correspondante sera supplémentée. S'ils sont surexprimés, il sera également possible de les bloquer par l'utilisation d'acides nucléiques nommés antagomir ou antimir et dont le mécanisme d'action est très similaire à celui des oligonucléotides antisens.

Malheureusement, l'utilisation thérapeutique de ces différents acides nucléiques est sérieusement entravée par leur faible stabilité dans les fluides biologiques et leur faible pénétration intracellulaire. Dans le domaine de l'interférence, les chercheurs ont envisagé des solutions pour l'administration des ARNi à l'aide de systèmes capables de les adresser vers leur cible sans qu'ils ne subissent aucune dégradation et qu'ils puissent être internalisés en grande quantité par les cellules cibles. L'objectif du présent article est de faire état de la percée clinique très récente des stratégies thérapeutiques pour l'administration des ARNi.

POTENTIEL THERAPEUTIQUE DES ARN INTERFERENTS

Cibles moléculaires des ARNi

Les ARNi ont été découverts en montrant que l'introduction de long ARN double brin (ARNds) dans une variété d'hôtes pouvait induire une extinction post-transcriptionnelle des gènes et/ou transgènes hôtes homologues [2,4]. Dans le compartiment intracellulaire, les ARNds sont métabolisés en ARNi par l'action d'une ribonucléase endogène dénommée DICER [2,4–6]. Depuis cette découverte, les chercheurs ont développé des séquences d'ARNi exogènes qui sont aujourd'hui largement utilisées pour inhiber l'expression des gènes d'intérêt (Figure 1). Les ARNi sont constitués d'ARN double brin de 21 à 23 paires de bases qui se lie à un complexe protéique cytoplasmique, connu sous le nom de RISC (pour « RNA silencing complex ») (Figure 1). Lors de l'assemblage avec le RISC, l'un des deux brins de l'ARNi, appelé brin « passager », est libéré, tandis que l'autre brin (brin « guide ») se lie à la protéine argonaute, Ago2 [7] (Figure 1). La protéine Ago2 achemine le brin « guide » vers sa séquence cible complémentaire sur l'ARNm (Figure 1) [8]. Sur l'ARNi, il existe une région

dénommée « seed » constituée par les nucléotides 2 à 7 à l'extrémité 5' du brin guide. Ces six nucléotides forment une région parfaitement exposée et disponible pour une interaction de base à base avec l'ARN ciblé produisant un appariement parfait [9,10]. L'ARNm est finalement clivé par l'activité RNase H située dans le domaine PIWI de la protéine Ago2, inhibant ainsi la synthèse protéique qui résulte du gène qui aura été ciblé [8] (Figure 1).

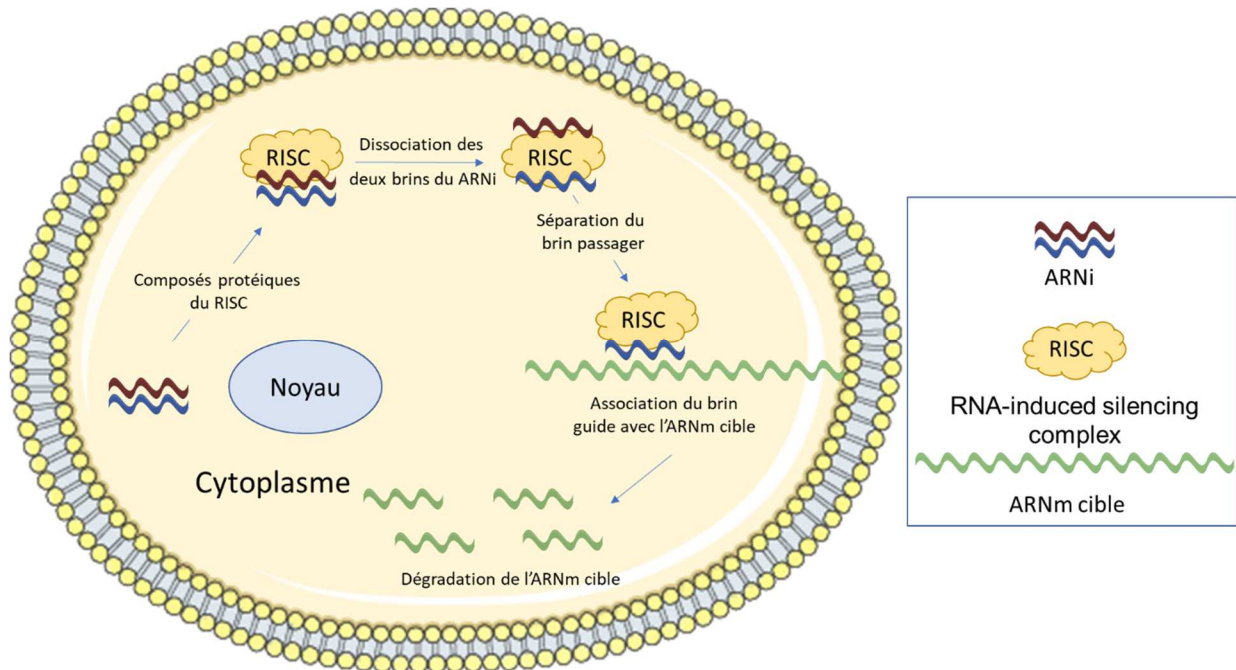


FIG. 1 : Mécanisme d'action des ARNi

Obstacles à l'administration des ARNi

Le mécanisme d'action des ARNi démontre qu'il est possible de réguler l'expression génique de n'importe quel ARN messager et par conséquent d'inhiber la synthèse de nombreuses protéines. Cependant, l'administration des ARNi nécessite de lever des obstacles qui s'opposent à leur efficacité. Ces verrous sont de plusieurs types : l'instabilité, la faible pénétration cellulaire, des effets hors cible et enfin la stimulation de l'immunité.

La stabilité des acides nucléiques dans les liquides biologiques ainsi que dans les tissus est extrêmement faible car ils sont rapidement dégradés par des endo- et exonucléases. La demi-vie des ARNi en milieu sérique varie ainsi de quelques minutes à une heure [11]. Par conséquent, après administration intraveineuse, la proportion d'ARNi intacts retrouvée dans les tissus est très faible. Pour être efficaces, les ARNi doivent non seulement être protégés contre la dégradation mais aussi atteindre leur cible cellulaire pour inhiber le gène d'intérêt. Après avoir atteint le tissu d'intérêt, les ARNi devront contourner d'autres obstacles afin d'atteindre le cytosol des cellules cibles pour y exercer leur efficacité. En effet, leur masse molaire élevée ainsi que leur charge négative s'opposent à la diffusion à travers la membrane plasmique des cellules et par conséquent à leur activité intracellulaire. En outre, toutes les stratégies qui utilisent l'endocytose comme voie de pénétration intracellulaire doivent permettre un échappement de l'endosome car les ARNi une fois piégés dans les endo-lysosomes subiront une forte dégradation intracellulaire. Enfin, une fois dans le

cytoplasme, les ARNi demeurent vulnérables vis-à-vis de la dégradation par les ARNases intracellulaires et doivent être reconnus et intégrés dans le RISC avec une grande efficacité.

