

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

**CORSO DI LAUREA IN FARMACIA**

TESI DI LAUREA

Terapie innovative per il trattamento della distrofia  
muscolare di Duchenne

RELATRICE: Prof.ssa Cristina Mammucari

LAUREANDA: Martina Giacomoni

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



# Indice

1	RIASSUNTO.....	1
2	LE DISTROFINOPATIE.....	2
2.1	Distrofia muscolare di Duchenne.....	2
2.1.1	Eziologia.....	2
2.1.2	Patogenesi.....	4
2.1.3	Aspetti clinici (prognosi, diagnosi, sintomi).....	6
2.2	Distrofia muscolare di Becker.....	8
3	TERAPIE FARMACOLOGICHE.....	9
3.1	Terapie Sintomatiche.....	10
3.1.1	Antinfiammatori.....	10
3.1.2	Vasodilatatori.....	12
3.1.3	Trattamenti mirati all'omeostasi del calcio e funzione mitocondriale; antiossidanti.....	12
3.1.4	Sovra regolazione della follistatina (Inibizione della miostatina).....	13
3.1.5	Trattamenti antifibrotici.....	13
3.2	Ripristino funzionalità distrofina.....	14
3.2.1	Terapia genica.....	14
3.2.2	Stop Codon Readthrough.....	17
3.2.3	Sovraespressione di proteine surrogate della distrofina e Terapie Cellulari.....	19
4	L'EXON SKIPPING E GLI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO (ASOs).....	21
4.1	Exon Skipping.....	21
4.2	Oligonucleotidi antisenso (ASOs).....	23
4.2.1	Descrizione.....	23
4.2.2	Farmacodinamica.....	25
4.2.3	Farmacocinetica.....	25
4.2.4	Tossicità.....	28
4.3	Farmaci approvati dalla <i>Food and Drug Administration</i> (FDA).....	30
4.3.1	Amondys 45 (casimersen).....	30
4.3.2	Viltepso (viltolarsen).....	31
4.3.3	Exondys 51 (eteplirsen).....	34
4.3.4	Vyondys 53 (golodirsen).....	37
5	CONCLUSIONE.....	40
6	BIBLIOGRAFIA.....	43



# 1 RIASSUNTO

La distrofia muscolare di Duchenne è la più comune e grave tra le distrofie muscolari. Si tratta di una patologia neuromuscolare genetica ereditaria, recessiva, legata a cromosoma X, di carattere degenerativo: fin dai 3 anni di età i pazienti maschi presentano debolezza muscolare e difficoltà nella deambulazione che si aggravano fino all'uso della sedia a rotelle attorno ai 10-12 anni di età. La patologia ha un esito letale che si presenta attorno ai 30-40 anni per scompenso cardiaco o respiratorio. La causa è una mutazione a livello del gene codificante la distrofina, proteina fondamentale per il funzionamento del muscolo in quanto ponte tra il citoscheletro della fibra muscolare e la matrice extracellulare. L'instabilità della distrofina porta ad un continuo processo di danno, infiammazione e rigenerazione tissutale che col progredire della patologia viene ad essere sostituito da tessuto fibrotico non funzionale. Lo scopo di questa tesi è l'approfondimento delle più recenti terapie farmacologiche per questa patologia. L'approccio terapeutico standard fino a poco tempo fa, infatti, aveva come fondamento la somministrazione di glucocorticoidi in grado di rallentare il progredire della patologia. Recentemente è stato introdotto un nuovo corticosteroide, vamorolone che presenta minori effetti collaterali rispetto agli *standards of care* prednisone e deflazacort. Altri approcci sintomatici testati a livello di trial clinico sono la sovra regolazione della follistatina, la regolazione dell'omeostasi del calcio e della funzione mitocondriale, oltre a trattamenti antifibrotici; tutte queste terapie mirano al rallentamento della progressione della patologia, ma non alla guarigione. Solo più recentemente è stato introdotto un valido approccio terapeutico di ripristino della distrofina, l'*exon skipping*, con quattro farmaci approvati dall'FDA, ma non dall'EMA a causa della loro non conformità alle linee guida europee. Questi sono Amondys 45 (casimersen), Viltepso (viltolarsen), Exondys 51 (eteplirsen), Vyondys 53 (golodirsen), tutti oligonucleotidi antisense (ASOs) del sottogruppo dei morfolino oligomeri fosforodiamidati (PMOs). In Europa un nuovo farmaco approvato è Translarna (ataluren) una molecola che agisce tramite meccanismo *stop codon readthrough*. Altre terapie per il ripristino della distrofia sono in fase di studio in vari trial clinici, tra queste troviamo in prima linea la terapia genica tramite virus adeno-associati AAV che sembra la più promettente malgrado gli effetti collaterali persistenti, e l'editing genomico tramite CRISP-Cas9.

## 2 LE DISTROFINOPATIE

### 2.1 Distrofia muscolare di Duchenne

#### 2.1.1 Eziologia

La distrofia muscolare di Duchenne è una patologia genetica ereditaria recessiva, progressiva, legata al cromosoma X (Xp21) che va a causare debolezza, dolori e atrofia muscolare, limitando i movimenti in un primo periodo, fino a portare a morte prematura per scompenso respiratorio o cardiaco. Colpisce 1 su 3500 a 6000 maschi nati vivi. Le femmine sono portatrici sane solitamente asintomatiche, ma in alcuni casi possono presentare problematiche a livello del muscolo scheletrico e sviluppare cardiomiopatie tardive. Molto raramente, meno di un caso su un milione, la patologia può manifestarsi completamente anche nelle femmine, questo è comunque limitato a tre casistiche: in presenza della sindrome di Turner, una condizione in cui è assente parzialmente o totalmente un cromosoma X dove se il rimanente presenta mutazioni DMD si avrà un fenotipo patologico, in presenza di traslocazione reciproca tra il cromosoma X ed un autosoma ed infine in caso di inattivazioni non random del cromosoma X sano, dove alcune cellule presenteranno distrofina mentre altre no, risultando in fenotipi di gravità variabile; questo fenomeno prende il nome di mosaicismo (Duan, et al., 2021).

La causa della distrofia muscolare di Duchenne è una mutazione a livello del gene codificante la distrofina, proteina essenziale per il corretto funzionamento dei muscoli; senza di essa, infatti, le fibre muscolari vanno incontro a degenerazione dovuta principalmente a una maggiore sensibilità al danno causato dalla attività muscolare di contrazione e rilassamento (Duan, et al., 2021).

La distrofina è una proteina del citoscheletro di 427-kDa che fa parte della famiglia delle  $\beta$ -spettrine/  $\alpha$ -actine. Può essere divisa in quattro domini principali, ovvero il dominio legante l'actina a livello N terminale, il dominio centrale rod, il dominio ricco in cisteina e il dominio C terminale. L'NH<sub>2</sub> terminale va a legarsi direttamente al citoscheletro a livello dell'actina. Il dominio rod è composto da 24 unità ripetitive simili alla spettina, ed è uno dei segmenti più soggetti a mutazioni costituendo gran parte del gene. In questo dominio strutture ad alfa elica superavvolta sono interrotte da quattro regioni cerniera ricche di prolina. L'ultima di queste è seguita dal dominio WW che è coinvolto nel legame a diverse proteine e media l'interazione tra la distrofina e i  $\beta$ -dicroglicani. A seguire, viene il dominio ricco in cisteina che va a legare calcio e che contiene il dominio ZZ, simile alle *zinc finger*, che va a legare la calmodulina in modo calcio dipendente. Il COOH terminale contiene due unità simili al dominio rod, con struttura alfa elica superavvolta **Figura1** (Blake, et al., 2002).

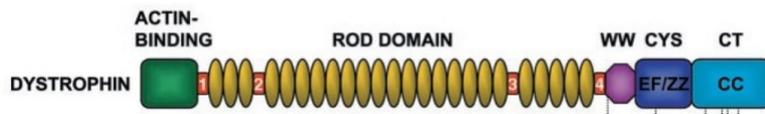


Figura 1 Rappresentazione schematica della distrofina con i principali domini: il dominio legante l'actina all' N terminale, il dominio centrale rod, il dominio ricco in cisteina e il dominio C terminale.

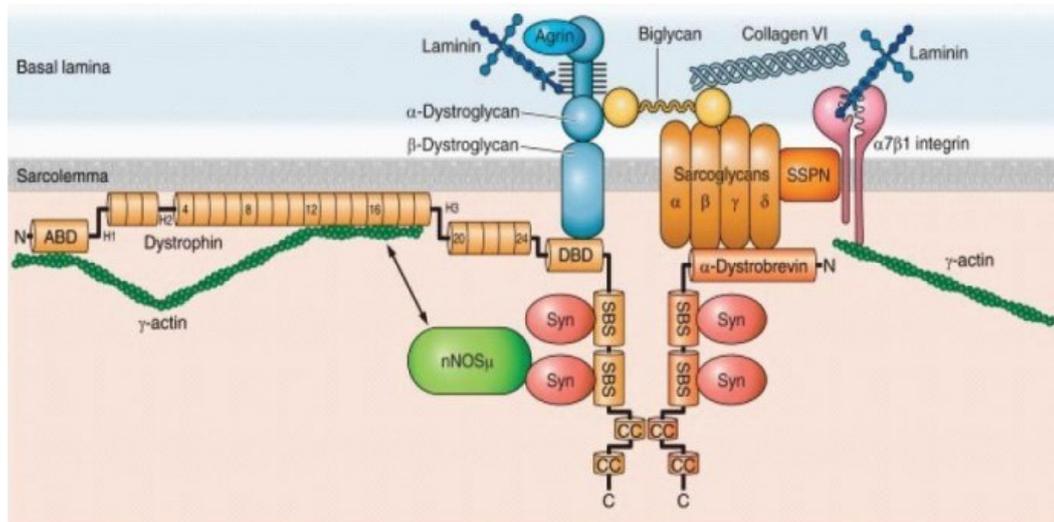


Figura 2 *Dystrophin-associated protein complex (DAPC)* nel muscolo scheletrico. A livello del C terminale la distrofina è associata a diverse proteine che possono essere divise in tre sottogruppi: il subcomplesso dei distroglicani, il subcomplesso sarcoglicani-sarcospani, e il subcomplesso citoplasmatico che include le sintrofine e l' $\alpha$ -distrobrevina (Blake, et al., 2002). La distrofina con *hinge region* (H1,H2,H3) e i domini simili alla spettina; nNOS ossido nitrico sintasi neuronale, Syn sintrofine; SSPN sarcospano; ABD dominio legante l'actina; DBD dominio legante i distroglicani; SBS il sito di legame alla sintrofina; CC il dominio ad alfa elica superavvolta (coiled-coil); (Allen, et al., 2016)

Nel muscolo striato la distrofina interagisce con svariate proteine oltre che al citoscheletro intracellulare e sarcolemma, le quali assieme formano il complesso proteine associate alla distrofina, *dystrophin-associated protein complex* (DAPC) rappresentato in **Figura 2**. A livello del C terminale la distrofina è associata a diverse proteine che possono essere divise in tre sottogruppi: il subcomplesso dei distroglicani ( $\alpha$  e  $\beta$ ), il subcomplesso sarcoglicani-sarcospani composto dai sarcoglicani ( $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ ) e sarcospano, e il subcomplesso citoplasmatico che include le sintrofine e l' $\alpha$ -distrobrevina. A livello extracellulare l' $\alpha$ -distroglicano è legato alla laminina-2 sulla matrice extracellulare e al  $\beta$ -distroglicano nel sarcolemma. Il  $\beta$ -distroglicano è legato a sua volta alla distrofina, completando il ponte tra il citoscheletro a base di actina e la matrice extracellulare. Anche l'ossido nitrico sintasi neuronale fa parte del DAPC (Blake, et al., 2002). La distrofina interagisce con il sarcolemma tramite quattro punti, a livello dei domini spettina-simili, e nei domini ricchi di cisteina **Figura2** (Duan, et al., 2021).

Le mutazioni che causano DMD sono per il 60-70% delezioni, 5-15% duplicazioni e per il 20% delezioni o inserzioni puntiformi. Queste ultime sono più comunemente associate alla distrofia muscolare di Duchenne dove, in conseguenza a mutazioni non senso o frame shift, la proteina

prodotta risulta non funzionale. Le mutazioni colpiscono maggiormente la regione centrale del gene, in particolar modo gli esoni 45-55 per il 47% dei casi e tra gli esoni 3 e 9 per il 7%. La diversa gravità interindividuale è correlata al genotipo della mutazione. Le mutazioni *frame shift*, ovvero delezioni o duplicazioni che coinvolgono un numero di nucleotidi non divisibile per tre o le mutazioni non senso, mutazioni puntiformi che codificano codoni di stop, portano alla produzione di una proteina troncata e quindi non funzionale. Non sempre mutazioni molto estese comportano fenotipi gravi. Come esempio si può prendere il caso di un paziente che aveva una delezione che comprendeva il 46% del gene per la distrofina (dall'esone 17 al 48), ma poiché la mutazione era in frame il fenotipo era quello di una distrofia muscolare di Becker, patologia simile alla Duchenne in cui però la distrofina prodotta è funzionale, dando un esito meno grave. Inoltre, questa mutazione colpiva il dominio rod, che si è quindi supposto funga come uno spaziatore fra i domini ricchi di cisteina e il COOH terminale, cruciali per il funzionamento della proteina (Blake, et al., 2002). Le mutazioni possono anche essere *de novo* a livello germinale, fenomeno che avviene per un terzo dei malati Duchenne. È stato notato che le madri sane (non portatrici) che hanno avuto un figlio con DMD hanno il 14% di rischio di partorire un altro bambino affetto dalla distrofia (Duan, et al., 2021).

### 2.1.2 Patogenesi

La distrofia muscolare di Duchenne si basa sui meccanismi di degenerazione e necrosi. Nel corso degli anni sono state fatte varie ipotesi sull'origine del processo degenerativo tra cui: ischemia a livello delle fibre muscolari, deficit nutrizionali, problemi a livello dei motoneuroni e infine danno a livello del sarcolemma, l'ipotesi più avvalorata, rivelatasi poi corretta. Le conseguenze dell'assenza di distrofina funzionale si manifestano attraverso diversi meccanismi patologici. Il primo e più importante è l'indebolimento del sarcolemma. Il tessuto muscolare è soggetto a continui stimoli contrattili. Nella DMD le fibre sono indebolite dalla mancata stabilizzazione data dal complesso DAPC, con conseguente rottura della membrana cellulare. Solitamente questi danni vengono ad essere riparati velocemente, ma il tasso di danno-rigenerazione in un soggetto Duchenne è sregolato e il danno supera la capacità rigenerativa. Non è un caso se i primi sintomi della patologia si manifestano in concomitanza ai primi sforzi muscolari, sebbene la distrofina sia espressa fin dai primi stadi gestazionali (Duan, et al., 2021).

L'instabilità del complesso DAPC, quindi, induce danno muscolare in quanto la struttura è deputata alla stabilizzazione della membrana plasmatica che, durante il ciclo contrazione-rilassamento, subisce tensioni. Nella distrofia muscolare di Duchenne queste tensioni vanno a creare danno, portando quindi a degenerazione di componenti cellulari dovuta soprattutto all'aumentato influsso di calcio che attiva proteasi e intacca il corretto funzionamento dei

mitocondri. Normalmente questi organelli malfunzionanti vanno ad attivare il processo autofagico limitando il danno, ma anche questo meccanismo nel paziente Duchenne è molto carente. Questa condizione è stata fatta risalire all'attivazione di Akt, un potente inibitore di autofagia, che viene indotto dalla via della fosfatidilinositolo-3-chinasi. Un'autofagia sregolata porta all'accumulo di proteine non funzionali, che porta a sua volta alla degenerazione delle cellule muscolari. Ne consegue una risposta infiammatoria il cui infiltrato nei primi stadi della patologia è composto prevalentemente da cellule T e macrofagi i quali contribuiscono alla necrosi cellulare tramite produzione di NOS. Nelle fasi successive i macrofagi andranno invece ad attivare processi di rigenerazione che nel lungo periodo non riescono più a sopperire il continuo danno e si vanno ad attivare vie alternative, come la sovra regolazione del fattore TGF- $\beta$  che causa il deposito di tessuto connettivo non funzionale e quindi fibrosi (Duan, et al., 2021).

La mancanza di distrofina funzionale rende instabile l'intero complesso DAPC, compresa l'ossido nitrico sintasi che non si ancorerà più al complesso portando una minor produzione di ossido nitrico, con conseguente minor vascolarizzazione e aumento di danno ischemico evidenziato a livello istologico da aree di necrosi raggruppate (Blake, et al., 2001). Un'altra conseguenza è l'accumulo di specie reattive azotate, create dall'attivazione citosolica della nNOS che vanno a dare danno ossidativo assieme ai ROS presenti a causa del malfunzionamento dei mitocondri.

Un ulteriore meccanismo che è stato suggerito oltre alla degenerazione è una possibile causa patologica nella rigenerazione del tessuto muscolare. Le cellule maggiormente imputate a questo processo sono le cellule satellite che nei pazienti DMD hanno livelli basali incrementati. In alcuni studi è stato dimostrato come queste cellule, isolate da un muscolo affetto da DMD, siano state in grado di dare minor repliche *in vitro* rispetto ai controlli. È stato ipotizzato che questo possa essere dovuto all'alto tasso di turnover a cui queste cellule devono sopperire in un muscolo DMD. Non ci sono però evidenze che questo sia dovuto ad un effettivo esaurimento del potenziale miogenico.

