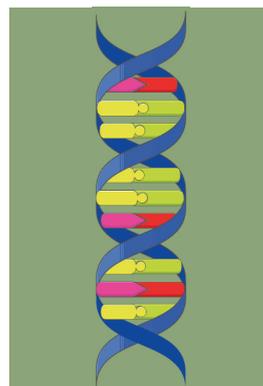


► Les oligonucléotides sont des petits acides nucléiques de synthèse capables de moduler l'expression de gènes cibles et leurs transcrits. Largement utilisés par les chercheurs comme outils de recherche pour moduler l'expression des gènes dont ils cherchent à décrypter les fonctions, les oligonucléotides peuvent également servir d'agents thérapeutiques pour réguler des cibles d'intérêt. Après l'arrivée sur le marché du premier oligonucléotide thérapeutique en 1998, le domaine a connu peu de succès cliniques jusqu'en 2016, date à laquelle le Spinraza® devient le premier médicament autorisé pour le traitement de l'amyotrophie spinale. Il deviendra dans les années suivantes le premier « *blockbuster* »<sup>1</sup> de cette classe de molécules. Depuis lors, une dizaine d'oligonucléotides ont reçu des autorisations de mise sur le marché (AMM), et de nombreux autres font actuellement l'objet d'un développement clinique. Dans cet article, nous décrivons différents oligonucléotides thérapeutiques, ainsi que leurs modes d'action et leur brevetabilité. ◀

Les oligonucléotides thérapeutiques sont une classe de médicaments qui interfèrent avec des mécanismes physiopathologiques en modulant l'expression de cibles thérapeutiques d'intérêt. Ce sont de courtes séquences d'acides nucléiques conçues pour interagir avec leurs cibles, ARN ou ADN, via des appariements de type Watson-Crick. Ils inhibent ou activent l'expression génique par divers mécanismes allant de l'activation directe de la transcription à la modulation de la traduction [1, 2]. Après avoir connu des hauts et des bas, le domaine des oligonucléotides thérapeutiques est aujourd'hui en plein essor. Suite à la première autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un oligonucléotide en 1998, douze

## Mécanismes d'action et brevetabilité des oligonucléotides thérapeutiques

Nicolas Crouvezier<sup>1</sup>, Anne-Céline Marie<sup>1</sup>, Lara Moumné<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Inserm Transfert, 7 rue Watt, 75013 Paris, France.  
lara.moumne@inserm-transfert.fr

autres ont été approuvés pour un usage médical par les autorités de santé et de nombreux autres font l'objet d'un développement clinique [3]. En parallèle de l'émergence des oligonucléotides dans le champ thérapeutique, on assiste à une augmentation du nombre de brevets relatifs à ces molécules, reflet d'une forte activité de recherche et de développement autour de ces composés [3].

Dans cette revue, nous décrivons les mécanismes biologiques qui sous-tendent l'action des oligonucléotides ainsi que les optimisations chimiques qui ont permis leur utilisation comme agents thérapeutiques. Nous expliquons également comment ce type de molécules peut être protégé par des brevets en décrivant les différents critères à respecter et en donnant les clés pour répondre à ces critères.

### Les oligonucléotides inhibiteurs de l'expression génique

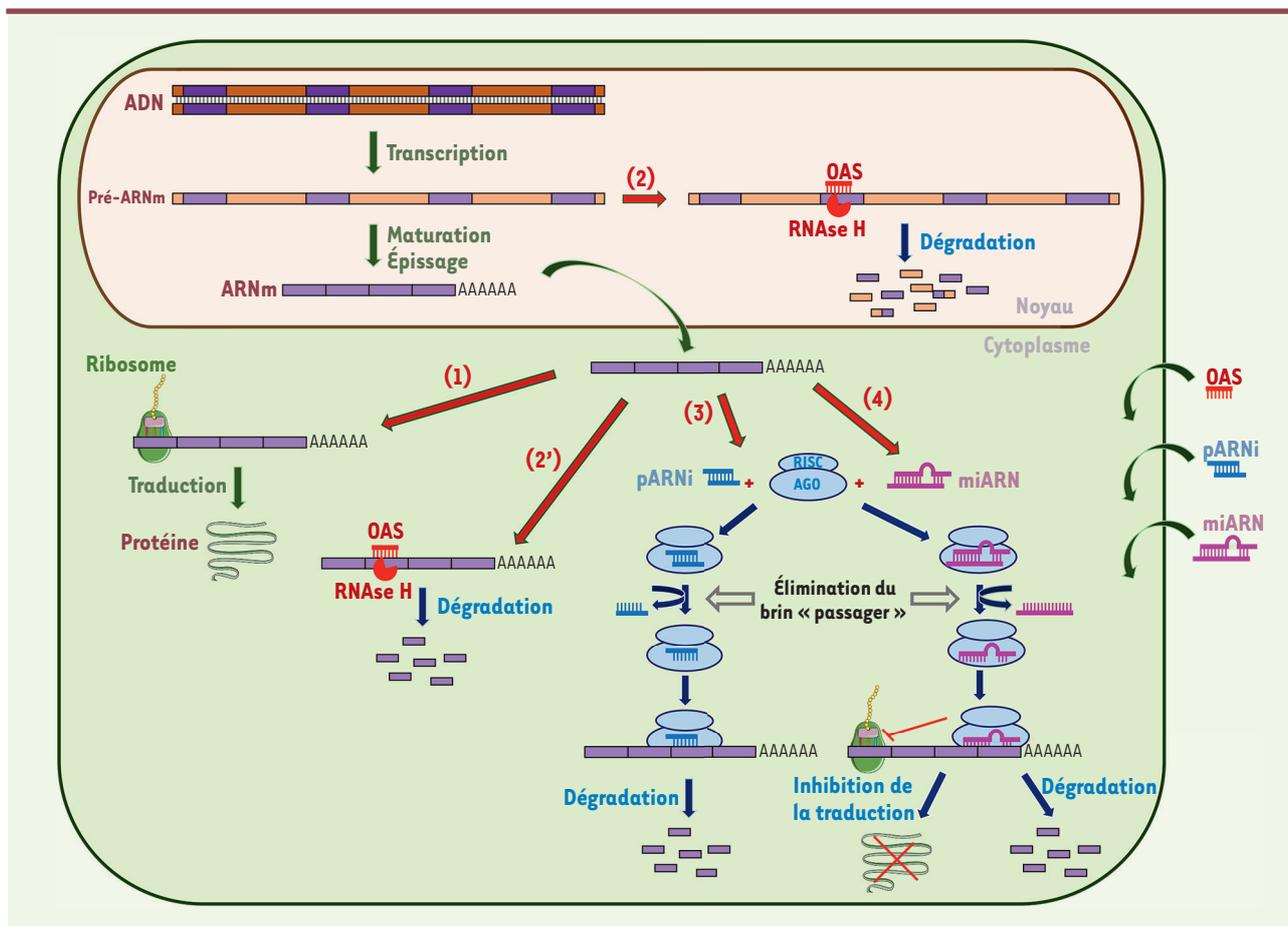
La majorité des oligonucléotides thérapeutiques sont des inhibiteurs d'expression. Ils induisent la dégradation de l'ARN ou le blocage de la traduction en détournant des mécanismes naturellement existants dans les cellules. Les principaux oligonucléotides utilisés à ces fins sont les oligonucléotides antisens, les petits ARN interférents et les microARN.