D'autres problèmes sont apparus lors de l'utilisation clinique des ARNi comme par exemple, des effets secondaires liés à l'extinction non désirée de certains gènes non ciblés. Ces effets hors cible, révélés par analyses par puces d'ADN, ne sont pas souhaitables car ils peuvent conduire à une mutation dangereuse de l'expression des gènes et à une transformation cellulaire inattendue [12]. Des études récentes ont démontré que la plupart de ces effets hors cible sont le résultat d'une homologie dans la région « seed » de la séquence d'ARNi. L'inhibition de gènes hors cible ne peut pas être ignorée dans le développement de thérapies à base d'ARNi, et toutes les séquences thérapeutiques potentielles d'ARNi doivent être soigneusement testées vis-à-vis de la perturbation éventuelle des profils d'expression de protéines normales. De plus, à mesure que les connaissances sur le mécanisme des ARNi progressent, les approches bio-informatiques prédictives mises en œuvre pour leur conception devraient permettre de réduire considérablement les risques d'effets hors cible.

Bien que très bien tolérés, les ARNi peuvent dans certains cas stimuler la réponse immunitaire [13,14]. Ils peuvent ainsi induire le déclenchement de la réponse interféron et provoquer la mort cellulaire [13]. Une étude a ainsi montré que certains ARNi peuvent se lier au récepteur Toll-like 7 (TLR7) [15]. Cet effet survient lorsque les ARNi sont riches en bases GU ou qu'ils contiennent des motifs 5'UGU3' [16]. Les réactions immunitaires varient selon le type cellulaire, il est difficile de les anticiper sur la base de travaux *in vitro* et l'immunogénicité ainsi que la toxicité sont des motifs de préoccupation qui doivent être appréciés lors du développement de l'ARNi à des fins thérapeutiques.

L'application clinique des ARNi doit donc être ciblée et adressée à un tissu, une cible cellulaire et subcellulaire. Par conséquent, pour pouvoir les administrer correctement, il faut lever l'ensemble des obstacles décrits ci-dessus. Trois approches ont été développées afin de surmonter ces obstacles. La première consiste à modifier chimiquement le squelette de l'ARNi, la deuxième consiste à générer chimiquement des conjugués moléculaires et la troisième à concevoir des systèmes particuliers capables de vectoriser les ARNi vers leur cible à l'aide notamment de nanoparticules lipidiques.

MODIFICATIONS CHIMIQUES ET FORMULATION DES ARN INTERFERENTS

Modifications chimiques des ARNi

Les modifications chimiques des acides nucléiques ont produit de nombreuses molécules extrêmement originales en les modifiant au niveau des groupements phosphates, du ribose ou des bases. Ces modifications chimiques peuvent considérablement améliorer la stabilité et le passage transmembranaire des ARNi. Cependant, ces modifications ne doivent pas entraîner d'effets indésirables, liés notamment à des effets hors cible. Le premier type de modification chimique des ARNi concerne la liaison phosphodiester, qui peut être convertie en phosphorothioate [17] ou boranophosphate [18] (Figure 2). Ces modifications permettent de renforcer la résistance aux nucléases provenant du sérum ou de toute autre origine [19]. Elles entraînent cependant une toxicité ainsi que dans certains cas, une diminution de l'activité inhibitrice [20]. En effet, un faible nombre de modifications préserve l'efficacité de l'ARNi alors que de nombreuses transformations induisent une baisse d'efficacité et/ou une

augmentation de toxicité notamment en raison d'interactions élevées avec les protéines [21]. Les ARNi modifiés par des boranophosphates sont résistants aux nucléases mais les bases transformées sont introduites à l'aide d'une transcription *in vitro* ce qui complique de manière importante leur synthèse et entraîne une distribution aléatoire des modifications le long de l'oligonucléotide [22]. Les ARNi boranophosphates agissent de manière similaire à celle des ARNi non modifiés et se sont avérés bien plus efficaces que les phosphorothioates [22].

Les modifications au niveau de la position 2' du ribose (Figure 2) sont très répandues, et en particulier le remplacement du 2'-hydroxyle par différents groupements. Les plus utilisées dans le domaine thérapeutique sont le 2'-O-méthyle, le 2'-O-méthoxyéthyle et le 2'-fluoro. Ces modifications chimiques permettent d'augmenter la stabilité des ARNi et particulièrement de les rendre résistants aux nucléases, sans réduire leurs propriétés d'inhibition *in vivo* [23]. Du point de vue de la synthèse, des modifications en 2' peuvent être introduites sur l'ensemble du duplex [24]. Il est cependant préférable d'alterner nucléotides modifiés et non modifiés, pour préserver l'activité inhibitrice tout en favorisant la stabilité [25]. Des modifications 2'-fluoro ont également été utilisées avec succès [26]. Elles sont sélectivement introduites sur les bases pyrimidines et sont souvent associées à des modifications 2'-O-méthyle sur les bases purines ce qui permet de combiner une stabilité optimale et une grande efficacité [26].

Des ARNi ont aussi été modifiés par l'introduction de résidus dénommés « locked nucleic acid » (LNA), qui améliore considérablement la demi-vie plasmatique sans modifier l'activité biologique [27,28]. Les LNA sont des modifications 2'-hydroxyle qui consistent à créer un pont méthylène reliant le 2'-O au 4'-C du ribose (Figure 2). Ces modifications ne doivent cependant pas être introduites sur les nucléotides en position 10, 12 et 14 du brin guide car cela réduit totalement l'effet inhibiteur des ARNi [29].