Nella distrofia muscolare di Duchenne non è solo l'isoforma di distrofina prodotta a partire dal sito promotore Dp427m ad essere colpita, ma anche altre due isoforme dei promotori Dp427c e Dp427p espresse a livello dei neuroni corticali e nelle cellule di Purkinje: questa è la causa principale dei deficit cognitivi come difficoltà di apprendimento e sbalzi d'umore che spesso accompagnano questa patologia in un terzo dei pazienti (Duan, et al., 2021).

### 2.1.3 Aspetti clinici (prognosi, diagnosi, sintomi)

I pazienti Duchenne presentano i primi sintomi poco dopo all'inizio della deambulazione autonoma, ovvero attorno ai 2-3 anni, questa caratteristica è stata la prima a suggerire che la patogenesi fosse dovuta soprattutto al danno causato dallo sforzo muscolare. Attorno ai 10 anni i pazienti già necessitano di sedia a rotelle, situazione che degenera fino ai 20-40 anni, dove sopraggiunge la morte per scompenso cardiaco o respiratorio. Ad oggi le aspettative di vita media è di 41 anni.

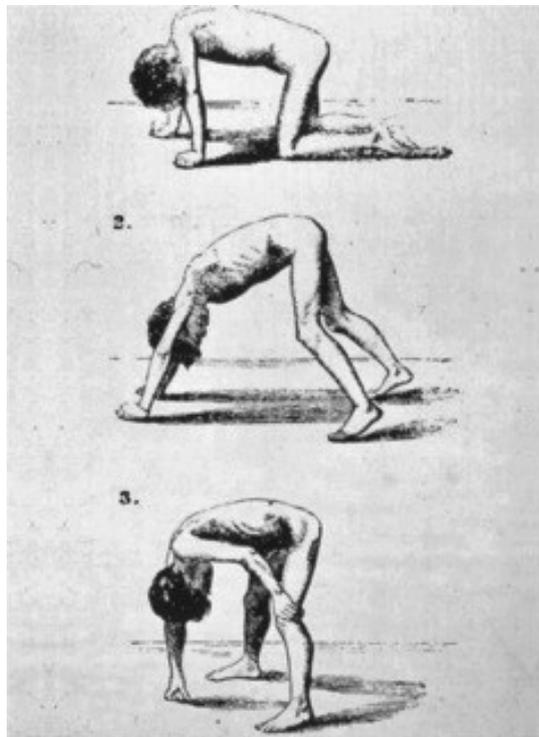
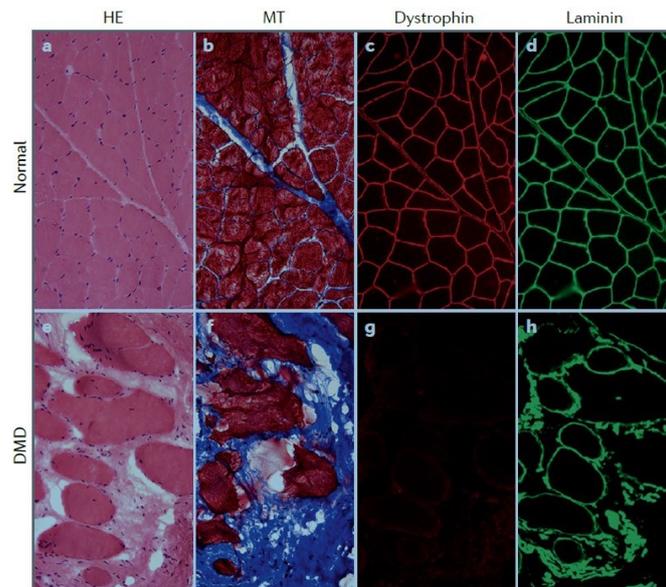


Figura 3 Segno di Gowers (From Gowers WR. A manual of disease of the nervous system. London: Churchill, 1886; 1:391-4).

La distrofia muscolare di Duchenne va ad essere indagata in maschi che, nei primi 2-4 anni di età, dimostrano difficoltà motorie, ipertrofia ai polpacci, debolezza muscolare evidenziata dalla manovra di Gower, una modalità con cui i pazienti si alzano facendo leva sugli arti superiori per compensare la debolezza dei muscoli del bacino e delle gambe **Figura 3**. Un altro fattore che viene preso in considerazione nella diagnosi DMD è il livello della creatina chinasi (CK) plasmatica, che nei pazienti DMD è notevolmente aumentato con valori  $>20000$  U/L. Questo è dovuto alla



**Figura 4** Sezione trasversale di muscolo sano (a-d) e di un paziente Duchenne (e-h). Colorazione con ematossillina eosina; Tale colorazione nel paziente Duchenne (e) evidenzia i nuclei centrali delle miofibrille, l'infiltrato infiammatorio, la variabilità nella dimensione delle miofibrille. (b-f) Colorazione tricromo di Masson, si evidenzia la fibrosi (in blu). (c-g) immunofluorescenza con anticorpi anti-distrofina; la distrofina nel paziente Duchenne (g) risulta assente; (d-h) immunofluorescenza con anticorpi anti-laminina. In (h) si noti l'aumentata variabilità nella dimensione delle miofibrille (Duan, et al., 2021).

degenerazione del tessuto muscolare, ma viene utilizzato anche come parametro nello screening neonatale. Altri valori ematici che accompagnano quello della CK sono l'aspartato transaminasi AST e alanina transaminasi ALT. In presenza di questi segni è cruciale procedere con l'identificazione della mutazione specifica in modo da valutare la terapia più idonea. Inizialmente si va a cercare la presenza e abbondanza dei 79 esoni del gene DMD utilizzando la tecnica di amplificazione legatura-dipendente multipla della sonda (*multiplex ligation-dependent probe amplification* MLPA) come test primario, che permette l'identificazione di delezioni anche puntiformi, duplicazioni, e anomalie nel numero di copie nel genoma, seguito da ulteriori test di conferma. La biopsia muscolare è richiesta solo come ultima risorsa e viene ad essere effettuata quando non vengono trovate mutazioni tramite tecnica MLPA o altre tecniche di sequenziamento. In quest'ultimo caso vengono presi in considerazione la presenza della distrofina in termini di abbondanza e corretto posizionamento utilizzando tecniche come il Western blotting e l'immunofluorescenza. Il tessuto muscolare normalmente presenta delle fibre di grandezza abbastanza variabile ma disposte uniformemente, con più nuclei localizzati in modo periferico. A

livello prenatale i muscoli non presentano particolari evidenze della DMD, mentre già nel neonato, ancor prima che si manifesti la debolezza, si possono notare i primi segni di fibre necrotiche e degenerate (Blake, et al., 2002). Con il progredire della patologia nelle biopsie sono presenti delle fibre rigenerative più piccole in diametro, maggiormente distanziate, il citoplasma ricco in residui basofili di RNA dovuto all'attiva sintesi proteica e nuclei grandi e centrali [Figura 4](#). La capacità rigenerativa del muscolo via via si va a perdere e prevale la generazione di tessuto connettivo fibrotico e di infiltrato adiposo che daranno la caratteristica pseudoipertrofia non funzionale che sarà seguita da atrofia (Blake, et al., 2002).

## **2.2 Distrofia muscolare di Becker**

Nella distrofia muscolare di Becker il fenotipo è meno grave che nella distrofia muscolare di Duchenne, questo è strettamente correlato al genotipo, ovvero la Becker presenta mutazioni *in frame*, che permettono la trascrizione di una distrofina funzionale anche in casi in cui la delezione sia molto più estesa che nella Duchenne (van den Berg, et al., 2014). Oltretutto le delezioni non coinvolgono mai i domini che vanno a legarsi alla matrice extracellulare garantendo una maggior stabilità della proteina che nella Duchenne è assente, risultando quindi danno minore. La BMD è presente in 8 casi su 100000 maschi nati vivi, con mutazioni rappresentate soprattutto da delezioni per il 60-70%, 20% duplicazioni e il restante 5.10% delezioni ed inserzioni puntiformi. L'insorgenza è spesso più tardiva e l'aspettativa di vita è più prolungata della DMD, ovvero 50 anni (Duan, et al., 2021).

### 3 TERAPIE FARMACOLOGICHE

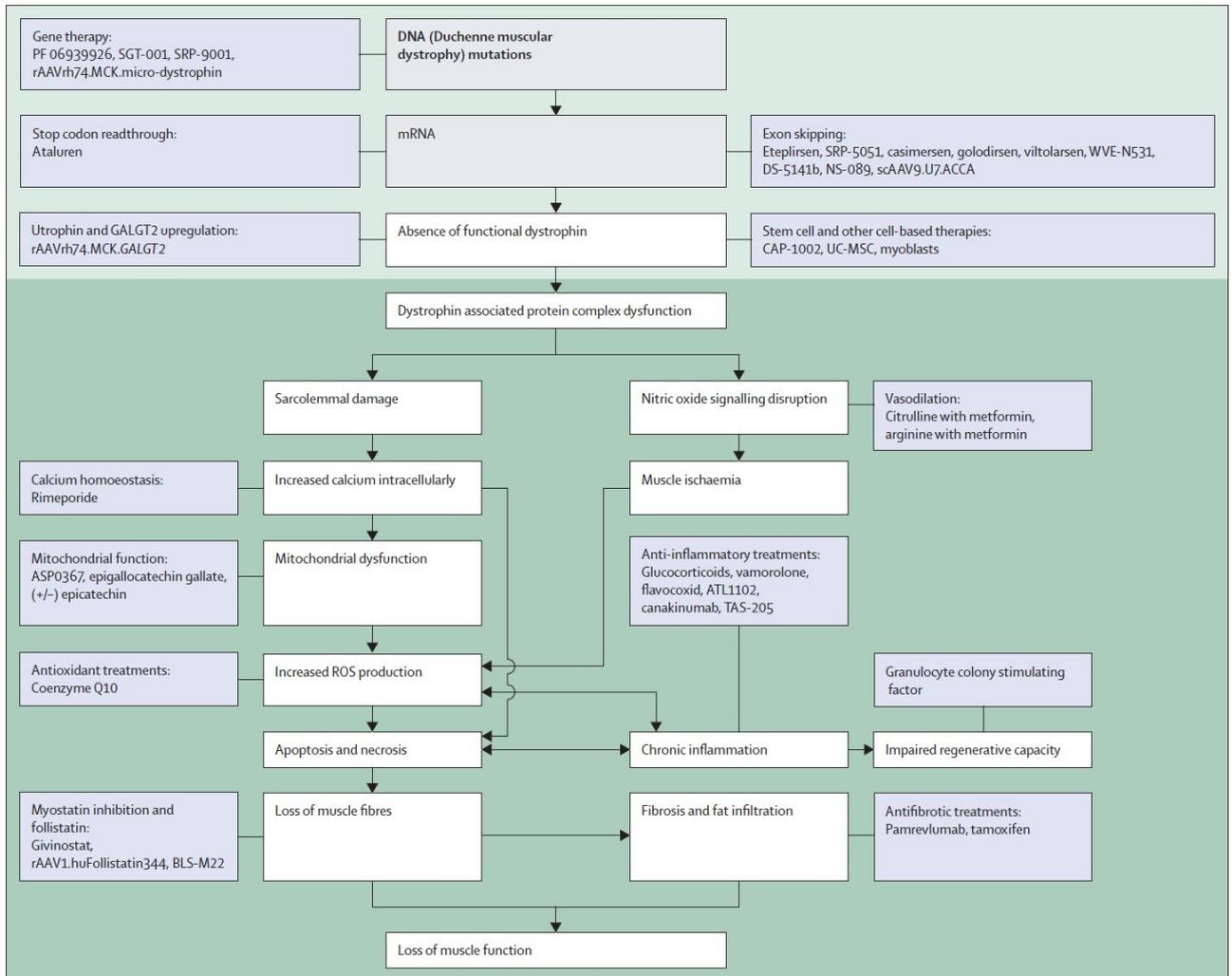


Figura 5 Ci sono due possibili tipi di approccio terapeutico nella DMD: il ripristino di una forma funzionale, o parzialmente funzionale, di distrofina e le terapie sintomatiche. Nel riquadro superiore sono presenti le terapie di ripristino come la terapia genica, lo *stop codon readthrough* e l'*exon skipping* con i loro rispettivi target. Nel riquadro inferiore invece sono riassunte le possibili terapie sintomatiche (Markati, et al., 2022) .

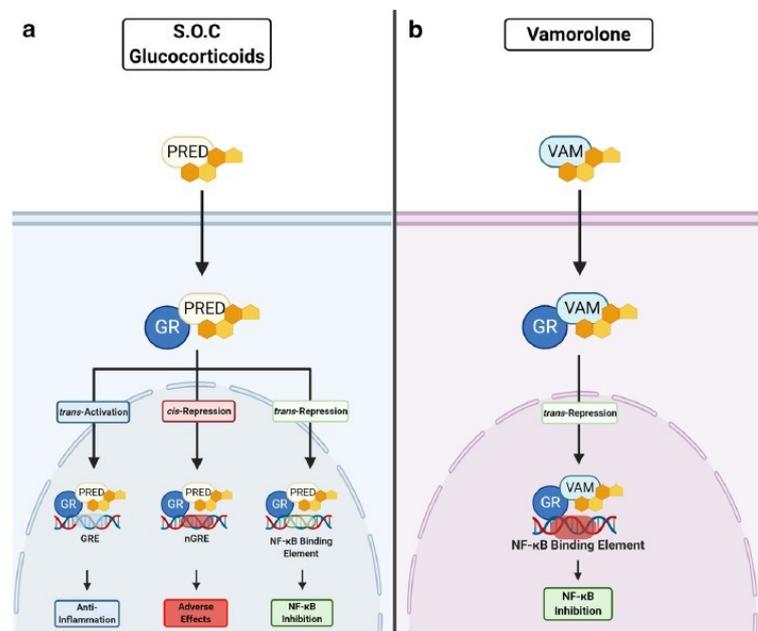
## 3.1 Terapie Sintomatiche

### 3.1.1 Antinfiammatori

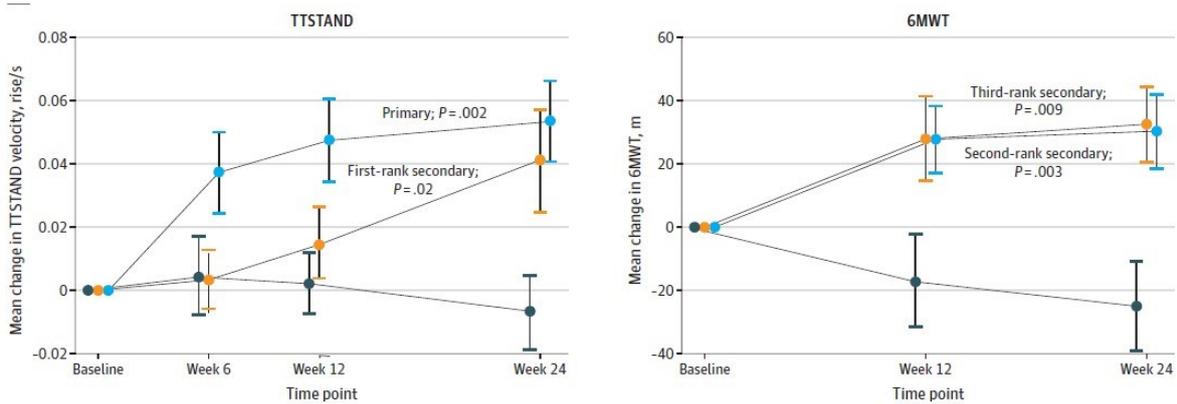
La mancanza di distrofina funzionale fa sì che siano compromesse la stabilità e funzionalità del sarcolemma, con conseguente danno cronico, infiammazione e degenerazione. Per questo la terapia standard e più consolidata per la distrofia muscolare di Duchenne è la somministrazione di glucocorticoidi. Questa classe farmaceutica permea attraverso la membrana cellulare, si lega ad il recettore per i glucocorticoidi nel citoplasma, per poi migrare nel nucleo dove il complesso interagisce con il fattore di trascrizione pro-infiammatorio NF- $\kappa$ B, bloccando la trascrizione di proteine pro-infiammatorie. L'uso di corticosteroidi limita il processo infiammatorio e la velocità con cui la patologia progredisce, ma nel lungo periodo insorgono problematiche legate agli effetti collaterali di questa classe terapeutica dovute a diverse interazioni del recettore per i glucocorticoidi attivato con altre modalità, come la cis-repressione (nGRE) [Figura 6](#). Questi effetti indesiderati includono aumento di peso, insulino-resistenza, insufficienza surrenale, sindrome di Cushing iatrogena, cambiamenti del tono dell'umore, crescita ritardata, da tenere in considerazione vista l'età media dei pazienti trattati, diminuita densità ossea con conseguente aumento delle fratture. Questi effetti collaterali rendono quindi difficile il proseguimento della terapia.

