



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN

Farmacologia e Oncologia Molecolare

CICLO XXIII

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

**Utilizzo di Nanoparticelle per il trasporto di Molecole
Antisenso nel modello murino di Distrofia Muscolare di
Duchenne**

Settore Scientifico Disciplinare MED/03

**Dottorando
Dott. Bassi Elena**

**Tutore
Prof. Ferlini Alessandra**

Anni 2008/2011

INDICE

	pagina
ABSTRACT	4
DMD e BMD	8
DISTROFINA: GENE, PROTEINA, MUTAZIONI E CORRELAZIONE CON IL FENOTIPO DMD/BMD	10
MODELLI ANIMALI DI DISTROFINOPATIA	15
TERAPIE FARMACOLOGICHE IN TRIAL CLINICO	18
<i>GLUCOCORTICOIDI</i>	18
TERAPIE MOLECOLARI IN TRIAL CLINICO	20
<i>PTC-124</i>	20
<i>EXON SKIPPING MEDIATO DA MOLECOLE ANTISENSO (AON)</i>	21
IL TOPO MDX COME MODELLO DI STUDIO PER L'APPROCCIO TERAPEUTICO DELL'EXON SKIPPING: DAGLI STUDI PRE-CLINICI ALL'UOMO	27
SCOPO	34
MATERIALI E METODI	40
Sintesi dell'AON M23D	40
Sintesi delle nanoparticelle T1, T1-Fluo e ZM2	40
Adsorbimento dell'AON M23D alle nanoparticelle T1 e ZM2	41

Somministrazione i.p dei topi mdx	41
Processazione dei tessuti/organi	42
Analisi dei tessuti in microscopia elettronica a trasmissione	42
Analisi in immunofluorescenza e conta delle fibre distrofina-positive	43
Analisi del trascritto distrofina	44
Analisi della proteina distrofina in Western blot	45
RISULTATI	46
Oligoribonucleotide antisenso (AON) M23D 2’O-metile-fosforotioato (2’OMePS)	46
<i>ESPERIMENTO CON LE NANOPARTICELLE T1</i>	47
Nanoparticelle T1 e esperimenti di loading con l’AON M23D	47
Schema di trattamento con nanoparticelle T1	47
Biodistribuzione delle nanoparticelle T1	48
Analisi istologica	49
Analisi in immunofluorescenza della proteina distrofina	49
Analisi della distrofina in Western blot	50
Nested RT-PCR	50
Analisi quantitativa degli effetti del trattamento con T1-M23D sul livello generale di trascrizione	51
Quantificazione dello skipping dell’esone 23 tramite ESRA	51
<i>ESPERIMENTI CON LE NANOPARTICELLE ZM2</i>	52
Nanoparticelle ZM2 e esperimenti di loading con l’AON M23D	52

Misurazione della citotossicità delle ZM2	52
Schema di trattamento con nanoparticelle ZM2	53
<u>Esperimento 1</u>	53
Analisi in immunofluorescenza della proteina distrofina	53
Analisi della distrofina in Western Blot	54
Nested RT-PCR	55
Quantificazione dello skipping dell'esone 23 tramite ESRA	55
Analisi in immunofluorescenza del muscolo liscio erettore del pelo "arrector pili" della cute	56
<u>Esperimento 2</u>	56
Analisi in immunofluorescenza della proteina distrofina	56
Analisi della distrofina in Western Blot	57
Nested RT-PCR	58
Quantificazione dello skipping dell'esone 23 tramite ESRA	58
CONCLUSIONI	59
FIGURE	65
BIBLIOGRAFIA	97

ABSTRACT

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è una grave patologia neuromuscolare ereditata con meccanismo recessivo legato al cromosoma X: è principalmente causata da mutazioni che interrompono la cornice di lettura (frame) dell'RNA messaggero determinando assenza di proteina distrofina nel tessuto muscolare sia scheletrico che cardiaco. Attualmente l'approccio terapeutico più promettente, definito come exon-skipping, si basa sull'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (AONs) a RNA che riconoscono specifiche sequenze esoniche e portano all'esclusione dell'esone bersaglio dal trascritto, inducendo il ripristino della cornice e permettendo la sintesi di una proteina funzionale. Una delle difficoltà maggiori di questo approccio terapeutico è ottenere la protezione dalla degradazione e il trasporto degli AONs nei tessuti bersaglio. Di conseguenza, per ottenere risultati consistenti è necessario utilizzare dosaggi elevati di AON, che costituiscono però una possibile fonte di effetti collaterali in terapie *ad vitam* come per la DMD. Il nostro gruppo di ricerca sta attualmente testando delle nuove nanoparticelle come possibili sistemi di trasporto per gli AONs con struttura a fosforotioato (2'-O-methyl-phosphorothioate 2'OMePs) nel modello murino di distrofia muscolare (topo mdx). Tali nanoparticelle sono costituite da materiale inerte biocompatibile (polimetilmetacrilato) al quale sono legati covalentemente gruppi cationici che permettono il legame elettrostatico con le molecole antisenso. In un primo esperimento pilota abbiamo utilizzato nanoparticelle di circa 500 nm e abbiamo dimostrato che sono in grado di legare e rilasciare gli AONs 2'OMePs, inducendo il ripristino dell'espressione di distrofina nei tessuti muscolari del topo mdx.

Nonostante i risultati positivi ottenuti, tali particelle presentano una scarsa capacità di adsorbire AONs in superficie e il loro diametro non consente la somministrazione intravenosa. Nei successivi esperimenti abbiamo quindi utilizzato nanoparticelle di dimensioni minori (circa 130 nm) ma con una capacità di adsorbimento 5 volte maggiore. Abbiamo trattato per via sistemica i topi mdx con dosaggi del complesso nanoparticella-AON molto bassi (52,5 mg AON/Kg), e abbiamo analizzato gli animali 1 e 12 settimane dopo la fine del trattamento. Ad 1 settimana dalla fine del trattamento l'analisi dell'mRNA (Nested-RT-PCR e Real Time-RT-PCR) ci ha permesso di identificare nei muscoli scheletrici e nel cuore il trascritto mancante dell'esone bersaglio; l'analisi della proteina (Western blot e immunofluorescenza) ha dimostrato inoltre il corretto peso molecolare e la corretta localizzazione della distrofina ripristinata nel sarcolemma delle fibre muscolari scheletriche, cardiache e nel muscolo liscio erettore del pelo. A distanza di 12 settimane dall'interruzione del trattamento il trascritto corretto è risultato ancora presente nei tessuti analizzati, anche se in minore quantità, inoltre anche la proteina è evidenziabile sia in immunofluorescenza che in western blot nei muscoli scheletrici. Questi risultati dimostrano che le nanoparticelle utilizzate rappresentano un buon sistema di trasporto/rilascio per AONs, in quanto sono in grado di: i) garantire la protezione delle molecole a RNA dalle nucleasi tissutali, abbassando i dosaggi necessari per ottenere un effetto misurabile; ii) diffondere nei tessuti bersaglio (muscoli) dove rilasciano in maniera lenta e controllata le molecole adsorbite, mantenendo più a lungo l'effetto del trattamento.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is an X-linked severe neuromuscular disease, mainly caused by mutations that disrupt the mRNA reading frame resulting in the absence of dystrophin protein in skeletal and cardiac muscles. Currently the most promising therapeutic approach, defined as exon-skipping, is based on the use of antisense oligonucleotides (AONs) to recognize specific RNA sequences that induce the exclusion of target exon from the mRNA and the restoration of the frame, allowing the synthesis of a functional protein.

One of the main difficulties of this therapeutic approach is to obtain protection from degradation and transport of the AONs to the target tissues.

Therefore, to obtain consistent results, high doses of AONs are needed, which are, however, a potential source of adverse reactions to life-long therapies as in DMD. Our research group is testing nanoparticles as a new delivery system for AONs with phosphorothioate backbone (2'-O-methyl-phosphorothioate 2'OMePs) in the mouse model of muscular dystrophy (mdx mice).

These nanoparticles consist of an inert biocompatible material (polymethylmethacrylate) with covalently linked cationic groups, which allow the electrostatic bond with the antisense molecules. In an initial pilot experiment, we used nanoparticles of about 500 nm of diameter and we have proved that they are able to bind and release the AONs 2'OMePs, leading to the restoration of dystrophin expression in mdx mouse muscles. Despite the positive results obtained, these nanoparticles have a low capacity to adsorb on the surface AONs, and their diameter does not allow for intravenous administration.

In subsequent experiments we therefore used nanoparticles of smaller size (about 130 nm of diameter) but with a 5 times higher adsorption capacity. We treated systemically mdx mice with low doses (52,5 mg AON / kg) of nanoparticle-AON complexes, and we analyzed the mice 1 and 12 weeks after the end of the treatment. At 1 week after the end of the treatment analysis of mRNA (Nested RT-PCR and Real Time-RT-PCR) has allowed us to identify in skeletal muscles and heart the transcript missing the target exon. Protein analysis (Western blot and immunofluorescence) also showed the correct molecular weight of restored dystrophin and proper localization in the sarcolemma of skeletal muscle fibers, cardiac, and arrector pili smooth muscle.

At a distance of 12 weeks after treatment the correct transcript was still present in the tissues analyzed, although in lesser quantities, and the protein also detectable by immunofluorescence and Western blot. These results demonstrate that these nanoparticles represent a promising system for AONs delivery, as they are able to: i) ensure the protection of RNA molecules from nucleases, allowing lower doses to produce a measurable effect, ii) spread in target tissues (muscles) where release the adsorbed molecules in a slow and controlled manner with a longer treatment effect.

DMD e BMD

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) e la Distrofia Muscolare di Becker (BMD) sono le più frequenti distrofinopatie, oltre alle altre forme alleliche più rare, come la cardiomiopatia dilatativa (XLDC) e la iper-CPKemia associata a crampi. Queste patologie sono causate da mutazioni del gene distrofina e possono essere ereditate oppure, nel 30% dei casi, esordire *de novo*.

La Distrofia Muscolare di Duchenne (OMIM #310200) è la patologia neuromuscolare più frequente dell'infanzia (AArtsma-Rus et al. 2010) ed è la forma allelica più severa (Emery 2002). L'incidenza è di 1 su 3500 maschi nati vivi (Moser 1984). Si manifesta come patologia progressiva, i cui primi sintomi a carico degli arti inferiori appaiono tra il terzo e il quinto anno di vita. I bambini affetti da questa patologia cominciano a camminare in ritardo rispetto alla norma (più del 50% dei bambini DMD non camminano fino ai 18 mesi) e dimostrano difficoltà nella corsa. Presentano polpacci ipertrofici, difficoltà nel camminare e nel salire le scale, camminano sulla punta dei piedi e spesso cadono. A causa della debolezza dei muscoli estensori del ginocchio e dell'anca, gli affetti da tale patologia si alzano dalla posizione supina tramite la cosiddetta manovra di Gower (si appoggiano prima su mani e piedi e poi posizionano le mani sulle cosce per spingere in alto la parte superiore del corpo). La debolezza muscolare progredisce fino al cingolo scapolare, i muscoli della parte superiore del tronco, e i pazienti perdono la capacità deambulatoria mediamente intorno ai 12 anni di età (Emery 1993). Inoltre sin dalla nascita si riscontra un innalzamento importante del livello sierico dell'enzima creatina chinasi (CK) (20000-50000 U/L, rispetto agli 80-250 U/L nei non affetti), che spesso rappresenta un campanello di allarme per una diagnosi tempestiva. Il

coinvolgimento del diaframma e dei muscoli preposti alla respirazione sono stati, fino agli anni novanta, la causa principale di morte per insufficienza respiratoria nella seconda decade di vita dei pazienti. Attualmente invece, gli affetti da DMD riescono a sopravvivere fino alla terza decade grazie ai miglioramenti delle cure respiratorie e della ventilazione assistita, e di solito muoiono a causa di cardiomiopatia dilatativa (Emery 2002; Simonds et al. 1998). Il coinvolgimento cardiaco compare nella maggior parte dei casi ad un'età di circa 6 anni ed è presente nel 95% dei pazienti negli ultimi anni di vita. Una percentuale di pazienti muore comunque entro i vent'anni a causa di infezioni respiratorie. Anche la muscolatura liscia presenta disfunzioni come ad esempio nel tratto digestivo (21% dei pazienti) e in quello urinario (6% dei casi). Un terzo dei bambini risulta inoltre affetto da deficit cognitivi di varia entità (Muntoni et al. 2003): circa il 20% dei pazienti DMD ha un IQ minore di 70 (Emery 2002) e difficoltà di apprendimento (Polakoff et al. 1998). Al contrario della compromissione muscolare i deficit cognitivi non sono progressivi.

La Distrofia Muscolare di Becker è la forma allelica più lieve e colpisce 1:15000 maschi. Anche i pazienti BMD soffrono di debolezza muscolare, ma il decorso della malattia è più lieve e benigno rispetto alla DMD (Emery 2002). Il fenotipo varia da molto lieve a moderatamente severo; i sintomi appaiono intorno ai 12 anni di vita anche se alcuni pazienti rimangono asintomatici per la maggior parte della loro vita. La maggioranza dei pazienti perde la capacità di deambulazione circa 20-30 anni dopo l'esordio della malattia (Emery 1993), anche se molti riescono a camminare per molto più tempo (England et al. 1990; Mirabella et al. 1998; Yazaki et al. 1999). Circa il 50% degli affetti soffre di cardiomiopatia, che spesso è l'unico sintomo (de Visser et al. 1990; Emery 1993). Le cardiomiopatie più severe di solito non si sviluppano prima dei 21 anni e solo pochi pazienti presentano problemi

cardiaci prima dei 13 anni (Nigro et al. 1983). I pazienti colpiti in modo più severo muoiono tra i 40 e i 50 anni, invece quelli colpiti solo lievemente hanno un'aspettativa di vita normale.

DISTROFINA: GENE, PROTEINA, MUTAZIONI E CORRELAZIONE CON IL FENOTIPO DMD/BMD

Il gene DMD è localizzato nel braccio corto del cromosoma X in posizione p21.1 (RefSeq NM_004006.2), e rappresenta il più grande gene del genoma umano, circa 2,4 Mb.

La parte codificante del gene è composta da 79 esoni, ma il 99% della sequenza genica è rappresentata da introni di grandi dimensioni (Ahn and Kunkel 1993). L'RNA messaggero full-length (14000 bp), è espresso prevalentemente nella muscolatura scheletrica e cardiaca, e, a livelli inferiori, nel cervello (Sironi et al. 2001; Torelli et al. 1999).

Il gene distrofina dà origine a 3 diverse isoforme proteiche full-length (isoforma muscolare, cerebrale, e dei neuroni cerebellari del Purkinje) che derivano da trascritti contenenti lo stesso numero di esoni, con un primo esone unico, ma la cui trascrizione è indotta da tre promotori indipendenti (**figura 1**). L'espressione delle 3 isoforme non è comunque esclusiva dei siti primari di espressione: per esempio il promotore cerebrale guida l'espressione soprattutto a livello dei neuroni corticali e nell'ippocampo (Nudel et al. 1989; Gorecki et al. 1992), mentre l'isoforma del Purkinje è espressa nelle cellule cerebellari del Purkinje e a concentrazioni molto basse anche nel muscolo scheletrico (Bies et al. 1992). Il promotore muscolare guida l'espressione nel muscolo scheletrico, nei cardiomiociti (Muntoni et al. 1995) e a basse concentrazioni anche in alcune cellule gliali del cervello (Yaffe et al.

1992). Oltre alle 3 isoforme full-length vari eventi di splicing alternativo generano altre isoforme più corte (Dp260, Dp140, Dp116, Dp71) che perdono alcuni domini nell'estremità amino-terminale, ma mantengono il dominio ricco in cisteine e quello carbossi-terminale (**figura 1**). Le varianti di splicing derivano sia dall'esclusione di alcuni esoni dal trascritto (exon skipping), sia dal "mescolamento" dell'ordine di alcuni esoni (exon scrambling) (Sadoulet-Puccio et al. 1996; Surono et al. 1999). Questi eventi di solito si verificano in maniera tessuto-specifica e contribuiscono alla complessa regolazione ed espressione della proteina distrofina nei diversi tessuti.

Le mutazioni più frequenti del gene distrofina sono costituite da riarrangiamenti che coinvolgono 1 o più esoni (80%), di cui il 70% è rappresentato da delezioni e il 10% da duplicazioni. Queste mutazioni avvengono di solito in due regioni, chiamate "hot spots regions", che comprendono gli esoni 2-19 (minor hot spot region) e 45-55 (major hot spot region).

Il 10-15% delle restanti mutazioni comprende piccole mutazioni: (nonsense, missenso, frameshift, mutazioni di splicing), e mutazioni atipiche introniche profonde.

La diagnosi clinica di Distrofia Muscolare di Duchenne viene solitamente formulata in seguito all'osservazione di i) funzionalità muscolare anormale in bambini maschi e presenza dei segni di Gower ii) aumento dei livelli sierici dell'enzima CK iii) aumento delle transaminasi (prodotte sia dal fegato che dai muscoli). Nei pazienti con sintomi riconducibili a DMD/BMD il completamento della diagnosi clinica viene effettuato mediante biopsia muscolare che permette l'analisi in immunofluorescenza/immunoistochimica della presenza/assenza della proteina distrofina. Successivamente si procede alla diagnosi genetica mediante analisi

molecolare del gene distrofina (multiplex PCR, MLPA, sequenziamento) alla ricerca di delezioni/duplicazioni o di piccole mutazioni. Se i tests genetici sopraelencati non identificano la mutazione causativa, o per chiarire la patogenicità di una variazione non descritta in precedenza, può essere utile l'analisi dell'RNA estratto dalla biopsia muscolare (Bushby et al. 2010).

A livello istologico le biopsie muscolari DMD evidenziano degenerazione e rigenerazione muscolare, variazione nel calibro delle fibre, presenza di infiltrati infiammatori, fibrosi e infiltrazione di tessuto adiposo che con il tempo va a sostituire la massa muscolare (Dubowitz 2000). Questi cambiamenti sono meno evidenti nei pazienti BMD. L'analisi in immunofluorescenza, eseguita su sezioni di muscolo con anticorpi specifici anti-distrofina (contro diversi domini della proteina) è in grado di rilevare l'eventuale assenza di segnale a livello del sarcolemma (DMD) oppure la presenza di una debole positività (BMD).

L'isoforma full-length della proteina distrofina ha un peso molecolare di 427 kDa, è composta da 3685 aminoacidi e contiene 4 domini: il dominio amino-terminale, il dominio centrale chiamato rod-domain e il dominio carbossi-terminale (**figura 2**). Il dominio N-terminale ha omologia con l' α -actinina e contiene 3 domini di legame con l'actina citoplasmatica (F-actina). Il dominio centrale è composto da 24 ripetizioni a tripla elica simili alla spectrina (spectrin-like) e contiene un ulteriore sito di legame con l'F-actina; di seguito si trova un dominio ricco in cisteina che lega il β -dystroglicano, il quale a sua volta si lega alla laminina-2 della matrice extracellulare tramite l' α -dystroglicano (Rentschler et al. 1999). Il dominio C-terminale si lega invece con le proteine citoplasmatiche distrobrevina e sintrofina (Tinsley et al. 1993; Roberts 2001) (**figura 2**).

La proteina distrofina si localizza in posizione sub-sarcolemmatica nel muscolo scheletrico e nel cuore, e la sua funzione principale è quella di agire da ponte meccanico tra le proteine sarcomeriche del citoscheletro (Rando 2001) e le proteine integrali di membrana (sarcoglicano, distroglicano, sintrofina, distrobrevina), formando il cosiddetto Dystrophin-Glycoprotein Complex (DGC) (**figura 2**). Questo complesso connette quindi l'interno della fibra muscolare alla lamina basale della matrice extracellulare (Rando 2001).

Il ruolo principale di questo complesso proteico è quello di stabilizzare il sarcolemma e di proteggere le fibre muscolari dai danni indotti dalla contrazione/decontrazione muscolare (Culligan et al. 1998; Michalak et al. 1997) che portano alla necrosi delle fibre muscolari. Infatti, mutazioni in geni che codificano per queste proteine causano vari tipi di distrofie muscolari (Emery 2002; Bushby 1999). Oltre alla funzione meccanica di protezione, il complesso DGC svolge un ruolo nella comunicazione cellulare e nel signalling (Petrof 2002; Rando 2001), poiché è coinvolto nei pathways che regolano l'organizzazione strutturale delle zone specializzate di contatto tra le membrane, in particolare il clustering dei canali ionici e dei recettori post-sinaptici di membrana (Perronnet et al. 2010). La mancanza di distrofina determina instabilità di membrana portando alla formazione di microlesioni indotte dalla contrazione muscolare e all'entrata di ioni calcio (Ca^{2+}) nel citoplasma (Lapidos et al. 2004; Hopf et al. 2007; Whitehead et al. 2006). Anche se la questione è ancora controversa, un aumento di calcio intracellulare porterebbe alla necrosi delle fibre e alla progressiva e irreversibile sostituzione del tessuto muscolare con tessuto fibroso e adiposo (Head 1993; Gailly et al. 1993).

La proteina distrofina è assente nei pazienti Duchenne, mentre nei pazienti Becker è presente anche se a livello inferiore rispetto alla norma e con un peso molecolare minore (Hoffman et al. 1988).

L'estensione delle mutazioni a carico del gene distrofina non è direttamente proporzionale alla gravità del fenotipo clinico (BMD/DMD); per esempio piccole delezioni, come quella dell'esone 45, causano un fenotipo Duchenne, mentre sono state descritte delezioni molto più ampie (es. rimozione di 35 esoni del dominio centrale rod-domain) associate a fenotipo Becker (Love et al. 1991; Love et al. 1990; England et al. 1990). Queste osservazioni hanno portato Monaco e colleghi nel 1988 a proporre la "teoria del frame", secondo la quale le mutazioni che causano il fenotipo Duchenne sono quelle che, indipendentemente dall'estensione della mutazione, determinano un'alterazione della cornice di lettura e quindi la sintesi di un RNA instabile e la produzione di una proteina tronca; mutazioni, anche molto estese, che non interrompono la cornice di lettura portano invece alla formazione di una proteina che può perdere anche molti domini (non determinanti per la funzione), ma che, risultando comunque semi-funzionale determina un fenotipo più lieve (Becker) (Monaco et al. 1988; Hoffman et al. 1988).

La gravità del fenotipo dipende anche dalla regione coinvolta dalla mutazione (Arikawa-Hirasawa et al. 1995; Fanin et al. 1996; Aartsma-Rus et al. 2006): piccole delezioni in domini funzionali essenziali (amino e carbossi-terminale) sono associate a fenotipo Duchenne. In realtà almeno una piccola parte del rod-domain è importante per la corretta funzione proteica (Fanin et al. 1996): è descritto nel rod-domain un sito addizionale di legame con l'actina citoplasmatica, e la rimozione dei primi 3 domini di legame all'actina (presenti nel dominio N-terminale) può essere parzialmente compensata dal dominio centrale e causare fenotipi BMD, mentre la rimozione di tutti i 4 domini causa DMD. Non sono mai state descritte in pazienti BMD delezioni del dominio ricco in cisteine e questo suggerisce che esso sia indispensabile per la funzione della distrofina (Bies et al. 1992b; Rafael et al. 1996). La teoria del frame giustifica il 90% dei fenotipi clinici e viene comunemente utilizzata per la diagnosi differenziale DMD/BMD (Monaco et al. 1988; Koenig et

al. 1989). Nel 10% circa dei casi la regola del frame non è rispettata; esistono infatti pazienti Becker con mutazioni che alterano la cornice di lettura (mutazioni frame-shifting), e pazienti Duchenne con mutazioni in-frame. I pazienti Becker con mutazioni frame-shifting presentano delezioni/duplicazioni al 5' del gene (esoni 3-7; 5-7; 3-6) o nella porzione centrale (esoni 51, 49-50, 47-52, 44, 45) (Arahata et al. 1991; Koenig et al. 1989); è probabile che eventi di splicing alternativo che ripristinano il frame di lettura permettano in questi pazienti di produrre comunque la proteina e di avere quadri clinici più lievi (Patria et al. 1996). Le mutazioni in-frame che causano un fenotipo Duchenne in genere sono ampie delezioni che si estendono dal 5' del gene alla porzione centrale del rod-domain (delezioni degli esoni 3-31, 3-25, 4-41, 4-18) (Nevo et al. 2003), coinvolgendo il principale sito di legame con l'actina presente nel dominio amino-terminale.

MODELLI ANIMALI DI DISTROFINOPATIA

Il gene distrofina è altamente conservato in vertebrati ed invertebrati. Esistono molti modelli animali con mutazioni nel gene distrofina, e tra questi i più utilizzati negli studi preclinici sono il topo mdx (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) e il cane Golden Retriever (GRMD).

