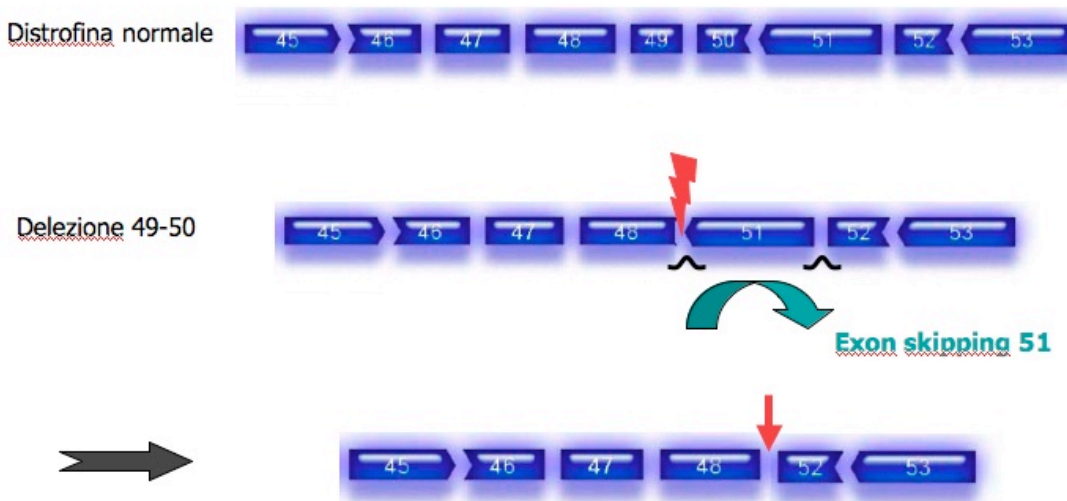


## Exon skipping: una strategia contro la DMD

Nell'ottica di una terapia genica per la DMD, una strategia molto innovativa è quella dell'exon skipping (tradotto letteralmente come "salto dell'esone"), una tecnica che mira ad eliminare il "danno molecolare" modificando direttamente l'RNA messaggero che codifica per la distrofina.

La terapia basata sull'exon skipping non può essere considerata una cura vera e propria, piuttosto un modo per convertire la distrofia di Duchenne in quella di Becker, ovvero un modo per ridurre la gravità della distrofia. Quando una mutazione cambia il "reading frame", ovvero lo schema di lettura, del gene della distrofina non vi è più la produzione della proteina funzionale e ciò causa l'insorgenza della DMD. Il corretto schema di lettura del gene può essere ristabilito eliminando direttamente uno o più esoni corrispondenti alla regione in cui è presente la mutazione.

Questo processo di eliminazione viene effettuato usando dei corti frammenti di RNA, chiamati antisense, che si appaiano in zone specifiche dell'RNA messaggero. Alla fine di questa "operazione molecolare", la distrofina prodotta sarà più corta del normale ma, se il pezzo eliminato non corrisponde ad una regione cruciale, la proteina potrà ancora svolgere la sua funzione muscolare. La versione corta presenta dei difetti, ma una distrofina meno funzionale è pur sempre meglio rispetto alla quasi completa assenza. Insomma, il concetto è di limitare i danni agendo direttamente sulla causa.



### Il meccanismo di exon skipping per l'esone 51

Sono diversi i gruppi di ricerca nel mondo che si stanno impegnando sull'exon skipping, tra i più importanti compaiono Prosensa (un'azienda biotech olandese), MDEX (un consorzio britannico), il gruppo di ricerca di Steve Wilton della University of Western Australia, ed infine il gruppo italiano guidato da Irene Bozzoni del Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare dell'Università "La Sapienza" di Roma. La tecnica dell'exon skipping è basata principalmente su due diversi approcci: da una parte vengono utilizzate semplici molecole di RNA, chiamate AON (Oligonucleotidi Antisense), che una volta iniettate vanno ad agire specificatamente sul RNA messaggero bersaglio, e dall'altra parte vengono utilizzati dei vettori virali (gli AAV, ovvero Virus Adeno Associati) per trasportare i cosiddetti "geni terapeutici". Entrambi gli approcci sono focalizzati sull'eliminazione dell'esone 51, questo perchè il salto di questo esone permette di agire sulle delezioni più frequenti presenti nei pazienti DMD.