I farmaci d'elezione fino ad oggi sono stati prednisone, prednisolone e deflazacort, un derivato ossazolidinico del prednisolone. Quest'ultimo ha dimostrato da dati osservazionali che è in grado di ritardare la perdita della deambulazione e di migliorare la sopravvivenza rispetto a prednisone e prednisolone (Markati, et al., 2022). In un trial clinico di fase 3 (NCT01603407) i due farmaci prednisone e deflazacort sono stati messi a confronto durante tre anni di terapia rispetto alla somministrazione intermittente di prednisone, non ottenendo differenze significative tra i due trattamenti, se non un minor rischio di incorrere in scoliosi in somministrazioni di deflazacort protratte per lunghi periodi di tempo (Kourakis, et al., 2021) e dimostrando con certezza come l'uso giornaliero di corticosteroidi sia un trattamento efficace per preservare la corretta deambulazione dei pazienti Duchenne, senza limitazioni dovute alla specificità della mutazione (Guglieri, et al., 2022). La terapia con glucocorticoidi va presa in considerazione attorno ai 2 anni di età in pazienti allo stato stazionario e diventa altamente raccomandata tra 2 e 5 anni quando si ha declino evidente della patologia e sempre, salvo casistiche particolari, sopra i 6 anni. In caso di effetti collaterali si suggerisce di ridurre la dose del 25-33% o passare a deflazacort se in trattamento con prednisone; deflazacort inoltre è da preferire qualora ci siano pazienti già aventi problemi di peso o comportamentali (Katharine, et al., 2010).

Un nuovo analogo steroideo ha dimostrato un'ottima attività antinfiammatoria sempre agendo tramite il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B. Vamorolone si è dimostrata una valida cura alternativa ai glucocorticoidi tradizionali, con minori effetti collaterali legati alla cis-repressione [Figura 5](#), minor incidenza di aumento di peso, sindrome di Cushing e sbalzi d'umore e la capacità di interagire come antagonista sul recettore per i mineralcorticoidi, effetto potenzialmente favorevole per quanto riguarda il controllo della pressione per i pazienti soggetti a cardiomiopatia. I trial clinico più recente effettuato su vamorolone (NCT03439670) ha coinvolto 121 pazienti randomizzati a placebo, prednisone o diverse dosi di vamorolone (2 mg/kg/d e 6 mg/kg/d). Questo studio ha raggiunto risultati statisticamente significativi per quanto riguarda gli *out-come* primari del 6MWT e del *Time to Stand from Supine Test* (TTSTAND), nonché riportato risultati incoraggianti riguardo al declino della densità ossea che non si è manifestato nei partecipanti al trial trattati con vamorolone [Grafico 1](#) (Guglieri & al., 2022).



**Figura 6** Confronto tra il meccanismo d'azione dei classici glucocorticoidi rispetto a vamorolone. (a) I glucocorticoidi come il prednisone (PRED) si legano al recettore per i glucocorticoidi (GR) nel citoplasma, formando un complesso che traslocherà nel nucleo attivando elementi responsivi ai glucocorticoidi (GRE) presenti nei promotori di geni codificanti proteine antiinfiammatorie, inibendo il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B. Tuttavia, i glucocorticoidi interagiscono anche con elementi responsivi ai glucocorticoidi negativi (nGRE), reprimendo la trascrizione di alcuni geni e causando effetti collaterali. (b) Anche vamorolone (VAM) si lega al recettore per i glucocorticoidi, ma a differenza dei corticosteroidi classici non attiva cis-repressione e quindi ha meno effetti collaterali (Kourakis, et al., 2021).



**Grafico 1** I risultati dello studio clinico NCT03439670 che ha investigato l'efficacia di vamorolone rispetto a placebo. I grafici riportano i valori di placebo (blu), vamorolone 2mg/kg/die (arancio) e 6mg/kg/die (azzurro) nel *time to stand from supine test* (TTSTAND) e nel *6 minute walk test* 6MWT. Entrambi gli end points hanno dimostrato di essere clinicamente significativi con una differenza di velocità nel TTSTAND di 0.06 "alzate" per secondo nella dose maggiore e 0.05 per la dose minore rispetto al placebo. Anche il 6MWT ha dimostrato una differenza significativa con 42m di differenza con la dose maggiore e 37m per la dose minore (Guglieri & al., 2022).

### 3.1.2 Vasodilatatori

Nella distrofia muscolare di Duchenne un meccanismo di patogenesi è il danno ischemico. La mancanza di distrofina ha come conseguenza anche una diminuzione dell'ossido nitrico sintasi a livello del sarcolemma e quindi anche la presenza dell'ossido nitrico che andrebbe a dare vasodilatazione a livello microvascolare. Sono presenti solo studi su animali di come i vasodilatatori possano migliorare questa condizione, mentre gli inibitori della fosfodiasterasi non si sono dimostrati efficaci a livello di trial clinici di fase 3. Sono stati fatti degli studi con associazioni di citrullina, il precursore dell'ossido nitrico, e metformina o arginina con metformina, dove la seconda associazione ha dimostrato un miglioramento del metabolismo muscolare (Markati, et al., 2022).

### 3.1.3 Trattamenti mirati all'omeostasi del calcio e funzione mitocondriale; antiossidanti

Altre vie di degenerazione tissutale che si hanno dopo il danno dovuto alla mancanza di distrofina funzionale è l'aumentata permeabilità al calcio che può portare ad apoptosi calcio-dipendente. Una delle conseguenze dell'incremento dei livelli di calcio intracellulari è una disfunzione mitocondriale dovuta ad un'alterata fosforilazione ossidativa che porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno, le quali possono influire dando danno ossidativo. È risaputo che il coenzima Q10 grazie alla sua capacità di accettare elettroni è un ottimo antiossidante. Alcuni studi si sono focalizzati su di un suo analogo sintetico, l'idebenone, non ottenendo però risultati soddisfacenti. È

in corso uno studio di fase 1 che valuta l'attività di rimeporide un composto che va ad agire inibendo lo scambiatore antiporto sodio-idrogeno di tipo 1 (NHE-1) andando a ridurre i livelli di calcio intracellulari. Questa sostanza ha dimostrato di avere attività antiossidante, antifibrotica e conseguentemente protettiva a livello cardiaco. Un'altra via che si sta percorrendo è quella dei modulatori dei recettori PPAR- $\delta$  che vanno a migliorare il metabolismo mitocondriale attivando la  $\beta$ -ossidazione (Markati, et al., 2022).

### **3.1.4 Sovra regolazione della follistatina (Inibizione della miostatina)**

Nel processo della crescita muscolare sono coinvolte anche due proteine individuate come possibili target per la terapia della distrofia muscolare di Duchenne. La prima, la miostatina fa parte della famiglia dei *transforming growing factor* beta (TGF- $\beta$ ) e ha un'attività inibitoria rispetto alla crescita muscolare. La diretta inibizione di quest'ultima attraverso anticorpi monoclonali non ha però dimostrato nessuna efficacia. Al contrario, la sovra regolazione della follistatina, proteina che va a legarsi alla miostatina inibendone l'attività, sembra una terapia promettente. Il farmaco givinostat assunto oralmente va a inibire l'istone deacetilasi andando a dare sovra regolazione della follistatina a livello epigenetico. Givinostat ha dimostrato di incrementare la dimensione delle fibre muscolari e, al contempo, limitare la fibrosi. È recentemente terminato un trial clinico di fase 3 controllato tramite placebo su 179 pazienti che aveva come obiettivo la valutazione dell'efficacia e della sicurezza di givinostat (NCT02851797) (Markati, et al., 2022).

### **3.1.5 Trattamenti antifibrotici**

Una conseguenza del continuo danno e rigenerazione tessutale nella distrofia muscolare di Duchenne è la formazione di tessuto fibrotico. Sono in corso diversi studi per valutare composti che possano arginare questo processo degenerativo. Un possibile target di queste terapie è il *connective tissue growing factor* CTGF che viene ad essere sovra espresso nei tessuti che vanno in contro a degenerazione di soggetti Duchenne sia animali che umani. Sono in corso due trial clinici per un anticorpo monoclonale, pamrevlumab, diretto contro CTGF, ma è già noto come il tamoxifene, un modulatore dei recettori per gli estrogeni utilizzato in terapia per tumori al seno estrogeno-positivi, abbia la capacità di diminuire la fibrosi in topi carenti distrofina. In uno studio ha già dimostrato di essere sicuro ed è in corso un trial clinico di fase 3 per stabilire la sua efficacia (NCT03354039) (Markati, et al., 2022).

## 3.2 Ripristino funzionalità distrofina

### 3.2.1 Terapia genica

Sin da quando si definì la causa genetica della distrofia muscolare di Duchenne l'idea di trasferire il gene normale a livello dei muscoli distrofici è sembrata logica. Purtroppo, ci sono alcuni ostacoli, come la grandezza del gene codificante distrofina composto da 14 kB e 79 esoni, nonché la vasta distribuzione dei muscoli nel corpo (Sun, et al., 2020).

Ad oggi uno dei metodi di terapia genica impiegato è la trasfezione genetica mirata tramite virus adeno-associati (AAV *Adeno-associated virus*) i quali sono attualmente i vettori più utilizzati per la terapia genica in quanto non sono patogenici e non vanno ad integrarsi con il genoma dell'ospite. Un ulteriore grande vantaggio è che alcuni sierotipi presentano un tropismo per il tessuto muscolare, caratteristica ottimale per le distrofie. Una delle limitazioni di questi virus invece, è quella di non poter contenere il gene della distrofina per intero dato che la loro capacità si limita a 4.7 kB. Questo limite si traduce con il possibile inserimento di transgeni di mini-distrofina, costituiti da almeno la metà del gene originale della distrofina, o transgeni micro-distrofina corrispondenti a solo un terzo del gene originale, ovvero senza l'estremità C terminale. È stato suggerito che la micro-distrofina non potrebbe ristabilire la funzione completa della distrofina senza il dominio C terminale, mentre la mini-distrofina avrebbe delle prospettive migliori per quanto riguarda la sua attività. Per ovviare al problema della grandezza sono stati ideati dei sistemi di trans-splicing tramite AAV, che consistono nello sviluppo di un triplice AAV dove tre separati vettori vanno a portare tre parti consecutive contenenti gli esoni del gene DMD per essere poi riuniti per generare la distrofina completa tramite *trans splicing*. (Sun, et al., 2020). Il processo di splicing alternativo (*trans splicing*) è una regolazione post-trascrizionale e consiste nel diverso riarrangiamento degli esoni modificando l'eliminazione degli introni. Questo è il principio per il quale un gene può essere tradotto in più proteine. Il processo è regolato da diversi fattori che interagiscono con determinate sequenze, introniche od esoniche, permettendo il riconoscimento dei siti di splicing. Allo stesso modo sono presenti sequenze che silenziano i siti di splicing. (Koo, et al., 2014)

La terapia genica viene solitamente somministrata per via sistemica, anche se l'unico studio completato sull'uomo per la distrofia muscolare di Duchenne ha utilizzato la via intramuscolare; i pazienti durante la terapia devono essere necessariamente in cura con glucocorticoidi per ridurre la possibilità di sviluppare una risposta immunitaria all'AAV. Questo trattamento, infatti, ha come grande svantaggio l'attivazione del sistema immunitario e della cascata del complemento: l'azione di questo ultimo è stata indicata come probabile causa di gravi reazioni avverse in pazienti del trial clinico di fase 1 NCT03362502, che hanno riportato gravi danni renali acuti e trombocitopenia. Altre limitazioni del trasferimento tramite AAV sono la limitata efficienza della trasfezione e il

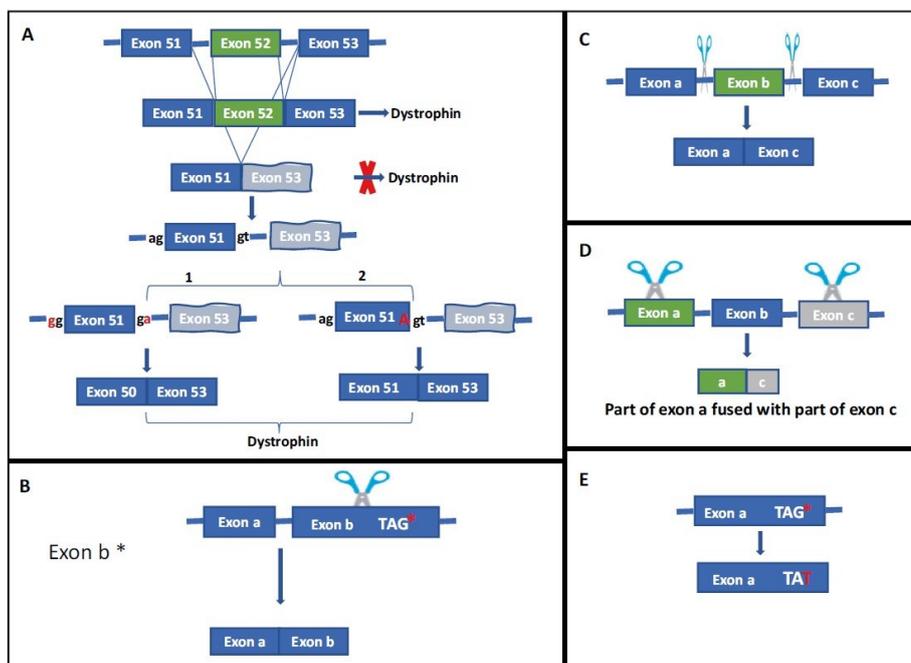
metodo di somministrazione. Secondo Guiner et al. (Le Guiner, et al., 2017) la somministrazione sistemica di micro-distrofina può portare all'espressione della stessa per almeno due anni, anche se va a diminuire dopo la divisione cellulare. Questo richiederebbe più somministrazioni in quanto la DMD è una malattia degenerativa, ma sarebbe comunque vantaggioso rispetto all'*exon skipping* tramite ASOs che richiede somministrazioni settimanali. Un ulteriore notevole vantaggio è che questo metodo non è mutazione specifico e quindi potrebbe essere adatto per molti più pazienti.

Attualmente sono in corso due trials clinici di fase 3 per la mini-distrofina (PF-06939926) e micro-distrofina (SRP-9001) con dati non ancora disponibili. Recentemente però si è concluso uno studio che ha somministrato rAAV2/8 per ricostituire la distrofina in un modello di cane distrofico. Questo ha mostrato dei risultati nel 50% delle cellule del muscolo scheletrico dove tramite western blot si è dimostrata la presenza del 60-80% di distrofina rispetto alle cellule *wilde-type*, ma non a livello dei cardiomiociti. Infatti, le somministrazioni locoregionali di questa terapia hanno scarso effetto a livello sistemico (Sun, et al., 2020).

#### CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 si basa sull'azione dell'mRNA che va ad ibridizzarsi in un punto specifico del DNA e funge da guida all'enzima Cas 9 che va a rompere il doppio filamento nel sito prestabilito, come una forbice molecolare, con successiva riparazione da parte degli enzimi adibiti. Questa tecnica va a diversificarsi in base al tipo di cellule target: nelle cellule che hanno una replicazione attiva si va ad utilizzare ricombinazione omologa, mentre in quelle che non vanno incontro a replicazione viene utilizzato il metodo di saldatura delle estremità non omologhe o NHEJ *non-homologous end-joining*. Dato che i tessuti muscolari colpiti dalla DMD sono post mitotici si va ad utilizzare proprio quest'ultima tecnica. Similmente all'*exon skipping* vengono progettati segmenti di RNA guida che vadano a ristabilire la cornice di lettura, ma a differenza di tale meccanismo terapeutico, la distrofina prodotta tramite CRISPR-Cas9 sarebbe completa, non troncata (Duan, et al., 2021). Sono stati utilizzati due diverse endonucleasi, SpCas9 derivante da *Streptococcus pyogenes* e SaCas9 da *Staphylococcus aureus*. Quest'ultima si è dimostrata più vantaggiosa in quanto più compatta della prima, permettendone così l'inserimento nello stesso plasmide dell'RNA guida. L'editing genomico è stato sperimentato sia *ex vivo* che *in vivo*. Nel primo caso gli studi si sono basati prevalentemente su cellule staminali pluripotenti indotte, mentre nelle secondo sono state effettuate iniezioni nel muscolo di topi *mdx*, contenenti nanoparticelle costituite da DNA donatore, spCas9 e sgRNA. Dopo due settimane dalla somministrazione intramuscolare i mioblasti prelevati vicino al sito di iniezione hanno dimostrato tra il 30% e il 40% di distrofina rispetto alle cellule *wild-type* (Sun, et al., 2020).

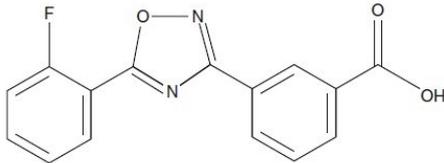
I potenziali meccanismi tramite i quali l'editing genomico con CRISPR-Cas9 agisce possono essere diversi. Una strategia può essere quella di generare delle micro-delezioni o micro-inserzioni a monte di un codone di stop prematuro, in modo tale da ristabilire la *reading frame* ed evitare la trascrizione della distrofina troncata. Oppure tramite due sgRNA si può eliminare esoni in modo tale da ristabilire il corretto schema di lettura. Un ulteriore meccanismo è quello di formare un esone ibrido, ovvero la fusione di due parti di esoni diversi, tecnica che permette di ottenere una distrofina con una struttura normale, completa. Un altro metodo è quello di andare a correggere direttamente il nucleotide mutato che andrebbe a causare un codone di stop. Per quanto riguarda l'approccio terapeutico tramite CRISPR-Cas9 alla distrofia muscolare di Duchenne, i meccanismi suggeriti sono due: il primo è quello di modificare due nucleotidi a livello del pre-mRNA, in particolar modo in presenza di delezione dell'esone 53 si andranno a modificare le sequenze che determinano lo splicing a monte o a valle inducendo il salto dell'esone e ristabilendo la *reading frame*. In alternativa si può inserire un nucleotide a livello dell'esone 51, ottenendo così la trascrizione dell'esone 51 e 53 [Figura 7](#) (Mbakam, et al., 2022).