#### Les oligonucléotides antisens inhibiteurs

Les oligonucléotides antisens (OAS) sont des courtes séquences d'ADN simple brin d'environ vingt nucléotides qui s'hybrident à leur ARN cible pour induire sa dégradation par la ribonucléase H (RNase H), une enzyme impliquée dans la réplication de l'ADN. Lors de la réplication,

Vignette (© Lara Moumné).

<sup>1</sup> Produit à forte valeur ajoutée, aussi appelé produit vedette.



**Figure 1. Inhibition de l'expression génique par les oligonucléotides thérapeutiques.** Les mécanismes d'action des oligonucléotides inhibiteurs sont illustrés. En absence d'oligonucléotides, le pré-ARNm transcrit dans le noyau est mûri et épissé pour produire l'ARNm qui migre dans le cytoplasme pour être traduit en protéine (1). Les OAS (représentés en rouge) s'hybrident soit au pré-ARNm dans le noyau (2) soit à l'ARNm dans le cytoplasme (2'), pour induire leur dégradation par la RNase H. Les pARNi (représentés en bleu) utilisent l'interférence par ARN pour induire la dégradation de l'ARNm dans le cytoplasme (3). Les miARN (représentés en rose) utilisent la machinerie miARN pour inhiber la traduction des ARNm ou induire leur dégradation dans le cytoplasme (4). L'interférence par ARN et la machinerie miARN font intervenir des acteurs communs, notamment le complexe AGO/RISC.

la synthèse du brin retardé nécessite des amorces ARN pour démarrer la synthèse des fragments d'Okazaki<sup>2</sup>. Le double brin néo-synthétisé comporte donc localement un hybride ADN-ARN. La RNase H élimine ces fragments d'ARN du brin indirect tout en préservant la matrice ADN pour permettre la polymérisation complète et la suture de l'ADN. Les OAS exploitent cette fonction naturelle de la RNase H pour induire la dégradation de leur ARN cible (Figure 1) [4]. Comme le mécanisme d'action de la RNase H nécessite la formation d'un hybride ADN-ARN, les OAS ont une structure chimique de type ADN.

Des modifications chimiques permettent de stabiliser les OAS. La substitution d'un atome d'oxygène non pontant par un atome de

soufre transforme la liaison phosphodiester en phosphorothioate (PS), rendant l'OAS insensible à l'action des nucléases, sans empêcher celle de la RNase H [5]. La position 2' du désoxyribose a également fait l'objet de nombreuses optimisations chimiques. L'addition d'un méthoxyéthyl (2'MOE) augmente la résistance des OAS à la dégradation par les nucléases, améliore leur affinité pour l'ARN cible, et réduit leur fixation non spécifique à des protéines du plasma. Présents sur l'ensemble des nucléotides d'un OAS, les 2'MOE bloquent cependant l'action de la RNase H. En revanche, leur présence sur les nucléotides situés en 5' et en 3' d'un OAS portant des désoxyriboses non modifiés sur les nucléotides centraux, est suffisante pour conférer à l'OAS les propriétés pharmacologiques des 2'MOE, tout en préservant la capacité de ce dernier à induire la

<sup>2</sup> Un fragment d'Okazaki est une courte séquence d'ADN formée lors de la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase à partir du brin d'ADN 3'-5'. Au cours de la réplication de l'ADN, les brins courts d'ADN venant d'être synthétisés sur le brin discontinu sont appelés fragments d'Okazaki. Ceux-ci sont synthétisés de 5' en 3' à partir d'amorces d'ARN qui sont ensuite éliminées. Les fragments d'Okazaki sont réunis par l'ADN ligase, complétant ainsi le nouveau brin.

dégradation de sa cible. Ce type d'OAS est appelé « *Gapmer* » (ou *Gapmère*) [5]. Des *Gapmers* contenant des liaisons phosphorothioate entre les nucléotides sont très stables et affins pour les ARN cibles. Ils constituent d'excellents inhibiteurs d'expression. Trois OAS présents sur le marché et de nombreux autres en développement clinique présentent ce type de structure [3]. D'autres modifications du ribose ont été développées, notamment les LNA (*locked nucleic acid*) et les cET (*(S)-constrained ethyl nucleic acid*) qui contiennent un pont méthylène entre l'oxygène 2' et le carbone 4' du ribose [5]. Comme pour les 2'MOE, la capacité des OAS contenant des LNA et des cET à dégrader les ARN *via* la RNase H n'est préservée que lorsque ces modifications sont utilisées en *Gapmers*. Ces modifications confèrent aux OAS une meilleure affinité et une meilleure spécificité pour leurs ARN cibles et augmentent leur résistance aux nucléases. Cependant les LNA et les cET sont beaucoup moins utilisés que les 2'MOE dans les thérapies oligonucléotidiques en raison de leur hépatotoxicité.