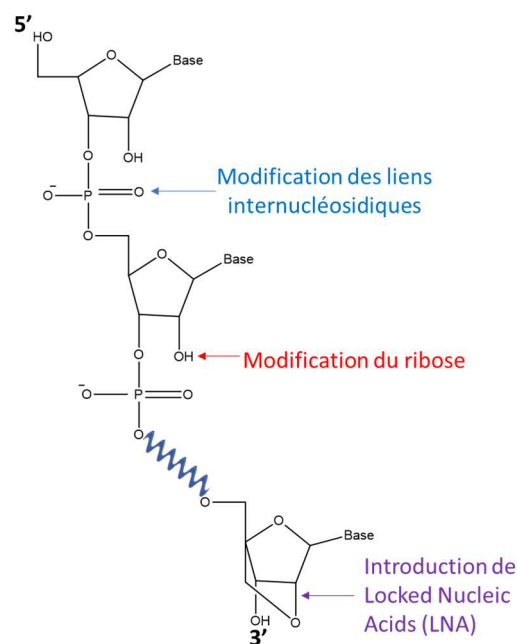


FIG. 2 : Modifications chimiques des oligonucléotides présents dans la structure des petits ARN interférents

Conjugués moléculaires galactosylés pour le ciblage hépatique

Des molécules hydrophobes d'origine lipidique ont été conjuguées à des ARNi pour améliorer leur biodisponibilité tissulaire et cellulaire ainsi que leur stabilité [30]. La modification la plus largement rencontrée concerne la fixation d'un court acide gras, couplé à une molécule de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), sur un groupement phosphate de la terminaison 3' de l'un des deux brins de l'ARNi (Figure 3). L'addition de GalNAc permet un adressage ciblé des hépatocytes *via* la reconnaissance du récepteur de l'asialoglycoprotéine [31]. Au cours d'essais précliniques, ces dérivés ont démontré pouvoir favoriser la distribution hépatique [32] ainsi que l'internalisation cellulaire des ARNi et améliorer l'inhibition de l'expression de certains gènes [33]. Au niveau préclinique, aucun effet délétère n'a été constaté avec ces conjugués [34]. Ils peuvent être administrés par voie sous-cutanée et surtout, permettent après une administration unique, d'obtenir des effets sur une période pouvant atteindre plusieurs semaines.

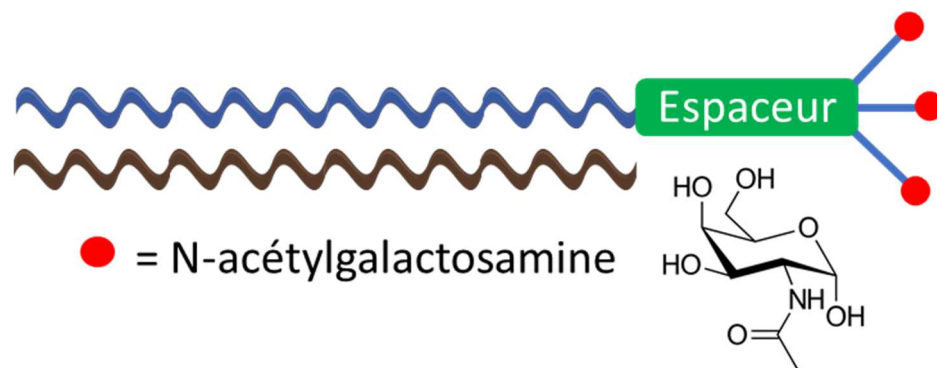


FIG. 3 : Représentation schématique des conjugués moléculaires galactosylés

Trois sociétés ont réalisé des essais cliniques à l'aide de conjugués GalNAc-siRNA dont certains ont par la suite reçu des autorisations de mise sur le marché ou sont en cours de demande. La société Alnylam Pharmaceuticals teste actuellement plusieurs conjugués GalNAc-siRNA dans des essais cliniques pour une grande variété de maladies d'origine hépatique (Tableau 1). Parmi les plus avancés, on distingue le Givosiran qui a reçu en novembre 2019, l'approbation de la « Food and Drug Administration » (FDA) avec la dénomination commerciale de Givlaari®. Il s'agit d'un conjugué qui cible le gène ALAS1 impliqué dans la porphyrie hépatique aiguë (PHA). L'efficacité a été évaluée au cours de l'étude ENVISION réalisée sur 94 patients atteints de PHA. Les patients ont été randomisés pour recevoir, en double aveugle, une fois par mois des injections sous-cutanées de Givosiran ou d'un placebo pendant une période de 6 mois. Le traitement par Givosiran de ces malades atteints de PHA et présentant des crises récurrentes très fréquentes a permis de réduire en 6 mois de 79% le nombre de crises de porphyrie [35]. Ainsi, le Givlaari® a récemment reçu l'avis positif du comité des médicaments à usage humain (CHMP) de l'agence européenne des médicaments (EMA). En parallèle, Alnylam a récemment fait une annonce concernant les résultats de la phase 3 du Lumasiran au cours de l'étude ILLUMINATE-A portant sur des patients atteints d'hyperoxalurie primaire de type 1 (PH1) et qui ont reçu un ARNi capable d'inhiber la glycolate oxydase. Les résultats de ILLUMINATE-A démontrent que le lumasiran peut réduire considérablement la production hépatique d'oxalate. L'Inclisiran utilisé dans le traitement des hypercholestérolémies est un ARNi qui inhibe la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) [36,37]. Au cours d'une

étude de phase 3 contre placebo (ORION 10), l'efficacité de l'inclisiran a été testée chez 1 561 patients ayant une maladie athéromateuse connue (plus de 90 % de coronaropathie) et dont le taux de cholestérol LDL reste ≥ 70 mg/dl. Chez ces patients, on observe, malgré une dose maximale tolérée de statine associée ou non à de l'ézétimibe (9 % des sujets), une baisse de 58 % du taux de cholestérol LDL dans le groupe traité par de l'Inclisiran par rapport au groupe placebo. Autre ARNi délivré sous la forme de conjugué galactosylé, le Vutrisiran cible le gène de la transthyréline (TTR) pour traiter l'amylose à transthyréline (ATTR) [38,39]. L'étude HELIOS-A de phase III actuellement en cours, porte sur l'ATTR héréditaire avec polyneuropathie tandis que l'étude HELIOS-B de phase 3 implique des patients atteints d'ATTR héréditaire et de type sauvage avec cardiomyopathie. Enfin, il faut citer le Fitusiran qui cible l'antithrombine 3 pour traiter les hémophilies A et B [40,41] et qui fait l'objet d'un début d'étude en Phase III (ATLAS).

D'autres produits sont en phase d'étude clinique précoce parmi lesquels l'ALN-HBV02, un ARNi antiviral dans le traitement de l'hépatite B [42], et le Cemdisiran (<https://www.alnylam.com>) testé pour le traitement des néphropathies à immunoglobulines A ciblant la fraction C5 du complément. La société Dicerna Pharmaceuticals qui utilise un conjugué tétraantenné développe une approche similaire à celle d'Alnylam Pharmaceuticals, afin d'inhiber l'expression de la glycolate-oxydase hépatique [43,44]. Enfin, la société Arrowhead Pharmaceuticals a conçu des conjugués chimiquement différents de ceux d'Alnylam parmi lesquels deux molécules sont au stade de phase 2. L'ARO-AAT qui cible la mutation responsable du déficit en α -1-antitrypsine [45] et l'ARO-HBV qui porte le nom de code JNJ-3989, en raison d'une collaboration avec Janssen Pharmaceuticals, inhibe l'ARNm HBV de l'hépatite B (<https://arrowheadpharma.com/>).