**Figura 7** Possibili approcci tramite CRISPR-Cas9 alla distrofia muscolare di Duchenne descritti nel capitolo 3.2.1

### 3.2.2 Stop Codon Readthrough

Il 10% delle mutazioni che causano la distrofia muscolare di Duchenne è non senso, ovvero una mutazione puntiforme che va a cambiare la sequenza traducibile in un amminoacido ad un codone di stop il quale, anche se non va ad intaccare la *reading frame*, causa la produzione di una proteina non funzionale in quanto precocemente terminata.



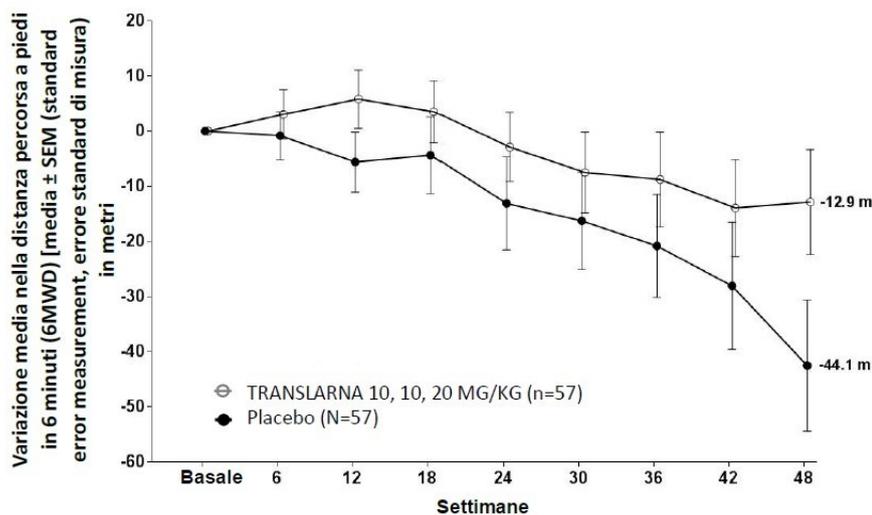
**Figura 8** Ataluren principio attivo del farmaco Translarna utilizzato per la terapia stop codon readthrough nelle mutazioni non senso 3-[5-(2-Fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]benzoic acid (Ryan, 2014)

Un farmaco che ha come target questo tipo di mutazioni è la gentamicina, antibiotico aminoglicosidico che però, se utilizzato cronicamente, può causare severa ototossicità e tossicità renale. Un composto che si è dimostrato sicuro è atalauren. A differenza degli ASOs è una molecola con un peso molecolare contenuto ed è somministrabile oralmente, caratteristica che rende più agevole l'assunzione che per

le altre terapie innovative avviene in modalità più invasiva, ovvero tramite via endovenosa. Ataluren va ad agire tramite *readthrough* ribosomiale dell'mRNA, facendo quindi saltare il codone di stop prematuro, rendendo così possibile la produzione della proteina funzionale (Sun, et al., 2020).

Translarna è un farmaco contenente atalauren già approvato dall'EMA in via condizionale per l'uso in pazienti con distrofia muscolare di Duchenne con età superiore ai 5 anni, diminuita a 2 dopo un trial clinico che ha dimostrato la sicurezza e la tollerabilità (NCT02819557). In un primo studio dopo somministrazione di 40 mg/kg di ataluren giornalieri, alla quarantottesima settimana si è dimostrata la sua capacità di limitare il declino nel 6MWD (*six minute walking distance*) in media di 12,9 metri rispetto al placebo (NCT00592553) **Grafico 2**. Il trial clinico di fase 3 confirmatorio che ha coinvolto 230 ragazzi ambulanti tra 7- 16 anni di età però non ha avuto risultati che suggeriscano un miglioramento generalizzato del 6MWT, ha però dimostrato di rallentare il declino della distanza percorsa in un sottogruppo di ragazzi che si trovavano in una fase transitoria della deambulazione e quindi, verosimilmente, più predisposti ad un declino rispetto agli altri pazienti. In una ricerca comparativa sull'efficacia di ataluren recente è stato dimostrato come, in due gruppi provenienti da trial clinici diversi precedentemente trattati con ataluren 40mg/kg/die, statisticamente la perdita di deambulazione sia stata ritardata di 2,2 anni (p=0.0006) (McDonald, et al., 2022). Il farmaco, inoltre, si è dimostrato sicuro, con principali effetti indesiderati come vomito, diarrea, nausea, flatulenza e cefalea in più del 5% dei pazienti, mentre ci sono stati dei casi più gravi, ma isolati di aumento dei trigliceridi e colesterolo ed alterazione della funzionalità renale. Per quanto riguarda la farmacocinetica ataluren raggiunge il

massimo picco plasmatico dopo 1,5 ore con una biodisponibilità dopo somministrazione orale di circa il 55%. *In vitro* il farmaco è legato per il 99,6% alle proteine plasmatiche. Dato il suo metabolismo enzimatico che avviene tramite enzimi UGT a livello epatico, ma anche renale ed intestinale, ataluren può avere interazioni con altri farmaci, aumentandone la loro concentrazione tramite interazione con i sistemi di trasporto OAT1 e OATP1B3; viene consigliata cautela nella co-somministrazione di aciclovir, captopril, furosemide, valsartan e statine. Non ha dimostrato interazione con corticosteroidi, farmaci che spesso sono somministrati come sintomatici per la DMD. La sua emivita è di 2-6 ore e l'eliminazione, che dipende dal tasso di glucuronizzazione, avviene prevalentemente per via urinaria. Sono recentemente terminati due trial clinici che dovrebbero quantificare la distrofina prima e dopo il trattamento con ataluren. (NCT03796637 e NCT03648827). Il principale svantaggio di questa tecnica rimane la sua applicabilità solo per mutazioni specifiche e la possibilità, seppur remota, che ci siano effetti off-target con aumento di espressione di sequenze amminoacidiche altrimenti non prodotte (AIFA, 2021).

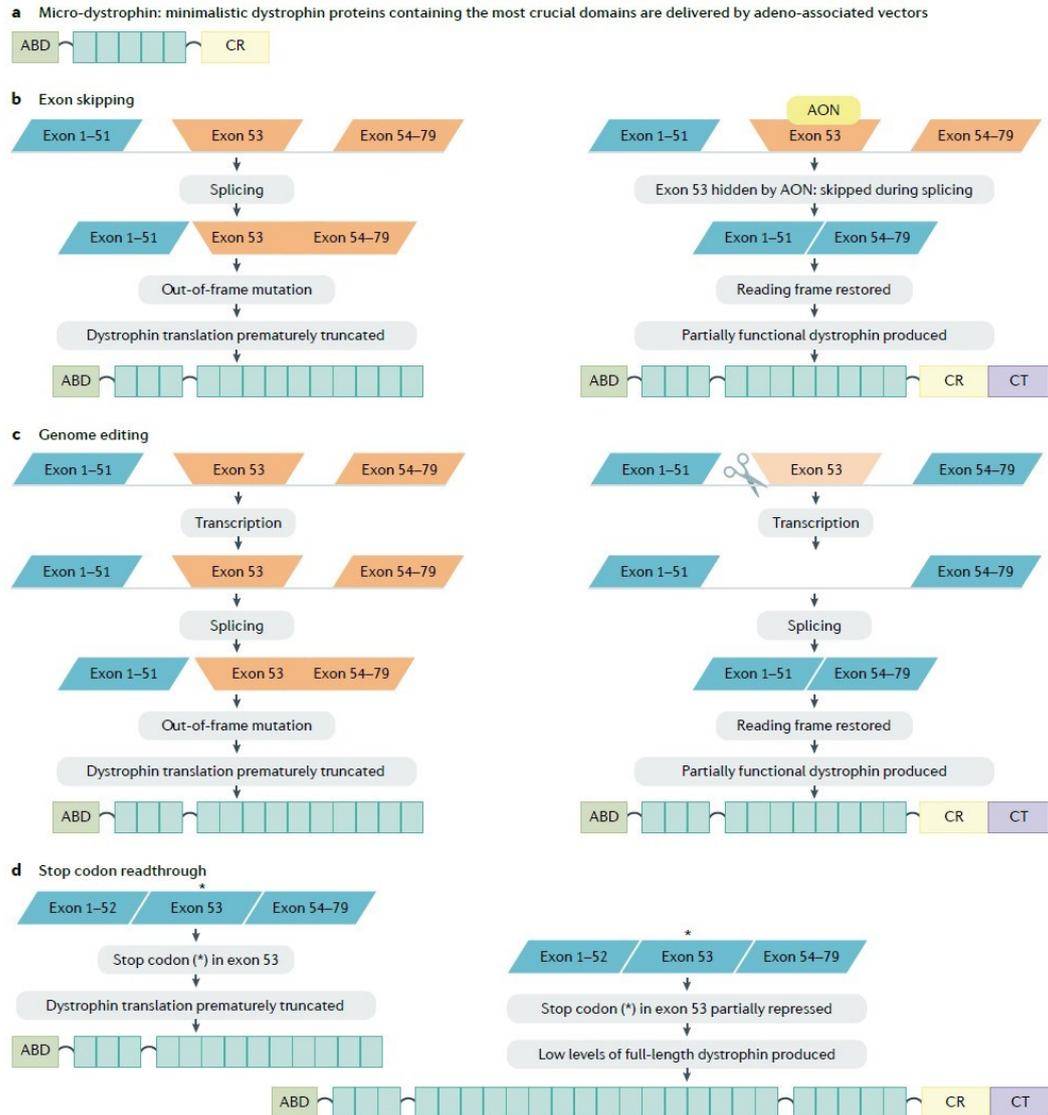


**Grafico 2** Variazione media nella 6MWD (*six minute walking distance*). Il grafico mostra un andamento di declino minore per il gruppo trattato con Translarna (ataluren) 40 mg/kg/die rispetto a quello trattato con placebo. La variazione media osservata dopo 48 settimane è migliore di 31,3m ( $p=0,056$ ) nel braccio trattato con il farmaco (AIFA, 2021).

### **3.2.3 Sovraespressione di proteine surrogate della distrofina e Terapie Cellulari**

Altre terapie ancora a livello di studi clinici di tipo 1 e 2 consistono nel trapianto di cellule allogeniche o autologhe miogeniche con potenziale di produzione di distrofina. Questo dovrebbe far sì che le fibre cellulari rigenerate a partire dalle cellule staminali vadano a produrre distrofina, ma la differenza istologica dei vari tessuti muscolari e la loro ampia distribuzione, fanno sì che questa terapia abbia prospettive abbastanza limitate per quanto riguarda la sua azione sistemica. Ad oggi sono state utilizzate CAP-1002, cellule allogeniche derivanti dal tessuto cardiaco tramite somministrazione intracoronarica per il trattamento di pazienti Duchenne con problematiche di fibrosi cardiaca o cardiomiopatie (NCT03406780, NCT04428476). Questi trials clinici di fase 2 hanno concluso che il trattamento è sicuro e ci sono stati dei risultati per quanto riguarda la diminuzione delle cicatrici cardiache ed un miglioramento delle performance degli arti superiori.

La sovra espressione di proteine surrogate della distrofina dovrebbe poter sopperire la carenza della stessa. L'utrofina è una proteina paraloga della distrofina, appartiene alla stessa famiglia di proteine e ha una funzione simile, sebbene abbia una espressione spaziotemporale diversa. In studi a livello animale la sovra espressione di questa proteina ha portato ad un miglioramento del fenotipo della distrofia muscolare di Duchenne. Tramite analisi ad alta efficienza *high throughput* è stato individuato un composto, ezutromid, in grado di indurre sovra-espressione di questa proteina, ma il suo sviluppo è stato abbandonato in quanto non efficace. Sono in corso altri studi che hanno come obiettivo la sovra-espressione dell'utrofina (Markati, et al., 2022).

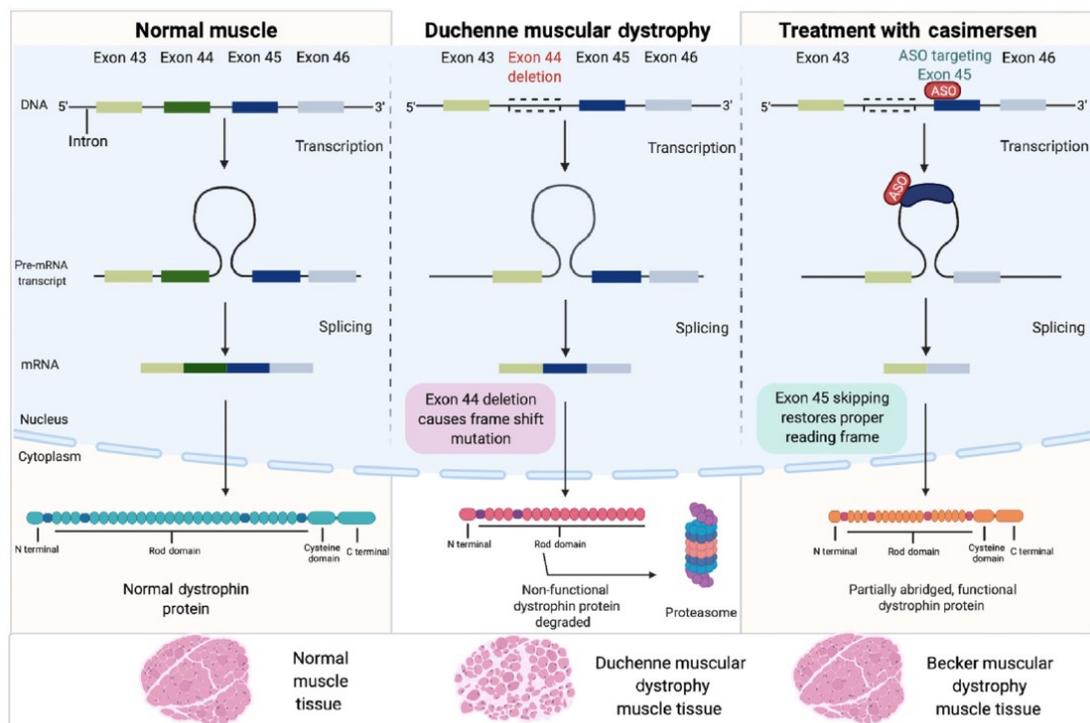


**Figura 9** Approcci di ripristino della distrofina. (a) la terapia tramite AAV viene utilizzata per produrre una micro-distrofina in quanto i virus adeno-associati hanno una limitata capacità che non riuscirebbe ad ospitare l'intero gene. (b) l'*exon skipping* va ad agire sull'pre-mRNA durante lo splicing. L'ASOs nasconde l'esone target causandone il salto nella traduzione e ristabilendo la *reading frame*, permettendo la traduzione di una distrofina simile a quella presente della distrofia dei Becker. (c) nell'editing genomico l'enzima Cas9 viene indirizzato tramite dell'RNA sulla regione che deve essere eliminata, anche in questo caso ristabilendo la *reading frame* e producendo una distrofina troncata, ma funzionale. (d) Il meccanismo dello *stop codon readthrough* è utilizzabile solo in pazienti con mutazioni non senso, va a silenziare i codoni di stop prematuri, permettendo la traduzione di una proteina completa.

## 4 L'EXON SKIPPING E GLI OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSO (ASOs)

### 4.1 Exon Skipping

Le mutazioni possono avere come conseguenza o l'inserimento di nuovi segnali di splicing che determinano l'inclusione anche di introni nell'mRNA, o delezioni (Ferrari & Seguin, 2018). Queste aberrazioni possono conservare la *reading frame* e quindi il corretto schema di lettura del pre-mRNA, ma anche inserire mutazioni non senso portando alla traduzione di un amminoacido diverso e ad una proteina potenzialmente non funzionale. La differenza tra la severità di fenotipi nelle distrofie deriva proprio dalla possibilità che le mutazioni creino tradotti *out of frame*, come nel caso della distrofia muscolare di Duchenne, o *in frame* e funzionali sebbene troncati, come per la distrofia di Becker. Il target dell'*exon skipping* è proprio quello di colmare la differenza tra questi due fenotipi **Figura 10** (Eser & Topaloğlu, 2022).

