



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE CHIMICHE"
XXI CICLO

COORDINATORE Prof. Gastone Gilli

Sintesi e Purificazione di Oligonucleotidi e Nucleosidi 2'- funzionalizzati

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/06

Dottorando
Dott. Lara Mari

Tutore
Prof. Simonetta Benetti

Anni 2006/2008

*Dedicata alla mia famiglia,
agli amici più cari e
a tutti coloro che mi hanno trasmesso un insegnamento*

Indice

- Indice	p. 1
- Abbreviazioni	p. 3
- Abstract in italiano	p. 5
- Abstract in inglese	p. 6

Capitolo 1

Sintesi e Purificazione di Oligonucleotidi 2'-OMe-fosforotioati(PS)

1.1 Introduzione

- Oligonucleotidi (ON): biomacromolecole utilizzate per la modulazione dell'informazione genetica	p. 7
- Struttura degli ON	p. 12
- Metodi di sintesi	p. 14
- Sintesi del primo di nucleotide	p. 14
- Epoca di Khorana: concetto di protezione e metodo del fosfodiesteri	p. 15
- Epoca di Letsinger: sintesi in fase solida, metodo del fosfotriestere, metodo del fosfitotriestere e nascita dei primi sintetizzatori automatici	p. 18
- Epoca di Marvin Caruthers: metodo del fosforoammidito	p. 23
- Gli oligonucleotidi modificati	p. 25
- Oligonucleotidi di 1 ^a generazione: modifiche del "ponte fosfato"	p. 26
- Oligonucleotidi di 2 ^a generazione: modifiche sull' -OH in 2' dello zucchero	p. 28
- Oligonucleotidi di 3 ^a generazione:	p. 29
- Oligo-PNA	p. 29
- Oligo-MF	p. 30
- Oligo-LNA	p. 30

1.2 Risultati e discussione

- Oligonucleotidi 2'-O-Metilefosforotioati (2'-OMePS)	p. 31
- Il sintetizzatore automatico "AKTA oligopilot 10 PLUS"	p. 35
- Sintesi in fase solida	p. 37
- Messa a punto della sintesi di oligonucleotidi 2'-OMePS	p. 41
- Ottimizzazione della reazione di detritilazione	p. 43
- Ottimizzazione della reazione di accoppiamento	p. 50

- Ottimizzazione della reazione di tio-ossidazione	p. 59
- Ottimizzazione della reazione di <i>Capping</i>	p. 64
- Trattamento con dietilammina (DEA)	p. 65
- Distacco e deprotezione dell'oligo dal supporto solido	p. 67
- Messa a punto della purificazione di ON 2'-OMePS	p. 68
- Analisi RP-HPLC del grezzo di sintesi di oligonucleotidi 2'-OMePS	p. 72
- Purificazione RP-HPLC di oligonucleotidi 2'-OMePS DMT-on	p. 77
- Rimozione del gruppo DMTr dall'oligo 2'-OMePS DMT-on purificato	p. 81
- Purificazione RP-HPLC dell'ON 2'-OMePS DMT-off, concentrazione, filtrazione su resina a scambio ionico e analisi qualitativa	p. 82
1.3 Conclusioni	p. 90

Capitolo 2 –

Sintesi di nucleosidi 2'-funzionalizzati con acidi biliari (AB)

2.1 Introduzione

- Oligonucleotidi coniugati con molecole <i>carriers</i>	p. 92
- Strategie di sintesi ipotizzate	p. 98

2.2 Risultati e discussioni

- Sintesi di coniugati adenosina-AB in posizione 2', mediante reazione di sostituzione nucleofila	p. 99
- Sintesi di coniugati adenosina-AB in posizione 2', mediante reazione di " <i>Click Chemistry</i> "	p. 101