Liposomes et nanoparticules lipidiques pour le ciblage hépatique

Les liposomes sont des vésicules composées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques entourant une cavité aqueuse. Pour pouvoir vectoriser des acides nucléiques, les chercheurs ont privilégié la présence de charges positives à la surface de liposomes cationiques plutôt que celle d'une cavité aqueuse pour y introduire les acides nucléiques. Les liposomes cationiques ont donc été choisis pour leur capacité à complexer les acides nucléiques, chargés négativement, par des interactions électrostatiques. Ces complexes dénommés lipoplexes (Figure 4) sont capables de protéger efficacement les ARNi vis-à-vis de la dégradation par les nucléases et d'induire une forte internalisation cellulaire. Découverts en 1987 [46], les liposomes cationiques ont fait l'objet de très nombreuses études pour le transfert d'acides nucléiques [47] par des chercheurs souhaitant trouver des alternatives à la thérapie génique virale. Ils ont ensuite été utilisés pour véhiculer les ARNi avec une grande efficacité notamment au cours d'expériences menées *in vitro*. En effet, les lipoplexes, chargés positivement, se fixent sur la membrane des cellules, chargée négativement, puis sont internalisés par endocytose suivie d'une déstabilisation de la membrane endosomale qui permet aux ARNi d'être libérés dans le cytoplasme et de s'associer au RISC [48]. Les lipoplexes font l'objet d'un essai clinique de phase I dans l'inhibition du gène de fusion EWS-fli1 impliqué dans le sarcome d'Ewing (tableau 1) [49]. Malgré ce résultat encourageant, rares ont été les applications cliniques des lipoplexes en dépit de très nombreuses études précliniques. Une des raisons provient de leur toxicité importante et des interactions entre ces particules chargées positivement et les protéines circulantes qui se traduisent par des phénomènes délétères d'agrégation dans le sang [50]. À partir de ces observations, deux

approches ont été développées. La première consiste à introduire les ARNi dans la cavité aqueuse de liposomes neutres (Figure 4). C'est le cas d'un ARNi ciblant le gène EphA2, un membre de la famille des tyrosines kinases surexprimé dans un grand nombre de cancers et qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire, la survie, la migration, l'invasion et l'angiogenèse. La formulation de ces liposomes contenant un ARNi anti-EphA2 est en phase clinique I [51]. Une seconde approche utilise des liposomes appelés nanoparticules lipidiques dans lesquelles les charges positives des lipides cationiques sont masquées par la présence d'un polymère hydrophile (Figure 4). Ces nanoparticules lipidiques (dénommées SNALP pour Stable Nucleic Acid Lipid Particles) sont constituées d'une bicouche composée d'un mélange de faible teneur en lipides cationiques et de lipides fusogènes pour permettre l'association aux cellules et la libération endosomale des ARNi. La surface des SNALP est recouverte d'un conjugué lipidique associé à du Poly-Ethylène Glycol (PEG), ce qui assure un long temps de circulation dans le sang et réduit les interactions avec les protéines plasmatiques. Cette approche favorise une distribution au sein des hépatocytes suffisante pour envisager des applications cliniques. Les SNALP sont utilisées pour inhiber la TTR hépatique et agir dans le traitement de l'ATTR évoquée plus haut. Le produit dénommé Patisiran (Onpattro®) a fait l'objet d'une étude de Phase III (APOLLO) pour le traitement de la neuropathie amyloïde familiale à transthyrétine. Les résultats de cette étude ont démontré que non seulement le traitement permettait de ralentir l'évolution de la maladie mais, chez plus de la moitié des patients, on observe à 18 mois une réversibilité, de même qu'une amélioration de la qualité de vie et de certaines fonctions telles que la marche et les troubles végétatifs [52].

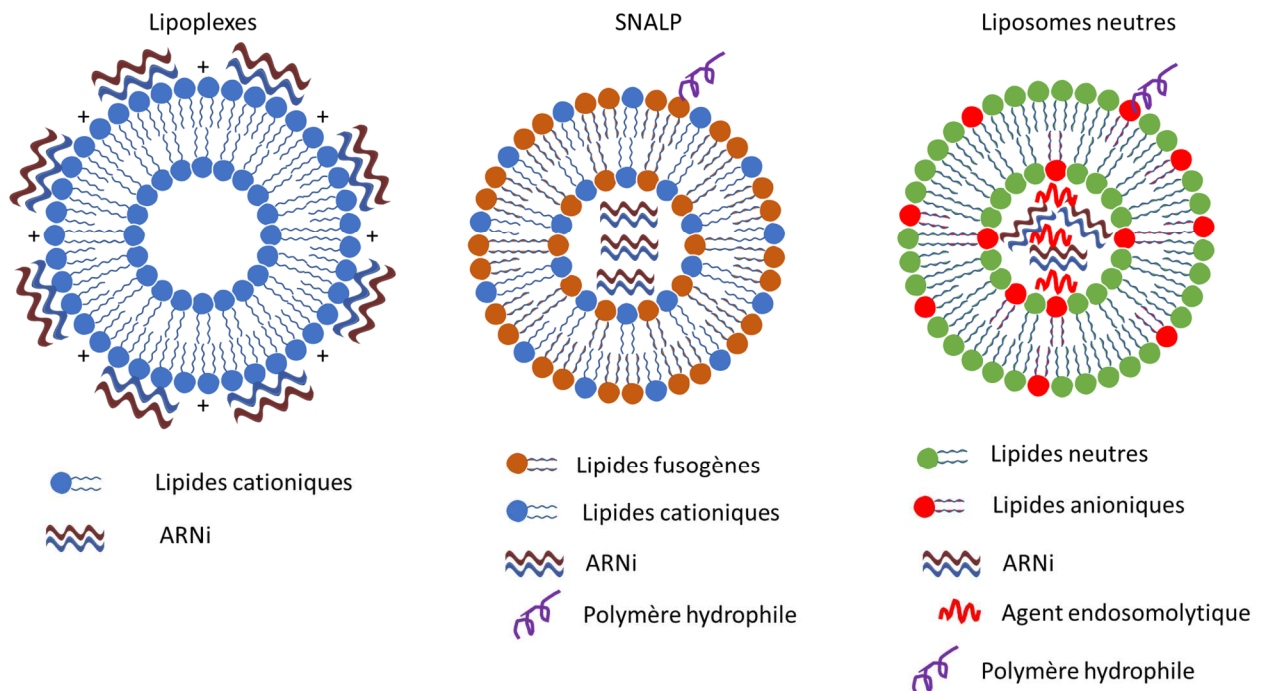


FIG. 4: Différents types de systèmes nanoparticulaires lipidiques pour l'administration d'ARNi