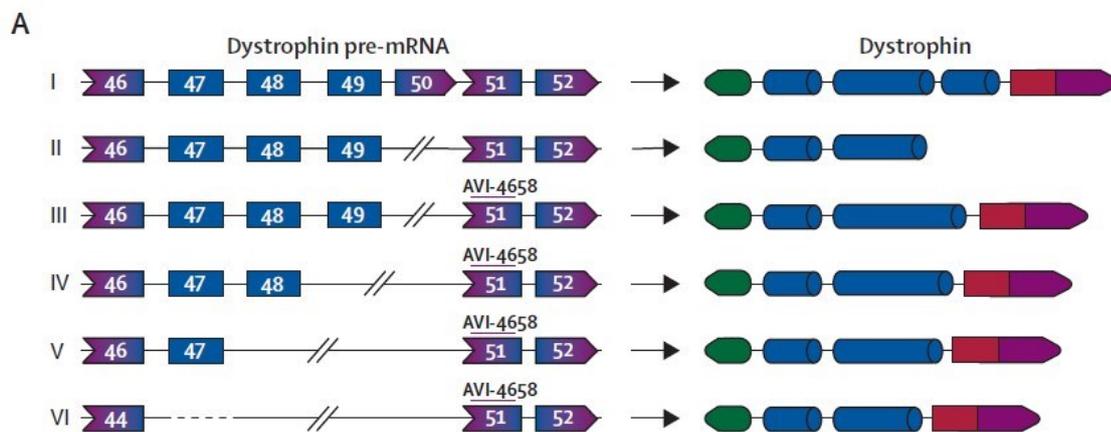


Trends in Pharmacological Sciences

**Figura 10** Esempio di meccanismo di *exon skipping*. Quando è presente una delezione che causa *frame shift* come nel caso della delezione dell'esone 44, in seguito a splicing le triplette di lettura risulteranno *out of frame*, producendo una proteina instabile che verrà degradata dal sistema ubiquitina-proteasoma. Con l'utilizzo di farmaci come il casimersen il sito di splicing 3' nell'introne a monte dell'esone 45 del pre-mRNA codificante il gene DMD viene mascherato. Durante lo splicing l'esone 45 verrà quindi escluso. La proteina prodotta sarà più corta, ma conserverà tutti i domini essenziali. Il fenotipo sarà più lieve come quello della distrofia di Becker (Zakeri, et al., 2022).

I farmaci che agiscono tramite *exon skipping* vanno a legarsi al pre-mRNA cosicché il corrispondente esone venga saltato ristabilendo la *reading frame*. Quale sia l'esone da saltare dipende dal sito e dall'estensione della mutazione, non deve essere necessariamente l'esone mutato. Soprattutto in seguito a delezioni, infatti, si tratta solo di ristabilire lo schema di lettura del pre-mRNA in modo che non si vada a creare un codone di stop. Questo è il caso delle delezioni a livello degli esoni 49-50 dove, con lo *skipping* del 51, si riesce a ristabilire la *reading frame*, ma non è la sola mutazione trattabile con il salto di questo esone **Figure 10 e 11**. Un altro caso è la delezione dell'esone 44 che porta alla formazione di una proteina non funzionale che va ad essere degradata a livello dei proteosomi: saltando l'esone 45 si va a ristabilire il *reading frame* e quindi un tradotto corretto.

Le terapie che si basano sul meccanismo dell'*exon skipping* hanno dei vantaggi, in quanto la proteina che va ad essere prodotta è più grande e completa di una mini o micro-distrofina ed è una tecnica con un uso clinico già consolidato. L'alta specificità, sia a livello cellulare, ma anche per quanto riguarda le mutazioni, è sia un vantaggio in quanto evita errori off-target, che una limitazione poiché fa sì che questa terapia possa avere come destinatari solo alcuni pazienti che devono essere sottoposti a somministrazioni settimanali endovenose, modalità meno agevole rispetto ad altre cure.



**Figura 11** Possibili esempi di delezioni trattabili con eteplirsen (AVI-4658). (I) pre-mRNA e distrofina completa. (II) delezione dell'esone 50 che porta alla produzione di una distrofina troncata ed instabile; (III) Lo skipping dell'esone 51 ristabilisce la *reading frame* e permette la produzione di una proteina troncata, ma funzionale; (IV) Delezione degli esoni 49 e 50 con skipping; (V) Delezione degli esoni 48-50 con skipping; (VI) Delezione esoni 45-50 con skipping; Tutte le distrofine troncata prodotte in seguito al salto dell'esone 51 non presentano i domini hinge 3 region e rod domain, ma sono associate al fenotipo della distrofia di Becker (Kinali, et al., 2009).

## 4.2 Oligonucleotidi antisenso (ASOs)

### 4.2.1 Descrizione

Gli oligonucleotidi antisenso consistono in brevi sequenze di nucleoidi sintetici a singolo filamento (da 8 a 50) che vanno ad appaiarsi con l'RNA target secondo il modello di Watson-Crick, andando a causare diversi tipi di alterazioni: possono agire inducendo la degradazione dell'RNA tramite coinvolgimento della ribonucleasi H (RNAasi H), modulare lo splicing o bloccare stericamente il pre-mRNA modificando la traduzione (Smith & Zain, 2019). Il loro primo utilizzo viene fatto risalire al 1978 da Zamecnik and Stephenson ed attualmente questa classe farmaceutica sta trovando molto riscontro terapeutico essendo il metodo più diretto per interagire con l'RNA. Sono utilizzati nelle terapie di diverse patologie come fibrosi cistica, beta talassemia, distrofia muscolare di Duchenne, ma anche come antitumorali (Ferrari & Seguin, 2018).

I diversi siti e meccanismi di azione vengono definiti dalle modifiche alla struttura chimica che possono essere effettuate a vari livelli: sulla parte zuccherina, sul legame fosfodiesterico, ma anche sulla struttura principale, la base nucleotidica stessa. Negli oligonucleotidi non modificati infatti sono presenti alcune caratteristiche che rendono questi composti non elegibili come terapeutici:

- vengono rapidamente degradati dalle nucleasi;
- i target dell'mRNA sono altamente strutturati, spesso richiedono un legame alle chaperonine e la selettività dei composti immoificati non è sufficiente;
- possono essere riconosciuti dal sistema immunitario;
- possono riconoscere RNA diverso da quello del target;

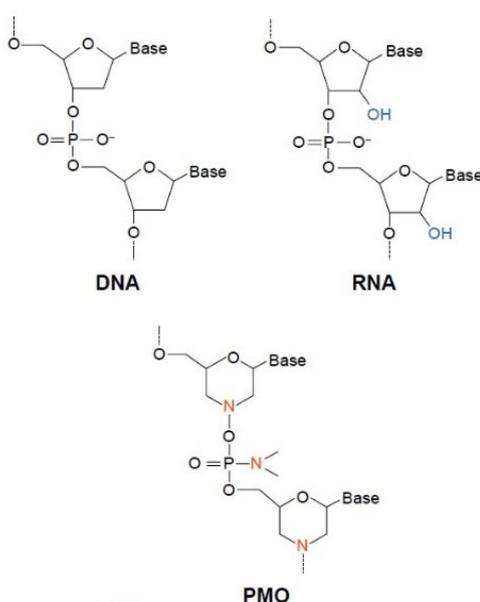


Figura 12 Struttura degli oligomeri morfolino fosforodiamidati in confronto a DNA e RNA. Si può notare l'assenza di cariche, e dei gruppi ossidrilici. Ciò impedisce la degradazione ad opera della ribonucleasi H (Ferrari & Seguin, 2018), (Lim, et al., 2017)

- la base è carica negativamente a livello del legame fosfodiesterico e questa caratteristica limita notevolmente il passaggio attraverso le membrane cellulari;

Per ovviare a questi problemi sono state effettuate diverse modifiche alla struttura ottenendo alcuni composti idonei, tra cui gli oligomeri morfolino fosforodiamidati (*phosphordiamidate morpholino oligomer* o PMOs) omologhi di DNA contenenti anelli morfolinici al posto dell'anello ribofuranosico, uniti da legami fosforodiamidati non ionici al pH fisiologico [Figura 12](#) (Ferrari & Seguin, 2018). I PMOs furono sviluppati da Summerton e Weller nel 1997 e vanno ad agire legandosi al pre-mRNA nel nucleo modulando lo splicing tramite il meccanismo dell'*exon skipping*. Il legame degli PMOs al sito d'azione ovvero l'ibridizzazione ad uno specifico esone, va a nascondere la sequenza allo spliceosoma, escludendolo dal trascritto. Questo va a creare una delezione sì più grande, ma la *reading frame* viene ad essere rigenerata e quindi la proteina va ad essere tradotta con i domini critici intatti, ristabilendo così le corrette interazioni con il resto del complesso DAPC (*dystrophin-associated protein complex*). Il beneficio che questa terapia porta però è transiente in quanto si ha il turnover del mRNA modificato dall'intervento degli ASOs, richiedendo così somministrazioni settimanali. L'ulteriore grande limitazione è che proprio per il suo meccanismo intrinseco, questa terapia è mutazione specifica e quindi valida solo per un numero limitato di soggetti.

Questi oligonucleotidi antisenso prendono anche il nome di SSOs ovvero *Complementary splice-switching oligonucleotides* in quanto impediscono ai fattori dello splicing l'accesso all'mRNA. Le altre classi di ASOs vanno ad agire con meccanismi diversi, per esempio andando a reclutare la ribonucleasi H che degrada l'RNA, questo meccanismo però porterebbe ad una completa eliminazione del tradotto e questo chiaramente non è auspicabile in caso della terapia per la DMD. L'isoforma di ribonucleasi H coinvolta nel meccanismo di splicing è la RNAasi H1 che è necessaria per la trascrizione. È stato dimostrato come l'incremento della sua espressione vada ad aumentare l'attività degli ASOs che agiscono tramite essa, mentre diminuiva andando a limitarne l'azione. Questi enzimi con un peso molecolare che si aggira intorno ai 20kDa, hanno il sito di legame all'RNA sul dominio N terminale, mentre l'attività catalitica è imputata al dominio C terminale. Quest'ultima funziona solo in presenza dei gruppi ossidrilici OH in 2'. Infatti, questi enzimi non vanno ad attaccare i PMOs in quanto specifici per l'eteroduplex che va a formarsi, quindi non va a rompere filamenti di RNA a singolo filamento né DNA a doppio filamento in quanto manca questo gruppo funzionale critico [Figura 12](#) (Ferrari & Seguin, 2018). I PMOs quindi hanno il vantaggio di non essere riconosciuti dalla ribonucleasi ed inoltre vanno a legarsi meno alle proteine plasmatiche rispetto ai classici ASOs aspetto che comporta un'eliminazione più rapida e minori rischi di accumulo. Gli ASOs che vanno ad agire tramite la stabilizzazione della ribonucleasi H, e quindi aumento dell'azione, hanno invece dimostrato una tossicità dovuta alla

presenza del gruppo fosforotioato a livello del legame fosfodiesterico, che va ad aumentare il legame con le proteine plasmatiche (Ferrari & Seguin, 2018).

#### 4.2.2 Farmacodinamica

I meccanismi con i quali gli ASOs interagiscono con il loro obiettivo e le conseguenti risposte fisiologiche sono descritte dalla farmacodinamica. I parametri che sono stati presi in considerazione nei vari studi di farmacodinamica sono stati la selezione dei target e la durata dell'interazione per ottenere un effetto terapeutico, ma anche la ricerca di biomarcatori per monitorare tali funzioni.

**Sito d'azione:** Gli ASOs sono stati ideati basandosi sul principio che nel genoma umano una specifica sequenza di RNA di almeno 13 nucleotidi è presente solo una volta. Quindi il processo dello studio parte sapendo già precisamente quale sarà il sito d'azione a differenza di alcune molecole dei farmaci classici a cui sono stati associati target attraverso processi di "serendipità farmacologica". Solitamente il bersaglio consiste in alterazioni genetiche che danno un prodotto non funzionale o alterazioni epigenetiche; in ogni caso gli ASOs sono stati presi in considerazione come valide terapie alternative solo quando i target non potevano essere trattati con farmaci tradizionali. La presenza di meccanismi già validati e più tradizionali è infatti una delle maggiori cause di invalidazione clinica per questa classe farmaceutica. Le patologie che possono trovare negli ASOs una valida terapia sono spesso monogeniche, ma anche nelle multifattoriali si può procedere tramite associazione di più oligonucleotidi o terapie con altri meccanismi. (Ferrari & Seguin, 2018)

**Meccanismo di azione:** Gli oligonucleotidi antisense vanno ad agire a livello del citoplasma o del nucleo, legandosi al RNA target. La loro azione si esplica tramite vari meccanismi come la rottura del mRNA tramite la ribonucleasi H, la modulazione dello splicing o tramite blocco sterico dell'RNA.

**Biomarcatori:** I metodi utilizzati per definire l'azione degli ASOs sui loro bersagli sono la real-time PCR per l'analisi dell'espressione dell'mRNA, mentre per la ricerca delle proteine si utilizzano saggi di immunistochemica, immunofluorescenza, Western Blotting e metodi citometrici spesso eseguibili unicamente su biopsie.

#### 4.2.3 Farmacocinetica

Inizialmente c'erano delle limitazioni nell'uso degli oligonucleotidi in quanto essi, a differenza dei farmaci tradizionali costituiti da molecole relativamente piccole e lipofile, sono più grandi ed

idrofili. Inoltre, gli oligonucleotidi non modificati vengono ad essere rapidamente degradati dalle nucleasi. (Smith & Zain, 2019)

I principi dell'ADME (*Administration, Distribution, Metabolism, Excretion*) sono essenziali nella fase preclinica per predire quelle che saranno l'efficacia ad una specifica dose e la frequenza del trattamento necessaria (Migliorati, et al., 2022). Per quel che riguarda la somministrazione (*Administration*) i PMOs casimersen, golodirsen, eteplirsen e viltolarsen sono solubili in acqua grazie alla percentuale inferiore al 36% di guanina (Heasman, 2002). Vengono somministrati per via intravenosa attraverso vene sia periferiche che centrali. Non vengono considerate la via orale e sottocutanea in quanto avrebbero uno scarso assorbimento nella prima, mentre nella sottocutanea verrebbero rapidamente degradati dalle nucleasi oltre ad indurre spesso reazioni di tipo infiammatorio nel sito di iniezione. L'emivita è abbastanza prolungata da permettere delle somministrazioni temporalmente distanziate. (Ferrari & Seguin, 2018).

La distribuzione (*Distribution*) dei PMOs risente minormente del legame alle proteine plasmatiche (meno del 40%), rispetto ai classici ASOs per i quali il legame dipende molto dalla presenza del gruppo fosforotioato che si lega con  $\alpha_2$ -macroglobulina e dalla lunghezza del nucleotide stesso. Quindi i derivati morfolinici vanno anche ad essere eliminati più rapidamente e questo comporta sì un minor rischio di accumulo, ma una minore tempo di azione terapeutica ed è stato suggerito possa essere il motivo della tossicità renale per questi composti (Ferrari & Seguin, 2018). La biodisponibilità è, in ordine decrescente, golodirsen>eteplirsen>casimersen>viltolarsen anche se essendo somministrati via intravenosa la biodisponibilità assoluta è del 100%. Il profilo della concentrazione plasmatica nel passare del tempo mostra il raggiungimento della massima concentrazione plasmatica nelle prime 1-2 ore seguita da un rapido declino (Migliorati, et al., 2022).

Per quanto riguarda la distrofia muscolare di Duchenne essendo il bersaglio della terapia il tessuto muscolare che va a costituire il 30% del corpo umano, il trattamento deve essere sistemico. La maggior parte degli ASOs iniettati però tende a finire a livello renale od epatico. Un caso particolare è stato osservato nel caso del PMO ritirato dal commercio drisapersen: la concentrazione del farmaco e, di conseguenza, anche l'azione terapeutica, era apprezzabilmente maggiore nelle fibre muscolari con carenza di distrofina rispetto a quelle appartenenti ad un topo sano. Il meccanismo suggerito è stato che la patologia va a contribuire l'assorbimento degli PMOs a causa della maggiore permeabilità dei tessuti danneggiati. Questo però non è altrettanto valido a livello dei cardiomiociti dove gli ASOs hanno un assorbimento limitato. (Ferrari & Seguin, 2018).

Prima di poter spiegare la loro azione gli ASOs devono poter interagire con il loro sito d'azione e per fare ciò devono entrare nella cellula. Essendo molecole abbastanza grandi, polari e talvolta cariche questo avviene tramite endocitosi recettore mediata, teoria avvalorata dalla presenza di

ASOs nelle vescicole intracellulari e dalla saturabilità del processo. L'entrata nella cellula avviene tramite passaggi che coinvolgono diverse proteine, in base alle quali si delineano distinte vie di endocitosi: clatrina-mediata, caveolina-mediata e micropinocitosi negli endosomi precoci (Migliorati, et al., 2022). Il processo comunque segue alcuni passaggi comuni:

- 1) L'entrata degli ASOs nella cellula avviene dopo interazione con recettore e formazione di una vescicola dalla membrana plasmatica. Le vie di endocitosi possono essere diverse in base al tipo di proteine coinvolte, ma la via classica prevede l'azione di caveolina o clatrina. Può avvenire anche per fagocitosi;
- 2) Il traffico intracellulare prevede il passaggio delle vescicole da endosomi con eventuale riciclaggio del recettore di membrana o, a volte, la degradazione diretta a livello dei lisosomi;
- 3) L'uscita dall'endosoma è uno step fondamentale per il funzionamento della terapia: questo è però dovuto ad una continua e spontanea fuoriuscita degli oligonucleotidi dalla membrana endoplasmatica durante il traffico cellulare;
- 4) L'entrata nel nucleo non incontra particolari ostacoli in quanto gli ASOs vanno ad essere accumulati nel nucleo nei minuti successivi al rilascio; invero quando sono associati a *nanocarrier* l'entrata potrebbe essere limitata a causa dell'ingombro sterico; Per gli ASOs che danno *exon skipping* come i PMOs per la cura della distrofia muscolare di Duchenne, il target si trova a livello del pre-mRNA.