### Les petits ARN interférents

Les petits ARN interférents (pARNi) sont des petits ARN double brin s'hybridant à leur ARN cible pour induire sa dégradation. Ils utilisent l'interférence à ARN, un mécanisme de défense naturel déclenché par la présence dans la cellule d'ARN double brin exogènes (*Figure 1*) [6]. Ces derniers sont reconnus par la ribonucléase Dicer qui les clive en petits ARN double brin d'une vingtaine de paires de bases. Les pARNi sont alors transférés au complexe multiprotéique RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) au sein duquel le brin « passager » est clivé par l'endonucléase AGO2 (*argonaute RISC catalytic component 2*) tandis que le brin « guide » dirige le complexe vers son ARNm cible. AGO2 clive alors l'ARNm au niveau de la région reconnue par le pARNi. Il s'en suit une dégradation totale de l'ARNm par des exonucléases [6, 7].

En 2001, l'équipe de Thomas Tuschl (*Max Planck Institute for Biophysical Chemistry*, Göttingen, Allemagne) a l'idée de détourner la machinerie d'interférence à ARN à des fins pharmacologiques. En transfectant des pARNi synthétisés chimiquement dans des cellules de mammifère, ils parviennent à réduire l'expression de gènes cibles, établissant ainsi la première preuve de concept de l'utilisation de ces outils pharmacologiques pour inhiber l'expression génique [8]. Il faudra cependant attendre de nombreuses années avant que le patisiran (ONPATRO®) ne devienne le premier pARNi thérapeutique à obtenir une AMM en 2018 pour le traitement des patients présentant une amyloïdose héréditaire à transthyréine [9].

Le développement des pARNi en tant que médicaments a été ralenti par trois obstacles majeurs : la délivrance, la stabilité et la spécificité. Ces obstacles existent pour les OAS mais sont exacerbés pour les pARNi. En effet, les pARNi étant des ARN, leur instabilité est liée à la fois à la sensibilité de la liaison phosphodiester à l'action des nucléases et au groupement nucléophile OH en 2' du ribose qui favorise l'hydrolyse de l'ARN. De plus, malgré la grande spécificité des pARNi pour leur séquence cible, l'interférence à ARN tolère parfois quelques mésappariements et induit la dégradation non spécifique de gènes non ciblés [10]. Des modifications chimiques ont néanmoins permis d'améliorer la stabilité et la spécificité des pARNi.

L'instabilité de la liaison phosphodiester a été réduite par l'utilisation de phosphorothioate. Des modifications de la position 2', en particulier la substitution du groupe -OH par un groupe O-méthyl (O-CH<sub>3</sub>) ou par un fluor, ont permis de bloquer l'hydrolyse de l'ARN tout en augmentant la spécificité des pARNi pour leurs séquences cibles [10]. Ces trois modifications sont largement utilisées dans les pARNi en développement et sur le marché, séparément ou en combinaison les unes avec les autres [3]. Par ailleurs, étant double brin, les pARNi sont en moyenne deux fois plus gros et deux fois plus chargés que les OAS simple brin, ce qui réduit leur capacité à franchir les membranes biologiques. Des nanoparticules lipidiques (NPL) ont été développées pour faciliter leur entrée dans les cellules. En plus de masquer les charges négatives et de favoriser l'endocytose des pARNi, ces particules permettent de les protéger contre la dégradation [11]. Si les NPL ont amélioré l'internalisation des pARNi, tels que le patisiran, la découverte majeure dans le domaine des pARNi est sans doute le développement des GalNac (N-acétylgalactosamine) [12]. Ce sont des motifs dérivés du galactose, liés de façon covalente aux pARNi et permettant leur fixation au récepteur des asialoglycoprotéines<sup>3</sup> suivie de leur endocytose dans les hépatocytes. Les GalNac améliorent de façon spectaculaire la pénétration cellulaire des pARNi et le ciblage spécifique du foie. À ce jour, quatre conjugués pARNi-GalNac ont obtenu des AMM et d'autres sont en cours de développement clinique [3]. La technique GalNac a été adaptée aux OAS et plusieurs conjugués OAS-GalNac sont également en cours de développement clinique [3].

### Les microARN

Comme les pARNi, les microARN (miARN) sont des ARN inhibiteurs développés comme outils pharmacologiques. Leur mécanisme d'action est proche de celui de l'interférence à ARN et implique des acteurs communs, comme Dicer et le complexe AGO (*Argonaute*)/RISC (*RNA-induced silencing complex*), mais plusieurs éléments les distinguent des pARNi (*Figure 1*) [7]. Les précurseurs naturels des pARNi sont des ARN double brin exogènes, tandis que ceux des miARN sont des ARN simple brin en épingle à cheveux, transcrits dans la cellule. Les pARNi ont une cible ARNm unique pour laquelle ils ont une complémentarité totale alors que les miARN ont des cibles multiples, totalement ou partiellement complémentaires. Enfin, le mode d'action des pARNi implique exclusivement une dégradation de

<sup>3</sup> Glycoprotéines dont l'acide sialique terminal a été clivé.

l'ARNm tandis que les miARN agissent soit en dégradant leurs cibles, soit en bloquant leur traduction. Des dérégulations d'expression des miARN sont impliquées dans la pathogenèse de plusieurs maladies humaines et des outils thérapeutiques sont développés pour mimer leur activité ou, au contraire, diminuer leur expression. Il n'y a pas à ce jour de mimiques ou d'inhibiteurs thérapeutiques de miARN sur le marché, mais plusieurs molécules sont en évaluation clinique [3].