Il topo mdx è un mutante naturale descritto per la prima volta nel 1984 (Bulfield et al. 1984, Hoffman et al. 1987), scoperto in seguito alla rilevazione di alti livelli plasmatici degli enzimi creatina chinasi e piruvato chinasi e di lesioni istologiche caratteristiche delle distrofinopatie. Presenta una mutazione puntiforme nell'esone 23 del gene distrofina (C→T nel nucleotide 28), che crea un codone di stop prematuro che porta all'assenza della proteina. Il topo mdx non presenta il grave quadro clinico tipico dei pazienti DMD, e ha un'aspettativa di vita ridotta del 20%

rispetto ad un topo wild type (Chamberlain et al. 2007). La patologia muscolare presenta una fase iniziale acuta tra le 2 e le 4 settimane di vita, nelle quali si osserva una marcata degenerazione muscolare seguita da rigenerazione (McGeachie et al. 1993), caratterizzata dalla presenza di fibre muscolari con nuclei centrali e calibro eterogeneo. In questa fase si osserva anche una massiva necrosi muscolare (Grounds et al. 2004; Messina et al. 2006), che diminuisce dopo le 12 settimane di vita (Nakamura et al. 2011). I cicli di necrosi e rigenerazione continuano, anche se in modo molto blando, per tutta la vita dell'animale (Nakamura et al. 2011). Dalle 8 settimane di vita il fenotipo rimane lieve e per il resto della vita del topo permangono una leggera miopatia e fibrosi (McGeachie et al. 1993). La fibrosi nella maggior parte dei muscoli rimane comunque meno pronunciata rispetto ai pazienti DMD, fatta eccezione per il diaframma che è il muscolo più colpito (Stedman et al. 1991; Connolly et al. 2001). La sintomatologia cardiaca si manifesta tardivamente: dai 10 mesi di età si sviluppa cardiomiopatia dilatativa caratterizzata da ipertrofia, diminuzione della forza di contrazione e della frequenza del battito (Ameen et al. 2010; Quinlan et al. 2004). La velocità e la forza di contrazione sono alterate a livello atriale anche nei topi giovani, prima che inizi la fibrosi indotta dalla necrosi; le disfunzioni nel ventricolo destro precedono quelle a carico del ventricolo sinistro e sono caratterizzate da una significativa riduzione della frazione di eiezione, che inizia a 8 mesi (Zhang et al. 2008).

Alcuni studi hanno dimostrato che se il cuore e la muscolatura scheletrica del topo mdx vengono sottoposte a intenso esercizio fisico, la degenerazione muscolare progredisce più rapidamente mimando quella caratteristica dei pazienti DMD (Nakamura et al. 2002).

Una spiegazione della minore gravità della patologia distrofica nel topo mdx è la fisiologica up-regolazione della proteina utrofina che vicaria la funzione della

distrofina nei tessuti muscolari murini (Rybakova et al. 2002). L'utrofina è una proteina con struttura simile alla distrofina, che nell'uomo è prodotta soprattutto durante lo sviluppo fetale e la rigenerazione muscolare, mentre diminuisce nel muscolo adulto, in cui è espressa prevalentemente a livello delle giunzioni miotendinee e neuromuscolari (Khurana et al. 1991; Ohlendieck et al. 1991).

Per generare un modello murino con un fenotipo clinico più simile a quello dei pazienti DMD e per studiare le terapie geniche basate sull'up-regolazione dell'utrofina, è stato creato il doppio mutante knockout mdx/utrn^{-/-} (Deconinck et al. 1997; Grady et al. 1997) che presenta una patologia distrofica più pronunciata e persistente, severa debolezza muscolare e contratture articolari, cifosi, pronunciato ritardo della crescita e aspettativa di vita ridotta (4-20 settimane). Il diaframma non risulta comunque più compromesso rispetto al topo mdx, suggerendo che l'utrofina non compensi, in questo muscolo, la mancanza di distrofina (Deconinck et al. 1997; Grady et al. 1997).

Il cane GRMD è, come il topo mdx, un mutante naturale; ha una variazione nucleotidica nel sito accettore di splicing dell'introne 6 del gene distrofina, che porta allo skipping dell'esone 7 con frameshifting e creazione di un codone di stop prematuro (Sharp et al. 1992). Il cane GRMD presenta un quadro clinico molto grave, progressivo e fatale, più severo rispetto ai pazienti DMD, caratterizzato da forte debolezza muscolare, difficoltà di deambulazione dalle 6-9 settimane seguita da atrofia muscolare, fibrosi e cifosi dai 6 mesi di vita. All'età di 12 mesi si sviluppano disfunzioni nella faringe ed esofago e diminuisce la capacità respiratoria. Rispetto agli altri modelli animali il coinvolgimento cardiaco è più evidente e paragonabile ai pazienti DMD.

Il modello murino hDMD (humanized DMD) è un topo transgenico che contiene l'intero gene della distrofina umana (t Hoen et al. 2008). Le analisi in RT-PCR, western blot e immunofluorescenza hanno confermato l'espressione della distrofina umana nel muscolo scheletrico, cuore, rene e testicoli, ed essa è in grado di prevenire il fenotipo distrofico.

Altri modelli animali di distrofinopatia sono il gatto HFMD (Gaschen et al. 1999), il topo mdx^{2CV-5CV} (Chapman et al. 1989), il topo mdx52, mdx/myoD^{-/-}, mdx/adbn^{-/-}, mdx/a7 integrin^{-/-}, mdx/PV^{-/-}, il cane beagle CXMDJ (Yugeta et al. 2006) e il cane Cavalier King Charles Spaniels (Walmsley et al. 2010).

TERAPIE FARMACOLOGICHE IN TRIAL CLINICO

GLUCOCORTICOIDI

La somministrazione di glucocorticoidi è attualmente l'unico trattamento farmacologico in grado di offrire reali benefici clinici ai pazienti (Bushby et al. 2004; Angelini 2007; Manzur et al. 2008), riducendo il rischio di scogliosi, stabilizzando la funzionalità polmonare (King et al. 2007) e portando al miglioramento della funzionalità cardiaca (Markham et al. 2008).

I glucocorticoidi più utilizzati sono il prednisone (Angelini 2007) e il suo derivato deflazacort (de Groot 2006). I pazienti trattati con tali farmaci manifestano un ritardo nella progressione della debolezza muscolare e riescono a deambulare per la maggior parte della loro vita (Griggs et al. 1991). Attualmente non esiste uno schema di trattamento con corticosteroidi che risulti il migliore per i pazienti DMD, e che sia accettato a livello internazionale. Il meccanismo attraverso il quale i

pazienti beneficiano del trattamento con glucocorticoidi non è ancora chiaro, anche se si pensa che i benefici clinici derivino in parte dagli effetti anti-infiammatori e immunosoppressivi che questi farmaci possiedono (Tidball et al. 2004).

Il trattamento prolungato con corticosteroidi può causare molteplici effetti collaterali quali aumento di peso, ritardo nella crescita, cataratta, osteoporosi e ipertensione (Muntoni et al. 2002) e per questo motivo sono stati effettuati molti studi clinici che hanno impiegato diversi dosaggi e diversi schemi di trattamento allo scopo di ridurre gli effetti indesiderati (Angelini et al. 1994; Merlini et al. 2003; Biggar et al. 2004; Connolly et al. 2002; Beenakker et al. 2005).

Recentemente Wissing e colleghi hanno testato nel topo mdx un analogo della ciclosporina A (CsA) chiamato Debio-025 (Millay et al. 2008), che si è dimostrato più efficace della CsA nella riduzione della patologia distrofica in vari modelli murini (Reutenauer et al. 2008; Tiepolo et al. 2009). Debio-025 impedisce, tramite l'inibizione della ciclofilina D, l'apertura dei pori mitocondriali, "mitochondrial permeability transition pore" (MPTP), responsabili dell'induzione della necrosi cellulare conseguente all'influsso di calcio nelle fibre muscolari distrofiche, e diversamente dai glucocorticoidi e dalla CsA, non ha un effetto immunosoppressivo. Il trattamento con Debio-025 provoca nel topo mdx riduzione dei nuclei centrali (caratteristici delle fibre distrofiche), riduzione della fibrosi e degli infiltrati infiammatori e riduzione della percentuale delle miofibre piccole (Wissing et al. 2010). Debio-025 può essere somministrato in contemporanea al prednisone senza effetti indesiderati, tuttavia non si registra un effetto sinergico dei due farmaci. Da questi studi è emerso che Debio-025 è comunque più efficace del solo prednisone nella riduzione della patologia distrofica nel topo mdx.

TERAPIE MOLECOLARI IN TRIAL CLINICO

PTC-124

Il PTC-124 {3-[5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazolo-3-yl]acido benzoico} è un derivato della gentamicina e agisce inducendo il *readthrough* ribosomale dei codoni di stop prematuri. Solo pazienti con mutazioni non senso (< del 15% dei pazienti DMD) possono beneficiare di tale trattamento. L'utilizzo di questo aminoglicoside in trial clinico (risultati non ancora pubblicati), è basato sui promettenti risultati ottenuti negli studi preclinici: il PTC-124 promuove la produzione di distrofina in cellule muscolari primarie derivate da pazienti DMD e nel topo mdx, e ripristina la funzione del muscolo striato nei topi mdx dopo trattamenti di 2-8 settimane (Welch et al. 2007). La selettività del PTC-124 per i codoni di stop prematuri, il suo profilo di attività ben caratterizzato, la sua biodisponibilità dopo somministrazione orale e le sue proprietà farmacologiche, indicano che questo farmaco potrebbe avere un grande potenziale clinico per il trattamento di un ampio gruppo di malattie genetiche con opzioni terapeutiche limitate o nulle (Welch et al. 2007). In volontari sani il PTC-124 si è dimostrato non tossico (trial clinico fase I). Un trial in fase II in pazienti DMD che si è recentemente concluso ha dimostrato che, in pazienti che hanno ricevuto differenti dosaggi di farmaco una volta al giorno per 4 settimane, il trattamento è stato ben tollerato e la distrofina è stata ripristinata al dosaggio più alto somministrato (<http://www.ptcbio.com>). Attualmente sono in corso diversi studi clinici atti a verificare se questo promettente risultato si rifletta anche in un miglioramento funzionale.

EXON SKIPPING MEDIATO DA MOLECOLE ANTISENSO (AON)

L'approccio terapeutico basato sull'utilizzo di oligoribonucleotidi antisenso (AONs) per indurre l'esclusione specifica di un esone dal trascritto maturo (exon skipping) per la cura della Distrofia Muscolare di Duchenne è stato studiato in modo estensivo dagli anni '90 ad oggi, e rappresenta un esempio di medicina personalizzata che offre una sempre più reale possibilità di cura per questa grave malattia.

Potenzialmente nei pazienti DMD l'eliminazione dal trascritto degli esoni contenenti la mutazione o di quelli adiacenti, è in grado di ripristinare la cornice di lettura e quindi la produzione di una distrofina mancante di alcuni domini proteici ma funzionale, trasformando quindi il fenotipo Duchenne in uno Becker-like compatibile con la vita.

Il rationale che sta alla base dell'exon skipping deriva da 3 diverse osservazioni (Wood et al. 2010):

1) L'utilizzo di AONs per la modulazione dello splicing (Dominski et al. 1993) utilizzando come bersaglio dei siti criptici di splicing alle estremità 5' e 3' del gene della β -globina, per la cura della β -talassemia: il trattamento è stato in grado di ripristinare, in saggi di splicing *in vitro*, il normale meccanismo di splicing alterato da vari tipi di mutazioni. Nonostante questo approccio non si possa tecnicamente definire exon skipping ma piuttosto re-direzionamento del normale processo di splicing, ha offerto un potenziale terapeutico per quelle malattie nelle quali varie mutazioni inducono la formazione di siti criptici di splicing. Inoltre Matsuo e colleghi avevano osservato che una delezione di 52 bp all'interno dell'esone 19

della distrofina causava uno skipping dell'esone stesso in un paziente DMD detto "DMD Kobe patient" (Matsuo et al. 1990, Matsuo et al. 1991); questo fenomeno doveva derivare dalla presenza di una sequenza, all'interno di queste 52 bp delete, indispensabile per la corretta inclusione dell'esone 19 nell' RNA maturo. In effetti l'utilizzo di un AON diretto verso una parte di questa sequenza induceva lo skipping dell'esone 19 *in vitro* e in cellule umane di controllo di linfoblastoma (Aartsma-Rus et al. 2007b).

2) In almeno il 50% dei pazienti DMD e nel topo mdx (Arechavala-Gomez et al. 2010; Hoffman et al. 1990) sono presenti fibre isolate o talvolta in clusters (tra lo 0,01% e il 7% nei pazienti DMD, e < 1% nel topo mdx), positive alla distrofina, chiamate fibre revertanti (Thanh et al. 1995; van Deutekom et al. 2007; Rimessi et al. 2009). La distrofina presente nelle fibre revertanti non possiede tutti i residui aminoacidici della proteina, ma mantiene i domini amino- e carbossi-terminale che ne permettono la corretta localizzazione a livello sarcolemmatico (Fanin et al. 1995; Thanh et al. 1995). I meccanismi che sono stati proposti per spiegare questo fenomeno sono reversioni somatiche (Bertoni et al. 2003), oppure eventi casuali di splicing alternativo che ripristinano la cornice di lettura producendo una proteina semi-funzionale, simile a quella presente nei pazienti Becker (Klein et al. 1992; Lu et al. 2000); questi ultimi sono stati descritti sia in pazienti DMD che in individui sani (Sironi et al. 2002).

3) La distrofina prodotta dai pazienti Becker, nonostante sia più corta perché mancante di alcuni domini proteici, è in grado di funzionare parzialmente grazie alla presenza dei due domini critici amino- e carbossi-terminale, come dimostrato in famiglie BMD con mutazioni in-frame degli esoni 32-44 e 48-51, che presentano fenotipi clinici lievi (Melis et al. 1998).

La “proof of principle” che l’exon skipping mediato da molecole antisense fosse in grado di correggere difetti molecolari del gene DMD è stata ottenuta in studi *in vitro* su colture di cellule muscolari stabilizzate da pazienti DMD con diversi tipi di mutazione, e in studi *in vivo*, nel topo mdx, nel topo hDMD, e nel Golden Retriever GRMD (Takeshima et al. 1995; Pramono et al. 1996; Dunckley et al. 1998).

Per le mutazioni per delezione, che rappresentano il 70% circa dei riarrangiamenti a carico del gene distrofina nei pazienti DMD, lo skipping di uno o più esoni si è dimostrato in grado di ripristinare la cornice di lettura e la sintesi di distrofina nella maggior parte delle cellule trattate (Aartsma-Rus et al. 2010).

Alcune delle mutazioni dovute a piccoli riarrangiamenti (28% di tutte le mutazioni DMD) possono essere corrette tramite induzione dello skipping dell’esone mutato se è in-frame (Aartsma-Rus et al. 2010). Per gli esoni mutati out-of-frame invece la cornice di lettura può, in alcuni casi, essere ripristinata inducendo un exon skipping multiplo, targettando oltre all’esone mutato anche uno o più esoni adiacenti (Aartsma-Rus et al. 2009). Per entrambi i tipi di mutazioni (in-frame e out-of-frame) l’exon skipping si è dimostrato realizzabile sia in cellule miogeniche (Aartsma-Rus et al. 2003; Aartsma-Rus et al. 2004), che nei due modelli murini topo mdx e topo mdx^{4cv}, recanti una mutazione puntiforme nell’esone 23 e 53 rispettivamente (Mitropant et al. 2009; Lu et al. 2003).

Le molecole antisense sono state utilizzate anche per correggere le rare piccole mutazioni introniche che inducono l’inclusione di esoni criptici (Rimessi et al. 2010; Gurvich et al. 2008), e per ripristinare la cornice di lettura in un paziente con inversione degli esoni 49 e 50 (Madden et al. 2009).

Per le duplicazioni (7% dei pazienti DMD) questo approccio terapeutico è più difficile da utilizzare in quanto l’esone originale e quello duplicato sono indistinguibili per l’AON. Nel caso della duplicazione di un singolo esone, uno qualunque dei due esoni può essere rimosso per ripristinare il trascritto normale, e

questo è stato ottenuto nelle cellule di un paziente con duplicazione dell'esone 45 (Aartsma-Rus et al. 2007); per altri tipi di duplicazioni di un singolo esone invece, lo skipping è stato così efficiente da causare la rimozione di entrambi gli esoni, determinando l'interruzione della cornice di lettura (Wilton et al. 2008). In certi casi poi per rimettere in-frame il trascritto occorre indurre un exon skipping multiplo (Aartsma-Rus et al. 2007). Per duplicazioni multiple l'exon skipping risulta più complesso dal momento che solo lo skipping di uno o due specifici esoni duplicati risulta vantaggioso, mentre lo skipping di altre combinazioni esoniche spesso distrugge la cornice di lettura.

Quindi l'approccio terapeutico dell'exon skipping è fondamentalmente mutazione specifico, e rappresenta un chiaro esempio di medicina personalizzata (Hoffman 2007). In teoria potrebbe essere applicabile a circa l'80% (Aartsma-Rus et al. 2009) di tutti i pazienti DMD, e ad oggi sono stati creati AONs in grado di indurre lo skipping di ogni esone della distrofina, eccetto per il primo e l'ultimo (Aartsma-Rus et al. 2005; Wilton et al. 2007). Dal momento che la maggior parte delle delezioni sono localizzate all'interno dei due hot spots mutazionali (il 70% e 25%), e le delezioni sono presenti nel 65-70% dei pazienti DMD (Aartsma-Rus et al. 2006), lo skipping di alcuni esoni può essere utile per correggere diverse mutazioni. Per esempio lo skipping dell'esone 51 è applicabile al 13% di tutti i pazienti DMD (Aartsma-Rus et al. 2009).

Gli oligoribonucleotidi antisense (AONs) utilizzati per l'induzione di exon skipping sono molecole sintetiche a RNA, lunghe 20-30 nucleotidi, complementari alle regioni bersaglio del pre-mRNA al quale si appaiano, all'interno del nucleo. L'appaiamento della molecola antisense all'RNA target crea un impedimento sterico (Poplewell et al. 2009; Aartsma-Rus et al. 2005) al legame dei fattori di

splicing, mascherandone i siti di riconoscimento e inducendo l'esclusione dell'esone bersaglio dal trascritto.

Nei primi studi di exon skipping in cellule di pazienti DMD venivano utilizzate come sequenze target per gli AONs il sito donatore e accettore di splicing e la sequenza branch point, che rappresentano le sequenze classiche di riconoscimento esonico (Mann et al. 2002; Dunckley et al. 1998; Wilton and Fletcher 2005). Dal momento che queste sequenze consenso sono altamente conservate e presenti in numerosi altri geni, ci si è poi orientati sull'utilizzo di sequenze target più specifiche, presenti all'interno degli esoni (Aartsma-Rus et al. 2005; Wilton and Fletcher 2005). Il riconoscimento specifico da parte dello spliceosoma, e l'inclusione nell'mRNA di un esone dipende da sequenze di riconoscimento esonico dette Exonic Splicing Enhancer (ESE) (Cartegni et al. 2002); le sequenze ESE vengono riconosciute dai domini di legame all'RNA presenti nelle proteine ricche in serina e arginina (SR proteins), che appartengono a sottofamiglie di fattori dello splicing (Stojdl and Bell 1999). Il riconoscimento delle ESE da parte delle proteine SR è seguito dal reclutamento dei fattori di splicing snRNP U2AF e U1, e permette all'esone di essere incluso nel trascritto maturo. Mascherando le sequenze ESE con le molecole antisense, si causa quindi il mascheramento dell'esone stesso. Le sequenze di riconoscimento esonico da utilizzare come bersaglio degli AONs vengono identificate mediante l'utilizzo di vari programmi bioinformatici, come per esempio RESCUE-ESE, ESEfinder, e PESX server, M-FOLD.

Gli AONs, per essere efficaci nell'induzione dello skipping delle sequenze target, devono essere stabili nei fluidi biologici, entrare all'interno della cellula e soprattutto all'interno del nucleo e legarsi in modo specifico alle sequenze bersaglio.

Nel corso degli anni sono state apportate molte modifiche chimiche alle molecole antisense, che essendo molecole a RNA, sarebbero altrimenti facilmente degradabili dalle nucleasi nei fluidi biologici, e dall'enzima RNAsi H all'interno del nucleo (Kurreck 2003).

Le due chimiche che attualmente vengono utilizzate in trials clinici per la cura della DMD sono i 2'-O-metile-fosforotioati (2'OMePS) e i morfolino fosforodiamidati (PMO) (Heemskerk et al. 2009).

2'OMePs: sono molecole nelle quali uno degli ossigeni non a ponte del legame fosfodiesterico è sostituito da un atomo di zolfo (De Clercq et al. 1969); questa modifica rende la molecola più stabile e la protegge dalla degradazione da parte delle eso- ed endonucleasi (**figura 3**). Inoltre l'ossigeno al 2' del ribosio è sostituito da un gruppo metilico (CH₃) (Kurreck 2003), e questo rende la molecola più affine alla sequenza bersaglio sull'RNA ed evita la degradazione da parte dell'RNAsi H (Dominski et al. 1993; Sproat et al. 1989). I 2'OMePs sono molecole cariche negativamente e questa caratteristica conferisce loro una maggior capacità di entrata nelle cellule, tuttavia sono molecole che vengono biodegradate molto lentamente.

PMO: sono analoghi dell'RNA nelle quali il ribosio è sostituito dal un anello morfolino a 6 atomi, ed il legame fosfodiesterico è sostituito da un legame fosforodiamidato (Summerton and Weller 1997) (**figura 3**). Sono anch'essi resistenti alla degradazione da parte dell'RNAsi H, ma il loro scheletro non ionico a pH fisiologico e la loro conseguente natura neutra rende le interazioni con la membrana cellulare più difficili, e quindi minore la loro capacità di entrata nelle cellule (Amantana and Iversen 2005), inoltre non vengono riconosciuti dalle proteine cellulari e quindi vengono rapidamente eliminati dal plasma ed escreti nelle urine. I PMO sono molecole non bio-degradabili.

IL TOPO MDX COME MODELLO DI STUDIO PER L'APPROCCIO TERAPEUTICO DELL'EXON SKIPPING: DAGLI STUDI PRE-CLINICI ALL'UOMO

Il topo mdx è il modello preclinico su cui si sono concentrati gli studi di messa a punto dell'exon skipping mediato da molecole antisense. Ha una mutazione di stop (C → T nel nucleotide 28) nell'esone 23 del gene distrofina che porta alla produzione di una proteina tronca e instabile che va incontro a degradazione.

La prima evidenza *in vivo* della correzione della mutazione nell'esone 23 murino tramite exon skipping mediato da AON deriva dagli studi di Mann e colleghi nel 2001. La molecola antisense utilizzata da Mann aveva uno scheletro a fosforotioato modificato 2'OMe, era lunga 25 nucleotidi ed era disegnata sul sito donatore di splicing dell'esone 23 murino. I topi mdx venivano trattati con 4 iniezioni intramuscolo nel quadricipite, utilizzando per ogni somministrazione 1 µg di AON complessato con lipofectina e, ad una settimana dalla fine del trattamento, si osservava il ripristino della sintesi della proteina distrofina sia in immunofluorescenza che in western blot: la distrofina appariva correttamente localizzata in membrana e di peso molecolare indistinguibile rispetto alla proteina wild type, come ci si aspettava dalla perdita di soli 71 aminoacidi. Inoltre l'analisi in Nested RT-PCR dimostrava l'esclusione dell'esone 23 da una frazione del trascritto maturo (Mann et al. 2001).

Negli esperimenti successivi Lu e colleghi (Lu et al. 2003) utilizzarono l'AON 2'OMePS, chiamato M23D, lungo 20 nucleotidi e complementare al sito donatore di splicing dell'esone 23. Topi mdx di 2, 4 e 24 settimane venivano trattati con una iniezione i.m nel tibiale anteriore di 5 µg di M23D complessato con il copolimero F127. Il trattamento induceva la sintesi di distrofina in tutti gli animali delle diverse

età e la marcatura in immunofluorescenza era paragonabile a quella di un topo wild type, inoltre l'espressione persisteva fino a 4 mesi dopo il trattamento. I muscoli dei topi trattati mostravano miglioramenti funzionali (aumento della generazione della forza isometrica), e non vi erano segni di risposta immunitaria nei confronti della nuova proteina prodotta (Lu et al. 2003).

Williams e colleghi nel 2006 utilizzarono il copolimero cationico PEG-PEI come agente trasfettante per un antisense 2'OMePS, al fine di indurre il ripristino proteico e la correzione della mutazione nel topo mdx (Williams et al. 2006).

Gebbski e colleghi nel 2003 dimostrarono che anche l'AON M23D a struttura morfolino se coniugato con corti oligo a DNA o RNA (leashes) e lipofectina, era in grado di indurre a livello locale (iniezioni i.m nel tibiale anteriore) lo skipping dell'esone 23 e il ripristino della distrofina (Gebbski et al. 2003).

Gli esperimenti i.m. avevano dimostrato che le molecole antisense, indipendentemente dalla chimica a 2'OMePS o PMO, riuscivano a correggere la mutazione murina inducendo la produzione di una distrofina più corta di quella wild type ma funzionale.

C'erano però alcuni limiti da superare:

- Per facilitare l'uptake cellulare della molecola antisense era richiesta una co-somministrazione con molecole lipidiche (Mann et al. 2001; Lu et al. 2003; Gebbski et al. 2003) o polimeri cationici (Williams et al. 2006), poiché gli AON "nudi", cioè non coniugati ad alcun tipo di agente trasfettante/carrier, avevano una scarsa capacità di penetrare all'interno delle cellule e tendevano ad essere rapidamente eliminati per via epatica e renale.

- Il trattamento locale non poteva raggiungere tutte le sedi muscolari corporee colpite dalla patologia (muscoli scheletrici e cuore), perciò c'era la necessità di

testare vie di somministrazione sistemiche che potessero poi essere traslate nell'uomo.