Il metabolismo (*Metabolism*) degli ASOs è prevalentemente a carico delle esonucleasi ed endonucleasi, enzimi che vanno ad idrolizzare i legami fosfodiesterici tra due nucleotidi; quindi, non avviene a livello epatico ([Grafico 3](#)) e non interferisce con il citocromo P450 come è stato dimostrato *in vitro*. Questo non è vero per i PMOs che sono stabili alla degradazione enzimatica ovvero non sono substrati delle idrolasi, nucleasi e proteasi (Ferrari & Seguin, 2018).

La velocità d'azione degli ASOs non dipende solo dalla rapidità con cui raggiungono il sito d'azione, ma anche dalla velocità con cui un certo segmento di mRNA viene ad essere tradotto e dall'emivita della proteina risultante. Quindi se il bersaglio fosse una proteina con un'emivita breve o di cui la traduzione è lenta allora avremmo un'azione più rapida (Ferrari & Seguin, 2018).

L'escrezione (*Excretion*) avviene per almeno due terzi per via renale con tempistiche leggermente variabili tra i diversi farmaci. Per l'eteplirsen nelle 24 ore post-somministrazione di 30mg/kg con una clearance di 339 mL/h/kg, ed emivita di 3-4 ore. Anche golodirsen e viltolarsen sono escreti via renale con un'emivita di 2,5 ore (Migliorati, et al., 2022).

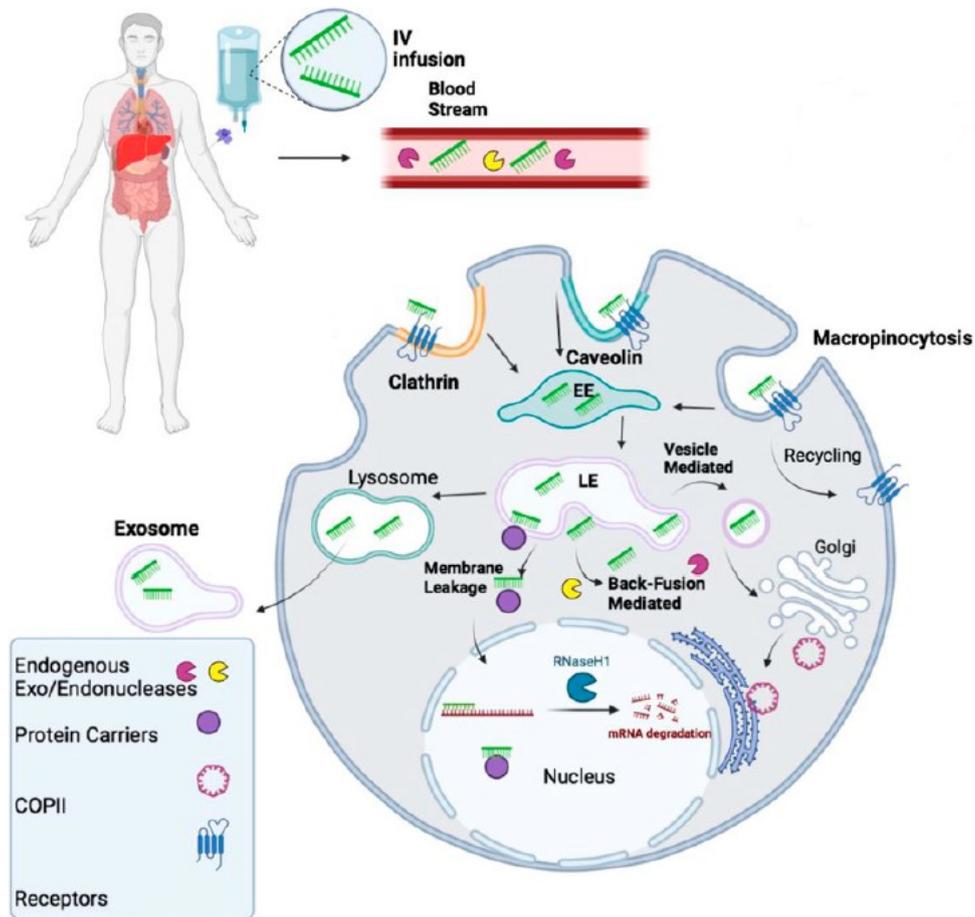


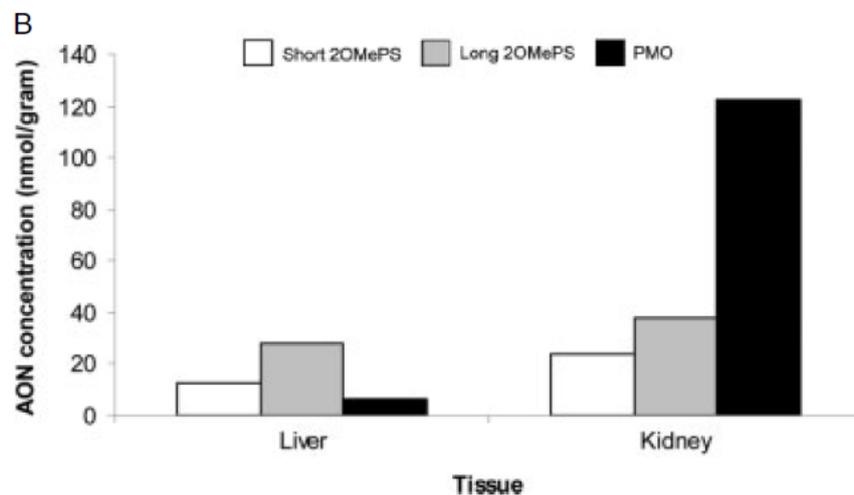
Figura 13 ADME di un ASOs. Dopo infusione intravenosa e aver raggiunto le cellule bersaglio gli ASOs entrano nelle cellule tramite varie vie di endocitosi, tra le quali quella clatrina-mediata, quella caveolina-mediata, e la micropinocitosi negli endosomi precoci. Da qui passano al nucleo dove andranno ad agire sul pre-mRNA (Migliorati, et al., 2022).

#### 4.2.4 Tossicità

La valutazione della sicurezza degli ASOs ha evidenziato come i vari farmaci abbiano delle reazioni avverse in comune. Gli organi più colpiti sono fegato e reni, ma una parte è dovuta a reazioni di ipersensibilità mediate dal sistema immunitario che hanno come sintomi principali rash, orticaria, mal di testa, piressia e febbre (Alhamadani, et al., 2022). Infatti, gli oligonucleotidi possono essere riconosciuti dal sistema immunitario ed è importante limitare quest'eventualità, soprattutto nei farmaci che vanno ad essere somministrati in dosi ripetute. Altre reazioni avverse che accomunano questa classe terapeutica sono reazioni nel sito di iniezione, nausea, vomito, tosse spesso però associata alle infezioni delle vie respiratorie, affaticamento e sintomi simil-influenzali che però possono essere facilmente trattati e quindi accettabili. Le reazioni che destano più preoccupazione sono quelle dovute alla epatotossicità, alla tossicità renale e la trombocitopenia limitatamente agli ASOs fosforotioati nella fase di studio preclinico (Ferrari & Seguin, 2018).

I meccanismi tramite i quali gli ASOs danno tossicità oltre ad attivare il sistema immunitario sono: ibridizzazione dipendenti quando vanno ad agire off-target legandosi ad un RNA con sequenza omologa, interagendo in modo non specifico con proteine plasmatiche, o riducendo l'azione della ribonucleasi H che è la principale causa dell'epatotossicità nel topo.

La tossicità renale è ricondotta all'accumulo degli oligonucleotidi a livello dei lisosomi delle cellule del tubulo prossimale fino a possibili rotture, con conseguente riduzione dell'assorbimento tubulare e proteinuria. Questo è probabilmente dovuto ad interazioni ioniche degli ASOs con le proteine, anche se i precisi meccanismi di tossicità, soprattutto quelli a livello genetico, sono ancora da definire. Questo meccanismo di tossicità è attribuibile in particolar modo ai PMOs in quanto, legandosi poco alle proteine plasmatiche, vanno ad essere rapidamente eliminati per via renale [Grafico 3](#) (Alhamadani, et al., 2022).



**Grafico 3** Biodistribuzione di ASOs (AON) 2O-metilati brevi, lunghi e morfolino oligomeri fosfordiamidati (PMOs). È evidente come i PMOs tendano a distribuirsi quasi esclusivamente a livello dei reni (Heemskerk, et al., 2009) dove danno tossicità da accumulo (Alhamadani, et al., 2022).

### 4.3 Farmaci approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA)

#### 4.3.1 Amondys 45 (casimersen)

AMONDYS 45 (casimersen) è un oligomero morfolinico fosfordiamidato utilizzato per la terapia della distrofia muscolare di Duchenne indotta da modifiche genetiche trattabili con l'*exon skipping*

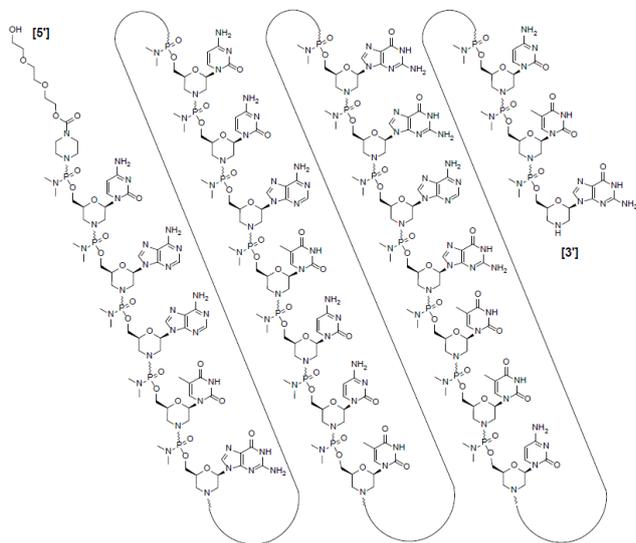


Figura 14 Amondys 45 (casimersen) codice ATC M09AX13

dell'esone 45. L'esclusione dell'esone 45 permette il ripristino della reading frame durante lo splicing, ottenendo così una proteina internamente troncata, ma funzionale in circa il 9% dei pazienti (Markati, et al., 2022). È costituito da 22 subunità, ognuna contenente una base eterociclica presente nel DNA (adenina, citosina, guanina, timina). La sequenza dall'estremità 5' a 3' è CAATGCCATCCTGGGATTCTG. La formula molecolare è  $C_{268}H_{424}N_{124}O_{95}P_{22}$  con un peso molecolare di 7584.5 dalton.

**Somministrazione:** Viene somministrato per via endovenosa in dosi di 30 mg/kg settimanalmente tramite infusioni di durata compresa tra 35 e 60 minuti. (Serepta Therapeutics, Inc., 2021).

**Distribuzione:** il legame alle proteine plasmatiche è compreso tra l'8.4% e il 31.6% e non dipende dalla concentrazione plasmatica. Il volume di distribuzione apparente allo stato stazionario è di 367 mL/kg.

**Metabolismo:** la clearance plasmatica è di 180 mL/h/kg con un'emivita di 3.5 ore; non è soggetto a metabolismo enzimatico ed *in vitro* è stato dimostrato che non dà interazioni con gli enzimi microsomiali epatici.

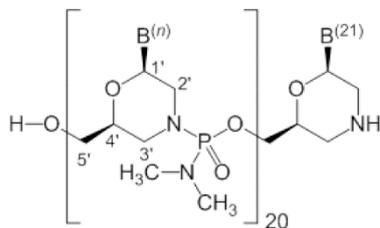
**Escrezione:** casimersen è escreto per il 90% nelle urine (Serepta Therapeutics, Inc., 2021).

**Tossicità e ADR:** Le prime reazioni avverse sono state riportate da un trial clinico di fase I a dose crescente con 12 partecipanti. Le più comuni, riscontrate in più del 20% dei pazienti, sono: infezioni alle prime vie aeree, tosse, piressia, mal di testa, artralgia e dolore orofaringeo. ADR meno comuni, inferiori all'1%, sono state dolore auricolare associato ad infezioni, nausea, vertigini e sensazione di "testa leggera". L'FDA ha ritenuto opportuno inserire in etichetta l'avvertenza di possibile tossicità renale evidenziata però solo a livello preclinico. Per precauzione viene comunque raccomandato il monitoraggio della funzione renale prima di iniziare il

trattamento e durante la somministrazione in particolar modo per pazienti soggetti a patologie renali (Alhamadani, et al., 2022), suggerendo inoltre di non considerare come parametro della clearance renale la creatinina in quanto, vista la natura della patologia che causa un'atrofia del muscolo scheletrico, potrebbe non essere affidabile (Serepta Therapeutics, Inc., 2021).

Studi clinici: Il farmaco è stato valutato solamente in maschi di età compresa tra 9 e 20 anni. È tutt'ora in corso un trial clinico (NCT02500381) in doppio cieco, controllato mediante placebo per valutare la sicurezza e l'efficacia di Amondys 45. Lo studio è rivolto a pazienti di età compresa tra 7 e 13 anni già in cura con corticosteroidi orali. L'efficacia viene valutata con i cambiamenti dei livelli di distrofina alla quarantottesima settimana, rispetto a quella basale. I risultati *ad interim* riportano come in 27 pazienti trattati con Amondys 45 in media dimostrano un incremento dalla quantità iniziale dello 0.81% ( $p < 0.001$ ) rispetto a quelli trattati con placebo dello 0.22% ( $p = 0.09$ ), con una differenza tra le medie dei due gruppi di 0.59 ( $p = 0.004$ ) (Serepta Therapeutics, Inc., 2021).

#### 4.3.2 Viltepsò (viltolarsen)



**Figura 15 Viltepsò (viltolarsen) codice ATC M09AX12**

Viltepsò (viltolarsen) è un oligomero morfolinico fosforodiamidato utilizzato per la terapia della distrofia muscolare di Duchenne indotta da modifiche genetiche trattabili con l'*exon skipping* dell'esone 53, ovvero il 10% dei pazienti. L'esclusione dell'esone 53 permette il ripristino della reading frame durante lo splicing, ottenendo così una proteina troncata, ma funzionale. È costituito da 21 subunità ognuna contenente una base eterociclica presente nel DNA (adenina, citosina, guanina, timina). La sequenza dall'estremità 5' alla 3' è CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC. La formula molecolare è  $C_{244}H_{381}N_{113}O_{88}P_{20}$  con un peso molecolare di 6924.82 dalton.

Somministrazione: Viene somministrato per via endovenosa in dosi di 80 mg/kg una volta alla settimana tramite infusioni di 60 minuti.

Distribuzione: Il legame con le proteine plasmatiche è compreso tra il 39% e il 40%, mentre il volume di distribuzione dopo la somministrazione di 80 mg/kg è di 300 mL/kg.

Metabolismo: Viltepsò non subisce metabolismo, pertanto la sua assunzione non comporta possibili interazioni con altri farmaci.

Escrezione: Il farmaco ha un'emivita di 2.5 ore e viene escreto immodificato nelle urine (NS Pharma, 2020)

Tossicità e ADR: Le reazioni avverse a Viltepsò sono state riportate da un trial clinico di fase II, randomizzato e con placebo, di 16 partecipanti, inizialmente in doppio cieco poi open label con dosi di 40 mg/kg e 80 mg/kg. Le più comuni, osservate nel 15% dei pazienti trattati, si sono rivelate essere: reazione al sito di iniezione, infezioni alle prime vie respiratorie, tosse e piressia. Altre meno comuni hanno incluso artralgia, nausea, vomito, diarrea, e dolore addominale. In etichetta l'FDA ha ritenuto opportuno inserire un avvertimento per quanto riguarda la tossicità renale osservata non negli studi clinici, ma in quelli preclinici dove sono state osservate delle glomerulonefriti, anche letali, nel topo. Viene quindi anche raccomandato il monitoraggio della funzionalità renale (Alhamadani, et al., 2022).

Studi clinici: Viltepsò è stato inizialmente valutato in uno studio diviso in due periodi che avevano come obiettivo quello di individuare la dose funzionale (NCT02740972). In un primo momento gli 8 pazienti, con età compresa tra i 4 e i 10 anni e sotto cura con corticosteroidi da almeno 3 mesi, sono stati randomizzati con farmaco o placebo e solo successivamente tutti i pazienti sono stati trattati con 40 mg/kg o 80 mg/kg per 20 settimane. L'efficacia è stata valutata con i cambiamenti dei livelli di distrofina alla venticinquesima settimana, rispetto a quelli basali. Le analisi effettuate su biopsie dei muscoli bicipiti brachiali tramite Western blot sono state normalizzate tramite l'analisi dei livelli di espressione delle catene pesanti della miosina. Dopo somministrazione di 80 mg/kg di Viltepsò i risultati riportano un incremento di distrofina in tutti i pazienti, in media del 5.3% ( $p=0.03$ ) rispetto a quella basale analizzato con western blot, mentre il valore cala leggermente tramite spettrometria di massa normalizzata tramite l'analisi dei livelli di filamina C, con una media risultante del 3.7% ( $p=0.03$ ) (Clemens, et al., 2020).