TABLEAU I : ARN interférents administrés sous forme de conjugué, de liposomes ou de nanoparticules lipidiques au stade d'étude clinique ou sur le marché * source : ClinicalTrials.gov

Dénomination du médicament ou nom de code	Forme Pharmaceutique	Indication	Cible	Voie d'administration	Phase clinique	Dernière étude clinique en date*
Givosiran GIVLAARI®	Conjugué Galactosylé	Porphyrie aiguë intermittente	acide aminolévulinique synthase-1 (ALAS1)	Sous-Cutanée	AMM FDA	NCT03338816
Lumasiran	Conjugué Galactosylé	Hyperoxaluries primitives	Glycolate-oxydase hépatique	Sous-Cutanée	Phase III en cours	NCT04152200
Inclisiran	Conjugué Galactosylé	Hypercholestérolémies Athérosclérose	Proprotéine convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9)	Sous-Cutanée	Phase III Achevée AMM FDA & EMA en cours	NCT03397121
Vutrisiran	Conjugué Galactosylé	Amyloïdose héréditaire à transthyréline avec et sans Cardiomyopathie	Transthyréline	Sous-Cutanée	Phase III en cours	NCT03759379 NCT04153149
Fitusiran	Conjugué Galactosylé	Hémophilie A et B	Antithrombine	Sous-Cutanée	Phase III en cours	NCT02554773
ALN-HBV02	Conjugué Galactosylé	Hépatite Chronique B	ARNm HBV	Sous-Cutanée	Phase I/II	NCT03672188
Cemdisiran	Conjugué Galactosylé	Néphropathie à Immunoglobuline 1	Fraction C5 du complément	Sous-Cutanée	Phase II	NCT03841448
DCR- PHXC	Conjugué Galactosylé	Hyperoxaluries primitives	glycolate-oxydase hépatique	Sous-Cutanée	Phase II en cours	NCT03392896
ARO- AAT	Conjugué Galactosylé	Déficit en α -1 antitrypsine	α -1-antitrypsine Z	Sous-Cutanée	Phase I	NCT03362242
ARO- HBV JNJ-3989	Conjugué Galactosylé	Hépatite Chronique B	ARNm HBV	Sous-Cutanée	Phase I/II	NCT03365947
	Lipoplexes	Sarcome d'Ewing	Gène de fusion EWS-FL1	Intraveineuse	Phase I	NCT02736565
EPHARNA	Liposomes neutres	Tumeurs solides avancées ou récurrentes	EphA2	Intraveineuse	Phase I	NCT01591356
Patisiran ONPATTRO®	Nanoparticules Lipidiques	Amyloïdose héréditaire à transthyréline	Transthyréline	Intraveineuse	AMM Juillet 2019	NCT01960348

Approches expérimentales pour l'adressage non hépatique des ARNi

En dépit de toutes les applications en clinique décrites précédemment, l'adressage vis-à-vis d'autres organes que le tissu hépatique reste complexe. Les formes qui ont été décrites plus haut possèdent très peu de spécificité pour d'autres tissus. C'est pour cette raison qu'il devient important de concevoir, sur la base des structures discutées précédemment, des systèmes d'adressage qui prennent en compte des aspects phénotypiques spécifiques des cellules que l'on souhaite atteindre. Au sein de l'institut Galien Paris-Sud, nous développons cette approche par le truchement du ciblage du récepteur CD44.

Le récepteur CD44 appartient à la famille des molécules d'adhésion cellulaire. Ces molécules sont impliquées dans les interactions entre les cellules elles-mêmes et entre les cellules et la matrice extracellulaire. Ces interactions sont essentielles au maintien de l'intégrité des tissus, régulant la croissance, la survie, la différenciation et la migration cellulaire. Le CD44 est aussi impliqué dans la progression tumorale ainsi que dans le processus métastatique [53]. De nombreuses études ont aussi démontré que le récepteur CD44 était un marqueur important des cellules souches tumorales [54] Le récepteur CD44 est aussi surexprimé par certaines cellules inflammatoires dont les macrophages [55,56].

Notre approche consiste à associer, à la surface de lipoplexes ou de liposomes, des ligands du récepteur CD44 afin de libérer au sein des cellules ciblées des ARNi pouvant inhiber un grand nombre de voies de signalisation. Pour ce faire, nous avons conçu des vecteurs nanoparticulaires dont la structure est basée sur un cœur cationique permettant de complexer les ARNi et de les libérer dans le cytoplasme. Ce cœur cationique est ensuite entouré d'une membrane chargée négativement pour éviter l'agrégation dans le sang et sur laquelle est fixé un ligand de CD44 (Figure 5).

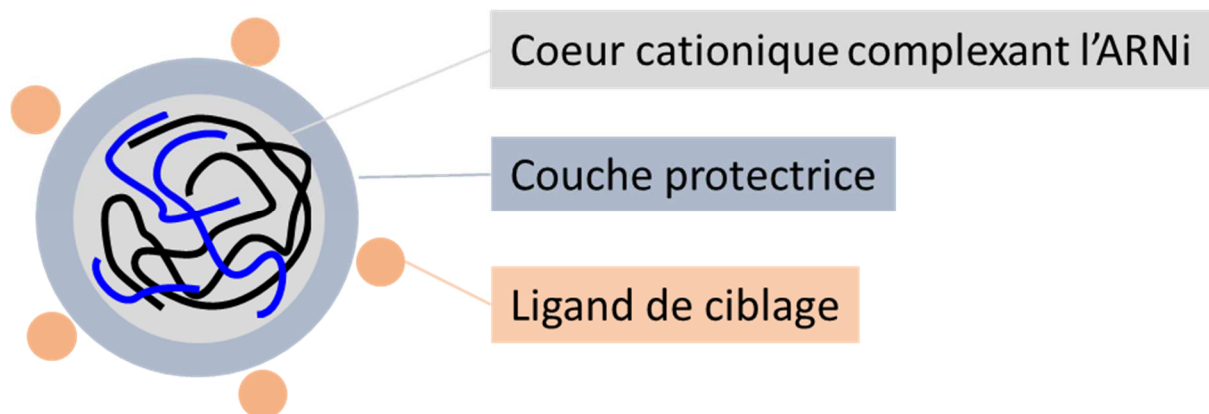


FIG. 5 : Architecture de systèmes nanoparticulaires lipidiques pour l'adressage d'ARNi conventionnels présentant à la fois un cœur cationique, une couronne hydrophile et un ligand de ciblage du récepteur CD44.

Les premiers systèmes ont été conçus sur la base de lipoplexes fonctionnalisés par de l'acide hyaluronique (HA), ligand naturel du récepteur CD44, couplé de manière covalente à un phospholipide pour une meilleure insertion au sein de la bicouche lipidique des liposomes cationiques [57]. La composition de ces lipoplexes (dénommés lipoplexes-HA) permet de répondre à plusieurs objectifs qui sont : (i) une complexation optimale des ARNi ; (ii) une toxicité limitée ; (iii) la capacité de l'HA à cibler les cellules surexprimant le récepteur CD44.