### Les oligonucléotides activateurs de l'expression génique

Des oligonucléotides peuvent être utilisés pour augmenter l'expression génique et/ou restaurer la fonction des protéines. Les deux mécanismes principaux utilisés à ces fins sont la modulation d'épissage, assurée par les OAS, et l'activation de la transcription, impliquant les petits ARN activateurs.

#### Les modulateurs d'épissage

Les OAS peuvent servir de bloqueurs stériques pour inhiber des mécanismes post-transcriptionnels ou traductionnels. En particulier, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées pour modifier l'épissage. Pour cela, les OAS se fixent à des séquences clés qui président à l'épissage du transcrit primaire pour modifier la composition exonique de l'ARNm mature et, par conséquent, la séquence de la protéine traduite. Deux stratégies sont utilisées : le saut d'exon et l'inclusion d'exon.

Les thérapies fondées sur le saut d'exon ont principalement été développées pour la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une myopathie héréditaire causée par les mutations du gène *DMD* codant la dystrophine. De nombreuses mutations entraînent un décalage du cadre de lecture et l'apparition de codons stop conduisant à un arrêt prématuré de la traduction et à une absence complète de la protéine, due à la dégradation des ARNm non-sens. Le saut d'exon peut être utilisé pour rétablir le cadre de lecture dans le transcrit mature, en éliminant un ou plusieurs exons. Il en résulte une production de protéines partiellement tronquées mais fonctionnelles (Figure 2) [13]. Plusieurs OAS sont développés pour induire le saut d'exons selon la localisation des mutations ciblées, et ainsi apporter aux patients le produit thérapeutique adapté à leur génotype, dans le cadre d'une approche de médecine personnalisée. Jusqu'à présent, quatre OAS ont obtenu des AMM sur la base de leur capacité à induire une production accrue de dystrophine, mais leur bénéfice clinique reste à confirmer [3].

Le saut d'exon peut également être utilisé pour corriger des anomalies d'épissage induites par des mutations génétiques. C'est le mode d'action du Sepofarsen, un OAS en évaluation clinique pour le traitement de l'amaurose de Leber<sup>4</sup> causée par une mutation récurrente du gène *CEP290* (*centrosomal protein 290*). Cette mutation introduit un site donneur d'épissage cryptique qui provoque l'insertion dans l'ARNm d'un exon surnuméraire contenant un codon stop. En masquant ce site

cryptique, le Sepofarsen permet de rétablir un épissage normal du transcrit et la production d'une protéine fonctionnelle [14].

À l'inverse de l'élimination d'un exon, un OAS peut servir à introduire un exon normalement absent. C'est le mode d'action du Spinraza<sup>®</sup>, premier médicament approuvé pour le traitement de l'amyotrophie spinale (SMA)<sup>5</sup>, une maladie rare causée par les mutations perte de fonction du gène *SMN1* (*survival of motor neuron 1*). Ce gène a un paralogue, appelé *SMN2*<sup>6</sup>, dont le transcrit primaire est presque identique mais qui subit un épissage alternatif dû à une variation d'un nucléotide (840C→T). Cet épissage alternatif, qui élimine l'exon 7 du transcrit mature, affecte 80 % à 90 % des transcrits, aboutissant à une protéine tronquée rapidement dégradée dans la cellule. L'exon 7 est en revanche présent dans 10 % à 20 % des transcrits produisant une protéine SMN totalement fonctionnelle. Le Spinraza<sup>®</sup> cible une séquence spécifique dans l'intron en aval de l'exon 7 de *SMN2* pour favoriser l'inclusion de l'exon 7<sup>7</sup>. Il en résulte une augmentation de la production de la protéine fonctionnelle (Figure 2) [15].

Pour agir comme modulateurs d'épissage, les OAS doivent être dépourvus de leur capacité à dégrader leur ARN cible. La chimie PMO (pour phosphorodiamidate morpholino oligo) a beaucoup été utilisée dans ce but car elle bloque l'action de la RNase H [11]. Il s'agit d'OAS dans lesquels les désoxyriboses sont remplacés par des cycles morpholines<sup>8</sup>, et les groupements phosphates par des phosphorodiamidates. Les PMO sont stables et peu toxique mais leur faible liaison aux protéines plasmatiques leur confère une mauvaise pharmacocinétique et une activité limitée. D'autres modifications chimiques peuvent être utilisées, notamment les 2'MOE et les LNA, à condition d'être présentes sur toute la longueur de l'OAS [5]. Enfin, il est possible d'utiliser des OAS ARN pour induire un encombrement stérique sans activer la RNase, qui ne reconnaît pas les duplex ARN-ARN [14]. Des modifications des ARN, telles que celles utilisées pour les pARNi, permettent de stabiliser les OAS ARN.