**A** Immunofluorescence staining of muscle biopsies for dystrophin and colocalization controls

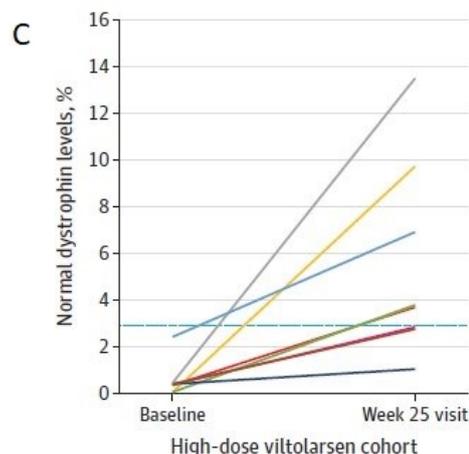
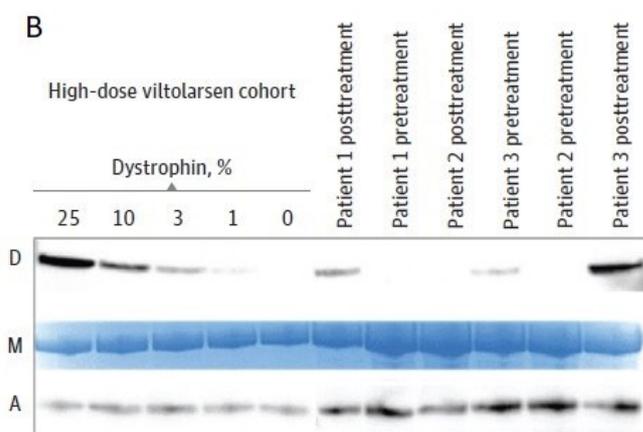
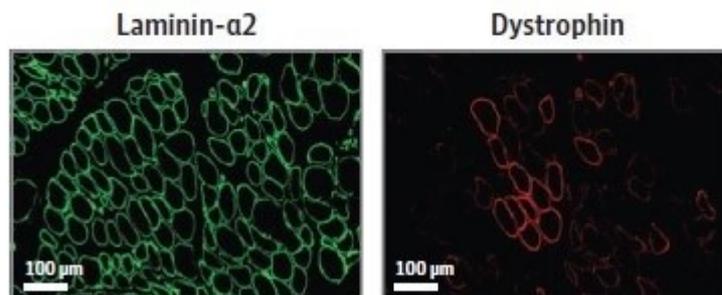


Figura 16 (A) immunofluorescenza di una biopsia di muscolo di un paziente trattato con viltolarsen 80mg/kg con laminina- $\alpha$ 2 come controllo di colocalizzazione (verde) e la distrofina (rosso) effettiva che, in un muscolo Duchenne, dovrebbe essere assente (B) western blot per la distrofina. In alto a sinistra è presente la curva standard per la distrofina, e il campione di tre pazienti prima e dopo trattamento con 80mg/kg di viltolarsen. L'analisi è stata normalizzata tramite catene pesanti della miosina (M) e  $\alpha$ -actinina (A); (C) grafico dei valori percentuali di distrofina normalizzata per ogni paziente dopo le 25 settimane di trattamento, con un incremento del 5.3% in media (Clemens, et al., 2020).

### 4.3.3 Exondys 51 (eteplirsen)

Exondys 51 (eteplirsen) è un oligomero morfolinico fosfordiamidato utilizzato per la terapia della distrofia muscolare di Duchenne indotta da modifiche genetiche trattabili con l'*exon skipping* dell'esone 51, ovvero delezioni che finiscono all'esone 50 e partono dal 52, corrispondenti al

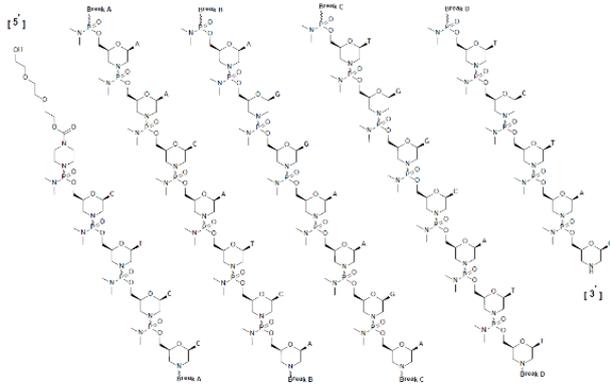


Figura 17 Exondys 51 (eteplirsen) codice ATC M09AX06

20,5% dei pazienti Duchenne soggetti a delezione e, in generale, al 14% dei pazienti in totale [Figura 18](#) (Lim, et al., 2017). L'esclusione dell'esone 51 permette il ripristino della reading frame durante lo splicing, ottenendo così una proteina troncata, ma funzionale (Markati, et al., 2022). È costituito da 30 subunità ognuna contenente una base eterociclica presente nel DNA (adenina, citosina, guanina, timina). La sequenza dall'estremità 5' alla 3' è CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG. La formula molecolare è  $C_{364}H_{569}N_{177}O_{122}P_{30}$  con un peso molecolare di 10305.7 dalton.

Somministrazione: Viene somministrato per via endovenosa in dosi di 30 mg/kg una volta alla settimana tramite infusioni di durata dai 35 ai 60 minuti.

Distribuzione: Analisi in vitro hanno dimostrato che Exondys 51 si lega alle proteine plasmatiche tra il 6% e il 17%. Il volume di distribuzione apparente è di 600 mL/kg dopo somministrazioni settimanali di 30 mg/kg.

Metabolismo: Exondys 51 non è soggetto a metabolismo dagli enzimi microsomiali epatici.

Escrezione: La gran parte del farmaco viene ad essere escreto via renale entro 24 ore con un'emivita di 3-4 ore. (Serepta Therapeutics, 2016)

Tossicità e ADR: in un trial clinico in doppio cieco, randomizzato con placebo di fase II di 12 partecipanti dopo somministrazione di una dose di 30 mg/kg o 50 mg/kg le reazioni avverse riscontrate sono state: problemi di equilibrio, vomito e dermatiti da contatto con un'incidenza del 25%. In un trial clinico di fase III di follow up di 109 pazienti, il 10% ha avuto rash, artralgia, vomito e infezioni all'apparato respiratorio. I reports post marketing dimostrano come meno dell'1% ha riportato problematiche a livello respiratorio quali broncospasmo, tosse e dispnea, ma anche reazioni di ipersensibilità come febbre, arrossamenti, orticaria. L' FDA ha ritenuto opportuno porre in etichetta un avvertimento per le reazioni di ipersensibilità (Alhamadani, et al., 2022).

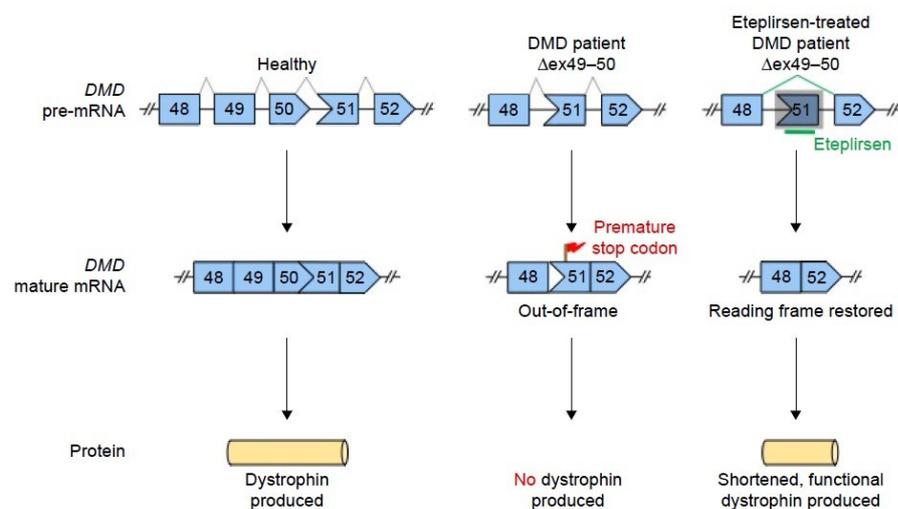


Figura 18 Eteplirsen come esempio di farmaco che causa *exon skipping*. Eteplirsen riconosce in modo specifico l'esone 51. In seguito al legame l'esone 51 viene escluso dallo splicing, facendo sì che si riabiliti la *reading frame* e ottenendo un trascritto funzionale. In questo caso specifico è mostrata la delezione dell'esone 49 che va a causare non solo una lettura *out of frame*, ma anche un codone di stop prematuro, che bloccherebbe la produzione della distrofina (Lim, et al., 2017).

Studi clinici: Exondys 51 è stato testato in diversi studi. Nello Studio 1, 12 pazienti con un'età media di 9.4 anni hanno ricevuto in modo randomizzato placebo, o Exondys 51 in dose 30 mg/kg o 50 mg/kg (NCT01396239). Come endpoint primario è stata designata la produzione di distrofina, mentre come *outcome* clinico è stato utilizzato il *6-minute walk test* (6MWT), prova che va a misurare la distanza che i pazienti riescono a percorrere in 6 minuti su di una superficie piana e dura. In questo primo studio non ci sono stati risultati evidenti dell'efficacia del farmaco. Nello Studio 2 tutti i pazienti sono stati randomizzati a una delle due dosi di Exondys 51, venendo poi comparati con un gruppo esterno. In aggiunta sono state prelevate delle biopsie dopo 180 settimane di trattamento analizzate tramite Western blot che hanno dato come risultato una percentuale del 0.93% di distrofina, ma non è stato possibile stimare l'effettiva produzione di

distrofina in quanto non sono stati raccolti dati dei livelli della stessa prima del trattamento. Nello Studio 3, 13 pazienti con età media di 8.9 anni e sotto trattamento con corticosteroidi da almeno 6 mesi, sono stati trattati in open label con 30 mg/kg di Exondys 51 previa biopsia per determinare i livelli di distrofina basali (NCT03218995). Dopo 48 settimane, la media in percentuale della distrofina rispetto ai livelli normali era di 0.44 rispetto al 0.16% iniziale, con una differenza in percentuale del 0.28% (p=0.008) (Serepta Therapeutics, 2016).

Uno dei trial più recenti PROMOVI ha somministrato eteplirsen a 78 ragazzi comparandoli inizialmente ad una corte di 15 pazienti con mutazioni non trattabili con lo *skipping* dell'esone 51. Dato l'esiguo numero dei controlli dovuto anche alla durata prolungata dello studio (96 settimane) problematico in una patologia progressiva, è stata effettuata un'analisi *post-hoc* tramite dati di trial clinici passati e banche dati di storia naturale della DMD, trovando che i pazienti trattati mostravano un declino minore del 6MWT (Grafico 4) e della capacità vitale forzata (FVC) nel tempo (McDonald, et al., 2021). Un ulteriore studio prospettivo-retrospettivo combinato con l'obiettivo di comparare dei risultati clinici a lungo termine di pazienti precedentemente trattati con eteplirsen in altri studi con una corte di controllo storico, ha avvalorato i risultati dello studio PROMOVI ottenendo ulteriori risultati che suggeriscono un ritardo nella perdita di deambulazione nei pazienti trattati di circa 2.09 anni (p=0.01) Figura 19 (Mitelman, et al., 2022).

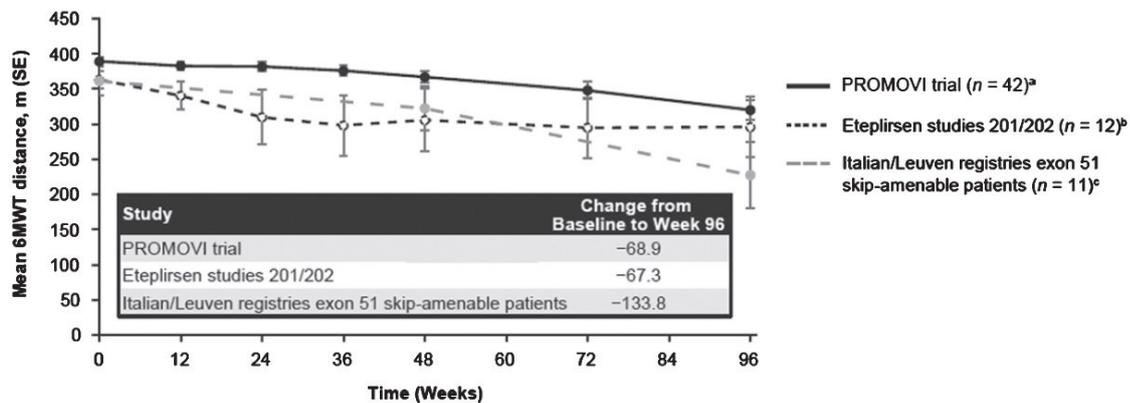


Grafico 4 Distanza media nel 6MWT nello studio PROMOVI in confronto ai trial clinici 201/202 e registri di storia naturale della DMD (Registro italiano della Duchenne di Telethon e Registro Leuven NMRC). Il declino è diminuito nei pazienti trattati nello studio PROMOVI (-68.9m) e negli altri studi su eteplirsen (-67.3) rispetto al controllo storico (-113.8) (McDonald, et al., 2021).

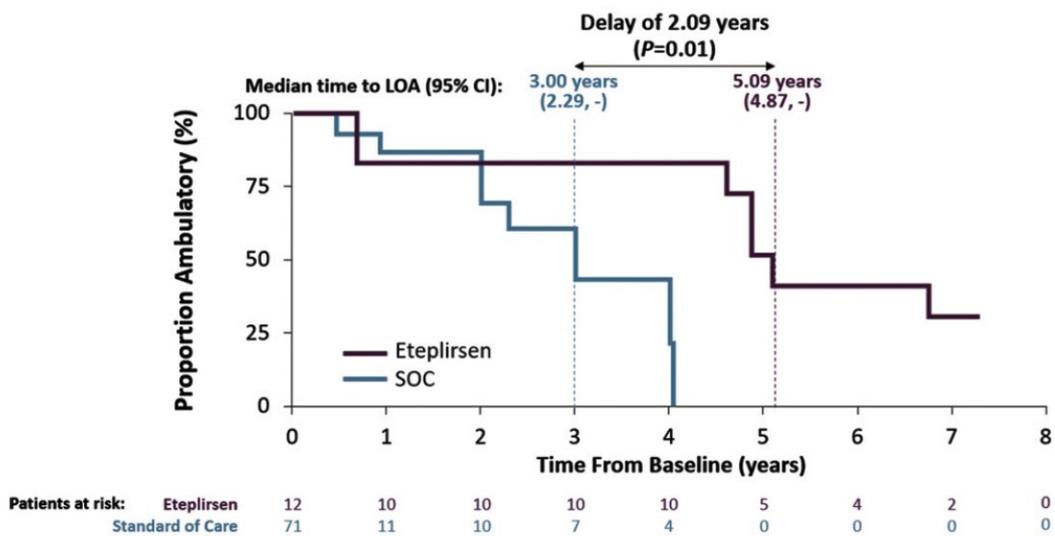


Figura 19 Curva di Kaplan-Meier per la perdita di deambulazione in pazienti trattati con le cure standard of care e in cura con eteplirsen in una coorte selezionata tra vari studi progressi. L'analisi dimostra un ritardo di 2.09 anni ( $p=0.01$ ) (Mitelman, et al., 2022).

#### 4.3.4 Vyondys 53 (golodirsen)

Vyondys 53 (golodirsen) è un oligomero morfolinico fosforodiamidato utilizzato per la terapia della distrofia muscolare di Duchenne indotta da modifiche genetiche trattabili con l'*exon skipping* dell'esone 53, ovvero il 10% dei pazienti. L'esclusione dell'esone 53 permette il ripristino della

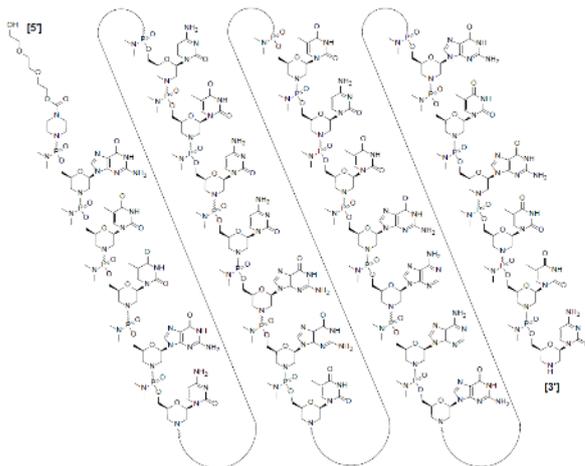


Figura 20 Vyondys 53 (golodirsen) codice ATC M09AX08

reading frame durante lo splicing, ottenendo così una proteina troncata, ma funzionale.

È costituito da 25 subunità ognuna contenente una base eterociclica presente nel DNA (adenina, citosina, guanina, timina). La sequenza dall'estremità 5' alla 3' è GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC.

La formula molecolare è  $C_{305}H_{481}N_{138}O_{112}P_{25}$  con un peso molecolare di 8647.28 dalton

**Somministrazione:** La dose raccomandata è di 30 mg/kg somministrata settimanalmente tramite infusioni endovenose di durata variabile dai 35 ai 60 minuti.

Distribuzione: Vyondys 53 si lega alle proteine plasmatiche in una percentuale che va dal 33% fino al 39%, mentre il volume di distribuzione è di 668 mL/kg dopo somministrazione della dose 30 mg/kg.