2.3 Conclusioni e Prospettive	p. 106
--------------------------------------	--------

Capitolo 3 –

Parte sperimentale

3.1 Materiali per la sintesi e la purificazione di oligo 2'-OMePS	p. 107
3.2 Metodi per la sintesi e purificazione di M23D 2'-OMePS <i>full length</i>	p. 108
3.3 Materiali per la sintesi e purificazione di nucleosidi 2'-funzionalizzati-AB	p. 112
3.4 Metodi per la sintesi e purificazione di nucleosidi 2'-funzionalizzati-AB	p. 112
3.5 Bibliografia	p. 118

Articolo allegato a fine tesi:

"Cationic PMMA nanoparticles bind and deliver antisense oligoribonucleotides allowing restoration of dystrophin expression in the mdx mouse"

Abbreviazioni

DNA	Acido desossiribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
m-RNA	Acido ribonucleico messaggero
ON	Oligonucleotide
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracile
CMV	Citomegalovirus
DMT o DMTr	Dimetossitritile o 4,4'- dimetossitriifenilmetile
DCC	Dicicloesil carbodiimmide
CPG	Vetro a porosità controllata
MSNT	Mesitil sulfonil nitro triazolo
CH ₃ CN	Acetonitrile
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
ETT	5-Etiltio-1 <i>H</i> -tetrazolo
DCI	4,5-dicianoimidazolo
BTT	5-benziltio-1 <i>H</i> -tetrazolo
<i>Activator 42</i>	5-(bis-3,5-trifluorometilfenil)-1 <i>H</i> -tetrazolo
<i>Beaucage Reagent</i>	3 <i>H</i> -1,2-benzoditiol-3-one-1,1-diossido
EDITH	3-etossi-1,2,4-ditiazolin-5-one
PADS	Fenilacetil disolfuro
DEA	Dietilammina
NH ₄ OH	Itrato d'ammonio
AN	Acrilonitrile
NMI	N-metilimidazolo
RP-HPLC	Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione in Fase Inversa
IEX-HPLC	Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione a Scambio Ionico
TEAA	Trietilammonio acetato
OD	Densità Ottica
NaOAc	Acetato di sodio
DMTr-OH	Dimetossitritanololo o alcool dimetossitritilico
DHAP	2',5'-Diidrossiacetofenone
PMMA	Polimetilmetacrilato
AB	Acido Biliare
UDCA	Acido Ursodesossicolico
CA	Acido Colico
TUDCA	Acido Tauroursodesossicolico
TCA	Acido Taurocolico
LA	Acido Litocolico
2'- <i>O</i> -DMAOE	2'- <i>O</i> -[2-[(<i>N,N</i> -dimetilammino)oxi]etil]
NaH	Sodio Idruro
PDI	Perilenediammide

PEG	Polietilenglicole
TEA	Trietilammina
THF	Tetraidrofurano
NaHCO ₃	Sodio bicarbonato
HCl	Acido cloridrico
AcOEt	Acetato di etile
Na ₂ SO ₄	Sodio solfato anidro
DMTBSCI	Dimetiltertbutilsililcloruro
DMAP	Dimetilammino piridina
NH ₄ Cl	Cloruro d'ammonio
MeONa	Metossido di sodio
<i>T_m</i>	Temperatura di <i>melting</i>
PS	Fosforotioato
PS ₂	Fosforoditioato
PO	Fosfato
Me-PS	Metil fosfonati
2'-OMePS	2'-OMetile fosforotioato
Ib	isobutirile
Tac	tertbutilfenossiacetile
Bz	benzoile
PA	Acido picolinico
³¹ P-NMR	Risonanza Magnetica Nucleare al ³¹ P
CDCl ₃	Cloroformio deuterato
DMD	Distrofia Muscolare di Duchenne
BMD	Distrofia Muscolare di Beker
DHBA	Acido 2,6-diidrossibenzoico

Abstract:

Gli oligonucleotidi (ON) sono molecole comunemente utilizzate per modulare l'espressione genica, mediante esperimenti realizzati su cellula o su modello animale .