- Dal momento che l'effetto del trattamento locale con AON sul ripristino proteico e sull'attivazione dello skipping aveva una durata massima di 3-4 mesi (Lu et al. 2005), bisognava mettere a punto dei protocolli di somministrazione ripetuta nel tempo a intervalli regolari, per garantire la continua produzione di distrofina.

- I dosaggi di AON utilizzati non dovevano creare problemi di accumulo o tossicità.

Dal 2005 ad oggi molti gruppi di lavoro si sono focalizzati sullo studio di diverse vie di somministrazione sistemica (via intravenosa i.v, intraperitoneale i.p, via sottocutanea s.c) per le due chimiche di AON M23D, e su vari schemi di trattamento.

La **tabella 1** riassume tutti gli articoli pubblicati fino ad oggi sui trattamenti sistemici nel topo mdx con molecole antisense.

Dal momento che il fenotipo distrofico nel topo mdx è paragonabile a quello dei pazienti DMD fino alle 8 settimane di vita (McGeachie et al. 1993), nella maggioranza dei lavori vengono utilizzati animali di 6-8 settimane.

Per animali così giovani le due vie di somministrazione più facili da utilizzare sono la i.p e la s.c, in quanto la via i.v prevede iniezioni nelle vene caudali, che sono difficilmente individuabili e che facilmente necrotizzano in seguito a trattamenti ripetuti nel tempo. Studi di farmacocinetica e accumulo degli AON 2'OMePs hanno evidenziato che nei topi mdx trattati 5 volte la settimana con alte dosi di AON (250 mg/Kg/iniezione) la quantità di AON che arriva nei muscoli varia di poco con le diverse vie di somministrazione (la i.v è di 1,3 volte superiore alla i.p e s.c), l'iniezione intravenosa tuttavia provoca un accumulo molto maggiore della

molecola nel fegato e nel rene. Quindi a questi dosaggi la via i.v sembra essere meno tollerata, anche se lo skipping dell'esone 23 nei muscoli scheletrici e nel cuore di questi topi è molto più alto (Heemskerk et al. 2010). Nei pazienti DMD la via sottocutanea sarebbe quindi la via di elezione, considerando che il trattamento richiede iniezioni ripetute nel corso di tutta la vita del paziente, e che sono da evitare possibili effetti tossici su rene e fegato.

La scelta dello schema di trattamento è determinante per l'efficacia del trattamento stesso. Da molti studi emerge che è preferibile aumentare il numero di somministrazioni piuttosto che la dose totale di molecola (Malerba et al. 2009; Yin et al. 2008; Yin et al. 2010). Malerba e colleghi hanno dimostrato che un ciclo di 4 iniezioni settimanali di 5 (trattamento low dose, in totale 20 mg/Kg) e 50 (trattamento high dose, in totale 200 mg/Kg) mg PMO/Kg/iniezione induce livelli di ripristino proteico maggiori rispetto alla somministrazione singola con lo stesso dosaggio totale (20 e 200 mg/Kg di PMO); inoltre i risultati delle due somministrazioni ripetute, sia ad alto che a basso dosaggio, sono comparabili, in termini di numero di fibre distrofina-positive presenti nei muscoli dei topi trattati (Malerba et al. 2009).

Risulta quindi essenziale mettere a punto, per ogni chimica di AON utilizzata, non solamente la frequenza di somministrazione, ma anche la minima dose efficace.

La scelta del dosaggio è correlata all'efficienza del raggiungimento di tutte le sedi anatomiche colpite dalla patologia: il cuore rappresenta sicuramente il bersaglio principale poiché la cardiomiopatia è la principale causa di morte dei pazienti DMD, d'altra parte i dosaggi richiesti per un trattamento sistemico non devono creare problemi di accumulo.

Gli esperimenti sul topo mdx dimostrano che per raggiungere tutti i muscoli coinvolti dalla patologia, cuore compreso, sono richiesti dosaggi di 2'OMePS molto

alti, tra 300 mg/Kg e 1250 mg/Kg (Lu et al. 2005, Heemskerk et al. 2010); risultati migliori si ottengono con dosi minori di PMO, circa 600 mg/Kg (Wu et al. 2010).

Tuttavia utilizzando molecole antisense non coniugate ad alcun tipo di carrier lo skipping e il ripristino proteico nel muscolo cardiaco sono molto scarsi o addirittura nulli (Alter et al. 2006; Lu et al. 2005; Heemskerk et al. 2009).

Un approccio utilizzato per migliorare la distribuzione tissutale degli AONs, la durata dell'effetto e l'efficienza dello skipping è rappresentato dall'uso di vettori virali che contengono la sequenza della molecola antisense. Nel primo esperimento *in vivo*, Goyenvalle e colleghi hanno dimostrato l'induzione dello skipping dell'esone 23 nel topo mdx, e il ripristino della distrofina fino a 6 mesi dopo il trattamento, tramite l'espressione della sequenza antisense legata allo snRNA U7 in un vettore virale adeno-associato (Goyenvalle et al. 2004). Questo approccio era basato su studi *in vitro* in cui era stato utilizzato il snRNA U1 (De Angelis et al. 2002) che riconosce fisiologicamente 50 giunzioni di splicing nel pre-RNA, e che anche nel topo mdx aveva prodotto risultati promettenti (Denti et al. 2006). L'utilizzo di questi vettori virali consentirebbe di indurre, con poche iniezioni, la sintesi endogena della molecola antisense e quindi un effetto terapeutico duraturo nel tempo (Goyenvalle et al. 2004). Mentre nel topo la stimolazione immunitaria indotta dal vettore virale è trascurabile, nel cane è risultata tale da precludere la possibilità di effettuare somministrazioni ripetute (Yuasa et al. 2007; Zaiss et al. 2008). Inoltre pensando ad una terapia personalizzata mutazione specifica la produzione su larga scala dei vettori virali richiederebbe costi molto alti, oltre ai problemi dovuti alla difficoltà di produzione e di stoccaggio.

L'utilizzo dei PMO coniugati con diversi tipi di peptidi "arginine rich" (CPP, cell penetrating peptides) migliora l'uptake cellulare e nucleare, e ha permesso di ottenere dei livelli di ripristino proteico vicini al 100%, nei muscoli scheletrici e,

soprattutto, nel cuore (Wu et al. 2009; Yin et al. 2008; Jearawiriyapaisarn et al. 2008), utilizzando dosaggi di PMO molto più bassi (da 18 a 180 mg/Kg, **tabella 1**). I peptidi CPP derivano dal peptide TAT (Vivès et al. 1997) del virus HIV e ad oggi non esistono studi sulla potenziale tossicità “trascrizionale” che essi potrebbero indurre. Infatti i domini ricchi in arginina che permettono al virus HIV di penetrare all’interno delle cellule e di attivare la replicazione virale, sono potenti transattivatori della trascrizione e potrebbero attivare/inibire vari pathways di segnalazione non specifici o addirittura tumorali (Rana et al. 1999).

La “proof of concept” che l’approccio terapeutico dell’exon skipping mediato da AON funzionasse anche nell’uomo è derivata dai risultati di due trials clinici di fase 2, uno condotto in Olanda e uno in Inghilterra, nei quali sono state utilizzate due diverse chimiche di AON, 2’OMePS e PMO rispettivamente, somministrati per via locale in pazienti DMD (van Deutekom et al. 2007; Kinali et al. 2009). Entrambi gli AONs sono stati disegnati per indurre lo skipping dell’esone 51, e possono essere utilizzati per correggere le seguenti delezioni: 45–50, 47–50, 48–50, 49–50, 50, o 52.

Nel trial condotto da Prosensa in Olanda 4 bambini DMD hanno ricevuto una iniezione i.m nel tibiale anteriore, di 0,8 mg dell’AON 2’OMePS PRO051/GSK2402968: in tutti i pazienti la proteina distrofina viene ripristinata nella maggioranza (97%) delle fibre muscolari del muscolo trattato, anche se a livelli variabili (dal 17% al 35% di positività), in assenza di eventi avversi (van Deutekom et al. 2007).

Nel trial condotto da AVI BioPharma in Inghilterra 7 bambini DMD hanno ricevuto una iniezione i.m nel muscolo estensore breve delle dita (EDB), di 0,09 e 0,9 mg dell’AON PMO AVI-4658; nei pazienti trattati col dosaggio maggiore la distrofina

viene ripristinata a livelli variabili dal 22% al 35% nel 79% delle fibre del muscolo trattato, e anche in questo caso non si osservano eventi avversi (Kinali et al. 2009).

I risultati incoraggianti ottenuti da questi due studi, hanno portato Prosensa e AVI BioPharma a condurre due trials sistemici, con le stesse molecole antisense utilizzate per gli studi locali.

AVI BioPharma ha recentemente riportato i risultati preliminari dello studio clinico di fase 1b/2 realizzato in Inghilterra, che prevedeva il trattamento sistemico i.v con AVI-4658, tramite un protocollo di dosi crescenti (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 10,0 e 20,0 mg/kg) di molecola, somministrata ai pazienti DMD una volta alla settimana per 12 settimane; da questi primi dati sembra che il trattamento sistemico sia risultato efficace e ben tollerato, in quanto nei pazienti trattati con 2mg/Kg di AVI-4658 viene ripristinata la sintesi della distrofina, e non si osservano eventi avversi né effetti collaterali fino alla dose di 10 mg/Kg (<http://www.avibio.com/>).

Lo studio sistemico di fase 1/2a condotto da Prosensa ha coinvolto 12 pazienti DMD che hanno ricevuto iniezioni sottocutanee settimanali, tramite un protocollo di dosi crescenti: dopo 5 settimane di trattamento con dosaggi superiori a 0,5 mg/Kg, è stato verificato il ripristino della produzione di distrofina, in assenza di eventi avversi fino a dosaggi di 6 mg/Kg (<http://www.prosensa.eu/>). E' in corso attualmente un trial di fase 3.

Recentemente Prosensa ha inoltre avviato uno studio di fase 1/2 con dosi crescenti di un AON 2'OMePS (PRO044) che induce lo skipping dell'esone 44.

SCOPO

L'approccio terapeutico dell'exon skipping mediato da oligoribonucleotidi antisenso (AONs) rappresenta un chiaro esempio di medicina personalizzata, e potrebbe essere applicabile a una grossa quota dei malati di Distrofia Muscolare di Duchenne. Questa grave malattia genetica è causata da mutazioni a carico del gene distrofina, e colpisce la muscolatura scheletrica e cardiaca, sedi in cui vi è completa assenza della proteina distrofina. In alcuni casi l'eliminazione dal trascritto distrofina degli esoni contenenti la mutazione o di quelli adiacenti, è in grado di ripristinare la cornice di lettura e quindi la produzione di una distrofina mancante di alcuni domini proteici ma funzionale, trasformando il fenotipo Duchenne in uno Becker-like compatibile con una qualità di vita migliore.

Questo approccio terapeutico è già stato testato in trias clinici, per indurre lo skipping dell'esone 51, che potenzialmente potrebbe correggere le mutazioni nel 13% di tutti i pazienti DMD, inoltre è iniziato da poco un altro trial clinico in cui il bersaglio è rappresentato dall'esone 44.

I primi studi clinici sull'utilizzo di molecole antisenso (2'-O-metile-fosforotioati, 2'OMePS, e morfolino, PMO) somministrate mediante iniezione i.m, hanno dimostrato che era possibile correggere la mutazione tramite l'esclusione dell'esone bersaglio dal trascritto, con conseguente ripristino della distrofina nelle fibre muscolari del muscolo trattato. In seguito sono state provate vie di somministrazione sistemiche (i.v e s.c), per permettere all'AON di raggiungere tutte le sedi corporee colpite dalla patologia, che dai dati preliminari sembrano essere efficienti nell'uomo, anche se gli studi devono ancora essere completati e i risultati pubblicati.

La terapia con AON, per avere un effetto terapeutico duraturo nel tempo, deve essere pensata come una terapia in cronico, cioè il paziente deve essere trattato per tutta la vita. Di conseguenza è molto importante che non ci siano effetti tossici legati all'eventuale accumulo dell'AON, che deve quindi essere utilizzato a dosaggi molto bassi. Negli studi clinici sull'uomo vengono oggi utilizzati AON "nudi", cioè non complessati ad alcun tipo di carrier, per periodi di tempo relativamente brevi.

I risultati ottenuti nel modello animale di distrofinopatia più utilizzato, il topo mdx, indicano però che le dosi di AON "nudo", richieste per avere un buon effetto terapeutico sulla muscolatura scheletrica e sul cuore, sono troppo alte per essere traslate in cronico sull'uomo (tra i 300 mg/Kg e 1250 mg/Kg per i 2'OMePS, e circa 600 mg/Kg per i PMO). Risultati migliori si ottengono coniugando i PMO a peptidi (CPP) che ne aumentino l'uptake nucleare, o veicolando la sequenza antisense all'interno di vettori virali adeno-associati (AAV), tuttavia ad oggi mancano studi approfonditi sull'eventuale "tossicità trascrizionale" dei CPP e sulle reazioni immunitarie indotte dal trattamento con gli AAV.

In questo lavoro di tesi abbiamo deciso di utilizzare nuove nanoparticelle "core shell", come sistemi di delivery non virali per il trasporto dell'AON 2'OMePS M23D nel topo mdx, al fine di i) proteggere la molecola antisense dalla degradazione ad opera delle nucleasi nei fluidi biologici, e dell'RNAsi H nel nucleo, ii) aumentarne la biodistribuzione, e quindi migliorare l'efficacia del trattamento, iii) diminuire le dosi.

L'utilizzo di composti polimerici non virali, rappresenta un approccio versatile e sicuro per trasportare *in vivo* molecole bio-attive, come per esempio DNA plasmidico, oligonucleotidi e peptidi. Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi tipi di sistemi polimerici: liposomi, copolimeri, nano- e micro-sfere (Li and Huang 2006), che incapsulano le molecole da trasportare al loro interno e le rilasciano *in*

vivo tramite un meccanismo di diffusione e degradazione del polimero stesso. Purtroppo durante le fasi di incapsulazione e rilascio, le molecole particolarmente delicate come gli acidi nucleici e le proteine vanno incontro a fenomeni di degradazione, accompagnati da riduzione dell'attività farmacologica (Tamber et al. 2005); inoltre all'interno della cellula il rilascio dalla matrice polimerica è troppo lento per essere efficace, e spesso questi complessi vengono rimossi dall'ambiente intracellulare prima che la molecola venga rilasciata (Little and Kohane 2008). Per ottenere un legame stabile e efficace tra la molecola trasportata e il sistema di trasporto, sono state create delle micro- e nano-sfere, costituite da polimeri biodegradabili (acido polilattico-glicolico), nelle quali gli agenti surfattanti cationici (cetyltrimethylammonium bromide) o altri polimeri cationici (polietilenimina) posti sulla superficie riescono ad adsorbire la molecola terapeutica (O'Hagan et al. 2001; Oster et al. 2005). Spesso però questi complessi risultano instabili a causa del desorbimento dei surfattanti cationici, causando problemi di riproducibilità ed effetti collaterali tossici.

Per superare questi problemi abbiamo preparato e testato *in vivo* due nuovi tipi di nanoparticelle "core shell", chiamate T1 e ZM2 (Laus et al. 2000; Tondelli et al. 2003), ottenute tramite reazione di polimerizzazione per emulsione; sono formate da un nucleo centrale (core) costituito da una matrice di polimetilmetacrilato (T1), e polimetilmetacrilato e N-isopropilacrilamide (ZM2), rispettivamente, a cui sono legati covalentemente dei gruppi ammonici quaternari (cationici) a formare un guscio esterno (shell) idrofilico. Il polimetilmetacrilato (PMMA) è un polimero biocompatibile che viene biodegradato lentamente (30-40% all'anno) in assenza di effetti collaterali tossici. La capacità delle nanoparticelle di legare molecole antisense dipende dall'interazione elettrostatica tra le cariche negative della molecola a RNA e le cariche positive del guscio esterno. Le molecole di AON si legano ai gruppi cationici sia all'interno (slow release region) che all'esterno (fast

release region) dello shell cationico, determinando il cosiddetto effetto depot: gli AON più superficiali vengono rilasciati prima di quelli che si trovano all'interno dello shell, e questo fenomeno di lento rilascio, controllato nel tempo, determina, almeno in teoria, una durata maggiore dell'effetto terapeutico, in quanto le molecole antisense rimangono disponibili per più tempo nei tessuti target.

Il legame covalente dei gruppi cationici al core evita i problemi di desorbimento dell'AON e di instabilità che altri sistemi di trasporto possiedono.

Tipi simili di nanoparticelle costituite da una matrice di PMMA e circondate da gruppi cationici/anionici, erano già state descritte *in vivo* per il trasporto di molecole peptidiche o DNA (Kreuter and Speiser 1976; Kreuter 1983), ma mai state descritte come sistemi di trasporto per molecole a RNA. Si sono dimostrate sistemi di delivery efficaci e promettenti per vaccini a DNA o peptidi, o per PNA (acidi peptido nucleici): i complessi particella-molecola bio-attiva entrano facilmente all'interno delle cellule, dove rilasciano la molecola trasportata, senza effetti tossici né immunogenici in modelli murini e in primati non umani anche dopo somministrazioni ad alto dosaggio, e vengono bio-degradati lentamente (Stieneker et al. 1991; Caputo et al. 2004; Castaldello et al. 2006).

Le nanoparticelle "core shell" hanno il vantaggio di essere facili ed economiche da produrre, sono molto stabili alle alte e basse temperature, plastiche e quindi facilmente modellabili a seconda delle esigenze; sono costituite da un materiale (PMMA) inerte e facilmente reperibile perché ampiamente utilizzato in molti campi, dalla biomedica (protesi, lenti intraoculari etc...), all'industria (vetri di sicurezza, fanali delle auto etc...), all'oggettistica d'arredamento o architettonica.

In un primo esperimento abbiamo somministrato le nanoparticelle T1 (diametro 500 nm) nel topo mdx per via i.p allo scopo di:

1) verificare se fossero in grado di raggiungere le sedi colpite dalla distrofinopatia (la muscolatura scheletrica e cardiaca). Per la visualizzazione delle T1 all'interno dei tessuti le abbiamo coniugate con una sostanza fluorescente (fluoresceina) in modo da poterle visualizzare in immunofluorescenza all'interno delle fibre muscolari. Un'analisi più approfondita sulla precisa localizzazione cellulare e sull'eventuale accumulo delle T1 è stata realizzata tramite microscopia elettronica a trasmissione sui muscoli/tessuti prelevati dai topi trattati.

2) verificare che l'AON M23D, disegnato per indurre lo skipping dell'esone 23 murino mutato, si legasse in maniera stabile e riproducibile alle T1, formando dei complessi che permettessero una efficienza di trasporto migliore dell'utilizzo dell'M23D "nudo", e che consentissero di abbassare i dosaggi di molecola antisense utilizzati in passato, confidando anche sull'effetto depot.

3) misurare gli effetti terapeutici indotti dal trattamento sistemico con il complesso T1-M23D, in termini di induzione dello skipping dell'esone 23 (misurato in RT-Real RT-Time PCR) e ripristino della sintesi di proteina distrofina (misurato in immunofluorescenza e western blot) nei muscoli scheletrici e nel cuore.

Poiché gli obiettivi sopraelencati sono stati effettivamente raggiunti in questo primo esperimento con le T1, abbiamo poi deciso di testare nanoparticelle con struttura simile (ZM2), ma più piccole (137 nm), che consentissero anche altri tipi di somministrazione sistemica (ad es: intravenosa), e con maggiore capacità di adsorbimento dell'M23D.

Nei successivi esperimenti abbiamo trattato i topi con iniezioni i.p dei complessi ZM2-M23D e analizzato i muscoli e il cuore sia a 1 settimana dall'ultimo trattamento, che a 12 settimane, per verificare se l'effetto del trattamento con bassi dosaggi di M23D permanesse a lungo termine dopo l'interruzione delle somministrazioni. Abbiamo analizzato, anche per questi topi, la presenza del

trascritto mancante dell'esone 23 sia in RT-PCR che in Real Time RT-PCR, e il ripristino proteico in immunofluorescenza e western blot.

Inoltre abbiamo cercato un nuovo possibile biomarcatore, meno invasivo rispetto all'analisi in immunofluorescenza della biopsia muscolare a tutt'oggi utilizzata nei trials clinici, che consentisse di monitorare efficacemente l'effetto terapeutico del trattamento. Abbiamo quindi valutato il ripristino dell'espressione di distrofina nel muscolo liscio erettore del pelo (arrector pili), in biopsie cutanee prelevate dalla regione posteriore del collo del topo wild type e dei topi mdx trattati e non trattati.

L'espressione di distrofina nel muscolo erettore del pelo è stata studiata nell'uomo ed è stata documentata la sua assenza nei pazienti DMD, ma non era stata finora analizzata nel modello animale mdx.

MATERIALI E METODI

(Rimessi et al. 2009, Ferlini et al. 2010)

Sintesi dell'AON M23D

L'M23D con sequenza (+07-18) 5'-GGCCAAACCUCGGCUUACCUGAAAU-3' ha una struttura a fosforotioato modificato 2'O-Metile, ed è complementare alla sequenza che comprende il sito donatore di splicing dell'esone 23, più precisamente la regione di appaiamento sul pre-mRNA della distrofina murina comprende gli ultimi 7 nucleotidi 3' dell'esone 23 e i primi 18 nucleotidi 5' dell'introne 23. E' stato sintetizzato utilizzando il sintetizzatore automatico "ÄKTA oligopilot plus 10 DNA/RNA" (GE Healthcare, Milano, Italia), con modalità trityl-on, e liofilizzato. La purezza è stata valutata con analisi MALDI-TOF MS, 31P-NMR e RP-HPLC.

Sintesi delle nanoparticelle T1, T1-Fluo e ZM2

Le nanoparticelle sono state sintetizzate tramite reazione di polimerizzazione per emulsione (Laus et al. 2000), utilizzando il metacrilato come monomero e uno o più co-monomeri solubili in acqua, come stabilizzatori dell'emulsione. La reazione inizia in fase acquosa portando alla formazione di oligoradicali, ricchi in co-monomeri solubili in acqua; quando si arriva al limite di solubilità, gli oligoradicali precipitano e formano le particelle primarie, che aumentano di dimensioni tramite incorporazione dei monomeri e dei co-monomeri.

Le T1 sono state ottenute dalla polimerizzazione per emulsione del metilmetacrilato e di un surfamero, il co-monomero cationico

2-(dimethyloctyl)ammonium ethyl-methacrylate bromine (TR), che è un monomero metacrilico con dei gruppi di ammonio quaternario nella catena laterale. Le T1 fluorescenti (T1-Fluo) sono state preparate sciogliendo il co-monomero TR, reso fluorescente tramite coniugazione con fluoresceina, insieme al metil-metacrilato.

Per la preparazione delle ZM2 è stato utilizzato il metil-metacrilato, come per le T1, insieme a due surfameri, il co-monomero cationico TR e il co-monomero non ionico N-isopropilacrilamide (NIPAM).

Adsorbimento dell'AON M23D alle nanoparticelle T1 e ZM2

Le nanoparticelle T1 sono state risospese in PBS (pH 7,4), vortexate/sonicate per 15 min, poi è stato aggiunto l'M23D e la sospensione è stata incubata a 25°C in agitazione per 2 h. Dopo centrifugazione a 18000 rpm per 15 min, il surnatante è stato filtrato, diluito in PBS e letto allo spettrofotometro ($\lambda = 260$). La percentuale di adsorbimento è stata calcolata in questo modo: $100 \times \frac{\text{M23D aggiunto} - (\text{M23D non legato})}{\text{M23D aggiunto}}$.

Somministrazione i.p dei topi mdx

In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi mdx maschi (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) e topi maschi wild type (WT) di controllo (C57BL/10SnJ), di età compresa fra le 6 e le 8 settimane. Le procedure impiegate sono conformi ai protocolli dei Comitati Etici di Sperimentazione sugli Animali. I topi sono stati stabulati in stanze con temperatura costante (22°C), umidità del 50% e con cicli di luce/buio di 12 h.

Gli schemi di trattamento degli esperimenti con le nanoparticelle T1 e ZM2 sono riassunti nelle **tabelle 3 e 5**.

Per le somministrazioni intraperitoneali (i.p) sono stati utilizzati 250 μ l per ogni iniezione, contenenti o 2,5 mg di nanoparticelle T1 e 45 μ g di M23D, o 2,5 mg di nanoparticelle ZM2 e 225 μ g di M23D, o 45/225 μ g di M23D non complessato (“nudo”), oppure 2,5 mg di T1-Fluo.

La soluzione è stata iniettata nella cavità peritoneale della regione addominale del topo, utilizzando un ago da insulina da 28G.

La dose totale di M23D somministrata nell’esperimento con le T1 è di 2,7 mg/Kg, nell’esperimento con le ZM2 è di 52,5 mg/Kg.

Processazione dei tessuti/organi

A vari tempi di analisi, indicati nelle **tabelle 3 e 5**, i topi sono stati sacrificati, e i tessuti/organi (quadricipite, gastrocnemio, diaframma, cuore, cute della regione posteriore del collo, fegato, milza e rene) sono stati isolati e congelati in azoto liquido (per l’analisi dell’RNA, e della proteina in western blot), e in isopentano liquido pre-raffreddato (per l’analisi della proteina in immunofluorescenza e in istologia). I campioni da utilizzare per la microscopia elettronica sono stati fissati in gluteraldeide 2,5% e tampone fosfato per 3 h, poi in tetrossido di osmio in buffer Veronal per 2 h, sono poi stati disidratati con etanolo e immersi in resina Epon E812.