## **La strategia basata sugli AON**

Gli AON in uso sono principalmente di due tipi: da una parte ci sono i 2-O-methyl AON, sperimentati dagli olandesi, e dall'altra parte i morpholino, sperimentati dagli inglesi e dagli australiani. Entrambi gli AON sono oligonucleotidi chimicamente modificati, ciò li rende più stabili e non vengono distrutti all'interno delle cellule muscolari. Alcuni aspetti legati all'efficacia di azione in determinate condizioni li differenzia ma i due approcci sembrano, al momento, essere entrambi promettenti. Proprio per questo motivo, gli scienziati pensano che la cosa migliore sia di mandare avanti i due studi in parallelo

Il primo studio clinico basato sull'uso dei i 2-O-methyl AON è stato avviato dagli olandesi - Prosensa - nel 2006. Le sperimentazioni sono state effettuate su 4 ragazzi DMD: per ogni paziente quattro iniezioni nel muscolo tibiale anteriore di un AON specifico contro l'esone 51 (PRO051). I risultati sono stati davvero incoraggianti: analisi molecolari e istologiche su biopsie del muscolo hanno mostrato una produzione di nuova distrofina ad un mese dall'iniezione. Ciò ha permesso di avviare una nuova sperimentazione clinica basata sulla somministrazione degli AON direttamente nella circolazione sanguigna. Questa seconda via permetterebbe agli AON di raggiungere i vari distretti del corpo ed agire così su tutti i muscoli colpiti dalla distrofia.

Dopo gli olandesi è stata la volta degli inglesi: ad ottobre 2007 il consorzio MDEX ha avuto l'approvazione da parte delle autorità britanniche di iniziare un trial clinico di exon skipping, su pazienti DMD, basato sull'uso di morpholino. Anche il team inglese ha scelto come bersaglio l'esone 51. Il trial è stato effettuato su una decina di ragazzi DMD di età compresa tra i 13 e i 17 anni. I pazienti sono stati divisi in 3 gruppi per la somministrazione di 3 dosi diverse di morpholino, iniettate localmente in un piccolo muscolo del piede (extensor digitorum brevis). Anche in questo caso, le analisi molecolari e istologiche su biopsie muscolari hanno evidenziato una produzione di distrofina. Una seconda parte della sperimentazione è ora in fase di avvio e, come per il trial olandese, prevede la somministrazione degli AON direttamente nella circolazione sanguigna in una ventina di ragazzi DMD.

## **La strategia basata sui vettori virali**

A differenza degli olandesi e degli inglesi, il gruppo italiano guidato da Irene Bozzoni ha puntato sull'exon skipping mediato da geni terapeutici veicolati da vettori AAV. Sebbene questo filone sia ancora nella fase di studio preclinica, le prospettive sono molto promettenti ed innovative: mentre nel caso di AON la somministrazione delle molecole antisense deve essere effettuata quotidianamente e per tutto il periodo di trattamento, la strategia italiana lascia sperare per una possibile terapia basata su di un trattamento che venga ripetuto solo ogni 5-6 anni. I Virus Adeno Associati sono vettori virali non patogenici che vengono molto usati nell'ambito della terapia genica, ad oggi nel mondo sono in corso ben 28 trial clinici con AAV dai dati positivi circa la loro efficacia. Le caratteristiche che rendono il sistema AAV un ottimo approccio per la terapia della DMD sono l'assenza di una reazione infiammatoria, l'efficienza di inserimento all'interno delle cellule muscolari, e l'espressione stabile e a lungo termine del "gene terapeutico" veicolato.

Per approfondire gli studi eseguiti dal team italiano potete scaricare il pdf "Exon skipping: la via italiana" nella sezione Biblioteca.

**Francesca Ceradini**