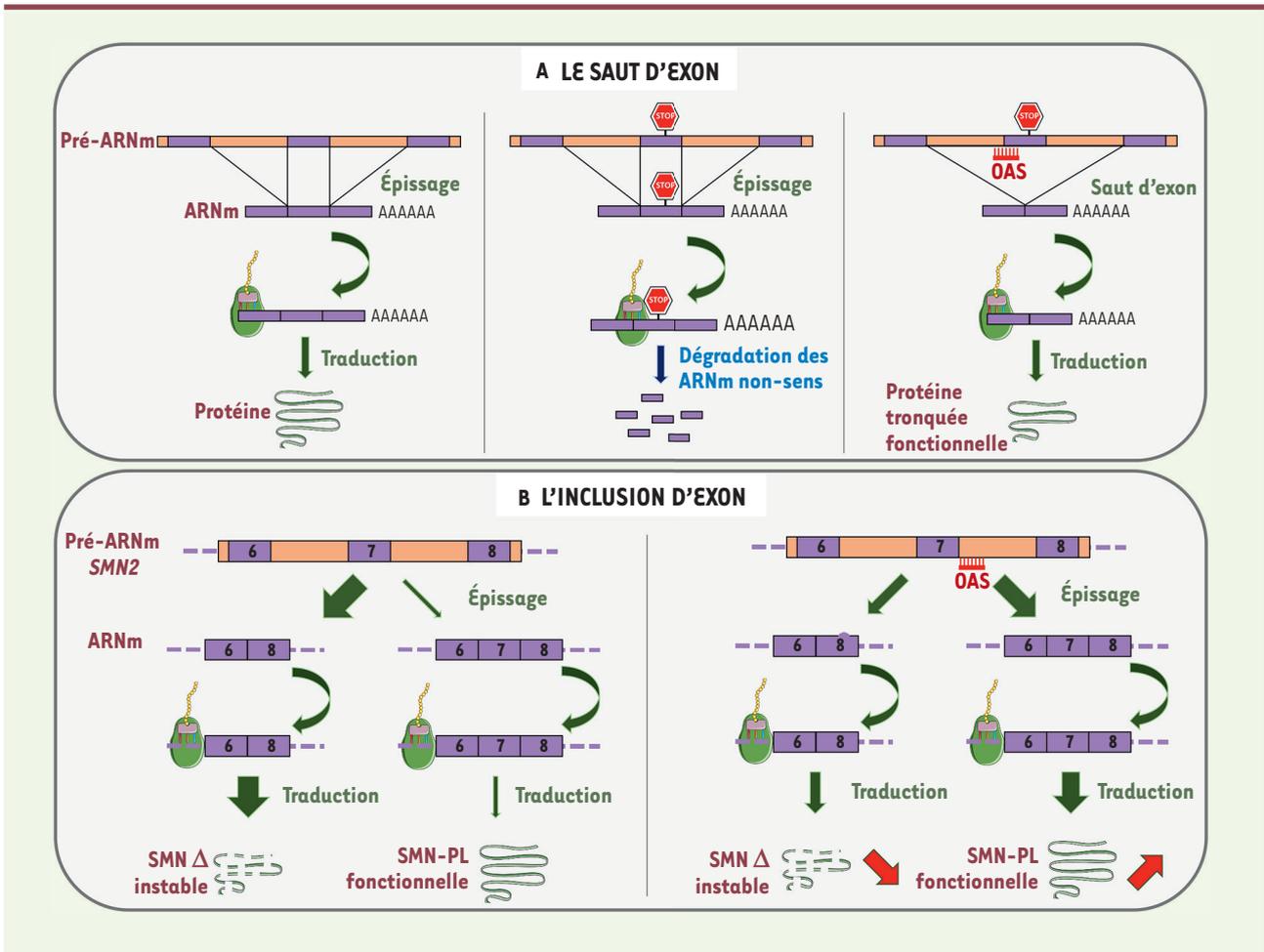
<sup>4</sup> Un groupe de dystrophies rétiniennes précoces et sévères, survenant dans les premiers mois de vie et entraînant une malvoyance profonde. Elle représente 10 à 18 % des cécités de l'enfance.

<sup>5</sup> La SMA est une maladie autosomique récessive affectant les motoneurons de la moelle épinière mais également d'autres organes, tels que le cœur, le foie ou les muscles squelettiques, menant à l'atrophie progressive des muscles.

<sup>6</sup> Deux copies de ce gène sont localisées sur le même chromosome, le gène télomérique *SMN1* et le gène centromérique *SMN2*.

<sup>7</sup> Plus précisément, cet oligonucléotide antisens se lie à un site d'inactivation de l'épissage intronique (ISS-N1) présent dans l'intron 7 de l'ARN pré-messager de *SMN2*. Sa liaison déplace les facteurs d'épissage, ce qui inhibe celui-ci. Le déplacement conduit à la rétention de l'exon 7 dans l'ARNm qui est alors traduit en une protéine fonctionnelle non tronquée.

<sup>8</sup> Composé hétérocyclique de formule C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>NO.