Analisi dei tessuti in microscopia elettronica a trasmissione

Sezioni ultra-fini di fegato, milza, rene, diaframma, gastrocnemio, quadricipite e cuore dei topi mdx trattati con le T1 senza M23D, sono state marcate con citrato di

piombo e acetato di uranile, e osservate al microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 400, a 100 kV.

Analisi in immunofluorescenza e conta delle fibre distrofina-positiva

Sono state tagliate al criostato sezioni trasversali di 7 μm , ad intervalli di 150 μm , e sono stati analizzati 6 livelli per ogni muscolo/tessuto.

Per l'analisi delle T1-Fluo, le sezioni di fegato, milza, diaframma, quadricipite, gastrocnemio e cuore dei topi del gruppo 3 (**tabella 3**) sono state marcate con l'anticorpo anti-nidogeno (Calbiochem, San Diego, CA), utilizzato come marker della membrana basale, rivelato con tetrametil-rodamina-isotiocianato (TRITC) (DAKO, Glostrup, Danimarca).

Per l'analisi dei muscoli scheletrici (quadricipite, gastrocnemio, diaframma), del cuore e del muscolo liscio "arrector pili" isolati dai topi mdx trattati con i complessi nanoparticella-M23D sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anticorpo policlonale anti-distrofina (H300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) rivelato con fluoresceina-isotiocianato (FITC) (DAKO, Glostrup, Danimarca), tetrametil-rodamina-isotiocianato (TRITC) (DAKO, Glostrup, Danimarca), o cianina 3 (Cy3) (Jackson ImmunoResearch, UK); anticorpo monoclonale anti-laminina α -2 (4H8-2) rivelato con TRITC (DAKO, Glostrup, Danimarca) o Cy2 (Jackson ImmunoResearch, UK), per la marcatura della lamina basale; anticorpo policlonale anti-desmina rivelato con FITC (DAKO, Glostrup, Danimarca), per la marcatura delle fibre muscolari lisce della cute.

I campi selezionati sono stati fotografati a ingrandimento 20X al microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 80i, agli stessi tempi di esposizione.

Per la quantificazione della positività, in ogni campo fotografato è stato contato prima il numero totale di fibre, identificate mediante la marcatura con la laminina

α -2, poi il numero di fibre con almeno il 50% del perimetro marcato con l'anticorpo anti-distrofina. E' stata calcolata la percentuale sul totale, delle fibre distrofina-positive ed è stata fatta la media di tutti i valori ottenuti per ciascun muscolo. La significatività è stata calcolata con il T-test, e sono stati considerati significativi i valori con $P < 0,005$.

Analisi del trascritto distrofina

L'RNA totale è stato estratto con Trizol (Invitrogen, Italia) e retrotrascritto a cDNA con il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Francoforte, Germania). Per la quantificazione dello skipping dell'esone 23 e per la valutazione del livello di trascritto distrofina è stato messo a punto un nuovo protocollo di Real Time PCR che utilizza sonde TaqMan (Applied Biosystems, Francoforte, Germania) esone-specifiche (esoni 7, 8, 22, 23, 25 del trascritto distrofina) disegnate con Primer Express (Applied Biosystems, Francoforte, Germania); il gene β -actina è stato utilizzato come controllo endogeno. Tramite il metodo $\Delta\Delta C_t$ è stata calcolata la percentuale di inclusione dell'esone 23 nel trascritto maturo, da cui deriva la percentuale di skipping. La significatività è stata calcolata con il T-test, e sono stati considerati significativi i valori con $P < 0,005$.

La corretta composizione esonica del trascritto distrofina è stata valutata in RT-PCR amplificando la regione compresa tra gli esoni 20 e 26 (20F 5'-CAGAATTCTGCCAATTGCTGAG-3', 26R 5'-TTCTTCAGCTTGTGTCATCC-3') con l'enzima Taq Platinum (Invitrogen, Italia), per trentacinque cicli a 94°C (45 sec), 60°C (45 sec), 72°C (1,2 min). 1 μ l della PCR primaria è stato utilizzato in Nested-PCR per amplificare la regione compresa tra gli esoni 21 e 25 (21F 5'-CAATGTTTCTGGATGCAGACTTTGTGG-3', 25R 5'

GTTCAGCTTCACTCTTTATCTTCTGCC-3'). I prodotti di PCR sono stati analizzati in gel di agarosio all'1,5%.

Analisi della proteina distrofina in Western blot

Sezioni (circa 30) di 20 µm dei muscoli scheletrici e cardiaco sono state lisate (7 mol/l urea, 2 mol/l thiourea, 1% amidosulfobetaine-14, e 0,3% dithioerythritol) e migrate in gel di sodio dodecil-solfato e poliacrilamide (6%), poi trasferite su membrana di nitrocellulosa a 75 V e incubate overnight a 4 °C con l'anticorpo anti-distrofina DYS2 (NovoCastra, Newcastle, UK). La quantità di proteine totali caricate su gel per il controllo WT è di 15 µg, mentre per i topi mdx trattati/non trattati è di 150 µg.

RISULTATI

Oligoribonucleotide antisenso (AON) M23D 2'O-metile-fosforotioato (2'OMePS)

La molecola antisenso (AON M23D) che abbiamo utilizzato per gli esperimenti sul topo mdx è un RNA sintetico la cui struttura chimica è stata modificata per evitarne la degradazione da parte delle nucleasi nei fluidi biologici, e da parte dell'enzima RNAsi H all'interno del nucleo. Ha uno scheletro a fosforotioato e l'ossigeno al 2' del ribosio è sostituito da un gruppo metilico. L'AON M23D, con sequenza (+07-18) 5'-GGCCAAACCUCGGCUUACCUGAAAU-3', è complementare alla sequenza che comprende il sito donatore di splicing dell'esone 23 della distrofina murina, più precisamente la regione di appaiamento sul pre-mRNA comprende gli ultimi 7 nucleotidi 3' dell'esone 23 e i primi 18 nucleotidi 5' dell'introne 23. Il legame dell'AON con la sequenza bersaglio provoca il mascheramento dell'esone 23 contenente la mutazione di stop (C → T nel nucleotide 28), con conseguente esclusione dal trascritto maturo (**figura 4**). L'esone 23 della distrofina murina è "in frame" quindi la cornice di lettura viene mantenuta e viene prodotta una proteina più corta di quella wild type ma funzionale.

Negli esperimenti *in vivo* l'AON M23D è stato utilizzato sia coniugato ai 2 tipi di nanoparticelle testate (chiamate T1 e ZM2), sia "nudo" (libero, non coniugato alle nanoparticelle).

ESPERIMENTO CON LE NANOPARTICELLE T1

(Rimessi et al. 2009)

Nanoparticelle T1 e esperimenti di loading con l'AON M23D

Le nanoparticelle “core shell “ T1 sono state sintetizzate tramite reazione di polimerizzazione per emulsione. La struttura è schematizzata in **figura 5a-b**, in **tabella 2** sono evidenziate le caratteristiche chimico-fisiche. Gli esperimenti di adsorbimento dimostrano che le T1 sono in grado di legare sulla loro superficie molecole a RNA modificate 2'OMePS in un rapporto di 18 µg di oligoribonucleotide per 1 mg di particelle T1. L'adsorbimento dell'M23D alle nanoparticelle T1 è un processo altamente riproducibile. L'efficienza di legame è alta a basse concentrazioni di M23D e diminuisce a più alte concentrazioni.

Schema di trattamento con nanoparticelle T1

In questo primo esperimento abbiamo trattato con 3 iniezioni intraperitoneali (1/settimana per 3 settimane) 11 topi mdx di età compresa tra le 6 e le 8 settimane (**tabella 3**). 6 mdx hanno ricevuto il complesso T1-M23D (45 µg di M23D adsorbito a 2,5 mg T1/iniezione) (gruppo 1), 2 mdx hanno ricevuto l'M23D “nudo” (45 µg di M23D per iniezione) (gruppo 2) e 3 mdx hanno ricevuto solo le nanoparticelle T1 fluorescenti (gruppo 3). La dose totale di M23D dell'intero trattamento, sia coniugato alle T1 sia “nudo”, è di 2,7 mg/Kg.

Come controlli sono stati utilizzati 6 topi mdx che non hanno ricevuto alcun trattamento (NT, gruppo 4).

Gli animali di ciascun gruppo di trattamento (ad eccezione del gruppo 2) sono stati sacrificati a 2 tempi, 1 e 6 settimane dopo l'ultimo trattamento.

Biodistribuzione delle nanoparticelle T1

Per valutare *in vivo* la diffusione e la biodistribuzione delle nanoparticelle T1 sono stati utilizzati i 3 topi mdx del gruppo 3 (**tabella 3**). Gli animali sono stati sacrificati a 1 e 6 settimane dall'ultimo inoculo e tramite immunofluorescenza sono stati analizzati fegato, milza, cuore, gastrocnemio, diaframma e quadricipite. Le nanoparticelle T1 fluorescenti (**figura 6**) sono risultate visibili come monodisperse in tutti i tessuti analizzati, compresi i muscoli scheletrico e cardiaco. Nel diaframma si trovavano addossate alle cellule mesoteliali o negli spazi intercellulari, nel gastrocnemio, quadricipite e nel cuore erano localizzate all'interno delle fibre muscolari (**figura 7**). Il numero di particelle/mm² è risultato maggiore nel diaframma rispetto a gastrocnemio e quadricipite (10 e 2 particelle/mm² rispettivamente). L'analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) ha confermato la presenza delle nanoparticelle in tutti i tessuti analizzati. Al TEM le T1 apparivano come strutture circolari elettro-translucenti con diametro di circa 500 nm. Quest'analisi ha inoltre consentito di visualizzarle nel diaframma, situate tra le cellule mesoteliali sul versante peritoneale, all'interno del citoplasma dei macrofagi circolanti nei vasi linfatici e all'interno di cellule endoteliali dei vasi sanguigni (**figura 8**). La biodistribuzione delle nanoparticelle fluorescenti è risultata analoga sia in immunofluorescenza che all'analisi al TEM ai due tempi di analisi (1 e 6 settimane dalla fine del trattamento).

Analisi istologica

Al fine di valutare l'occorrenza di reazioni infiammatorie in risposta alla somministrazione di nanoparticelle e/o complessi nanoparticelle/AON è stata eseguita un'analisi istologica degli organi prelevati (fegato, rene, milza). Tale analisi non ha evidenziato danni tissutali, alterazioni della morfologia, modificazioni dell'architettura cellulare né presenza di infiltrati infiammatori in ognuno degli organi esaminati (**figura 9a**). Inoltre i muscoli scheletrici dei topi trattati con T1-M23D mostravano un miglioramento dell'architettura e una riduzione delle aree di infiammazione/necrosi (**figura 9b**).

Analisi in immunofluorescenza della proteina distrofina

L'analisi in immunofluorescenza con anticorpi specifici per la proteina distrofina ha mostrato che i muscoli scheletrici (quadricipite, diaframma e gastrocnemio) dei topi trattati col complesso T1-M23D presentavano distrofina correttamente localizzata nel sarcolemma delle fibre muscolari in un numero significativo di fibre che apparivano "clusterizzate", come mostrato in **figura 10 a-b**. L'intensità della marcatura era comparabile a quella presente nel topo wild type (wt).

Inoltre diverse aeree del cuore dei topi trattati ed esaminati 1 settimana dopo l'ultimo inoculo presentavano gruppi di cardiomiociti esprimenti distrofina (**figura 11**), mentre risultava negativa la marcatura del cuore degli animali analizzati dopo 6 settimane.

Nei muscoli scheletrici dei topi trattati col complesso T1-M23D è stata fatta un'analisi semi-quantitativa delle fibre distrofina-positive, rapportando il numero delle fibre marcate per la distrofina a quello delle fibre marcate per la laminina α -2, una

proteina della matrice extracellulare che viene espressa da tutte le fibre muscolari scheletriche e cardiache del topo mdx, e che co-localizza con la distrofina; le fibre distrofina-positive con meno del 50% del perimetro marcato e quelle con pattern di marcatura discontinuo sono state escluse dal conto. La percentuale media di fibre positive variava a seconda del muscolo (**figura 12**): in tutti i muscoli analizzati la percentuale di fibre distrofina-positive nei topi mdx trattati col complesso T1-M23D era significativamente più alta rispetto sia ai topi trattati con la stessa dose di M23D “nudo”, che ai topi mdx di controllo.

Analisi della distrofina in Western blot

L'analisi in western blot ha dimostrato che la distrofina identificata in immunofluorescenza corrispondeva in peso molecolare alla distrofina del topo wild type (427 kDa), poiché tradotta dal messaggero che manca dell'esone target 23 e quindi priva di un piccolo dominio a livello proteico (8 kDa). La banda specifica era chiaramente visibile nel gastrocnemio, quadricipite e diaframma di tutti i topi trattati col complesso T1-M23D e analizzati sia a 1 che a 6 settimane dalla fine del trattamento, mentre era assente negli mdx non trattati o trattati con l'M23D “nudo” (**figura 13**).

Nested RT-PCR

L'analisi del trascritto distrofina in Nested RT-PCR ha dimostrato la presenza del trascritto full-length (874 bp) in tutti i campioni analizzati e del trascritto generato dallo skipping dell'esone 23 (661 bp) nel quadricipite, gastrocnemio e cuore dei topi trattati col complesso T1-M23D, sacrificati 1 settimana dopo l'ultima iniezione (**figura 14**).

Analisi quantitativa degli effetti del trattamento con T1-M23D sul livello generale di trascrizione

Mediante analisi con Exon Specific Real-time Assays (ESRAs) è stata valutata la quantità di trascritto distrofina nei muscoli scheletrici e cardiaco dei topi mdx trattati con il complesso T1-M23D, con l'M23D "nudo" o non trattati, rispetto a topi wild type. I risultati ottenuti hanno dimostrato che gli mdx non trattati hanno in generale un livello trascrizionale più basso rispetto a quello dei topi WT (considerato come il 100%), che presenta un pattern muscolo-specifico, con i livelli più alti nel diaframma (34% rispetto al WT) e nel cuore (14%), e i livelli più bassi nel gastrocnemio (10%) e quadricipite (6%) (**figura 15**). Nei topi mdx trattati col complesso T1-M23D e sacrificati 1 settimana dopo la fine del trattamento, è stato evidenziato un aumento significativo dei livelli di trascritto distrofina nel cuore (80% in più), gastrocnemio e quadricipite (70% e 50% in più rispettivamente) (**figura 15**). Nel diaframma invece i livelli trascrizionali rimanevano simili nei topi trattati e non trattati.

Quantificazione dello skipping dell'esone 23 tramite ESRA

La percentuale del trascritto con skipping dell'esone 23 è stata misurata tramite ESRA utilizzando l'esone 7 come reference e la β -actina di topo come controllo endogeno. Lo skipping era chiaramente visibile nel cuore (16%) e nei muscoli scheletrici (6%) degli mdx trattati con T1-M23D e sacrificati a 1 settimana dalla fine del trattamento (**figura 16**). E' stata anche verificata la presenza della corretta giunzione esone 22-esone 24 tramite sequenziamento del prodotto di Nested RT-PCR.

Negli animali analizzati dopo 6 settimane dall'ultima iniezione, il livello trascrizionale rimaneva simile ai topi non trattati e non si evidenziava skipping dell'esone 23.

ESPERIMENTI CON LE NANOPARTICELLE ZM2

(Ferlini et al. 2010)

Nanoparticelle ZM2 e esperimenti di loading con l'AON M23D

Le nanoparticelle ZM2 sono state sintetizzate, come le T1, tramite reazione di polimerizzazione per emulsione (**figura 5a,c**). A differenza delle T1 le ZM2 hanno un nucleo centrale costituito da una matrice di polimetilmetacrilato (PMMA) e di N-isopropilacrilamide (NIPAM), una densità di carica superficiale maggiore (202 $\mu\text{moli/g}$) e un diametro minore (120-137 nm). Gli esperimenti di adsorbimento hanno dimostrato che le nanoparticelle ZM2 hanno una maggiore capacità di legame rispetto alle T1 e sono in grado di legare sulla loro superficie 90 μg di AON M23D per mg di nanoparticella (**tabella 4**).

Misurazione della citotossicità delle ZM2

Per la misurazione della citotossicità delle nanoparticelle ZM2, cellule HeLa sono state incubate con concentrazioni crescenti di ZM2. Come mostra la **figura 17**, nelle cellule trattate con concentrazioni fino a 1 mg/ml non si osservava alcuna riduzione ($p > 0,05$) della vitalità cellulare, rispetto alle cellule non trattate. Anche se si osservava una leggera riduzione (10%) della vitalità alla concentrazione di 1

mg/ml, la differenza non risultava significativa rispetto alle cellule di controllo ($p > 0,05$). Questi risultati hanno indicato che le ZM2 non sono citotossiche.

Schema di trattamento con nanoparticelle ZM2

Come mostrato in **tabella 5**, sono stati trattati 16 topi mdx di 6 settimane di età con 7 iniezioni i.p (1/settimana per 7 settimane). 8 mdx hanno ricevuto il complesso ZM2-M23D (225 μ g di M23D adsorbito in 2,5 mg di ZM2/ iniezione), 8 mdx sono stati trattati con l'M23D “nudo” (225 μ g di M23D per iniezione). La dose totale di M23D ricevuta è di 52,5 mg/Kg.

Come controlli sono stati utilizzati 4 topi mdx che non hanno ricevuto alcun trattamento (NT).

Per ogni gruppo di trattamento (ZM2-M23D e M23D “nudo”) 4 animali sono stati sacrificati 1 settimana dopo l'ultima iniezione (**Esperimento 1**), gli altri 4 topi sono stati analizzati a 12 settimane dall'interruzione del trattamento (**Esperimento 2**).

Esperimento 1

Analisi in immunofluorescenza della proteina distrofina

L'effetto del trattamento con il complesso ZM2-M23D nei topi mdx è stato valutato prima in immunofluorescenza, poi in western blot e infine mediante analisi trascrizionale. L'analisi tramite immunofluorescenza ha dimostrato chiaramente che il complesso ZM2-M23D si è rivelato in grado di indurre il ripristino e la corretta localizzazione della distrofina in modo molto efficace nei muscoli scheletrici (quadricipite e diaframma) e anche nel cuore. I muscoli scheletrici degli mdx trattati

con M23D “nudo” presentavano tracce di proteina, i topi non trattati risultavano negativi (**figura 18**).

Per dare una valutazione semi-quantitativa della positività riscontrata nei differenti muscoli dei topi trattati con il complesso ZM2-M23D o con M23D “nudo”, sono state contate le fibre con almeno il 50% del perimetro marcato per la distrofina, nei campi più positivi (Vitiello et al. 2008, Malerba et al. 2009), e questo numero è stato rapportato al numero totale di fibre presenti in ogni campo analizzato, evidenziate tramite marcatura con la laminina α -2. La conta ha evidenziato che nei muscoli scheletrici dei topi trattati con ZM2-AON si riscontravano alte percentuali di fibre positive, 46% nel diaframma e 58% nel quadricipite, che erano significativamente superiori a quelle trovate nei muscoli dei topi che avevano ricevuto l'M23D “nudo” (6% nel diaframma, 9% nel quadricipite). Anche nel cuore dei topi trattati con ZM2-M23D, ma non in quelli che avevano ricevuto M23D “nudo”, erano presenti fibre distrofina-positive (5%), tuttavia la percentuale non risultava significativa rispetto ai topi non trattati (**figura 19**).

Analisi della distrofina in Western Blot

L'analisi in western blot ha evidenziato la presenza della banda, con peso molecolare indistinguibile dalla proteina full length, in quadricipite e diaframma degli animali trattati con ZM2-M23D (**figura 20**); una banda di intensità più debole era presente anche nel cuore.

Inoltre anche nel quadricipite e nel diaframma dei topi trattati con M23D “nudo” era visibile una debole banda.

Nested RT-PCR

L'analisi mediante Nested RT-PCR del trascritto distrofina ha dimostrato che il trascritto full-length (874 bp) era rilevabile in tutti i muscoli scheletrici analizzati e nel cuore negli animali trattati e non trattati (**figura 21**). Nel quadricipite e nel diaframma dei topi trattati col complesso ZM2-M23D ed anche nel diaframma degli animali che hanno ricevuto solo M23D “nudo”, era visibile anche il prodotto più corto (661 bp), derivante dallo skipping dell'esone 23. Il cuore degli mdx trattati non presentava trascritto mancante dell'esone 23.

Quantificazione dello skipping dell'esone 23 tramite ESRA

La quantificazione del trascritto distrofina corretto (mancante dell'esone 23 mutato) è stata realizzata mediante analisi ESRA, utilizzando sonde specifiche per l'esone 23 (target) e per gli esoni 22 e 25 (reference) della distrofina murina, e il gene β -actina come controllo endogeno. Questa analisi ha evidenziato la presenza del trascritto corretto in tutti i muscoli scheletrici analizzati e nel cuore dei topi trattati con ZM2-M23D, con valori di skipping compresi tra il 3% (cuore) e il 21% (diaframma) (**figura 22**).

Sono state rilevate basse percentuali di skipping (<2%) anche nel quadricipite dei topi trattati con M23D “nudo”.

Analisi in immunofluorescenza del muscolo liscio erettore del pelo “arrector pili” della cute

Allo scopo di individuare un possibile biomarcatore, meno invasivo se paragonato all'analisi immunoistochimica del muscolo scheletrico, che possa monitorare efficacemente l'effetto terapeutico del trattamento, abbiamo valutato il ripristino dell'espressione di distrofina nel muscolo liscio erettore del pelo (arrector pili).

L'espressione di distrofina nel muscolo erettore del pelo è stata descritta nell'uomo ed è stata documentata la sua assenza nei pazienti DMD, ma non era stata finora analizzata nel modello animale mdx.

Abbiamo analizzato il muscolo arrector pili in una biopsia cutanea prelevata dalla regione posteriore del collo dei topi WT, per verificare la presenza di distrofina, e dei topi mdx trattati/non trattati per valutare il suo eventuale ripristino in seguito al trattamento.

La distrofina, presente nei topi WT e assente negli mdx non trattati, veniva ripristinata negli animali trattati col complesso ZM2-M23D (**figura 23**), che mostravano una marcatura intensa e omogenea, ma non negli animali che avevano ricevuto la stessa dose di M23D "nudo".

Esperimento 2

Analisi in immunofluorescenza della proteina distrofina

Al fine di valutare se l'effetto del trattamento con le nanoparticelle ZM2 fosse ancora misurabile dopo 3 mesi dall'interruzione degli inoculi i.p, i muscoli scheletrici e il cuore dei topi mdx appartenenti ai due gruppi di trattamento (ZM2-

M23D e M23D “nudo”, vedi esperimento 1) sono stati analizzati in immunofluorescenza, western blot, ed infine tramite analisi trascrizionale.

L'analisi in immunofluorescenza ha dimostrato che dopo un periodo di sospensione così lungo la distrofina era ancora chiaramente visibile, e correttamente localizzata in membrana, nei muscoli scheletrici sia dei topi trattati col complesso ZM2-M23D sia, anche se con minore intensità, in quelli trattati con M23D “nudo” (**figura 24a**).

Il cuore invece risultava negativo.

Nei due gruppi di trattamento si osservava un diverso pattern di distribuzione e di intensità del segnale: nei muscoli degli mdx trattati con ZM2-M23D infatti erano presenti gruppi di fibre distrofina-positivo con marcatura molto intensa e continua, invece le fibre positive negli animali trattati con M23D “nudo” erano caratterizzate da un segnale più diffuso, meno continuo, e da un'intensità di marcatura più debole (**figura 24b**).

La conta delle fibre nei campi più positivi (vedi esperimento 1) ha evidenziato che nei topi trattati con ZM2-M23D la percentuale di fibre distrofina-positivo era 30% nel diaframma e 40% nel quadricipite, mentre nei topi che hanno ricevuto M23D “nudo” le percentuali erano inferiori (10% nel diaframma, 15% nel quadricipite) (**figura 25**).

Analisi della distrofina in Western Blot

L'analisi in western blot ha evidenziato la presenza della banda, con peso molecolare indistinguibile dalla proteina full length, nel quadricipite e diaframma degli mdx trattati con ZM2-M23D, mentre i topi trattati con M23D “nudo” risultavano negativi (**figura 26**).

Nested RT-PCR

L'analisi in Nested RT-PCR ha dimostrato che il trascritto full length era presente in tutti gli animali trattati, ma in nessuno dei muscoli scheletrici analizzati (quadricipite e diaframma) né nel cuore era rilevabile il prodotto derivante dallo skipping dell'esone 23 (**figura 27**).

Quantificazione dello skipping dell'esone 23 tramite ESRA

La quantificazione del trascritto distrofina corretto (mancante dell'esone 23 mutato), prodotto dal trattamento, è stata determinata mediante analisi utilizzando sonde specifiche per l'esone 23 (target) e per gli esoni 8 e 25 (reference), e la β -actina come controllo endogeno.

L'analisi ha mostrato che il trascritto corretto era presente in tutti i muscoli scheletrici e nel cuore degli mdx trattati con il complesso ZM2-M23D con valori del 9,5% nel diaframma, 7,8% nel cuore e 6,3% nel quadricipite (**figura 28**).

Anche nei muscoli degli animali che hanno ricevuto la stessa quantità di M23D "nudo" sono state rilevate basse percentuali di skipping (dal 2,6% al 6,5%), e le differenze tra i due gruppi di trattamento sono significative solo nei muscoli scheletrici, ma non nel cuore (**figura 28**).