Ces lipoplexes ont été formulés et caractérisés d'un point de vue physico-chimique, mais aussi vis-à-vis de leur efficacité *in vitro* et *in vivo* pour la vectorisation active d'ARNi vers des cellules tumorales surexprimant le récepteur CD44. Il a été montré que l'ajout du conjugué HA-DOPE ne compromet pas l'association de l'ARNi à des liposomes cationiques présentant l'HA en surface [58]. La capacité de nos lipoplexes modifiés par l'HA à se lier spécifiquement au récepteur CD44 de manière concentration-dépendante a été démontrée par la technique de résonance plasmonique de surface [58]. Les lipoplexes-HA sont internalisés plus rapidement que les lipoplexes non modifiés et, une fois dans des cellules, ils sont localisés principalement au niveau du cytoplasme [59]. La capacité des lipoplexes à transporter jusqu'au cytoplasme des ARNi intacts a été évaluée en testant l'inhibition de l'expression de la luciférase *in vitro* et *in vivo* sur la lignée cellulaire de cancer du poumon A549-luc. 81 % d'inhibition d'expression de la luciférase ont été obtenus *in vitro* avec les lipoplexes-HA présentant une forte proportion d'ARNi. *In vivo*, sur un modèle orthotopique de métastases pulmonaire (cellules A549), le traitement avec les lipoplexes-HA transportant un ARNi anti-luciférase a mené à une diminution statistiquement significative de l'expression de la luciférase, qui a été confirmée par la réduction de l'expression d'ARNm de la luciférase dans le poumon des animaux traités avec les lipoplexes-HA [59]. L'analyse de la distribution des lipoplexes dans les poumons a montré que les lipoplexes modifiés par l'HA sont distribués de façon plus importante et plus homogène dans le tissu pulmonaire que les lipoplexes non modifiés [59]. Ces résultats confirment le potentiel des lipoplexes-HA dans le transport ciblé d'ARNi via le récepteur CD44.

Dans une deuxième approche, le ligand est constitué par des aptamères, qui sont des acides nucléiques (fragments d'ADN ou d'ARN) caractérisés par une forte affinité de fixation et une excellente spécificité vis-à-vis d'une cible donnée [60]. Ces petites molécules sont en outre parfaitement bien tolérées par l'organisme. Grâce à la technique d'évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX), nous avons identifié une séquence d'aptamères à très haute affinité pour le récepteur CD44 [61]. Nous avons alors conçu un vecteur liposomal constitué d'un cœur et d'une couronne. La couronne présente un aptamère liant le récepteur CD44 permettant à l'ensemble de reconnaître spécifiquement et avec une grande affinité les cellules porteuses du récepteur. Le cœur du vecteur est composé d'une enveloppe lipidique entourant un complexe formé par l'association d'un ARNi à de la protamine. Cette protéine cationique permet la sortie précoce de l'ARNi à partir de l'endosome avant que ce dernier ne fusionne avec les lysosomes. Nous avons observé que l'affinité de l'aptamère pour le récepteur était améliorée par sa présence à la surface des liposomes par rapport à l'aptamère seul [62]. La capture cellulaire des liposomes fonctionnalisés a été évaluée sur des lignées cellulaires exprimant CD44 et comparée à une lignée cellulaire ne l'exprimant pas [62]. Les résultats ont démontré une internalisation beaucoup plus importante de ces liposomes par les cellules exprimant le récepteur. Ce système original a ensuite été évalué pour l'extinction du gène rapporteur de la luciférase exprimé dans un modèle de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231 *in vitro* ainsi qu'*in vivo* en situation orthotopique. L'objectif de cette étude était de servir de plateforme pour inhiber à terme toute une série de protéines impliquées dans les processus de maturation et de prolifération des cellules souches cancéreuses [63]. Comparativement aux lipoplexes HA décrits plus haut, ce système n'utilise que très peu d'excipients cationiques, souvent délétères lors des transpositions cliniques, et repose sur des ligands de ciblage de haute affinité et sélectivité.

Conclusion

Les recherches les plus récentes ont permis de dégager deux approches principales pour l'administration des ARNi et le traitement de pathologies d'origine hépatique : les conjugués galactosylés ou des systèmes nanoparticulaires lipidiques. Ces approches ont permis d'améliorer les traitements de maladies rares aussi bien que répandues. La transformation clinique est récente mais un grand nombre de médicaments devrait voir le jour dans les mois et les années à venir. Afin d'élargir les potentialités de tels traitements, il est important de pouvoir détourner les conjugués ou nanoparticules du tissu hépatique pour atteindre en quantité suffisante d'autres sites pathologiques (tumeurs ou inflammation) ou d'autres tissus (cœur, cerveau...). Sans que cela ait été abordé dans cette revue, il faut être conscient que d'autres voies d'administration ont fait la preuve d'une certaine efficacité dans des études précliniques. C'est le cas de la voie pulmonaire ou intra-oculaire. Enfin, dans les années à venir, ces mêmes approches devraient s'appliquer à l'administration d'antagomir ou de miARN dont les potentialités thérapeutiques font actuellement l'objet d'un grand nombre d'études.

Déclaration de liens d'intérêts

Elias Fattal ne possède aucun lien d'intérêt en lien avec cet article

Références

- [1] E. Fattal, G. Barratt. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA, *Br. J. Pharmacol.* 2009;157:179–94. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00148.x.
- [2] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*. 1998;391:806–11. doi:10.1038/35888.
- [3] D.P. Bartel. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function, *Cell*. 2004;116:281–97. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- [4] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl. Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411:494–98. doi:10.1038/35078107.
- [5] L. Timmons, A. Fire. Specific interference by ingested dsRNA [10]. *Nature* 1998;395:854. doi:10.1038/27579.
- [6] R.F. Ketting, S.E.J. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G.J. Hannon, R.H.A. Plasterk. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2001;15:2654–9. doi:10.1101/gad.927801.
- [7] G. Meister, M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, T. Tuschl. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs, *Mol. Cell*. 2004;15:185–97. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007.