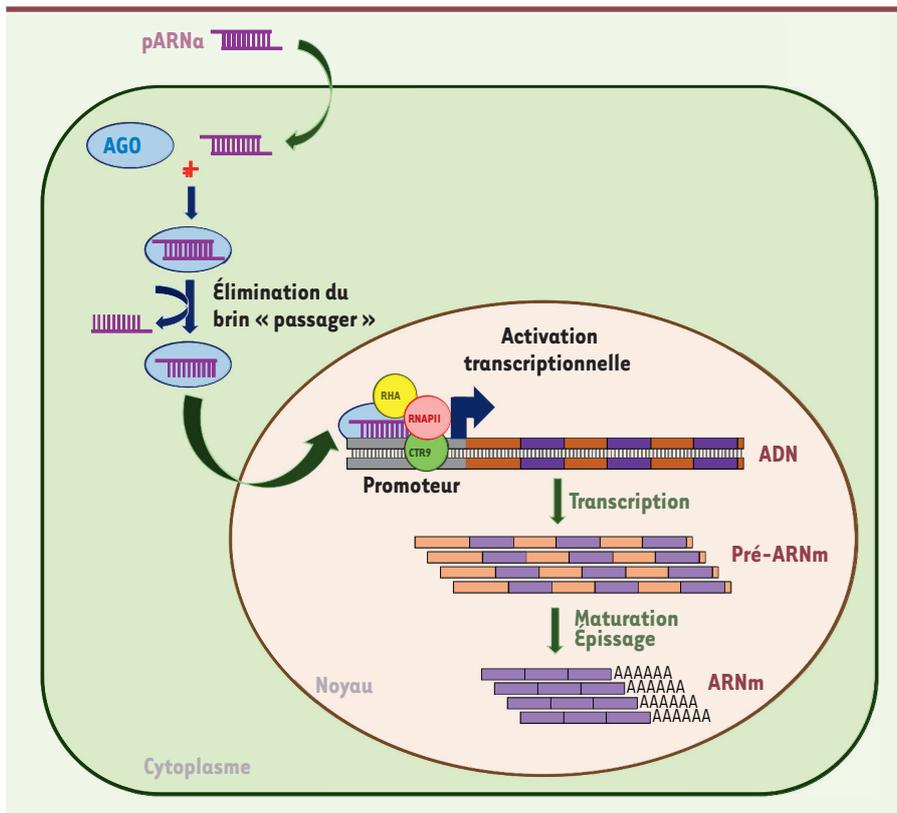


**Figure 2. Restauration de protéines fonctionnelles par modulation d'épissage.** **A.** Saut d'exon (panneau du haut) : en l'absence de mutation (à gauche), le pré-ARNm est épissé pour produire un ARNm traduit en une protéine fonctionnelle. Si une mutation induit un codon stop prématuré (au milieu), la traduction s'arrête précocement, induisant une dégradation des ARNm non-sens. En masquant le site receveur d'épissage, un OAS (représenté en rouge) peut empêcher l'incorporation de l'exon portant la mutation dans le transcrite mature. L'ARNm dépourvu de cet exon peut alors être traduit en une protéine tronquée mais fonctionnelle (à droite). **B.** Inclusion d'exon (panneau du bas) : le mode d'action du Spinraza® est illustré ici. Le pré-ARNm du gène *SMN2* produit deux transcrits alternatifs : un transcrite majoritaire dépourvu de l'exon 7 produisant une protéine SMN tronquée ( $\Delta$ ) rapidement dégradée, et un transcrite minoritaire contenant l'exon 7 produisant une protéine SMN « pleine longueur » (PL) totalement fonctionnelle (à gauche). L'OAS (représenté en rouge) cible une séquence spécifique dans l'intron en aval de l'exon 7 de *SMN2* pour favoriser l'inclusion de ce dernier. Il en résulte une augmentation de la production de transcrits contenant l'exon 7 et de la production de protéine « pleine longueur » fonctionnelle (droite).

### Les petits ARN activateurs

Les petits ARN activateurs (pARNA) sont des ARN non codants qui se distinguent des autres oligonucléotides par leur action au niveau de l'ADN et non de l'ARN [2]. Les pARNA ont une structure semblable aux pARNi, malgré leurs fonctions biologiques opposées. En effet, alors que les pARNi inhibent l'expression génique, les pARNA activent la transcription de leurs gènes cibles en agissant sur les promoteurs. Le mode d'action des pARNA n'est pas complètement élucidé mais il est actuellement suggéré qu'après leur entrée dans la cellule, les pARNA s'associent à AGO2 (*argonaute RISC catalytic component 2*). Le complexe AGO2/pARNA ainsi formé migre dans le noyau où il recrute d'autres protéines pour former un complexe d'activation transcrip-

tionnelle dans lequel les pARNA servent de guide vers les promoteurs cibles (Figure 3). Les pARNA peuvent ainsi servir d'outils thérapeutiques, en tant qu'activateurs de la transcription. Des optimisations en termes de stabilité et d'efficacité ainsi que l'utilisation d'une formulation favorisant la pénétration cellulaire ont permis au MTL-CEBPA d'être le premier pARNA à être évalué, en combinaison avec le sorafenib, dans des essais de Phase I puis II pour le traitement du cancer hépatocellulaire avancé (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04710641) [16, 17].



**Figure 3. Activation de l'expression génique par les petits ARN activateurs (pARNa).** Le mécanisme d'action des pARNa est illustré. Après son entrée dans la cellule, le pARNa (représenté en violet) s'associe avec AGO puis migre dans le noyau où il recrute les protéines RHA (RNA Helicase A), CTR9 (RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog) et RNAPII (RNA polymerase II) pour former un complexe d'activation transcriptionnelle dans lequel les pARNa servent de guide vers les promoteurs ciblés. Il en résulte une activation de la transcription et une augmentation de la production de pré-ARNm et d'ARNm du gène cible.

### Comment breveter les oligonucléotides ?

Le développement croissant des oligonucléotides thérapeutiques s'accompagne d'une forte dynamique de dépôts de demandes de brevets pour protéger ces produits. Pour obtenir une protection par brevet, une invention doit être nouvelle, inventive et susceptible d'application industrielle. L'invention doit également être claire et suffisamment décrite. Nous donnons ci-dessous un aperçu des pratiques relatives à la protection des oligonucléotides.

#### Les critères de brevetabilité et les inventions

Rappelons qu'une invention, pour être brevetable, doit être nouvelle, c'est-à-dire que ses caractéristiques ne doivent pas avoir été divulguées avant la date de dépôt de la demande de brevet, par une description écrite ou orale, un usage ou par tout autre moyen. Une invention doit également être considérée comme impliquant une activité inventive, c'est-à-dire que, pour un homme du métier, elle ne doit pas découler d'une manière évidente de l'état de la technique. L'exigence d'activité inventive a pour but d'éviter la protection « d'inventions » qui sont, au vu de l'état de l'art, évidentes à tester et/ou ayant une probabilité raisonnable de succès. Pour protéger une invention dans le domaine des oligonucléotides, différents types de protection sont possibles. Elles sont déterminées par les revendications qui définissent l'objet de la demande pour lequel la protection est recherchée. Le niveau de divulgation de la cible participera à déterminer le type de protection.

Lorsque la cible est complètement nouvelle, c'est-à-dire qu'elle n'a jamais été identifiée auparavant, tout type d'inhibiteur pourra être

revendiqué, y compris un oligonucléotide (Figure 4, exemples 1 et 2). C'est le niveau de protection le plus large possible pour ce type de demande de brevet. Si la cible est connue, mais que son implication dans une maladie n'a jamais été renseignée, tout type d'inhibiteur pourra également être revendiqué, y compris un oligonucléotide dans le traitement de cette maladie (Figure 4, exemple 5). Enfin, si la cible est connue et son implication dans une maladie déjà démontrée, une protection sur l'utilisation d'oligonucléotides pourra être envisagée, à condition qu'aucun adressage par oligonucléotides de cette cible pour le traitement de cette maladie n'ait été décrit auparavant (Figure 4, exemple 6). Ces types de revendications sont dits « fonctionnels » car c'est la fonction en tant que telle qui est visée, c'est-à-dire l'inhibition ou l'activation de la cible via un oligonucléotide.