CONCLUSIONI

In questo lavoro si descrive la prima applicazione di nanoparticelle cationiche “core-shell” come vettori di oligoribonucleotidi antisenso (AONs) per l'induzione di exon skipping nel trascritto distrofina *in vivo*.

Abbiamo testato nel topo mdx 2 tipi di nanoparticelle chiamate T1 e ZM2, entrambe costituite da un nucleo centrale di materiale inerte, non tossico e non immunogeno, a cui sono legati covalentemente dei gruppi cationici a formare un guscio esterno. La molecola antisenso utilizzata, M23D, è un RNA sintetico con scheletro fosforotioato modificato 2'OMe, che si lega ai gruppi cationici delle nanoparticelle tramite interazioni elettrostatiche.

Nel primo esperimento abbiamo utilizzato le nanoparticelle T1 (diametro 500 nm) coniugate con l'AON M23D, per verificare: i) se fossero effettivamente in grado di legare l'AON e di trasportarlo in tutte le sedi muscolari interessate dalla patologia (muscoli scheletrici e cuore) in seguito a inoculi i.p; ii) se inducessero un effetto terapeutico in termini sia di induzione dello skipping che di ripristino proteico, utilizzando bassi dosaggi di M23D (2,7 mg/Kg in totale), in assenza di effetti tossici; iii) se l'eventuale effetto terapeutico fosse effettivamente dovuto alla coniugazione dell'M23D con la nanoparticella.

i) Gli studi di biodistribuzione realizzati con T1 fluorescenti, hanno dimostrato che le nanoparticelle vengono trasportate nei tessuti, in particolare nei muscoli scheletrici e nel cuore, dove appaiono come monodisperse all'interno delle fibre muscolari. L'analisi in microscopia elettronica ci ha portato a ipotizzare che le T1

vengano probabilmente trasportate dal sito di inoculo sia attraverso il circolo sanguigno che il circolo linfatico; sono infatti state identificate tra le cellule mesoteliali sul versante peritoneale del diaframma (vicino al sito di inoculo), all'interno delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni e nel citoplasma dei macrofagi circolanti presenti nei vasi linfatici.

ii) La coniugazione con le nanoparticelle T1 permette all'M23D di essere protetto durante la diffusione nel circolo sanguigno/linfatico e di rimanere biodisponibile per tempi lunghi, inducendo un effetto terapeutico su tutti i muscoli colpiti, ed in particolare sul cuore, a dosaggi (2,7 mg/Kg in totale) corrispondenti a 1/100 di quelli utilizzati per i 2'OMePS e i PMO non coniugati ad alcun carrier (nudi) (**tabella 1**). L'effetto sul trascritto è stato finemente quantificato mediante la messa a punto di un metodo semi-quantitativo basato su saggi di RT-Real Time-PCR esone specifici (ESRA). La correzione, mediata dall'M23D, del trascritto mutato si riflette sul ripristino della distrofina, che in immunofluorescenza appare di intensità paragonabile a quella del topo wild type nei muscoli scheletrici fino a 45 giorni dalla fine del trattamento. La proteina distrofina che viene prodotta appare funzionale perché correttamente localizzata in membrana nelle fibre muscolari, e del corretto peso molecolare.

L'utilizzo dei complessi T1-M23D non causa lesioni istologiche né reazioni immunitarie o infiammatorie in rene, fegato e milza, inoltre l'analisi istologica dei muscoli scheletrici mostra una riduzione delle aree di necrosi negli animali trattati con i complessi, rispetto agli mdx di controllo.

iii) L'effetto terapeutico viene chiaramente indotto dalla coniugazione dell'M23D con le nanoparticelle T1, poiché la stessa dose di M23D non complessato non produce alcun effetto né in RT-PCR né in immunofluorescenza o in western blot.

Inoltre, anche la persistenza della proteina ripristinata fino ad almeno 45 giorni dopo l'interruzione del trattamento, deriva probabilmente dall'effetto stoccaggio/lento-rilascio dell'M23D, esercitato dalle nanoparticelle T1 che permettono alla molecola di rimanere in circolo e biodisponibile per più tempo. Questo effetto, in aggiunta alla protezione dell'AON dalla degradazione, aumenta la biodisponibilità della molecola terapeutica riducendone i dosaggi necessari per produrre risultati consistenti.

Il risultato più promettente e inaspettato è stata la sintesi di distrofina a livello cardiaco, misurabile sia sul trascritto che sulla proteina (immunofluorescenza), a 1 settimana dall'ultimo inoculo, nonostante il basso dosaggio utilizzato rispetto ai lavori precedenti (**tabella 1**).

I risultati ottenuti con le nanoparticelle T1 sono decisamente incoraggianti, tuttavia le grandi dimensioni (500 nm di diametro) ne precludono l'utilizzo per altre vie di somministrazione, come ad esempio la intravenosa e la sottocutanea.

Per questo motivo e per migliorare il potenziale di questo approccio innovativo, abbiamo deciso di utilizzare un altro tipo di nanoparticella "core shell" (ZM2), più piccola (137 nm di diametro) e con una maggiore densità di carica superficiale, quindi in grado di legare e trasportare un numero maggiore di molecole di AON.

Queste nuove nanoparticelle sono risultate non tossiche né *in vitro* né *in vivo* e ci hanno permesso di ottenere il ripristino della sintesi di distrofina a breve termine in misura paragonabile agli esperimenti precedenti con le nanoparticelle T1, con l'eccezione della presenza anche in western blot della distrofina nel muscolo cardiaco.

Abbiamo inoltre individuato un nuovo possibile biomarcatore, rappresentato dal muscolo liscio erettore del pelo (arrector pili) isolato da biopsia cutanea, che

potrebbe essere utilizzato per monitorare l'effetto terapeutico del trattamento. Abbiamo prima verificato che il topo mdx, analogamente ai pazienti DMD (Marbini et al. 1995; Marbini et al. 1996; Tanveer et al. 2009), non esprimesse distrofina nell'arrector pili, diversamente dai soggetti sani e dai topi wild type. Abbiamo quindi valutato la presenza/assenza di distrofina nei topi mdx trattati e non trattati. Il risultato ha rivelato che anche l'arrector pili rappresenta un muscolo target del trattamento, che risponde come il muscolo scheletrico ripristinando la corretta sintesi di distrofina, e il cui prelievo rappresenta un intervento poco invasivo, che non richiede anestesia. L'utilizzo di un biomarcatore che permetta, grazie alla semplicità di analisi, di fare test ripetuti è da considerarsi particolarmente utile non solamente per la valutazione end-point, ma anche per testare *in itinere* l'efficacia e il protocollo di somministrazione/dosaggio in tempo utile per poter apportare eventuali modifiche.

Il persistere di un effetto misurabile anche in western blot a tre mesi dalla sospensione del trattamento, ha confermato l'effetto "retard" esercitato dalle nanoparticelle ZM2 sul rilascio dell'AON nonostante il basso dosaggio utilizzato, corrispondente a circa 1/20 rispetto ai trattamenti sistemici descritti in letteratura (**tabella 1**).

Inaspettatamente a distanza di tre mesi dalla fine del trattamento anche gli mdx trattati con lo stesso dosaggio di M23D "nudo" presentano in immunofluorescenza fibre positive alla distrofina, dato che però, a differenza di quanto ottenuto negli mdx trattati con i complessi ZM2-M23D, non è confermato dall'analisi in western blot. Un effetto così a lungo termine non era mai stato descritto con AON 2'OMePS, ancora una volta a sottolineare il potenziale terapeutico delle nanoparticelle come vettori per molecole a RNA.

A tutt'oggi sistemi non virali efficienti e non tossici, utilizzabili per somministrazioni ripetute in patologie croniche, possibilmente trasferibili dagli studi preclinici all'utilizzo nell'uomo, non sono ancora stati individuati e molti studi sono attualmente in corso.

Alcuni studi si sono focalizzati sull'uso di copolimeri PEG-PEI e polimerosomi non ionici come sistemi di trasporto di AONs 2'OMePS nel topo mdx. Tali sistemi manifestano però bassi livelli di citotossicità che ne limitano l'utilizzo in cronico (Williams et al. 2008; Kim et al. 2009).

Copolimeri PEG-PEI funzionalizzati con la regione ricca in arginina del peptide TAT di HIV-1 hanno dato risultati promettenti in termini di uptake nucleare (Sirsi et al. 2008). Rimane tuttavia da escludere un possibile effetto off-target di attivazione trascrizionale prodotto dal peptide.

Nanoparticelle rivestite di chitosano sono state utilizzate in modelli murini per il trasporto di siRNA nel trattamento del carcinoma papillare della tiroide mediante somministrazione sistemica (De Martimprey et al. 2010). Tuttavia, l'attivazione del sistema del complemento in sieri incubati con nanoparticelle rivestite di chitosano suggerisce possibili effetti collaterali significativi (Bertholon et al. 2006).

Più promettente, e attualmente in trial clinico in pazienti con tumori solidi, è l'utilizzo di nanoparticelle costituite da un polimero derivato dalla ciclodestrina, da un ligando per la transferrina umana sulla parte esterna delle nanoparticelle, da un polimero idrofilo (PEG) e da siRNA (Davis et al. 2010).

In conclusione, questo lavoro apre nuove prospettive sull'impiego di vettori sintetici non virali per terapie che prevedono la somministrazione sistemica di molecole a RNA. L'assenza di immunogenicità consente trattamenti ripetuti, inoltre la diffusione capillare attraverso i sistemi venoso e linfatico permette il raggiungimento di organi e tessuti normalmente poco accessibili. L'effetto

protettivo e la cinetica di rilascio controllato che il vettore esercita sulla molecola terapeutica ne aumenta la biodisponibilità e quindi l'efficacia anche a bassi dosaggi.

FIGURE

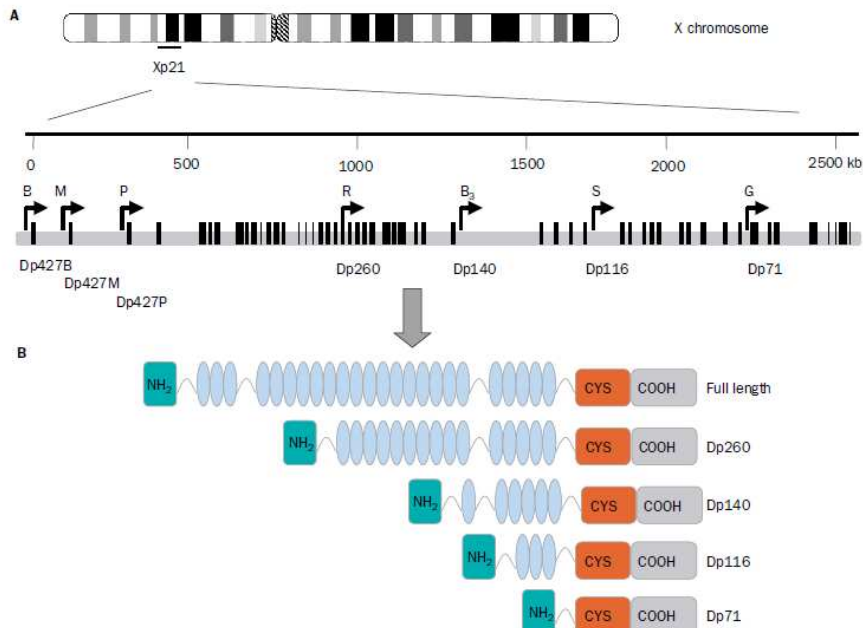


Figura 1: Il gene distrofina e le isoforme proteiche: **A)** Organizzazione genomica del gene distrofina, localizzato sul braccio corto del cromosoma X, in posizione p21.1. I blocchi neri rappresentano i 79 esoni; le frecce nere indicano i 3 promotori (B, brain; M, muscle; P, Purkinje) al 5' del gene che guidano l'espressione delle isoforme proteiche full-length (Dp427B, Dp427M e Dp427P), e i 4 promotori (R, retinal; B₃, brain specific; S, Schwann cells; G, general) che guidano l'espressione delle isoforme corte (Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71); **B)** Composizione delle

isoforme proteiche della distrofina: il dominio amino-terminale (NH₂) è seguito dal dominio spectrin-like, dal dominio ricco in cisteine (CYS) e dal dominio carbossi-terminale (COOH).

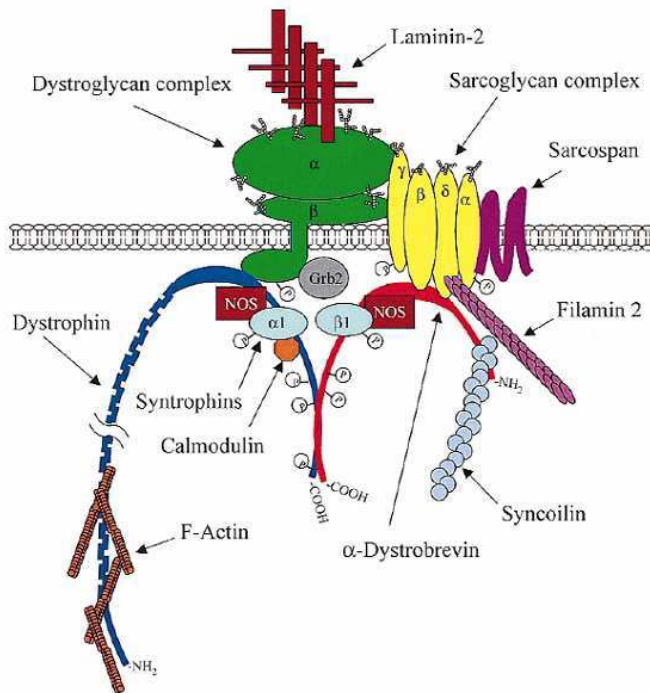


Figura 2: Il complesso “Dystrophin-Glycoprotein Complex (DGC)”.

Nell'immagine sono rappresentati tutti i componenti del DGC: la distrofina (blu) si lega mediante l'estremità amino-terminale e una parte del dominio spectrin-like alla F-actina citoplasmatica, e mediante i domini ricco in cisteina e carbossi-terminale, alla sintrofina, calmodulina e distrobrevina citoplasmatiche, e al β-distroglicano della membrana. Tramite il complesso dei distroglicani la distrofina si lega alla laminina-2 della matrice extracellulare, agendo quindi da ponte meccanico tra il citoscheletro e la lamina basale.

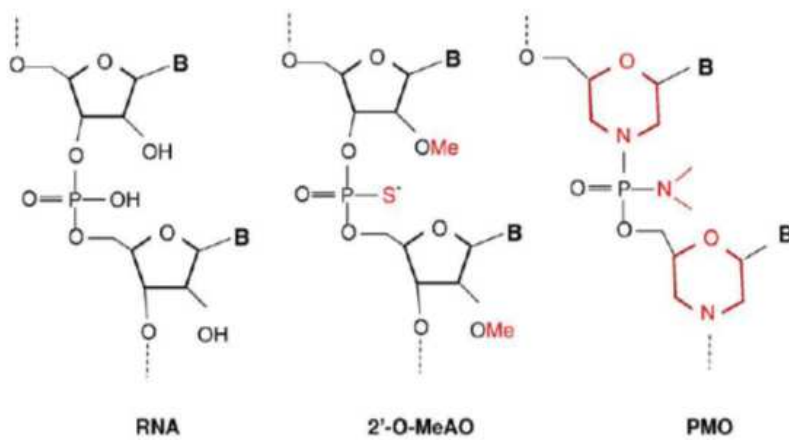


Figura 3: Struttura dell'RNA, degli oligoribonucleotidi antisense a scheletro fosforotioato modificato 2'OMetile (2'OMePS), e dei morfolino fosforodiamidati (PMO). Nei 2'OMePS uno degli ossigeni non a ponte del legame fosfodiesterico è sostituito da un atomo di zolfo (S) e l'ossigeno al 2' del ribosio è sostituito da un gruppo metilico (Me); nei PMO il ribosio è sostituito dal un anello morfolino a 6 atomi e il legame fosfodiesterico è sostituito da un legame fosforodiamidato (in rosso). B, basi: adenina, guanina, uracile, citosina.

AON	Tipo di somministrazione	Dose regimen	AON totale somministrato	Sacrificio (gg/settimane dall'ultimo trattamento)	Ref.
2'OMePS-F127	I.V.	3 settimane (100 mg/Kg/iniez. 1 iniez./sett. 3 iniezioni TOT.)	300 mg/Kg	2 settimane	Lu et al. (2005)
PMO	I.P.	3 settimane (25 mg/Kg/iniez. 1 iniez./gg per 7 gg + 3 iniez./sett. per 2 settimane 13 iniezioni TOT.)	325 mg/Kg	3 settimane	Fletcher et al. (2006)
PMO	I.V.	1 settimana (100 mg/Kg/iniez. 1 iniez./gg 7 iniezioni TOT.)	700 mg/Kg	2 settimane	Alter et al. (2006)
CPP-PMO	I.P.	4 settimane (5 mg/Kg/iniez. 1 iniez./sett. 4 iniezioni TOT.)	20 mg/Kg	3- 23 settimane	Fletcher et al. (2007)
CPP-PMO	I.V.	4 giorni (12 mg/Kg/iniez. 1 iniez./gg 4 iniezioni TOT.)	48 mg/Kg	17 settimane	Jearawiri yapaisarn et al. (2008)
CPP-PMO	I.V.	1 settimana (25 mg/Kg/iniez. 1 iniez./sett. 1 iniezioni TOT.)	25 mg/Kg	3 settimane	Yin et al. (2008)
CPP-PMO	I.V.	3 mesi (30 mg/Kg/iniez. 1 iniez./2 sett. 6 iniezioni TOT.)	180 mg/Kg	2 settimane	Wu et al. (2008)
B-MSP-PMO	I.V.	3 settimane (6 mg/Kg/iniez. 1 iniez./sett. 3 iniezioni TOT.)	18 mg/Kg	3 settimane	Yin et al. (2009)
2'OMePS	S.C.	12 settimane (100 mg/Kg/iniez. 2 iniez./sett. 24 iniezioni TOT.)	2400 mg/Kg	10 giorni	Heemske rk et al. (2009)

PMO	I.V.	4 settimane (5 mg/Kg/iniez. 1 iniez./sett 4 iniezioni TOT.)	20 mg/Kg	4 settimane	Malerba et al. (2009)
2'OMePS e PMO	I.V.	3 settimane (100 mg/Kg/iniez. 3 iniez./sett. 9 iniezioni TOT.)	900 mg/Kg	4 giorni	Heemske rk et al. (2009)
Vivo-PMO	I.V.	8 settimane (6 mg/Kg/iniez. 1 iniez./sett 5 iniezioni TOT.)	30 mg/Kg	2 settimane	Wu et al. (2009)
CPP-PMO	I.V.	5 settimane (12 mg/Kg/iniez. 4 iniez./gg per 4 gg a 2 sett.di intervallo 8 iniezioni TOT.)	96 mg/Kg	1 settimana	Jearawiri yapaisarn et al. (2010)
PMO	I.V.	1 settimana (3000 mg/Kg/iniez. 1 iniez./sett. 1 iniezioni TOT.)	3000 mg/Kg	2 settimane	Wu et al. (2010)
2'OMePS	I.V.	1 settimana (250 mg/Kg/iniez.j 5 iniez./sett. 5 iniezioni TOT.)	1250 mg/Kg	3 giorni	Heemske rk et al. (2010)
B-MSP-PMO	I.V.	12 settimane (6 mg/Kg/iniez. 2 iniez./sett. 24 iniezioni)	144 mg/Kg	1 settimana	Yin et al. (2010)

Tabella 1: Elenco degli articoli pubblicati fino ad oggi sui trattamenti sistemici nel topo mdx con molecole antisense. PMO, AON morfolino; 2'OMePS, AON fosforotioato modificato 2'OMetile; I.V, iniezione intravenosa; I.P, iniezione intraperitoneale; S.C, iniezione sottocutanea: CPP, B-MSP, Vivo, diversi tipi di cell-penetrating peptide.

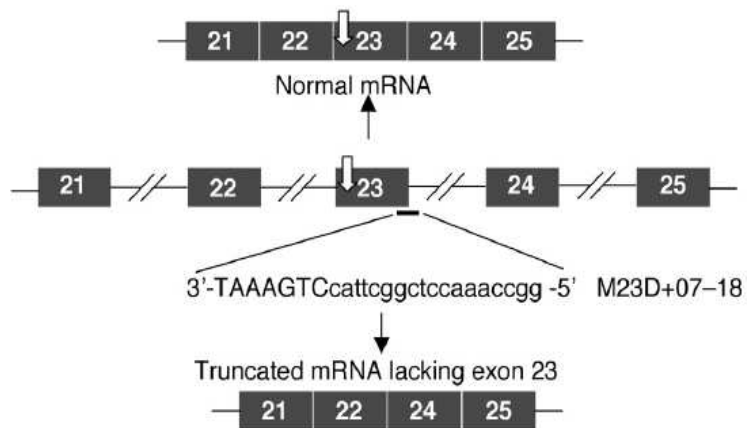


Figura 4: Meccanismo d'azione dell'oligoribonucleotide antisense M23D, nell'induzione dello skipping dell'esone 23 mutato del topo mdx. La freccia bianca indica la posizione della mutazione (C→T, nucleotide 28) nell'esone 23 della distrofina murina; il trattino nero indica la regione di appaiamento dell'M23D, con sequenza (+07-18) 5'-GGCCAAACCUCGGCUUACCUGAAAU-3'. Il legame dell'M23D alla sequenza bersaglio induce l'esclusione dell'esone 23 dal trascritto, come indicato dalla freccia nera nella parte inferiore della figura.

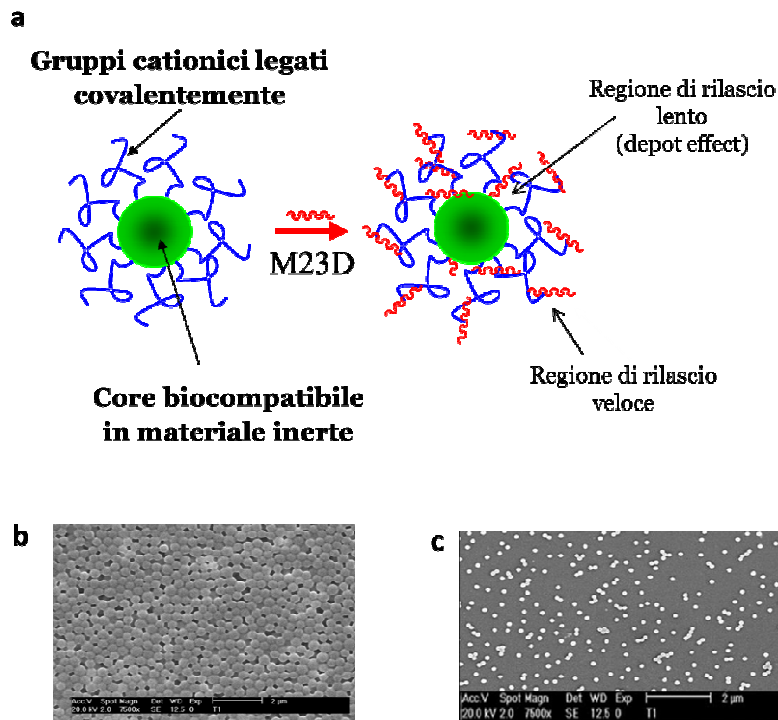


Figura 5: Nanoparticelle “core shell”. **a)** Rappresentazione schematica della struttura delle nanoparticelle T1 e ZM2: il nucleo centrale (core, in verde) è costituito da una matrice di polimetilmetacrilato (T1), o da PMMA e N-isopropilacrilamide (ZM2) a cui sono legati covalentemente dei gruppi ammonici quaternari (cationici) a formare un guscio esterno (shell, in blu) idrofilico. L’AON M23D (in rosso) si lega alla nanoparticella mediante interazioni elettrostatiche tra le cariche negative della molecola a RNA e le cariche positive del guscio; **b)** Immagine delle nanoparticelle T1 al microscopio elettronico a scansione; il diametro medio delle nanoparticelle risulta essere di 417 nm. **c)** Immagine delle nanoparticelle ZM2 al microscopio elettronico a scansione; il diametro medio delle nanoparticelle risulta essere di 120 nm.

	STABILIZZATORE SUPERFICIALE	DENSITA' DI CARICA SUPERFICIALE	DIAMETRO IN SOLUZIONE	Diametro SEM	LOADING 2'OMePS
T1	IDROSSIETIL METACRILATO	155 $\mu\text{mol/g}$	500 nm	417 nm	18 $\mu\text{g/mg}$

Tabella 2: Caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle T1

Gruppo (n° di animali)	Formulazione	N° di iniezioni i.p 1/settimana	1° Sacrificio	2° Sacrificio
1 (n=6)	T1 2,5 mg M23D 45 μg /iniezione (2,7 mg/Kg tot)	3	1 settimana dopo n=4	6 settimane dopo n=2
2 (n=2)	M23D 45 μg /iniezione (2,7 mg/Kg tot)	3	1 settimana dopo n=2	
3 (n=3)	T1-fluo 2,5 mg	3	1 settimana dopo n=1	6 settimane dopo n=2
4 (n=6)	NT	NT	1 settimana dopo n=3	6 settimane dopo n=3

Tabella 3: Schema di trattamento dei topi mdx con le nanoparticelle T1

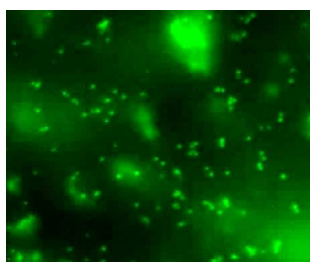


Figura 6: Nanoparticelle T1 fluorescenti (T1-fluo) al microscopio a fluorescenza.