- [8] J.-J. Song, S.K. Smith, G.J. Hannon, L. Joshua-Tor. Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* 2004;305:1434–7. doi:10.1126/SCIENCE.1102514.
- [9] A. Birmingham, E.M. Anderson, A. Reynolds, D. Ilesley-Tyree, D. Leake, Y. Fedorov, S. Baskerville, E. Maksimova, K. Robinson, J. Karpilow, W.S. Marshall, A. Khvorova. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets., *Nat. Methods* 2006;3:199–204. doi:10.1038/nmeth854.
- [10] A.L. Jackson, J. Burchard, J. Schelter, B.N. Chau, M. Cleary, L. Lim, P.S. Linsley. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity, *Rna*. 2006;12:1179–87. doi:10.1261/rna.25706.
- [11] R.P. Hickerson, A. V. Vlassov, Q. Wang, D. Leake, H. Ilves, E. Gonzalez-Gonzalez, C.H. Contag, B.H. Johnston, R.L. Kaspar. Stability study of unmodified siRNA and relevance to clinical use, *Oligonucleotides*. 2008;18:345–54. doi:10.1089/oli.2008.0149.
- [12] A.L. Jackson, S.R. Bartz, J. Schelter, S. V Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, P.S. Linsley. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi, *Nat. Biotechnol.* 2003;21:635.
- [13] A. Reynolds, E.M. Anderson, A. Vermeulen, Y. Fedorov, K. Robinson, D. Leake, J. Karpilow, W.S. Marshall, A. Khvorova. Induction of the interferon response by siRNA is cell type - and duplex length-dependent, *Rna*. 2006;12:988–93. doi:10.1261/rna.2340906.
- [14] V. Hornung, M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. De Fougerolles, S. Endres, G. Hartmann. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 2005;1;263–70. doi:10.1038/nm1191.
- [15] M.P. Gantier, S. Tong, M.A. Behlke, D. Xu, S. Phipps, P.S. Foster, B.R.G. Williams, TLR7 Is Involved in Sequence-Specific Sensing of Single-Stranded RNAs in Human Macrophages. *J. Immunol.* 2008;180:2117–124. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2117.
- [16] A.D. Judge, V. Sood, J.R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 2005;23:457–62. doi:10.1038/nbt1081.
- [17] F. Eckstein. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides, *Nucleic Acid Ther.* 2014;24:374–87. doi:10.1089/nat.2014.0506.
- [18] A.H.S. Hall, J. Wan, A. Spesock, Z. Sergueeva, B.R. Shaw, K.A. Alexander. High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA, *Nucleic Acids Res.* 2006;34:2773–81. doi:10.1093/nar/gkl339.
- [19] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, et al. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*. 2004;432:173–8. doi:10.1038/nature03121.

- [20] C.A. Stein. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: Questions of specificity. *Trends Biotechnol.* 1996;14:147–9. doi:10.1016/0167-7799(96)20006-X.
- [21] M. Amarzguioui, T. Holen, E. Babaie, H. Prydz, Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:589–95. doi:10.1093/nar/gkg147.
- [22] A.H.S. Hall, J. Wan, E.E. Shaughnessy, B.R. Shaw, K.A. Alexander. RNA interference using boranophosphate siRNAs: Structure-activity relationships. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:5991–6000. doi:10.1093/nar/gkh936.
- [23] Y.L. Chiu, T.M. Rana. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *Rna.* 2003;9:1034–48. doi:10.1261/rna.5103703.
- [24] C.R. Allerson, N. Sioufi, R. Jarres, T.P. Prakash, N. Naik, A. Berdeja, et al. Bhat, Fully 2' - Modified Oligonucleotide Duplexes with Improved in Vitro Unmodified Small Interfering RNA, *J. Med. Chem.* 2005;48:901–4.
- [25] F. Czauderna, M. Fechtner, S. Dames, H. Aygün, A. Klippel, et al. Kaufmann, Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 2003. doi:10.1093/nar/gkg393.
- [26] D.A. Braasch, S. Jensen, Y. Liu, K. Kaur, K. Arar, M.A. White, et al. RNA interference in mammalian cells by chemically modified RNA, *Biochemistry.* 2003;42:7967–75.
- [27] J. Elmén, H.Y. Zhang, B. Zuber, K. Ljungberg, B. Wahren, C. Wahlestedt, et al. Locked nucleic acid containing antisense oligonucleotides enhance inhibition of HIV-1 genome dimerization and inhibit virus replication, *FEBS Lett.* 2004;578:285–90. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.015.
- [28] O.R. Mook, F. Baas, M.B. de Wissel, K. Fluiter. Evaluation of locked nucleic acid–modified small interfering RNA in vitro and in vivo. *Am. Assoc. Cancer Res.* 2007;6:833–43. doi:10.1158/1535-7163.mct-06-0195.
- [29] J. Elmén, H. Thonberg, K. Ljungberg, M. Frieden, M. Westergaard, Y. Xu, et al. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* 2005. doi:10.1093/nar/gki193.
- [30] M.F. Osborn, A. Khvorova. Improving siRNA Delivery in Vivo Through Lipid Conjugation. *Nucleic Acid Ther.* 2018. doi:10.1089/nat.2018.0725.
- [31] J.K. Nair, J.L.S. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, M.R. Alam, Q. Wang, et al. Multivalent N -acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing, *J. Am. Chem. Soc.* 2014;136:16958–61. doi:10.1021/ja505986a.
- [32] K.G. Rajeev, J.K. Nair, M. Jayaraman, K. Charisse, N. Taneja, J. O’Shea, et al., Hepatocyte-Specific Delivery of siRNAs Conjugated to Novel Non-nucleosidic Trivalent N-Acetylgalactosamine Elicits Robust Gene Silencing in Vivo, *ChemBioChem.* 2015. doi:10.1002/cbic.201500023.