Si la cible n'est pas nouvelle et qu'elle a déjà été ciblée par au moins un oligonucléotide, la seule protection envisageable portera sur le ou les oligonucléotides en tant que tels (Figure 4, exemple 3). Ce type de revendication est dit « structurel », car la protection portera sur une structure particulière. Leur utilisation comme médicament pour le traitement de maladies spécifiques pourra être prévue (Figure 4, exemple 4). Enfin, des travaux d'optimisation des oligonucléotides pourront également être protégés. Dans ce cas, les oligonucléotides en tant que tels, avec leurs modifications, seront revendiqués ainsi que leurs utilisations.

	Type de revendication	Exemple	
Portée de la protection	1	Revendication avec la cible nouvelle	Oligonucléotide antisens contre la cible X
	2	Revendication avec la région nouvelle	Oligonucléotide antisens contre la séquence d'acides nucléiques X à XX de la séquence d'acide nucléique définie par SEQ ID NO : X
	3	Revendication avec une séquence d'oligonucléotide nouvelle	Oligonucléotide antisens ayant la séquence d'acide nucléique définie par SEQ ID NO : Y
	4	Revendication thérapeutique	Oligonucléotide antisens contre la cible X comme médicament
	5	Revendication thérapeutique	Oligonucléotide antisens contre la cible X pour son utilisation dans la maladie X
	6	Revendication thérapeutique	Oligonucléotide antisens contre la cible X pour son utilisation dans la maladie Y

**Figure 4. Exemples de revendications.** Les revendications 1, 2, 4, 5 et 6 sont dites « fonctionnelles » et la revendication 3 « structurelle ».

Lorsque la demande de brevet aura été déposée, chaque office de brevets analysera si les revendications satisfont aux critères de brevetabilité.

### Analyse de la brevetabilité

#### Nouveauté

La nouveauté sera normalement facile à déterminer, que la cible soit connue ou non. En effet, si la cible n'est pas connue ou n'a jamais été ciblée par un oligonucléotide, la nouveauté d'une revendication sur la cible en tant que telle devrait être reconnue facilement. Si la cible est connue, alors des oligonucléotides spécifiques devraient être reconnus comme nouveaux si leurs séquences particulières n'ont jamais été divulguées dans l'état de la technique.

#### Activité inventive

L'activité inventive sera potentiellement plus compliquée à déterminer. En effet, il faudra montrer qu'il n'était pas évident pour l'homme du métier d'adresser la cible d'intérêt avec des oligonucléotides, ou d'utiliser des oligonucléotides avec de nouvelles séquences nucléotidiques alors qu'il en existait déjà. Il faudra donc démontrer soit les effets particuliers dus à l'utilisation de ce type de produit, comme une meilleure efficacité ou une moindre toxicité, soit les effets particuliers que confèrent ces nouveaux oligonucléotides, par exemple, une inhibition complète de la cible ou le traitement d'une nouvelle maladie. Dans ces deux cas, la partie expérimentale de la demande de brevet sera primordiale et devra être robuste, afin de détailler et montrer tous les avantages des oligonucléotides décrits dans la demande de brevet.

Concrètement, si une revendication fonctionnelle est recherchée, le demandeur devra montrer qu'il n'était pas évident d'obtenir un effet biologique recherché en modulant la fonction de la cible par des oligonucléotides. Il faudra pour cela montrer que l'utilisation d'oligonucléotides confère des effets techniques supplémentaires ou inattendus par rapport à ce qui était connu dans l'art antérieur, par exemple que la modulation de l'expression d'un gène induit un effet biologique plus important que la modulation de la fonction de la protéine qu'il code. Dans ce type de situation, les inventeurs devront mener un programme

de recherche qui permettra de tester des oligonucléotides ciblant différentes parties du gène afin de montrer que le gène dans son entièreté peut être ciblé et, idéalement, de tester différents types d'oligonucléotides (OAS, pARNi, etc.) afin de montrer que l'effet obtenu n'est pas dû à un type d'oligonucléotide particulier. Il pourra cependant être compliqué d'obtenir ce type de revendications car les offices considèrent dorénavant qu'il est plus ou moins évident d'utiliser ces outils pour une cible donnée. Une façon de contourner cet obstacle serait d'identifier une région spécifique de la séquence d'un ARNm à cibler qui permettrait d'obtenir un effet technique inattendu, par exemple une meilleure efficacité d'extinction de l'expression du gène que le ciblage d'autres régions, ou d'utiliser un sous-type d'oligonucléotide apportant également un effet inattendu. Dans ce cas, l'inventeur devra montrer de façon expérimentale que certains oligonucléotides fonctionnent dans une région spécifique et que d'autres, ciblant d'autres régions du gène, ne fonctionnent pas. En ce qui concerne la revendication structurelle, afin de prouver l'activité inventive, il faudra montrer que les oligonucléotides spécifiques ont des effets inattendus, surprenants par rapport aux oligonucléotides de l'art antérieur. Il peut s'agir d'une meilleure sélectivité, d'une meilleure efficacité de réponse ou d'une capacité à cibler une population de patients particulière. Dans ce type de situation, les chercheurs devront comparer expérimentalement des oligonucléotides de l'art antérieur avec leurs nouveaux oligonucléotides, et montrer de façon claire et non ambiguë la supériorité de ces nouveaux oligonucléotides.