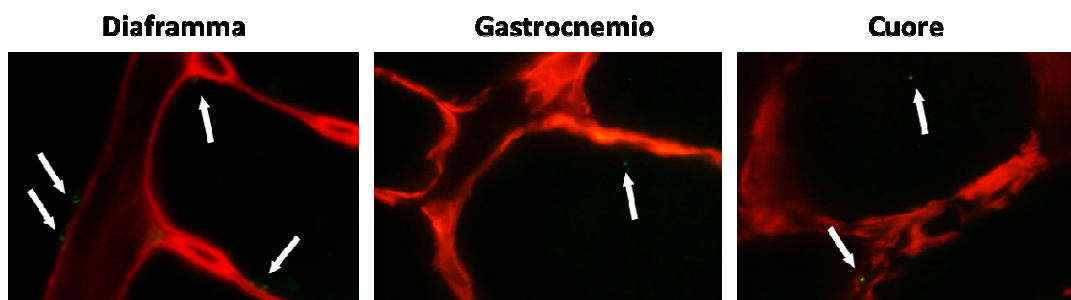


Figura 7: Biodistribuzione delle nanoparticelle T1-fluo al microscopio a fluorescenza nel muscolo scheletrico e cardiaco dei topi mdx. Le sezioni dei tessuti muscolari (diaframma, gastrocnemio e cuore) sono state marcate con un anticorpo anti-nidogeno (in rosso) per evidenziarne la membrana basale. Nanoparticelle monodisperse (verde) sono visibili all'interno del citoplasma e in corrispondenza della membrana basale delle fibre muscolari (freccie).

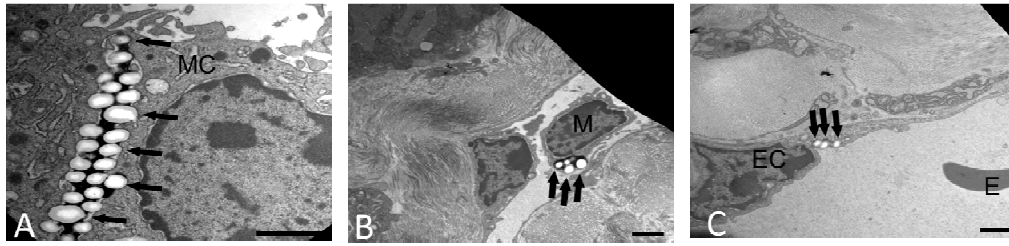


Figura 8: Biodistribuzione delle nanoparticelle T1 al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Sono visibili nanoparticelle a livello del diaframma tra le cellule mesoteliali sul versante peritoneale (A), nel citoplasma di macrofagi nei vasi linfatici (B) e nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni (C) (freccette). MC, cellula mesoteliale; M, macrofago; EC, cellula endoteliale.

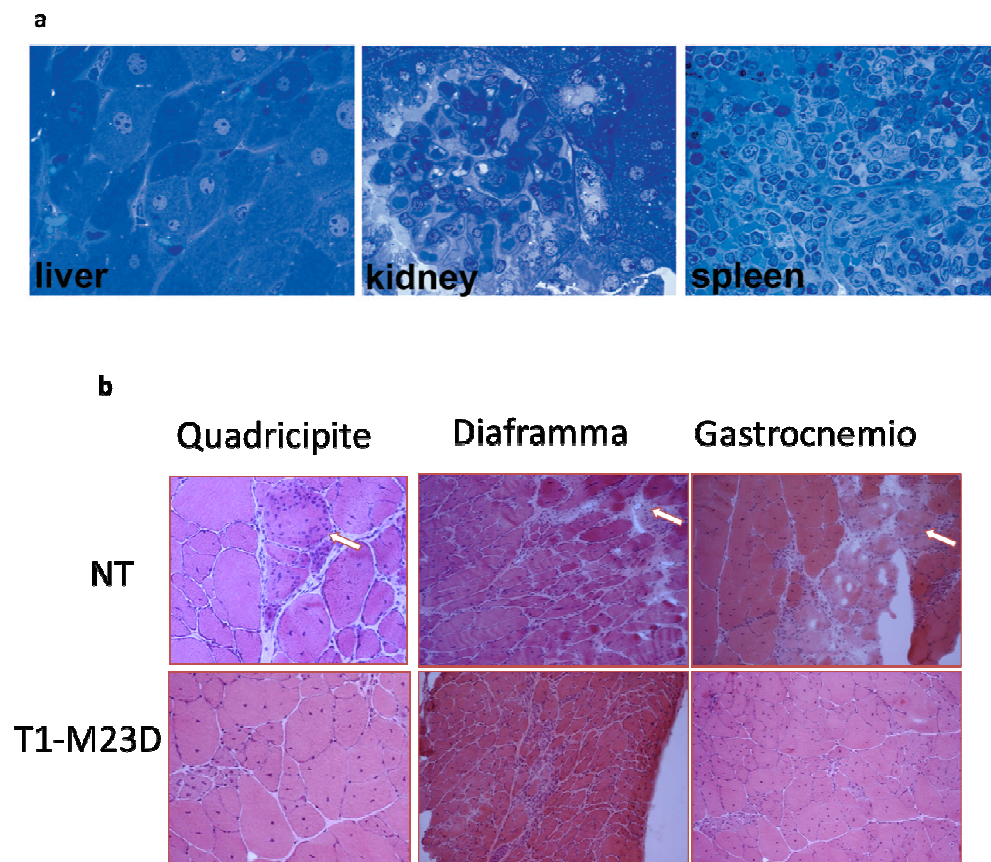
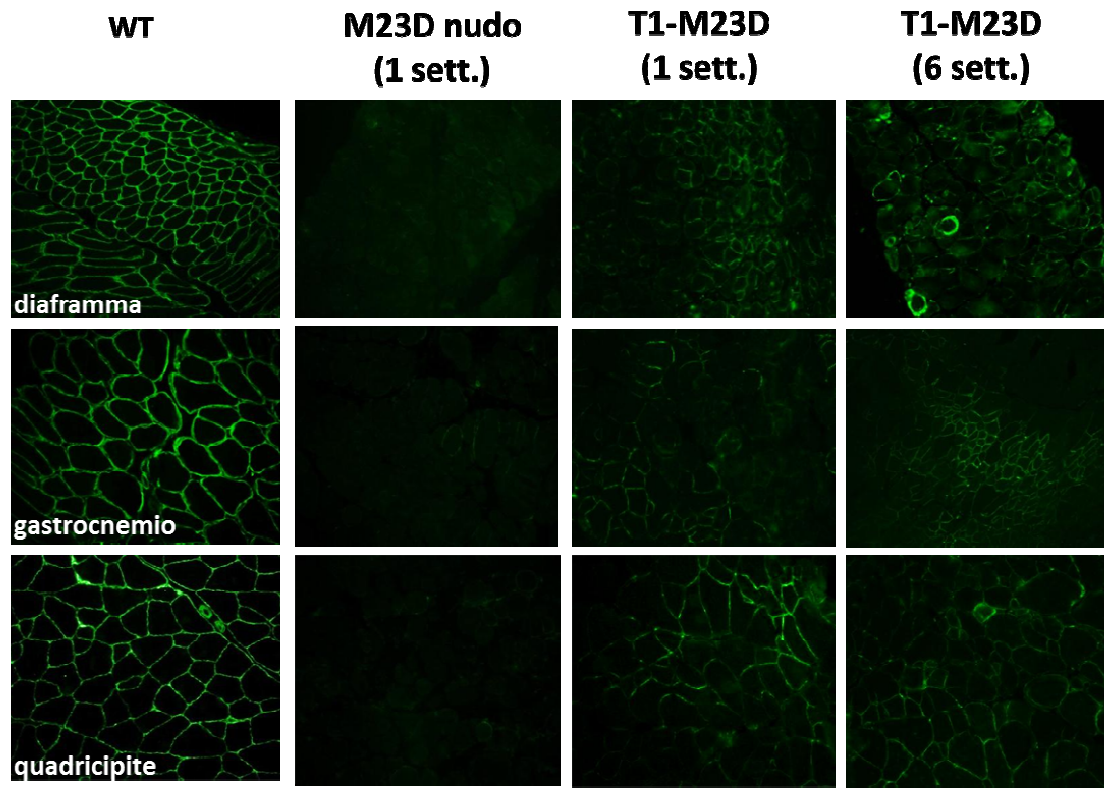


Figura 9: Analisi morfologica di organi e muscoli di topi mdx inoculati i.p. con il complesso T1-M23D. a) fegato, rene e milza: le sezioni marcate con blu di toluidina mostrano assenza di reazioni infiammatorie; b) quadricipite, diaframma e gastrocnemio: le sezioni muscolari marcate con ematossilina-eosina mostrano un miglioramento dell'architettura e una riduzione delle aree di infiammazione/necrosi (frece bianche), rispetto ai topi mdx non trattati (NT).

a



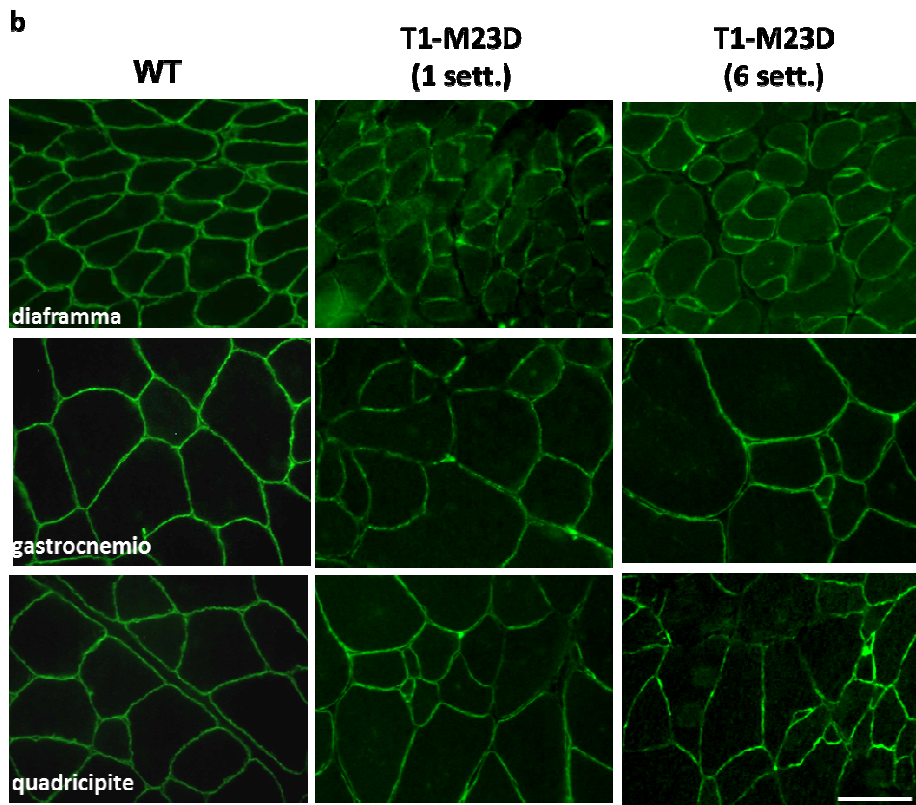


Figura 10: Analisi in immunofluorescenza della distrofina nei muscoli scheletrici dei topi mdx trattati con M23D “nudo” o col complesso T1-M23D.
a) La marcatura delle sezioni con l’anticorpo anti-distrofina-FITC (verde) mostra il ripristino della distrofina, in gruppi di fibre “clusterizzate”, nei muscoli scheletrici (diaframma, gastrocnemio e quadricipite) dei topi trattati con T1-M23D, analizzati sia a 1 che a 6 settimane dalla fine del trattamento (2,7 mg M23D/ Kg in totale); i muscoli scheletrici dei topi trattati con M23D “nudo” risultano negativi; **b)** Ingrandimento che evidenzia come l’intensità della marcatura per la distrofina

(correttamente localizzata) nei muscoli scheletrici dei topi trattati col complesso T1-M23D sia paragonabile a quella del topo wild type (WT).

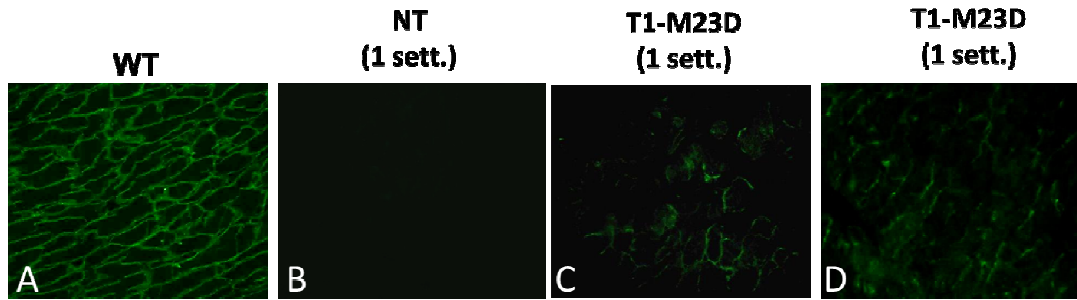


Figura 11: Analisi in immunofluorescenza della distrofina nel cuore dei topi mdx trattati col complesso T1-M23D rispetto ai topi non trattati. Si osserva il ripristino della sintesi di distrofina (verde) in alcune aree nel cuore dei topi mdx trattati con T1-M23D e analizzati a 1 settimana dall'ultimo inoculo (C, D). I topi non trattati risultano negativi (B).

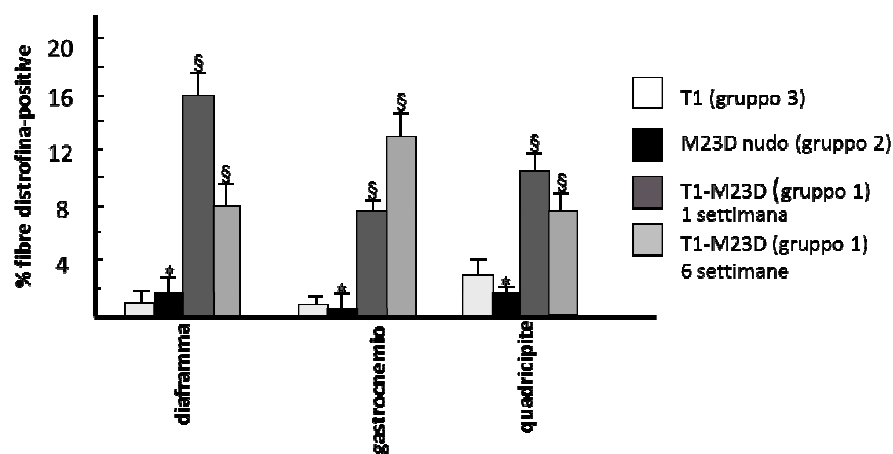


Figura 12: Rappresentazione grafica della conta delle fibre distrofina-positivie nei muscoli scheletrici dei topi mdx trattati con M23D "nudo", con le nanoparticelle T1 da sole o con il complesso T1-M23D. L'analisi statistica mostra un aumento significativo della percentuale di fibre distrofina-positivie nel diaframma, gastrocnemio e quadricipite dei topi trattati con T1-M23D (gruppo 1), rispetto a quelli trattati con M23D "nudo" (gruppo 2) o con le T1 da sole (gruppo 3, vedi tabella 3). I livelli di positività variano tra i diversi muscoli e nei due tempi di analisi (1 e 6 settimane dopo l'ultima somministrazione). Le percentuali indicate nel grafico derivano dalla conta delle fibre distrofina-positivie, rapportata al numero totale di fibre per campo (contate mediante marcatura della laminina α -2, che co-localizza con la distrofina). I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD). §P < 0,005; *P > 0,05.

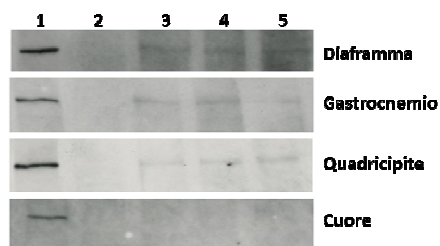


Figura 13: Analisi in Western blot della distrofina espressa nei muscoli scheletrici e nel cuore dei topi mdx trattati con i complessi T1-M23D. La marcatura con l'anticorpo anti-distrofina DYS2 mostra la presenza di una banda specifica nel diaframma, gastrocnemio, e quadricipite dei topi trattati con T1-M23D, e analizzati 1 settimana dopo l'ultimo trattamento (riga 3 e 4) e 6 settimane dopo l'ultimo trattamento (riga 5); i muscoli del topo mdx non trattato risultano negativi (riga 2), così come il cuore dei topi trattati/non trattati. Per i muscoli del topo WT (riga 1), è stato caricato 1/10 della quantità di proteina.

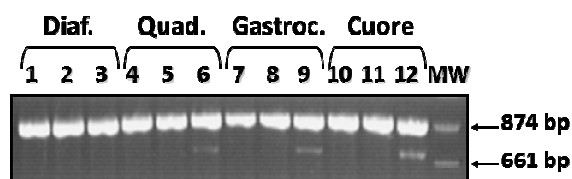


Figura 14: Nested RT-PCR della regione compresa tra gli esoni 21-25 del trascritto distrofina nei muscoli dei topi mdx trattati con M23D "nudo" o con il complesso T1-M23D, analizzati 1 settimana dopo l'ultimo inoculo. In tutti i campioni analizzati è presente il trascritto full-length (874 bp); nel quadricipite (riga 6), gastrocnemio (riga 9) e cuore (riga 12) dei topi trattati con T1-M23D è presente anche il trascritto più corto (661 bp) privo dell'esone 23, che è invece

assente nei topi trattati con M23D “nudo” (righe 2,5,8,11) e non trattati (righe 1,4,7,10). MW, DNA Molecular Weight Marker IX (Roche).

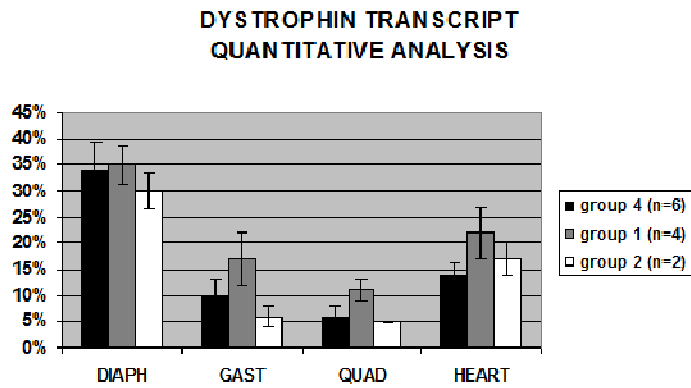


Figura 15: Analisi in Real Time RT-PCR del livello trascrizionale del gene distrofina nei muscoli schetrici e cardiaco dei topi mdx non trattati, trattati con M23D "nudo" o con il complesso T1-M23D. L'espressione del trascritto distrofina è stata calcolata rispetto a quella del topo WT (considerata come il 100%), utilizzando il gene della β -actina come controllo endogeno e gli esoni 7, 22 e 25 del trascritto distrofina come reference. Gli istogrammi rappresentano la media \pm deviazione standard (SD) delle percentuali ottenute in 26 esperimenti.

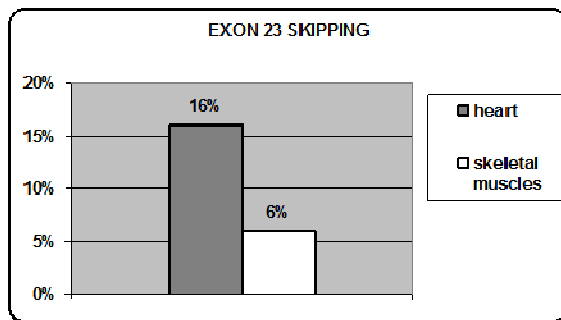


Figura 16: Quantificazione dello skipping dell'esone 23 mediante Real Time RT-PCR nel cuore e nei muscoli scheletrici dei topi mdx trattati con il complesso T1-M23D rispetto ai topi non trattati. La percentuale di skipping è stata calcolata nei muscoli scheletrici gastrocnemio e quadricipite e nel cuore dei topi trattati con T1-M23D e sacrificati 1 settimana dopo l'ultimo inoculo, rispetto ai topi non trattati. Gli istogrammi rappresentano le percentuali di skipping calibrate sull'esone 7 del trascritto distrofina. Nel cuore lo skipping è 16% (colonna grigia), nei muscoli scheletrici 6% (colonna bianca).

	STABILIZZATORE SUPERFICIALE	DENSITA' DI CARICA SUPERFICIALE	DIAMETRO IN SOLUZIONE	Diametro SEM	LOADING 2'OMePS
ZM2	NIPAM (N-isopropilacrilamide)	202 μ moli/g	137 nm	120 nm	90 μ g/mg

Tabella 4: Caratteristiche chimico-fisiche delle nanoparticelle ZM2.

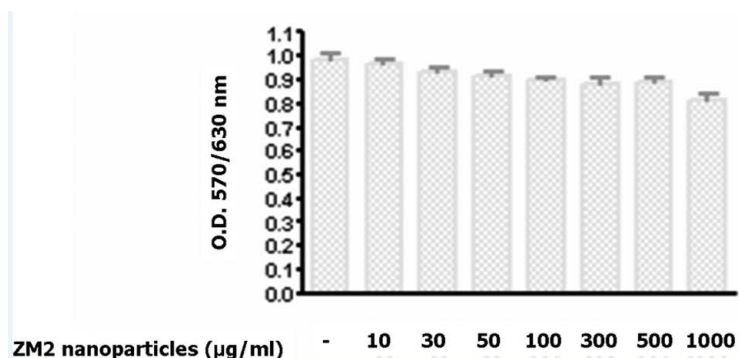


Figura 17: Test di cito-tossicità delle nanoparticelle ZM2 in colture di cellule HeLa. Le cellule sono state trattate per 96 ore con quantità crescenti di nanoparticelle ZM2 (0,01–1mg/ml) e la proliferazione cellulare è stata misurata con il saggio MTT (bromuro di 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). I risultati sono espressi come media (\pm S.D.) di sei valori.

Gruppo (n° di animali)	Formulazione	N° di iniezioni i.p 1/settimana	1° Sacrificio (esperimento 1)	2° Sacrificio (esperimento 2)
I (n=8)	M23D 225 µg/iniezione (52,5 mg/Kg tot)	7	1 settimana dopo N=4	12 settimane dopo N=4
II (n=8)	ZM2 2.5 mg M23D 225 µg/iniezione (52,5 mg/Kg tot)	7	1 settimana dopo N=4	12 settimane dopo N=4
III (n=4)	NT	NT	1 settimana dopo N=4	12 settimane dopo N=4

Tabella 5: Schema di trattamento dei topi mdx con le nanoparticelle ZM2

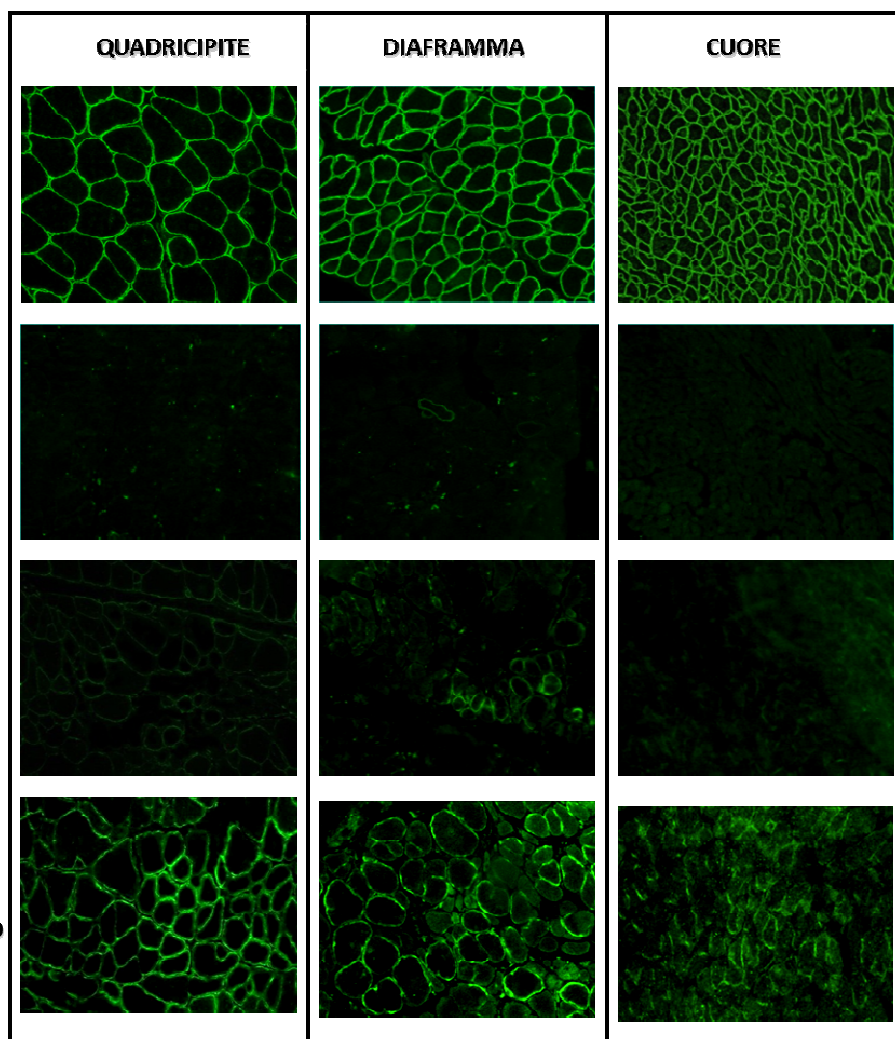


Figura 18: Analisi in immunofluorescenza della distrofina nei muscoli scheletrici e nel cuore dei topi mdx non trattati, trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D (1° sacrificio). La marcatura delle sezioni con

L'anticorpo anti-distrofina-Cy2 mostra il ripristino dell'espressione della distrofina (verde), correttamente localizzata in membrana, nei muscoli scheletrici dei topi trattati con ZM2-M23D (52,5 mg M23D/Kg in totale); alcune fibre distrofina-positivo sono presenti anche nei muscoli scheletrici e nel cuore dei topi trattati con M23D "nudo"; i muscoli dei topi mdx non trattati risultano negativi.