- [33] A.D. Springer, S.F. Dowdy. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics, *Nucleic Acid Ther.* 2018;28:109–18. doi:10.1089/nat.2018.0736.
- [34] M.M. Janas, C.E. Harbison, V.K. Perry, B. Carito, J.E. Sutherland, A.K. Vaishnav. The Nonclinical Safety Profile of GalNAc-conjugated RNAi Therapeutics in Subacute Studies, *Toxicol. Pathol.* 2018;46:735–45. doi:10.1177/0192623318792537.
- [35] E. Sardh, M. Balwani, P. Harper, P. Stein, D. Rees, J. Bloomer, et al. A phase 1/2, randomized, placebo controlled and open label extension studies of Givosiran and investigational RNA interference therapeutic, in patients with acute intermittent porphyria, *J. Hepatol.* 2018;68:S66–S67. doi:10.1016/s0168-8278(18)30354-4.
- [36] K.K. Ray, R.M. Stoekenbroek, D. Kallend, L.A. Leiter, U. Landmesser, R. Scott Wright, et al. Effect of an siRNA therapeutic targeting PCSK9 on atherogenic lipoproteins prespecified secondary end points in Orion 1. *Circulation.* 2018. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034710.
- [37] K.K. Ray, U. Landmesser, L.A. Leiter, D. Kallend, R. Dufour, M. Karakas, et al. Inclisiran in patients at high cardiovascular risk with elevated LDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 2017. doi:10.1056/NEJMoa1615758.
- [38] D. Adams, K. Verena. Phase 1 study of ALN-TTRsc02, a subcutaneously administered investigational RNAi therapeutic for the treatment of transthyretin-mediated amyloidosis. *Rev. Neurol. (Paris).* 2019. doi:10.1016/j.neurol.2019.01.339.
- [39] T. Coelho, D. Adams, A. Silva, P. Lozeron, P.N. Hawkins, T. Mant. Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 2013. doi:10.1056/NEJMoa1208760.
- [40] K.J. Pasi, S. Rangarajan, P. Georgiev, T. Mant, M.D. Creagh, T. Lissitchkov, et al. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with RNAi therapy. *N. Engl. J. Med.* 2017. doi:10.1056/NEJMoa1616569.
- [41] N. Machin, M. V. Ragni. An investigational RNAi therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia A and B. *J. Blood Med.* 2018;9:135–40. doi:10.2147/JBM.S159297.
- [42] T. Michler, A.D. Kosinska, J. Festag, T. Bunse, J. Su, M. Ringelhan, et al. Knockdown of Virus Antigen Expression Increases Therapeutic Vaccine Efficacy in High-titer HBV Carrier Mice. *Gastroenterology.* 2020. doi:10.1053/j.gastro.2020.01.032.
- [43] C. Dutta, N. Avitahl-Curtis, N. Pursell, M. Larsson Cohen, B. Holmes, R. Diwanji, et al. Inhibition of glycolate oxidase with dicer-substrate siRNA reduces calcium oxalate deposition in a mouse model of primary hyperoxaluria type 1. *Mol. Ther.* 2016. doi:10.1038/mt.2016.4.
- [44] A. Liebow, X. Li, T. Racie, J. Hettinger, B.R. Bettencourt, N. Najafian, et al. An investigational RNAi therapeutic targeting glycolate oxidase reduces oxalate production in models of primary hyperoxaluria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017.

doi:10.1681/ASN.2016030338.

- [45] A.M. Turner, J. Stolk, R. Bals, J.D. Lickliter, J. Hamilton, D.R. Christianson, et al. Hepatic-targeted RNA interference provides robust and persistent knockdown of alpha-1 antitrypsin levels in ZZ patients. *J. Hepatol.* 2018. doi:10.1016/j.jhep.2018.03.012.
- [46] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987;84:7413–7. doi:10.1073/pnas.84.21.7413.
- [47] S. Simões, A. Filipe, H. Faneca, M. Mano, N. Penacho, N. Düzgünes, et al. Cationic liposomes for gene delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005;2:237–254. doi:10.1517/17425247.2.2.237.
- [48] O. Zelphati, F.C. Szoka. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. doi:10.1073/pnas.93.21.11493.
- [49] D.D. Rao, C. Jay, Z. Wang, X. Luo, P. Kumar, H. Eysenbach, et al. Preclinical Justification of pbi-shRNA EWS/FLI1 Lipoplex (LPX) Treatment for Ewing’s Sarcoma. *Mol. Ther.* 2016;24:1412–22. doi:10.1038/mt.2016.93.
- [50] G. Caracciolo, L. Callipo, S.C. De Sanctis, C. Cavaliere, D. Pozzi, A. Laganà. Surface adsorption of protein corona controls the cell internalization mechanism of DC-Chol-DOPE/DNA lipoplexes in serum, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2010;1798:536–43. doi:10.1016/j.bbamem.2009.11.007.
- [51] M.J. Wagner, R. Mitra, M.J. McArthur, W. Baze, K. Barnhart, S.Y. Wu, et al. Preclinical mammalian safety studies of EPHARNA (DOPC Nanoliposomal EphA2-Targeted siRNA), *Mol. Cancer Ther.* 2017. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0541.
- [52] D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W.D. O’Riordan, C.C. Yang, M. Ueda, A. V. Kristen, et al. Patisiran, an RNAi therapeutic, for hereditary transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 2018. doi:10.1056/NEJMoa1716153.
- [53] V. Orian-Rousseau. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur. J. Cancer.* 2010;46:1271–7. doi:10.1016/j.ejca.2010.02.024.
- [54] S. Misra, P. Heldin, V.C. Hascall, N.K. Karamanos, S.S. Skandalis, R.R. Markwald, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J.* 2011. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x.
- [55] J.M. Rios de la Rosa, A. Tirella, A. Gennari, I.J. Stratford, N. Tirelli. The CD44-Mediated Uptake of Hyaluronic Acid-Based Carriers in Macrophages. *Adv. Healthc. Mater.* 2017;6:1–11. doi:10.1002/adhm.201601012.
- [56] B.A. Johnson, G.K. Haines, L.A. Harlow, A.E. Koch, Adhesion molecule expression in human synovial tissue, *Arthritis Rheum.* 1993, 36:137–46. doi:10.1002/art.1780360203.

- [57] F. Dosio, S. Arpicco, B. Stella, E. Fattal. Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016;97:204–36. doi:10.1016/j.addr.2015.11.011.
- [58] T.L. Nascimento, H. Hillaireau, M. Noiray, C. Bourgaux, S. Arpicco, G. Pehau-Arnaudet, et al. Supramolecular Organization and siRNA Binding of Hyaluronic Acid-Coated Lipoplexes for Targeted Delivery to the CD44 Receptor, *Langmuir*. 2015;31:11186–94. doi:10.1021/acs.langmuir.5b01979.
- [59] T. Leite Nascimento, H. Hillaireau, J. Vergnaud, M. Rivano, C. Deloménie, D. Courilleau, et al. Hyaluronic acid-conjugated lipoplexes for targeted delivery of siRNA in a murine metastatic lung cancer model. *Int. J. Pharm.* 2016;514. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.06.125.
- [60] W. Alshaer, H. Hillaireau, E. Fattal. Aptamer-guided nanomedicines for anticancer drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018;134:122–37. doi:10.1016/j.addr.2018.09.011.
- [61] N. Ababneh, W. Alshaer, O. Allozi, A. Mahafzah, M. El-Khateeb, H. Hillaireau, et al. In vitro selection of modified RNA aptamers against CD44 cancer stem cell marker. *Nucleic Acid Ther.* 2013;23:401–7. doi:10.1089/nat.2013.0423.
- [62] W. Alshaer, H. Hillaireau, J. Vergnaud, S. Ismail, E. Fattal. Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells, *Bioconjug. Chem.* 2015;26:1307–13. doi:10.1021/bc5004313.
- [63] W. Alshaer, H. Hillaireau, J. Vergnaud, S. Mura, C. Deloménie, F. Sauvage, et al. Aptamer-guided siRNA-loaded nanomedicines for systemic gene silencing in CD-44 expressing murine triple-negative breast cancer model. *J. Control. Release.* 2018;271. doi:10.1016/j.jconrel.2017.12.022.