Dans les cas de revendications fonctionnelles ou structurelles, les chercheurs devront également démontrer l'efficacité de leurs oligonucléotides dans différentes maladies ou sous-types de maladies. Par exemple, si une portée « traitement de tout cancer »

est recherchée, il faudra idéalement tester les oligonucléotides dans trois ou quatre cancers différents, au moins *in vitro*.

D'une manière générale, lors de la rédaction de la demande de brevet, le demandeur sera vigilant à bien exposer les difficultés techniques rencontrées lors des expérimentations, les solutions apportées à ces problèmes et les effets techniques inattendus et surprenants apportés par l'invention, comme un meilleur effet biologique.

## Conclusion

Grâce à leur capacité à agir sur l'expression génique, les oligonucléotides représentent des outils pharmacologiques de choix pour le développement de nouveaux traitements. En effet, en interagissant avec l'ARN ou l'ADN pour réguler l'expression des protéines, les oligonucléotides s'affranchissent de la difficulté de reconnaître les structures tridimensionnelles souvent complexes des protéines. De plus, leur action ne dépendant pas de la fonction des protéines dont ils régulent l'expression, les oligonucléotides peuvent potentiellement réguler toutes les protéines y compris celles qui ont des fonctions difficiles à cibler. Si la grande majorité des oligonucléotides thérapeutiques sont des inhibiteurs d'expression [3], plusieurs stratégies fondées sur la modulation d'épissage par les OAS et sur l'activation transcriptionnelle par les pARNa, permettent d'augmenter l'expression génique.

Diverses modifications chimiques ont permis d'améliorer les propriétés pharmacologiques des oligonucléotides, mais il existe encore une forte marge de progression pour créer des médicaments plus performants. Par exemple, le succès rencontré par les GalNac pour le ciblage hépatique démontre le grand intérêt de cibler spécifiquement un tissu. Pour le moment, seul le foie bénéficie d'une méthode aussi efficace, mais de nombreux programmes de recherche visent à développer des stratégies analogues pour d'autres organes [11].

Ce nouvel essor des oligonucléotides thérapeutiques s'accompagne d'une augmentation du nombre de brevets relatifs à ces molécules. Malgré des critères de brevetabilité communs, ces derniers peuvent être analysés différemment selon les territoires visés. C'est le cas en Europe et aux États-Unis, en raison des différentes interprétations des lois et de jurisprudences passées [3]. Aux États-Unis, la délivrance de revendications ayant une définition fonctionnelle ou structurelle peut s'avérer beaucoup plus difficile à obtenir qu'en Europe. Il est cependant important d'inclure dans la demande de brevet le plus de résultats expérimentaux possibles et de prévoir, lors de la rédaction de la demande de brevet, des positions de repli intéressantes pour ne pas subir une déconvenue lors des examens nationaux. ♦

## SUMMARY

### Mechanisms of action and patentability of therapeutic oligonucleotides

Oligonucleotides are small nucleic acids capable of interacting with DNA or RNA to modulate gene expression. Widely used by researchers as research tools to modulate the expression of the genes they seek to decipher the function, oligonucleotides can also serve as therapeutic agents to regulate targets of interest. After the first marketing authorisation

of an oligonucleotide therapeutics in 1998, the field met little clinical success until 2016 when Spinraza® became the first drug authorized for spinal muscular atrophy. This compound became in the following years the first "blockbuster" among this class of molecules, validating the commercial potential of oligonucleotide drugs. Since then, about ten other oligonucleotides hit the market and a broad pipeline is currently in late clinical development. Through our article, we describe therapeutic oligonucleotides, their modes of action and their patentability. ♦

## REMERCIEMENTS

Nous remercions les docteurs Allison Agus et Melina Gaffré, ainsi que Gloria Batone pour leur relecture critique de ce manuscrit.

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Crook ST, Witzum JL, Bennett CF, et al. RNA-Targeted Therapeutics. *Cell Metab* 2018 ; 27 : 714-39.
2. Li LC, Okino ST, Zhao H, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 17337-42.
3. Moumné L, Marie AC, Crouvezier N. Oligonucleotide Therapeutics: From Discovery and Development to Patentability. *Pharmaceutics* 2022 ; 14 : 260.
4. Liang XH, Sun H, Nichols JG, et al. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus. *Mol Ther* 2017 ; 25 : 2075-92.
5. Bennett CF. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age. *Annu Rev Med* 2019 ; 70 : 307-21.
6. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.
7. Lam JK, Chow MY, Zhang Y et al. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015 ; 4 : e252.
8. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001 ; 411 : 494-8.
9. Hoy SM. Patisiran: First Global Approval. *Drugs* 2018 ; 78 : 1625-31.
10. Hu B, Zhong L, Weng Y, et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther* 2020 ; 5 : 101.
11. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2020 ; 19 : 673-94.
12. Springer AD, Dowdy SF. GalNac-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics. *Nucleic Acid Ther* 2018 ; 28 : 109-18.
13. Matsuo M. Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon-skipping Therapies: Precision Medicine Spreading from Duchenne Muscular Dystrophy. *JMA J* 2021 ; 4 : 232-40.
14. Cideciyan AV, Jacobson SG, Ho AC, et al. Durable vision improvement after a single treatment with antisense oligonucleotide seipofarsen: a case report. *Nat Med* 2021 ; 27 : 785-9.
15. Wadman M. Antisense rescues babies from killer disease. *Science* 2016 ; 354 : 1359-60.
16. Reebye V, Saetrom P, Mintz PJ, et al. Novel RNA oligonucleotide improves liver function and inhibits liver carcinogenesis in vivo. *Hepatology* 2014 ; 59 : 216-22.
17. Sarker D, Plummer R, Meyer T, et al. MTL-CEBPA, a Small Activating RNA Therapeutic Upregulating C/EBP- $\alpha$ , in Patients with Advanced Liver Cancer: A First-in-Human, Multicenter, Open-Label, Phase I Trial. *Clin Cancer Res* 2020 ; 26 : 3936-46.

## TIRÉS À PART

L. Moumné