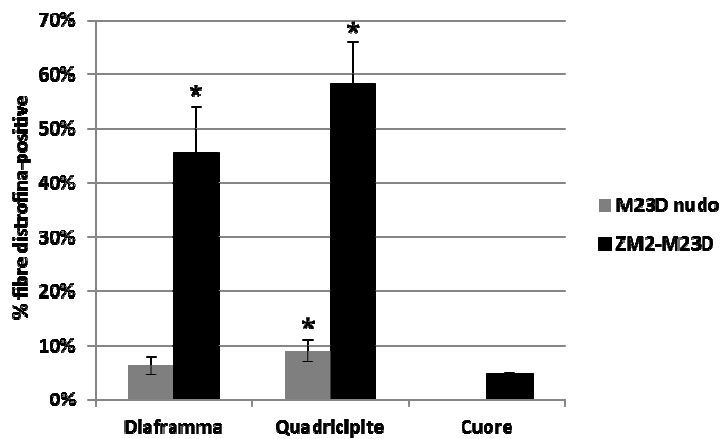


Figura 19: Rappresentazione grafica della conta delle fibre positive alla distrofina nei muscoli dei topi trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D (1° sacrificio). Gli istogrammi rappresentano la media delle percentuali ottenute dalle conte delle fibre distrofina-positivo in campi selezionati (quelli più positivi), rapportata al numero totale di fibre per campo. *, $P < 0,005$.

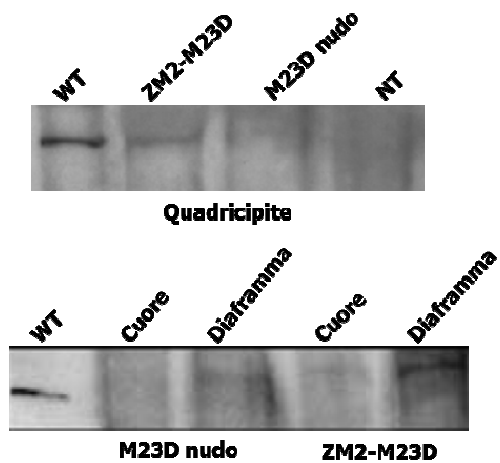


Figura 20: Analisi in Western blot della distrofina nei muscoli scheletrici e nel cuore dei topi mdx trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D (1° sacrificio). La marcatura con l'anticorpo anti-distrofina DYS2 mostra la presenza di una banda specifica nel diaframma, quadricipite e cuore dei topi trattati con ZM2-M23D; anche nel diaframma e quadricipite dei topi trattati con M23D "nudo" è presente una banda, anche se di intensità inferiore. Per i muscoli del topo WT è stato caricato 1/10 della quantità di proteina.

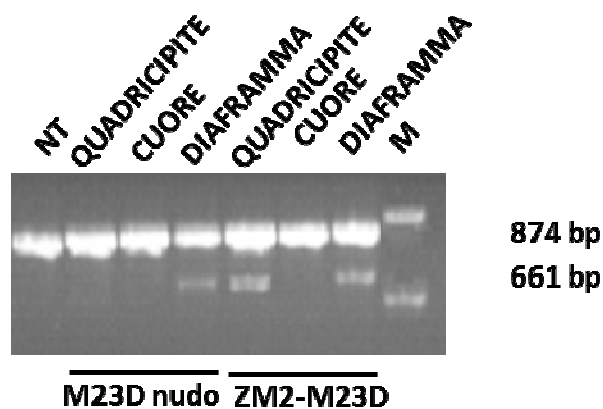


Figura 21: Analisi in Nested RT-PCR della regione compresa tra gli esoni 21-25 del trascritto distrofina nei muscoli dei topi mdx trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D (1° sacrificio). In tutti i campioni analizzati è presente il trascritto full-length (874 bp); nel quadricipite e diaframma dei topi trattati con ZM2-M23D, e nel diaframma degli animali che hanno ricevuto l'M23D "nudo" è presente anche il trascritto più corto (661 bp) che deriva dallo skipping dell'esone 23. M, DNA Molecular Weight Marker IX (Roche).

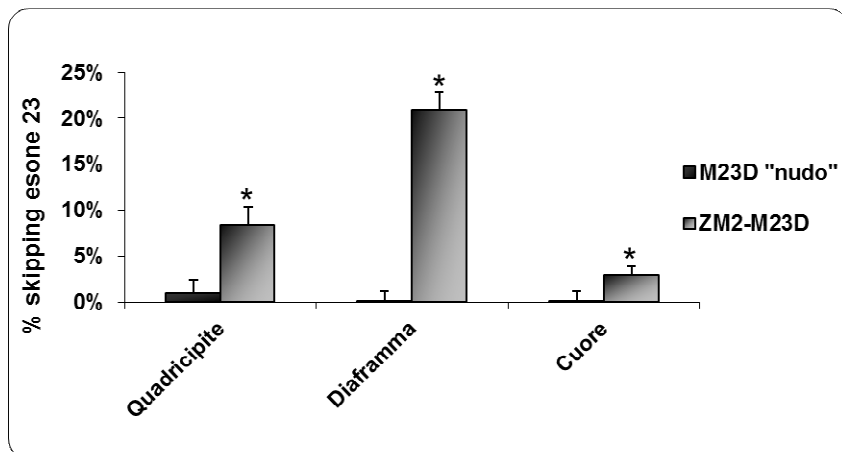


Figura 22: Quantificazione dello skipping dell'esone 23 mediante Real Time RT-PCR nel cuore e nei muscoli scheletrici dei topi mdx trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D rispetto ai topi non trattati (1° sacrificio). Gli istogrammi rappresentano la percentuale di skipping, calibrata sugli esoni 22 e 25 del trascritto distrofina, nel quadricipite, diaframma e cuore dei topi trattati (ZM2-M23D, colonna grigia; M23D "nudo", colonna nera) rispetto ai topi non trattati. *, $P < 0,005$.

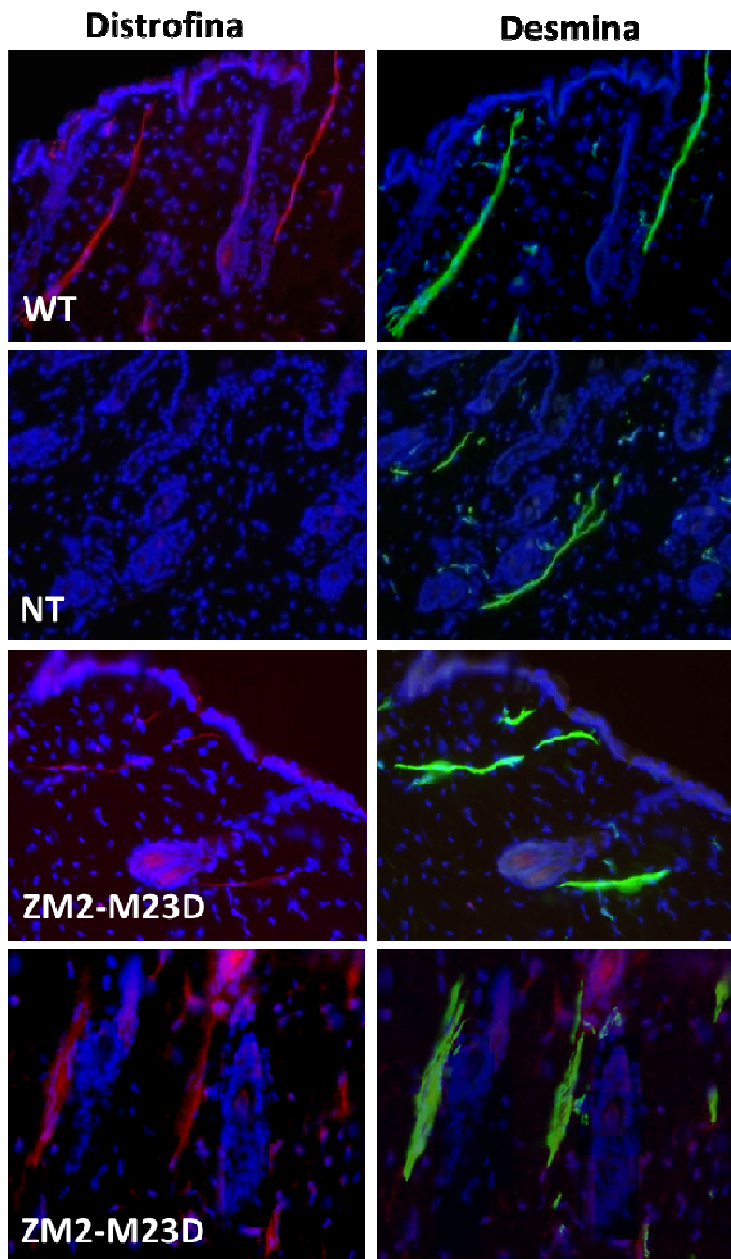
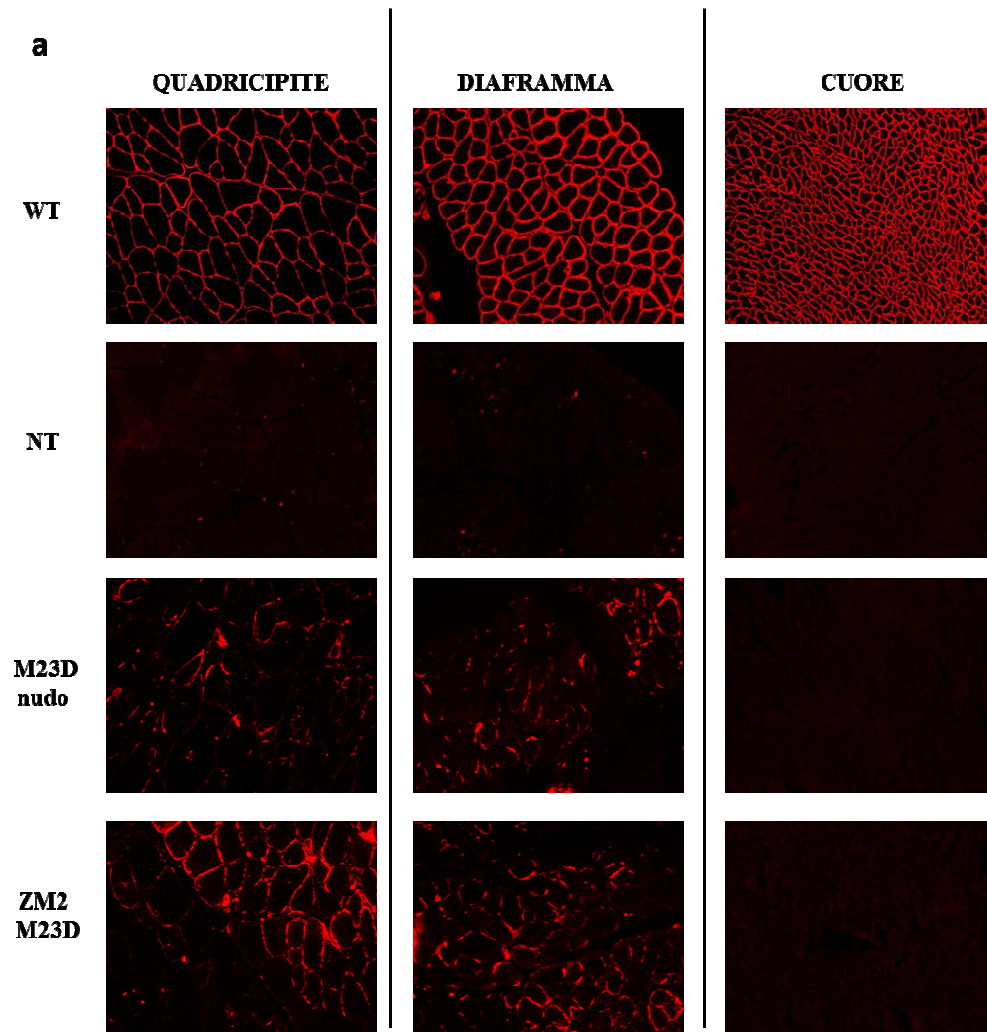


Figura 23: Analisi in immunofluorescenza per la distrofina del muscolo liscio erettore del pelo (“arrector pili”) della cute dei topi WT e dei topi mdx non trattati o trattati con il complesso ZM2-M23D. Le sezioni della cute prelevata dalla regione posteriore del collo del topo WT, dei topi non trattati (NT), e dei topi trattati con ZM2-M23D, sono state marcate con l’anticorpo anti-distrofina-TRITC (rosso) o con l’anticorpo anti-desmina-FITC (verde). La distrofina è chiaramente visibile nell’arrector pili del topo WT, assente nei topi NT e viene ripristinata nei topi trattati; un ingrandimento maggiore mostra la marcatura intensa e omogenea della distrofina (A), che co-localizza con la desmina (B), nell’arrector pili dei topi trattati con ZM2-M23D.



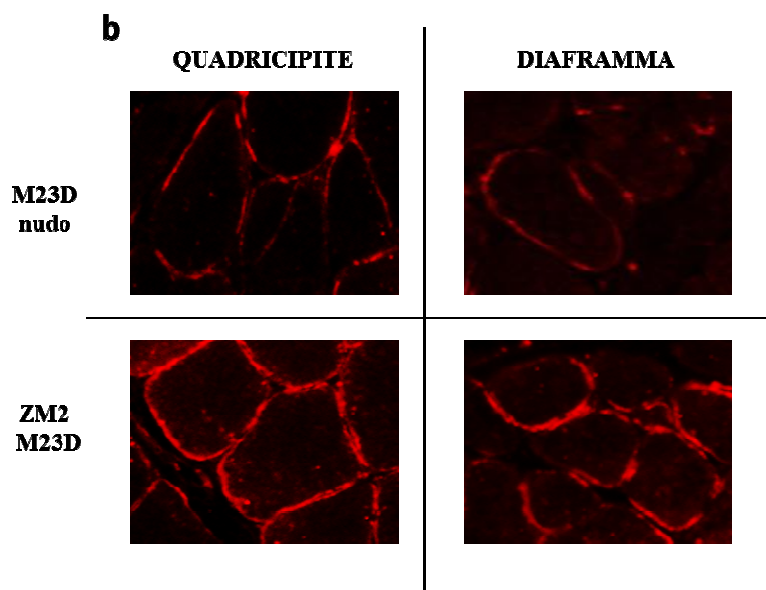


Figura 24: Analisi in immunofluorescenza della distrofina nei muscoli scheletrici e nel cuore dei topi mdx non trattati, trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D (2° sacrificio) a) La marcatura delle sezioni con l'anticorpo anti-distrofina-Cy3 (rosso), mostra il ripristino della proteina, che appare correttamente localizzata in membrana, nel quadricipite e nel diaframma dei topi trattati con ZM2-M23D (52,5 mg M23D/Kg in totale); alcune fibre distrofina-positive sono presenti anche nel quadricipite e nel diaframma dei topi trattati con M23D "nudo", il cuore risulta negativo, così come i muscoli dei topi non trattati (NT). **b)** Ingrandimento che mostra la marcatura più intensa e continua della distrofina nei muscoli scheletrici dei topi trattati con ZM2-M23D, rispetto a quella presente nei topi trattati con M23D "nudo".

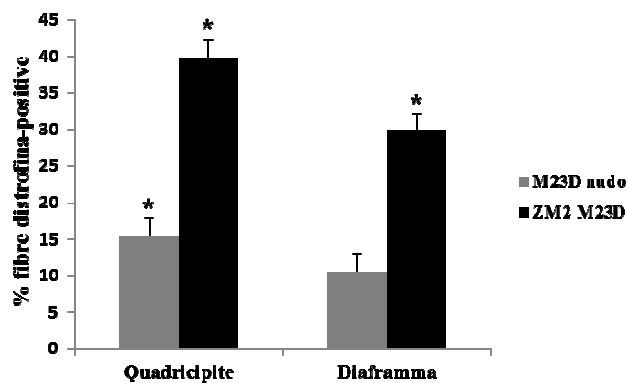


Figura 25: Rappresentazione grafica della conta delle fibre distrofina-positiva nei muscoli scheletrici dei topi mdx trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D rispetto ai topi mdx non trattati (2° sacrificio). Gli istogrammi rappresentano la media delle percentuali di fibre distrofina-positiva nel quadriceps e diaframma dei topi mdx trattati con M23D "nudo" (colonna grigia) e ZM2-M23D (colonna nera). Le percentuali derivano dalle conte delle fibre distrofina-positiva nei campi più positivi, rapportata al numero totale di fibre per campo, contate mediante la marcatura della laminina α -2. *, $P < 0,005$.

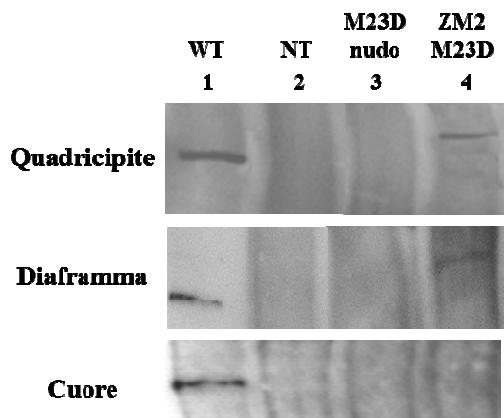


Figura 26: Analisi in Western blot della distrofina nei muscoli scheletrici e nel cuore dei topi mdx non trattati, trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D (2° sacrificio). La marcatura con l'anticorpo anti-distrofina DYS2 mostra la presenza di una banda specifica nel quadricipite e diaframma dei topi trattati con ZM2-M23D (riga 4); nei topi non trattati (NT, riga 2) e in quelli trattati con M23D "nudo" (riga 3) non si evidenzia alcuna banda. Per i muscoli del topo WT (riga 1) è stato caricato 1/10 della quantità di proteina.

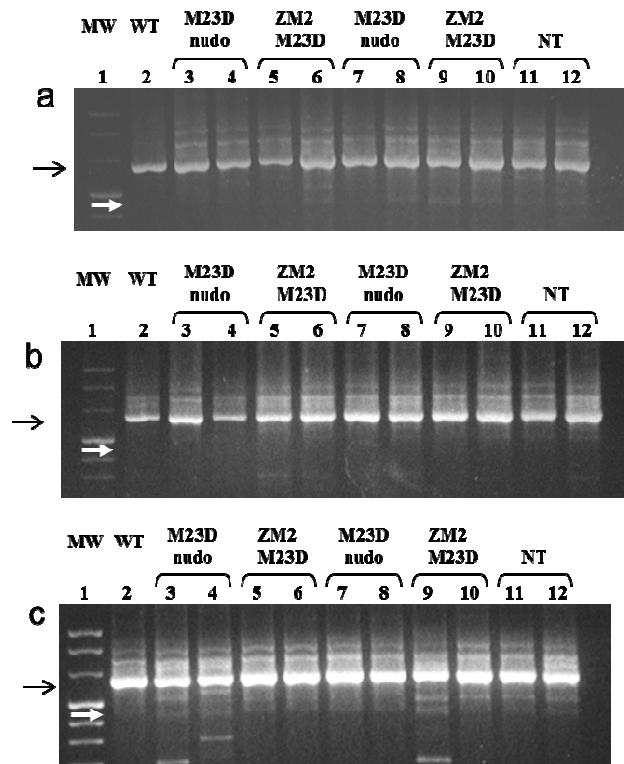


Figura 27: Analisi in Nested RT-PCR della regione compresa tra gli esoni 21-25 del trascritto distrofina nei muscoli dei topi mdx trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D (2° sacrificio). In tutti i campioni analizzati (a, diaframma; b, quadricipite; c, cuore) è presente il trascritto full-length (freccia nera), ma non il prodotto derivato dallo skipping dell'esone 23 (freccia bianca). MW, Molecular Weight Marker IX (Roche).

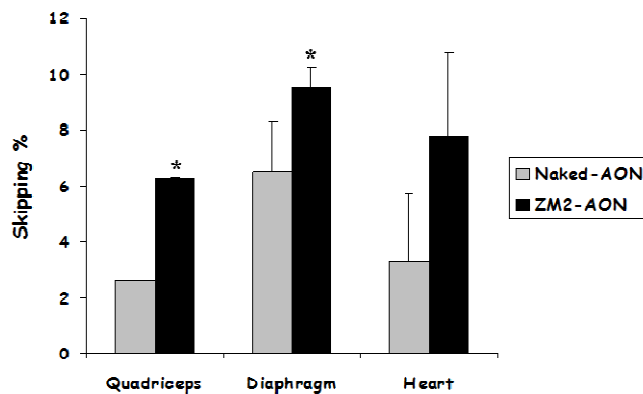


Figura 28: Quantificazione dello skipping dell'esone 23 mediante Real Time RT-PCR nel cuore e nei muscoli scheletrici dei topi mdx trattati con M23D "nudo" o con il complesso ZM2-M23D rispetto ai topi non trattati (2° sacrificio). Gli istogrammi rappresentano la percentuale di skipping, calibrata sugli esoni 8 e 25 del trascritto distrofina, nel quadricipite, diaframma e cuore dei topi trattati con ZM2-M23D (colonna nera) e M23D "nudo" (colonna grigia), rispetto ai topi mdx non trattati. *, $P < 0,005$.

BIBLIOGRAFIA

Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE et al (2003). Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 12: 907–914.

Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE et al (2004). Antisense-induced multiexon skipping for duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 74: 83–92.

Aartsma-Rus A, Winter CL, Janson AAM et al (2005). Functional analysis of 114 exon internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 15: 284–297.

Aartsma-Rus A, Van Deutekom JC, Fokkema IF, Van Ommen GJ, Den Dunnen JT (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34:135-44.

Aartsma-Rus A, Janson AA, van Ommen GJ, van Deutekom JC (2007). Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet* 8: 43.

Aartsma-Rus A, van Ommen GJ (2007). Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* 13:1609-24.

Aartsma-Rus A, Fokkema IF, Verschuuren JJ et al (2009). Theoretic applicability of antisense mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* 30: 293–299.

Aartsma-Rus A, van Ommen GJ (2010). Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur J Hum Genet* 18:146-53.

Ahn AH, Kunkel LM. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 3:283-291.

Alter J, Lou F, Rabinowitz A, Yin H, Rosenfeld J, Wilton SD, et al. (2006). Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 12: 175-7.

Amantana A and Iversen PL (2005). Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Curr. Opin. Pharmacol* 5: 550–555.

Ameen V, Robson LG (2010). Experimental models of duchenne muscular dystrophy: relationship with cardiovascular disease. *Open Cardiovasc Med J*. 4:265-77.

Angelini C, Pegoraro E, Turella E, Intino MT, Pini A, Costa C (1994). Deflazacort in Duchenne dystrophy: study of long-term effect. *Muscle Nerve* 17:386–391.

Angelini C (2007). The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve* 36: 424–35.

Arahata K, Beggs AH, Honda H, et al (1991). Preservation of the C-terminus of dystrophin molecule in the skeletal muscle from Becker muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 101: 148–56.

Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, Guglieri M, Edge G, Main M, Hunt D, Lehovsky J, Straub V, et al. (2010). Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: implication for clinical trials. *Neuromuscul Disord* 20:295-301.

Arikawa-Hirasawa E, Koga R, Tsukahara T, Nonaka I, Mitsudome A, Goto K, et al (1995). A severe muscular dystrophy patient with an internally deleted very short (110 kD) dystrophin: presence of the binding site for dystrophin-associated glycoprotein (DAG) may not be enough for physiological function of dystrophin. *Neuromuscul Disord* 5:429–438.

Beenakker EAC, Fock JM, Van Tol MJ et al (2005). Intermittent prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Arch Neurol* 62:128–132.

Bertholon I, Vauthier C, Labarre D (2006). Complement activation by core-shell poly(isobutylcyanoacrylate)-polysaccharide nanoparticles: influences of surface morphology, length, and type of polysaccharide. *Pharm Res* 23: 1313-23.

Bertoni C, Lau C, Rando TA (2003). Restoration of dystrophin expression in mdx muscle cells by chimeraplast-mediated exon skipping. *Hum Mol Genet* 12:1087–99.

Bies RD, Friedman D, Roberts R, Perryman MB, Caskey CT (1992). Expression and localization of dystrophin in human cardiac Purkinje fibers. *Circulation*; 86: 147–53.