Metabolismo: Golodirsén è metabolicamente stabile e non subisce modifiche. Secondo studi *in vitro* non interagisce con gli enzimi microsomiali epatici.

Escrezione: L'emivita di golodirsén è di 3.4 ore ed è escreto immodificato nelle urine.

Tossicità e ADR: In un trial clinico randomizzato, con placebo e con aggiustamento del dosaggio in corso della terapia, seguito da una valutazione open label, il 20% dei pazienti ha riportato reazioni avverse quali mal di testa, piressia, cadute, dolori addominali, nasofaringiti, riniti, tosse, vomito e nausea. Il 5% ha inoltre riportato diarrea, costipazione, confusione, distorsione dei legamenti e fratture ossee, influenza, tachicardia, abrasioni cutanee e reazioni al sito di iniezione. Sono state riportate anche reazioni di ipersensibilità. La tossicità renale non è emersa negli studi clinici, ma in quelli preclinici: i topi che hanno ricevuto Golodirsén, infatti, hanno mostrato degenerazione a livello tubulare, problematica osservata anche a livello dei primati. Per questo l'FDA ha riportato in etichetta un avvertimento di possibili reazioni di ipersensibilità e tossicità renale, consigliando di eseguire mensilmente una valutazione della proteinuria nei pazienti sotto trattamento (Alhamadani, et al., 2022).

Studi clinici: La capacità di indurre produzione di distrofina di Vyondys 53 è stata valutata in uno studio su 12 pazienti per stabilire il titolo della dose (NCT02310906). La parte 1 dello Studio 1 si è svolta con modalità doppio cieco, e con controllo placebo. I pazienti hanno ricevuto dose crescenti comprese tra i 4 mg/kg ai 30 mg/kg. La parte 2 invece è stata eseguita in modalità open label nei 12 pazienti precedentemente trattati più altri 13 con età media di 8 anni e sotto cura con corticosteroidi da almeno 6 mesi. L'efficacia è stata valutata misurando la produzione di distrofina rispetto alla quantità basale misurata tramite Western blot alla quarantottesima settimana. I risultati riportano come i livelli di distrofina siano passati dalla media del 0.10% (SD0.07) al 1.02% (SD 1.03) con una differenza di distrofina del 0.92% ( $p=0.001$ ) (Frank, et al., 2020). Uno studio di fase 3 sta arruolando su invito circa 260 pazienti e dovrebbe concludersi nell'agosto 2026.

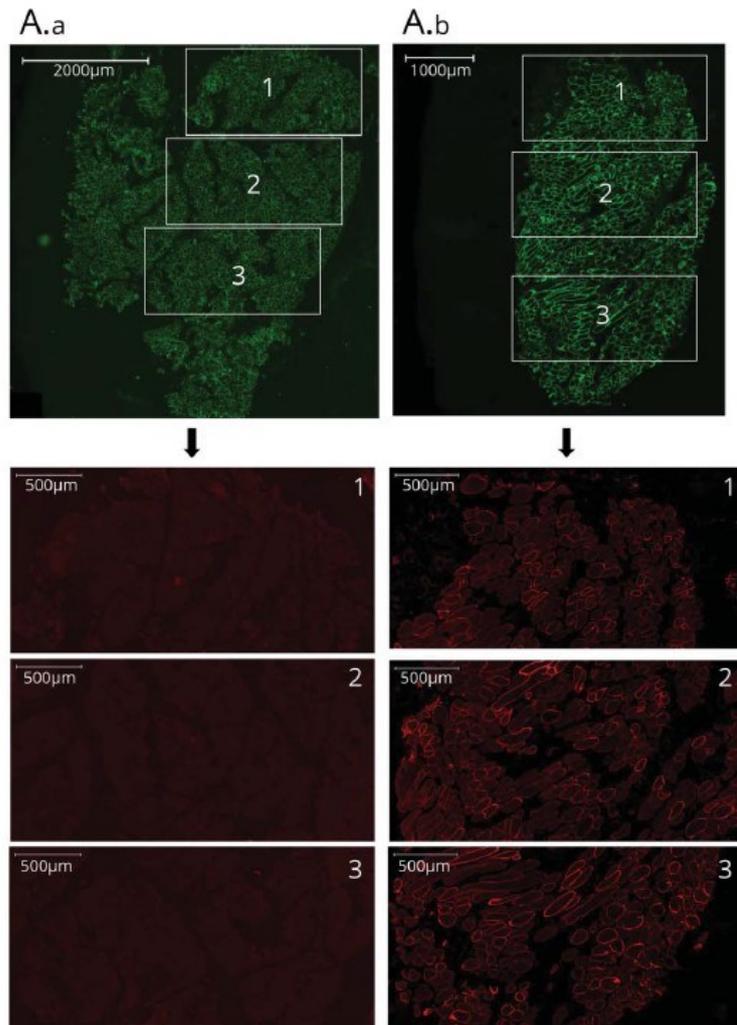


Figura 21 sezione di tessuto muscolare dove sono state evidenziate laminina- $\alpha 2$  (verde) e distrofina (rosso) prima (A.a) e dopo (A.b) il trattamento con 30mg/kg di golodirsen. Le immagini sotto sono un ingrandimento di quella superiore. In questo paziente la distrofina era il 4.3% rispetto al controllo.

## 5 CONCLUSIONE

Le possibili terapie per la distrofia muscolare di Duchenne hanno subito diversi cambiamenti negli ultimi cinque anni. Ad oggi la cura standard rimane ancora quella antinfiammatoria a base di glucocorticoidi. Altri cinque farmaci Translarna (ataluren), Amondys 45 (casimersen), Viltepsa (viltolarsen), Exondys 51 (eteplirsen) e Vyondys 53 (golodirsen) sono stati approvati dall'FDA o dall'EMA, ma non da entrambe. Infatti, mentre ataluren è approvato solo in Europa, gli oligonucleotidi antisenso sono una terapia utilizzabile solo negli Stati Uniti. Il motivo di questo divario è da ricondursi principalmente al fatto che l'FDA può garantire un'approvazione accelerata in base ad *endpoint* surrogati, come l'espressione della distrofina tronca e funzionale, mentre l'EMA richiede evidenze di efficacia clinica. Proprio per questo motivo la richiesta di approvazione di eteplirsen è stata rigettata nel 2018, in quanto per l'EMA l'autorizzazione all'immissione in commercio può avvenire solo una volta soddisfatti i parametri dimostranti il rapporto rischio/beneficio favorevole, la composizione quali-quantitativa del medicinale adeguata e l'efficacia terapeutica (Straub Volker, et al., 2016). Per il progetto dei trial clinici sulla Duchenne in Europa si fa riferimento alle linee guida sull'indagine clinica dei medicinali per il trattamento della distrofia muscolare di Duchenne e distrofia muscolare di Becker dell'EMA del 2013 (EMA, 2013). Gli studi effettuati su eteplirsen non seguivano tali linee guida, in quanto il metodo utilizzato non era stato controllato con placebo, ma utilizzando una comparazione con dati storici, modalità non soddisfacente per dimostrare l'efficacia. Inoltre, i dati presentati si basavano su di uno studio su 12 pazienti in 24 settimane che non aveva dimostrato differenza significativa nel 6MWT (EMA, 2018). Oltretutto, molti studi utilizzano l'espressione di distrofina come *outcome* secondario e questo, secondo le linee guida dell'EMA del 2013, è questionabile per quanto riguarda robustezza e riproducibilità delle metodiche per la quantificazione della proteina presenti all'epoca, e tali dati possono solo essere delle prove per dimostrazione del concetto (EMA, 2013). Ataluren d'altro canto è stato approvato in Europa grazie al raggiungimento di un *outcome* secondario, ovvero l'incremento del 6MWT anche se solo in un sottogruppo specifico di pazienti ed è in corso un trial clinico di fase 3 che ne dovrebbe determinare l'approvazione dell'FDA (Aartsma-Rus & Goemans, 2019).

Tra gli ASOs analizzati nei vari studi Viltepsa (viltolarsen) è quello che ha dimostrato un incremento di distrofina maggiore, sebbene i risultati dei diversi studi non siano tra loro direttamente comparabili (Clemens, et al., 2020). In ogni caso i livelli di distrofina che si ottengono dopo terapia con questi farmaci sono comunque bassi, in quanto alcuni studi hanno suggerito che l'incremento di distrofina per avere un'efficacia clinica dovrebbe essere tra il 5 e il 20% (Markati, et al., 2022), ma deve ancora essere dimostrato se siano effettivamente sufficienti o meno per

rallentare il progredire della patologia. La loro autorizzazione accelerata, infatti, riconosce solo la loro capacità di ripristinare, seppur in minima parte, la distrofina funzionale ma non la loro efficacia. Questo dimostra come ci sia ancora molto da approfondire sulle possibilità di questa classe farmaceutica che potrebbe essere una valida terapia per il 30% dei pazienti con distrofia muscolare di Duchenne. Ulteriori limitazioni sono gli effetti collaterali, soprattutto la tossicità renale, e la frequenza di somministrazione intravenosa settimanale che rende la terapia invasiva e impattante nella vita dei pazienti (Eser & Topaloglu, 2022). Come affermano Ferrari & Seguin “Leggendo la letteratura sugli ASOs, in particolar modo le ricerche più recenti, si ha la sensazione di essere sulle montagne russe: sembra che il campo delle terapie a base di oligonucleotidi sia in un perpetuo stato tra il “guadagnando slancio” e “in procinto di realizzare il loro potenziale”, ma si protrae da vent’anni.” (Ferrari & Seguin, 2018). È evidente come ci sia ancora molto lavoro da fare nel campo della terapia tramite oligonucleotidi antisenso per le distrofie.

Una delle terapie tra le più promettenti ancora in studi clinico di fase 3 sembrerebbe essere la terapia genica tramite virus adeno-associati (AAV), la quale ha il grande vantaggio di non essere specifica per una determinata mutazione. Purtroppo, ha ancora molti ostacoli da superare, primo tra tutti gli effetti avversi come trombocitopenia, attivazione del complemento, epatotossicità e rischio di sindrome emolitica uremica che destano non poche preoccupazioni. Un altro limite di questa terapia è che se viene somministrata in giovane età, come prevedibile per limitare la progressiva atrofia muscolare, con la crescita del paziente e la divisione cellulare, si va a diluire il suo effetto richiedendo successive somministrazioni con potenziale rischio di attivazione immunitaria verso il capsido virale. La soluzione potrebbe essere quella di somministrare la terapia genica solo in età matura, ma la natura degenerativa della patologia richiede un trattamento nel frattempo. Protocolli che combinino farmaci sintomatici e di ripristino della distrofina è la prospettiva più realistica auspicabile per il prossimo futuro (Markati, et al., 2022).



## 6 BIBLIOGRAFIA

Aartsma-Rus, A. & Goemans, N., 2019. A Sequel to the Eteplirsen Saga: Eteplirsen Is Approved in the United States but Was Not Approved in Europe. *Nucleic Acid Therapeutics*, 29(1), pp. 13-15.

AIFA, 2021. *farmaci.agenziafarmaco.gov.it*. [Online] Available at: [https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_004154\\_043535\\_RCP.pdf&sys=m0b113](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_004154_043535_RCP.pdf&sys=m0b113) [Consultato il giorno 11 2022].

Alhamadani, F. et al., 2022. Adverse Drug Reactions and Toxicity of the Food and Drug Administration–Approved Antisense Oligonucleotide Drugs. *Drug Metabolism and Disposition*, Issue 50, pp. 879-887.

Allen, D., Whitehead, N. & SC, F., 2016. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signalling: Roles of Ca<sup>2+</sup>, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiology Review*, Issue 96, pp. 253-305.

Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E. & Davies, K. E., 2002. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiology Review*, Issue 82, pp. 291-329.

Clemens, P. R. et al., 2020. Safety, Tolerability, and Efficacy of Viltolarsen in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 53 Skipping A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 77(8), pp. 982-991.

Duan, D. et al., 2021. Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Disease Primers*, 13(7).

EMA, E. M. A., 2013. *Guideline on the clinical investigation of medicinal products for the treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy*, s.l.: s.n.

EMA, E. M. A., 2018. *Refusal of the marketing authorisation for Exondys (eteplirsen) Outcome of re-examination*, s.l.: s.n.

Eser, G. & Topaloğlu, H., 2022. Current Outline of Exon Skipping Trials in Duchenne Muscular Dystrophy. *Genes*, Issue 13, p. 1241.

Ferrari, N. & Seguin, R., 2018. *Oligonucleotide-Based Drugs and Therapeutics: Preclinical and Clinical Considerations for Development*. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Frank, D. et al., 2020. Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, Issue 94, pp. 2270-2282.

Guglieri, M. & al., e., 2022. Efficacy and Safety of Vamorolone vs Placebo and Prednisone Among Boys With Duchenne Muscular Dystrophy A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology: Original Investigation*, 19(10), pp. 1005-1014.

Guglieri, M. et al., 2022. Effect of Different Corticosteroid Dosing Regimens on Clinical Outcomes in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy A Randomized Clinical Trial. *JAMA American Medical Association: Original Investigation*, 327(15), pp. 1456-1468.

Heasman, J., 2002. Morpholino Oligos: Making Sens of Antisense?. *Developmental Biology*, Issue 243, pp. 209-214.

Heemskerk, H. A. et al., 2009. In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorotioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *The journal of gene medicine*, Issue 11, pp. 257-266.

Katharine, B. et al., 2010. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, Volume 9, pp. 77-93.

Kinali, M. 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 Neurology*, Issue 8, pp. 918-928.

Koo, T., Popplewell, L., Athanasopoulos, T. & Dickson, G., 2014. Triple Trans-Splicing Adeno-Associated Virus Vectors Capable of Transferring the Coding Sequence for Full-Length Dystrophin Protein into Dystrophic Mice. *Human Gene Therapy*, Issue 25, pp. 98-108.

Kourakis, S. et al., 2021. Standard of care versus new-wave corticosteroids in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Can we do better?. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 117(16).

Le Guiner, C. et al., 2017. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications*, Volume 8.

Lim, K. R. Q., Maruyama, R. & Yakota, T., 2017. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Dovepress journal Drug Design, Development and Therapy*, Volume 11, pp. 533-545.

Markati, T. et al., 2022. Emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurology*, Published online([https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(22\)00125-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(22)00125-9)), p. 814–829.

Mbakam, C. H., Lamothe, G., Tremblay, G. & Tremblay, J. P., 2022. CRISPR-Cas9 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurotherapeutics*, Issue 19, pp. 931-941.

McDonald, C. M. et al., 2022. Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients. *Journal of Comparative Effectiveness Research*, 3(11), pp. 139-155.

McDonald, C. M. et al., 2021. Open-Label Evaluation of Eteplirsen in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 51 Skipping: PROMOVI Trial. *Journal of Neuromuscular Diseases*, Issue 8, pp. 989-1001.

Migliorati, J. M. et al., 2022. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of US Food and Drug Administration-Approved Antisense Oligonucleotide Drugs. *Drug Metabolism and Disposition*, Issue 50, pp. 888-897.

Mitelman, O. et al., 2022. A Combined Prospective and Retrospective Comparison of Long-Term Functional Outcomes Suggests Delayed Loss of Ambulation and Pulmonary Decline with Long-Term Eteplirsen Treatment. *Journal of Neuromuscular Diseases*, Issue 9, pp. 39-52.

- NS Pharma, 2020. *Viltepro (viltolarsen) injection, for intravenous use. US prescribing information*, s.l.: s.n.
- Ryan, N. J., 2014. Ataluren: First Global Approval. *Drugs*, Issue 74, pp. 1709-1714.
- Serepta Therapeutics, Inc., 2021. *Amondys 45 (casimersen) injection, for intravenous use. US prescribing information.*, s.l.: s.n.
- Serepta Therapeutics, I., 2016. *Exondys 51 (eteplirsen) injection, for intravenous use. US prescribing information*, s.l.: s.n.
- Serepta Therapeutics, I., 2019. *Vyondys 53 (golodirsen) injection, for intravenous use. US prescribing information*, s.l.: s.n.
- Smith, E. & Zain, R., 2019. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp. 605-630.
- Straub Volker, P. B. et al., 2016. Stakeholder cooperation to overcome challenges in orphan medicine development: the example of Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurology*, Volume 15, pp. 882-890.
- Sun, C., Shen, L., Zhang, Z. & Xie, X., 2020. Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes*, Volume 11.
- van den Berg, J. et al., 2014. Dystrophin levels and clinical severity in Becker muscular dystrophy patients. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, Issue 85, pp. 747-753.
- Zakeri, S. E. et al., 2022. Casimersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 43(7).

## RINGRAZIAMENTI

Ho finito le conclusioni, ho aggiornato l'indice e la bibliografia... ma ci sono ancora alcune righe che vorrei scrivere.

Innanzitutto, vorrei ringraziare la mia relatrice, la professoressa Cristina Mammucari, per la sua infinita disponibilità e pazienza.

Grazie a te Ale, che mi hai accompagnata anche in questo ultimo sforzo prima del traguardo.

Grazie a tutta la mia famiglia che mi ha sempre sostenuta e si è sempre mantenuta ben aggiornata sui miei progressi. Grazie.

Grazie alle mie amiche Kristal, Irene e Gloria per i vostri gentili incoraggiamenti a distanza.

Grazie Alice, perché un viaggio condiviso è più facile da affrontare.

E grazie Martina. Ce l'hai fatta ad arrivare fino a qui, ci credi?