Bies RD, Caskey CT, Fenwick R (1992). An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. *J Clin Invest* 90:666–672.

Biggar WD, Politano L, Harris VA et al (2004). Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord* 14:476–482.

Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 8:1189–92.

Bushby KM, Goodship JA, Nicholson LV, et al (1993). Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 3: 57–64.

Bushby KM (1999). The limb-girdle muscular dystrophies multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet* 8: 1875–82.

Bushby K, Muntoni F, Urtizberea A, Hughes R, Griggs R (2004). Report on the 124th ENMC International Workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. 2–4 April 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 14: 526–34.

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C; DMD Care Considerations Working Group (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 9:77-93.

Caputo A, Brocca-Cofano, E, Castaldello, A, De Michele, R, Altavilla, G, Marchisio, M et al. (2004). Novel biocompatible anionic polymeric microspheres for the delivery of the HIV-1 Tat protein for vaccine application. *Vaccine* 22:2910–2924.

Cartegni L, Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet* 3: 285–298.

Castaldello A, Brocca-Cofano, E, Voltan, R, Triulzi, C, Altavilla, G, Laus, M et al. (2006). DNA prime and protein boost immunization with innovative polymeric cationic core-shell nanoparticles elicits broad immune responses and strongly enhance cellular responses of HIV-1 tat DNA vaccination. *Vaccine* 24:5655–5669.

Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, Townsend D, Faulkner JA (2007). Dystrophin deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J.* 21:2195-204

Chapman VM, Miller DR, Armstrong D, Caskey CT (1989). Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1292-6.

Connolly AM, Keeling RM, Mehta S, Pestronk A, Sanes JR (2001). Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin, dystrophin/utrophin-, and laminin alpha2-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 11:703–12.

Connolly AM, Schierbecker J, Renna R, Florence J (2002). High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12:917–925.

Culligan KG, Mackey AJ, Finn DM, Maguire PB, Ohlendieck K (1998). Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy (review). *Int J Mol Med* 2: 639–48.

Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA et al. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464: 1067-70.

De Angelis FG, Sthandier O, Berarducci B, Toso S, Galluzzi G, Ricci E, et al (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9456–61.

De Clercq E, Eckstein F, Sternbach H, Merigan TC (1969). Interferon induction by and ribonuclease sensitivity of thiophosphate-substituted polyribonucleotides. *Antimicrobial Agents Chemother* 9:187-91.

Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, et al (1997). Utrophin-dystrophin deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:717-27.

de Groot IJ (2006). Guideline on the use of corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy from paediatric neurologists, neurologists and rehabilitation physicians. *Ned Tijdschr Geneesk* 150:684-5.

de Martimprey H, Bertrand JR, Malvy C, Couvreur P, Vauthier C (2010). New core-shell nanoparticles for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma. *Pharm Res* 27: 498-509.

Denti MA, Rosa A, D'Antona G, Sthandier O, De Angelis FG, Nicoletti C, et al (2006). Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3758–63.

de Visser M, Bakker E, Defesche JC, Bolhuis PA, van Ommen GJ (1990). An unusual variant of Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol* 27:578-81.

Dominski Z, Kole R (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8673-7.

Dubowitz V (2000). Muscular Dystrophies. In: Sanders WB (ed) *Muscle disorders in Childhood*, London, pp 34-79.

Dunckley MG, Manoharan M, Villiet P, Eperon IC, Dickson G (1998). Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides. *Hum Mol Genet* 7: 1083-90.

Emery AEH (1993). *Duchenne muscular dystrophy*. Oxford University Press, Oxford.

Emery AE (2002). The muscular dystrophies. *Lancet*. 359:687-95.

England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, et al (1990). Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343:180-2.

Fanin M, Danieli GA, Cadaldini M, Miorin M, Vitiello L, Angelini C (1995). Dystrophin positive fibers in Duchenne dystrophy: origin and correlation to clinical course. *Muscle Nerve* 18:1115-20.

Fanin M, Freda MP, Vitiello L, Danieli GA, Pegoraro E, Angelini C (1996). Duchenne phenotype with in-frame deletion removing major portion of dystrophin rod: threshold effect for deletion size? *Muscle Nerve* 19:1154-1160.

Ferlini A, Sabatelli P, Fabris M, Bassi E, Falzarano S, Vattei G, Perrone D, Gualandi F, Maraldi NM, Merlini L, Sparnacci K, Laus M, Caputo A, Bonaldo P, Braghetta P, Rimessi P (2010). Dystrophin restoration in skeletal, heart and skin arrector pili smooth muscle of mdx mice by ZM2 NP-AON complexes. *Gene Ther.* 17:432-8.

Fletcher S, Honeyman K, Fall AM, Harding PL, Johnsen RD, Wilton SD (2006). Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J Gene Med* 8: 207-16.

Fletcher S, Honeyman K, Fall AM, Harding PL, Johnsen RD, Steinhaus JP, et al. (2007). Morpholino oligomer-mediated exon skipping averts the onset of dystrophic pathology in the mdx mouse. *Mol Ther* 15: 1587-92.

Gailly P, Boland B, Himpens B, Casteels R, Gillis JM (1993). Critical evaluation of cytosolic Ca²⁺ determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice. *Cell Calcium* 14:473–83.

Gaschen L, Lang J, Lin S, Ade-Damilano M, Busato A, Lombard CW, Gaschen FP (1999). Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hypertrophic feline muscular dystrophy. *J Vet Intern Med* 13:346-56.

Gebski BL, Mann CJ, Fletcher S, Wilton SD (2003). Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle. *Hum Mol Genet* 12:1801-11.

Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* 1: 505–10.

Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L, et al (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306: 1796–9.

Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:729–38.

Griggs RC, Moxley RT III, Mendell JR et al (1991). Prednisone in Duchenne dystrophy. *Arch Neurol* 48:383–388

Grounds MD, Torrisi J (2004). Anti-TNF alpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *Faseb J* 18:676-82.

Gurvich OL, Tuohy TM, Howard MT et al (2008). DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype, and potential therapy. *Ann Neurol* 63: 81–89.

Head SI (1993). Membrane potential, resting Ca²⁺ and Ca²⁺ transients in isolated muscle fibres from normal and dystrophic mice. *J Physiol* 469:11–9.

Heemskerk HA, de Winter, CL, de Kimpe, SJ, van Kuik-Romeijn, P, Heuvelmans, N, Platenburg, GJ et al. (2009). In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J Gene Med* 11: 257–266.

Heemskerk H, de Winter CL, van Ommen GJ, van Deutekom JC, Aartsma-Rus A (2009). Development of antisense-mediated exon skipping as a treatment for duchenne muscular dystrophy. *Ann N Y Acad Sci* 1175: 71-9.

Heemskerk H, de Winter C, van Kuik P, Heuvelmans N, Sabatelli P, Rimessi P, et al. (2010). Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense oligonucleotides in the mdx mouse model. *Mol Ther* 18: 1210-7.

Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-28.

Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, et al (1988). Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318:1363-8.

Hoffman EP, Morgan JE, Watkins SC, Partridge TA (1990). Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *J Neurol Sci* 99:9–25.

Hoffman EP (2007). Skipping toward personalized molecular medicine. *N Engl J Med* 357: 2719–2722.

Hopf FW, Turner PR, Steinhardt RA (2007). Calcium misregulation and the pathogenesis of muscular dystrophy. *Subcell Biochem* 45:429–64.

Jearawiriyapaisarn N, Moulton HM, Buckley B, Roberts J, Sazani P, Fucharoen S, et al. (2008). Sustained dystrophin expression induced by peptide-conjugated morpholino oligomers in the muscles of mdx mice. *Mol Ther* 16: 1624-9.

Jearawiriyapaisarn N, Moulton HM, Sazani P, Kole R, Willis MS (2010). Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers. *Cardiovasc Res* 1;85:444-53.

Kim Y, Tewari M, Pajerowski JD, Cai S, Sen S, Williams JH, Sirsi SR, Lutz GJ, Discher DE (2009). Polymersome delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *J Control Release* 134:132-40.

Kinali M, Arechavala-Gomez V, Feng L, Cirak S, Hunt D, Adkin C, et al. (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol* 8: 918-28.

Koenig M, Beggs AH, Moyer M, et al (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*; 45: 498–506.

Khurana TS et al. (1991). Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord* 1, 185–194.

King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, et al (2007). Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 68: 1607–13.

Klein CJ, Coovert DD, Bulman DE, Ray PN, Mendell JR, Burghes AH (1992). Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am J Hum Genet* 50:950–9.

Kreuter J and Speiser PP (1976). New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infect Immun* 13: 204–210.

Kreuter J (1983). Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm Acta Helv* 58: 196–209.

Kurreck J (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270:1628-44.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM (2004). The dystrophin–glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94:1023–31.

Laus M, Sparnacci K, Lelli M, Vannini R, Tondelli L. (2000). Core–shell functional nanospheres for oligonucleotide delivery. II. *J Polym Sci Part A Polym Chem* 38:1110–1117.

Li SD and Huang L (2006). Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther* 13 1313–1319.

Little R and Kohane DS (2008). Polymers for intracellular delivery of nucleic acids. *J Mater Chem* 18:832–841.

Love DR, Flint TJ, Marsden RF, et al (1990). Characterization of deletions in the dystrophin gene giving mild phenotypes. *Am J Med Genet*; 37: 136–42.

Love DR, Flint TJ, Genet SA, Middleton-Price HR, Davies KE (1991). Becker muscular dystrophy patient with a large intragenic dystrophin deletion: implications for functional minigenes and gene therapy. *J Med Genet* 28: 860–64.

Lu QL, Morris GE, Wilton SD, Ly T, Artem'yeva OV, Strong P, et al (2000). Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J Cell Biol* 148:985–96.

Lu QL, Mann CJ, Lou F et al (2003). Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 8: 1009–1014.

Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, Yokota T, Yin H, Alter J, et al. (2005). Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 198-203.

Madden HR, Fletcher S, Davis MR, Wilton SD (2009). Characterization of a complex Duchenne muscular dystrophy-causing dystrophin gene inversion and restoration of the reading frame by induced exon skipping. *Hum Mutat* 30: 22–28.

Malerba A, Thorogood FC, Dickson G, Graham IR (2009). Dosing regimen has a significant impact on the efficiency of morpholino oligomer-induced exon skipping in mdx mice. *Hum Gene Ther* 20: 955-65.

Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, Ly T, Lloyd F, Fletcher S, Morgan JE, Partridge TA, Wilton SD (2001). Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 2 98:42-7.

Mann CJ, Honeyman K, McClorey G, Fletcher S, and Wilton SD. (2002). Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J. Gene Med* 4: 644–654.

Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A (2008). Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 1: CD003725.

Marbini A, Marcello N, Bellanova MF, Guidetti D, Ferrari A, Gemignani F (1995). Dystrophin expression in skin biopsy immunohistochemical. Localisation of striated muscle type dystrophin. *J Neurol Sci* 129: 29–33.

Marbini A, Gemignani F, Bellanova MF, Guidetti D, Ferrari A (1996). Immunohistochemical localization of utrophin and other cytoskeletal proteins in skin smooth muscle in neuromuscular diseases. *J Neurol Sci* 143: 156–160.

Markham LW, Kinnett K, Wong BL, Woodrow Benson D, Cripe LH (2008). Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 18: 365–70.

Matsuo M, Masumura T, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, Nishio H, Koga J, and Nakamura H. (1990). A very small frameshifting deletion within exon 19 of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 170: 963–967.

Matsuo M, Masumura T, Nishio H, Nakajima T, Kitoh Y, Takumi T, Koga J, and Nakamura H. (1991). Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe. *J. Clin. Invest* 87: 2127–2131.

McGeachie JK, Grounds MD, Partridge TA, Morgan JE (1993). Age-related changes in replication of myogenic cells in mdx mice: quantitative autoradiographic studies. *J Neurol Sci* 119:169–79.

Melis MA, Muntoni F, Cau M, Loi D, Puddu A, Boccone L, et al (1998). Novel nonsense mutation (C→A nt 10512) in exon 72 of dystrophin gene leading to exon skipping in a patient with a mild dystrophinopathy. *Hum Mutat (Suppl 1)*: S137–8.

Merlini L, Cicognani A, Malaspina E, Gennari M, Gnudi S, Talim B, Franzoni E (2003). Early prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 27:222-7.

Messina S, Bitto A, Aguenouz M, et al (2006). Nuclear factor kappa-b blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in mdx mice. *Exp Neurol* 198:234–41.

Michalak M, Opas M (1997). Functions of dystrophin and dystrophin associated proteins. *Curr Opin Neurol* 10: 436–42.

Millay DP, Sargent MA, Osinska H, et al (2008). Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med* 14:442–7.

Mirabella M, Galluzzi G, Manfredi G, Bertini E, Ricci E, De Leo R, Tonali P, et al (1998). Giant dystrophin deletion associated with congenital cataract and mild muscular dystrophy. *Neurology* 51:592-5.

Mitrpant C, Fletcher S, Iversen PL, Wilton SD (2009). By-passing the nonsense mutation in the 4 CV mouse model of muscular dystrophy by induced exon skipping. *J GeneMed* 11: 46–56.

Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2:90-5.

Moser H (1984). Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet.* 66:17-40.

Muntoni F, Melis MA, Ganau A, Dubowitz V (1995). Transcription of the dystrophin gene in normal tissues and in skeletal muscle of a family with X linked dilated cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 56: 151–57.

Muntoni F, Fisher I, Morgan JE, Abraham D (2002). Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research. *Neuromuscul Disord* 12(Suppl 1):S162–5.

Muntoni F, Torelli S, Ferlini A (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2:731-40.

Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, Ikeda S (2002). Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS Lett* 520: 18-24.

Nakamura A, Takeda S (2011). Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol* Epub 2011 Jan 5.

Nevo Y, Muntoni F, Sewry C, et al (2003). Large in-frame deletions of the rod-shaped domain of the dystrophin gene resulting in severe phenotype. *Isr Med Assoc J* 5: 94–97.

Nigro G, Comi LI, Limongelli FM, Giugliano MAM, Politano L, Petretta V, Passamano L, Stefanelli S. (1983). Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve* 6:253-262.

Nudel U, Zuk D, Einat P, et al (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337: 76–78.

O’Hagan D, Singh M, Ugozzoli M, Wild C, Barnett S, Chen MC et al. (2001). Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J Virol* 75:9037–9043.

Ohlendieck K et al. (1991). Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* 7, 499–508.

Oster CG, Kim N, Grode L, Barbu-Tudoran L, Schaper AK, Kaufmann SHE et al. (2005). Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethyleneimine as carriers systems for parental DNA vaccination. *J Control Release* 104:359–377.

Patria SY, Alimsardjono H, Nishio H, Takeshima Y, Nakamura H, Matsuo M (1996). A case of Becker muscular dystrophy resulting from the skipping of four contiguous exons (71-74) of the dystrophin gene during mRNA maturation. *Proc Assoc Am Physicians* 108: 308–14.

Perronnet C, Vaillend C (2010). Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol*. Epub 2010 Jun 17.

Petrof BJ (2002). Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil* 81 (11 suppl): S162–74.

Polakoff RJ, Morton AA, Koch KD, Rios CM (1998). The psychosocial and cognitive impact of Duchenne's muscular dystrophy. *Semin Pediatr Neurol* 5:116-23.

Popplewell LC, Trollet G, Dickson IR, Graham (2009). Design of phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) for the induction of exon skipping of the human DMD gene, *Mol. Ther* 17 554–561.

Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, Matsuo M (1996). Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 445–9.

Quinlan JG, Hahn HS, Wong BL, Lorenz JN, Wenisch AS, Levin LS (2004). Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul Disord* 14: 491-6.

Rafael JA, Cox GA, Corrado K, Jung D, Campbell KP, Chamberlain JS (1996). Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure–function correlations. *J Cell Biol*;134:93–102.

Rana TM, Jeang KT (1999). Biochemical and functional interactions between HIV–1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* 365: 175–85.

Rando TA (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24: 1575–94.

Rentschler S, Linn H, Deininger K, Bedford MT, Espanel X, Sudol M (1999). The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* 380:431–442.

Reutenauer J, Dorchies OM, Patthey-Vuadens O, Vuagniaux G, Ruegg UT (2008). Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *Br J Pharmacol* 155:574–84.

Richards CS, Watkins SC, Hoff man EP, et al (1990). Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*; 46: 672–81.

Rimessi P, Sabatelli P, Fabris M, Braghetta P, Bassi E, Spitali P, Vattei G, Tomelleri G, Mari L, Perrone D, Medici A, Neri M, Bovolenta M, Martoni E, Maraldi NM, Gualandi F, Merlini L, Ballestri M, Tondelli L, Sparnacci K, Bonaldo P, Caputo A, Laus M, Ferlini A (2009). Cationic PMMA nanoparticles bind and deliver antisense oligoribonucleotides allowing restoration of dystrophin expression in the mdx mouse. *Mol Ther*. 7:820-7.

Rimessi P, Fabris M, Bovolenta M, Bassi E, Falzarano S, et al. (2010). Antisense modulation of both exonic and intronic splicing motifs induces skipping of a DMD pseudo-exon responsible for x-linked dilated cardiomyopathy. *Hum Gene Ther*. Sep 21:1137-46.

Roberts RG (2001). Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol*; 2: REVIEWS3006.

Rybakova IN, Patel JR, Davies KE, Yurchenco PD, Ervasti JM (2002). Utrophin binds laterally along actin filaments and can couple costameric actin with sarcolemma when overexpressed in dystrophin-deficient muscle. *Mol Biol Cell* 13:1512-21.

Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM (1996). Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol* 6: 25–35.

Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, et al (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden

retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13:115-21.

Simonds AK, Muntoni F, Heather S, Fielding S (1998). Impact of nasal ventilation on survival in hypercapnic Duchenne muscular dystrophy. *Thorax*. 53:949-52.

Sironi M, Bardoni A, Felisari G, et al (2001). Transcriptional activation of the non-muscle, full-length dystrophin isoforms in Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *J Neurol Sci* 186: 51–57.

Sironi M, Cagliani R, Pozzoli U, Bardoni A, Comi GP, Giorda R, et al (2002). The dystrophin gene is alternatively spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett* 517:163–6.

Sirsi SR, Schray RC, Guan X, Lykens NM, Williams JH, Erney ML, et al. (2008). Functionalized PEG-PEI copolymers complexed to exon-skipping oligonucleotides improve dystrophin expression in mdx mice. *Hum Gene Ther* 19: 795-806.

Sproat BS, Lamond AI, Beijer B, Neuner P, Ryder U (1989). Highly efficient chemical synthesis of 2'-O-methyloligoribonucleotides and tetra biotinylated derivatives; novel probes that are resistant to degradation by RNA or DNA specific nucleases. *Nucleic Acids Res* 17:3373-86.

Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, Narusawa M, et al (1991) The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352:536-9.

Stienecker F, Kreuter J and Löwer J (1991). High antibody titres in mice with polymethylmethacrylate nanoparticles as adjuvant for HIV vaccines. *AIDS* 5:431–435.

Stojdl DF and Bell JC (1999). SR protein kinases: The splice of life. *Biochem. Cell Biol* 77: 293–298.

Summerton J and Weller D (1997). Morpholino antisense oligomers: Design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7: 187–195.

Surono A, Takeshima Y, Wibawa T, Ikezawa M, Nonaka I, Matsuo M (1999). Circular dystrophin RNAs consisting of exons that were skipped by alternative splicing. *Hum Mol Genet* 8: 493–500.

Takeshima Y, Nishio H, Sakamoto H, Nakamura H, Matsuo M (1995). Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe. *J Clin Invest* 95: 515–20.

Tamber H, Johansen P, Merkle HP and Gander B (2005). Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57:357–376.

Tanveer N, Sharma MC, Sarkar C, Gulati S, Kalra V, Singh S et al (2009). Diagnostic utility of skin biopsy in dystrophinopathies. *Clin Neurol Neurosurg* 111: 496–502.

Thanh LT, Nguyen Thi M, Hori S, Sewry CA, Dubowitz V, Morris GE (1995). Characterization of genetic deletions in Becker muscular dystrophy using monoclonal antibodies against a deletion-prone region of dystrophin. *Am J Med Genet* 58:177-86.

't Hoen PA, de Meijer EJ, Boer JM, Vossen RH, Turk R, Maatman RG, Davies KE, van Ommen GJ, van Deutekom JC, den Dunnen JT (2008). Generation and

characterization of transgenic mice with the full-length human DMD gene. *J Biol Chem* 283:5899-907.

Tidball JG, Wehling-Henricks M (2004). Evolving therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: targeting downstream events. *Pediatr Res* 56:831–841.

Tiepolo T, Angelin A, Palma E, et al (2009). The cyclophilin inhibitor Debio 025 normalizes mitochondrial function, muscle apoptosis and ultrastructural defects in Col6a1(/) myopathic mice. *Br J Pharmacol* 157:1045–52.

Tinsley JM, Blake DJ, Pearce M, Knight AE, Kendrick-Jones J, Davies KE (1993). Dystrophin and related proteins. *Curr Opin Genet Dev* 3: 484–90.

Tondelli L, Ballestri M, Magnani L, Vivarelli D, Fini A, Cerasi A, Chiarantini L, Sparnacci K, Laus M. (2003). Core–Shell Nanospheres for Oligonucleotide Delivery V: Adsorption/Release Behavior of Stealth Nanospheres *J. Biomat. Sci. Polym Ed* 14:1209–1227.

Torelli S, Ferlini A, Obici L, Sewry C, Muntoni F (1999). Expression, regulation and localisation of dystrophin isoforms in human foetal skeletal and cardiac muscle. *Neuromuscul Disord.* 9: 541–51.

van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 357:2677-86.

Vivès E, Brodin P, Lebleu B (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272:16010-7.

Walmsley GL, Arechavala-Gomez V, Fernandez-Fuente M, Burke MM, Nagel N, Holder A, Stanley R, Chandler K, Marks SL, Muntoni F, Shelton GD, Piercy RJ (2010). A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping. *PLoS One* 5:e8647.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, et al. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447:87-91.

Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG (2006). Muscle damage in mdx (dystrophic) mice. Role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:657–62.

Williams JH, Sirsi SR, Latta DR, Lutz GJ (2006). Induction of dystrophin expression by exon skipping in mdx mice following intramuscular injection of antisense oligonucleotides complexed with PEG-PEI copolymers. *Mol Ther.* Jul 14:88-96.

Williams JH, Schray RC, Sirsi SR, Lutz GJ (2008). Nanopolymers improve delivery of exon skipping oligonucleotides and concomitant dystrophin expression in skeletal muscle of mdx mice. *BMC Biotechnol* 2: 8:35.

Wilton SD and Fletcher S (2005). Antisense oligonucleotides in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Where are we now? *Neuromuscul. Disord* 15: 399–402.

Wilton SD, Fall AM, Harding PL, McClorey G, Coleman C, Fletcher S (2007). Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript. *Mol Ther* 15: 1288–1296.

Wilton SD, Fletcher S (2008). Exon skipping and Duchenne muscular dystrophy: hope, hype and how feasible? *Neurol India* 56: 254–262.

Wissing ER, Millay DP, Vuagniaux G, Molkentin JD (2010). Debio-025 is more effective than prednisone in reducing muscular pathology in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 20:753-60.

Wood MJ, Gait MJ, Yin H (2010). RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain*. 133:957-72.

Wu B, Moulton HM, Iversen PL, Jiang J, Li J, Li J, et al. (2008). Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14814-9.

Wu B, Li Y, Morcos PA, Doran TJ, Lu P, Lu QL (2009). Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Mol Ther* 17: 864-71.

Wu B, Lu P, Benrashid E, Malik S, Ashar J, Doran TJ, et al. (2010). Dose-dependent restoration of dystrophin expression in cardiac muscle of dystrophic mice by systemically delivered morpholino. *Gene Ther* 17: 132-40.

Yaffe D, Makover A, Lederfein D, et al (1992). Multiple products of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Symp Soc Exp Biol* 46: 179–88.

Yazaki M, Yoshida K, Nakamura A, Koyama J, Nanba T, Ohori N, Ikeda S (1999). Clinical characteristics of aged Becker muscular dystrophy patients with onset after 30 years. *Eur Neurol* 42:145-9.

Yin H, Moulton HM, Seow Y, Boyd C, Boutilier J, Iverson P, et al. (2008). Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. *Hum Mol Genet* 17: 3909-18.

Yin H, Moulton HM, Betts C, Seow Y, Boutilier J, Iverson PL, et al. (2009). A fusion peptide directs enhanced systemic dystrophin exon skipping and functional restoration in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet* 18: 4405-14.

Yin H, Moulton HM, Betts C, Merritt T, Seow Y, Ashraf S, Wang Q, Boutilier J, Wood MJ (2010). Functional rescue of dystrophin-deficient mdx mice by a chimeric peptide-PMO. *Mol Ther* 18:1822-9.

Yuasa K, Yoshimura M, Urasawa N et al (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Therapy* 14: 1249–1260.

Yugeta N, Urasawa N, Fujii Y, Yoshimura M, Yuasa K, Wada MR, Nakura M, et al. (2006). Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies. *BMC Cardiovasc Disord* Dec 4;6:47.

Zaiss AK, Muruve DA (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Therapy* 15: 808–816.

Zhang W, ten Hove M, Schneider JE, Stuckey DJ, Sebag-Montefiore L, Bia BL, Radda GK, Davies KE, Neubauer S and Clarke K (2008). Abnormal cardiac

morphology, function and energy metabolism in the dystrophic mdx mouse: an MRI and MRS study. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 45, 754–760.