E' possibile sintetizzare un'ampia gamma di oligonucleotidi chimicamente modificati, contenenti modifiche sul ponte fosfato, sullo zucchero o in corrispondenza della nucleo base. In particolare oligonucleotidi 2'-*O*-Metile-Fosforotioati a base RNA (2'-OMePS) vengono utilizzati per modulare l'espressione genica agendo sullo *splicing* del pre-mRNA, ed inducendo l'omissione (*SKIPPING*) di esoni specifici.

In questi anni di ricerca abbiamo messo a punto un laboratorio attrezzato ed abbiamo sviluppato protocolli efficienti ed affidabili per la sintesi e la purificazione di oligonucleotidi 2'-OMePS modificati su tutta la loro lunghezza. Tutte le sintesi sono state realizzate su un sistema automatico *AKTA oligopilot 10 PLUS* della *General Electric* (GE), su scala variabile da 1 a 50 μ molare, utilizzando supporti solidi a base di polistirene/divinilbenzene con diverse capacità di caricamento e reagenti fosforoamiditi β -cianoetili. Tutte le purificazioni sono state realizzate mediante cromatografia a fase inversa (RP-HPLC) su un sistema di tipo *AKTA basic UPC* della GE.

Abbiamo inoltre studiato la sintesi di nuovi nucleosidi coniugati in posizione 2' con molecole di acidi biliari (nucleosidi 2'-*O*-AB), poiché in futuro ci proponiamo di inserire tali unità nell'ambito del processo di sintesi automatica, al fine di ottenere oligonucleotidi coniugati in 2' contenenti una o più unità di acido biliare, per migliorare l'efficienza dell'assorbimento cellulare.

Abstract: Oligonucleotides (ON) are commonly used as research reagents to modulate gene expression in cell culture and in animal models. Various chemistries of ON have been synthesized, incorporating modifications to the phosphodiester backbone, sugar or nucleobases portions. Oligonucleotides 2'-O-Methyl-RNA-Phosphorothioates (2'-OMePS) can modulate gene expression through splicing arrest of pre-mRNA and inducing the skipping of specific exons. In these years, we have set up a fully equipped laboratory and we have developed efficient and reliable protocols for the synthesis and purification of 2'-OMePS full length oligonucleotides. All synthesis were performed on a GE ÄKTA™ *oligopilot plus 10* fully automated synthesizer in the 1 to 50 µmol scale range using a polystyrene-based solid support at different loading, and β-cyanoethyl phosphoroamidite synthons. All purification were performed on a ÄKTA *basic UPC HPLC* system by reverse phase chromatography. Furthermore, we have studied the synthesis of new 2'-O-bile acids (AB) conjugated nucleosides, because in future we will insert these building blocks in the automated synthesis process to obtain different 2'-O-conjugates oligonucleotides containing one or more units of AB for improvement of cellular uptake efficiency.

Sintesi e Purificazione di Oligonucleotidi 2'-OMe-fosforotioati(PS)

1. Introduzione

Oligonucleotidi (ON): biomacromolecole utilizzate per la modulazione dell'informazione genetica

La scoperta della struttura del DNA¹ (acido desossiribonucleico) più di cinquant'anni fa, ha permesso di chiarire le basi molecolari della genetica, dando luogo ad una nuova disciplina definita "Medicina Molecolare" che si basa fundamentalmente sulla comprensione della struttura e della funzione di geni e proteine; ma ha anche fornito ai chimici un modello per realizzare molecole in grado di "leggere" l'informazione contenuta nel DNA ed eventualmente intervenire su di essa: "gli oligonucleotidi".

Il noto dogma della Biologia Molecolare che governa tutti i processi essenziali dei sistemi biologici, afferma che dal DNA viene sintetizzato l'RNA messaggero (m-RNA) e da quest'ultimo, mediante una complessa catena di eventi, vengono successivamente codificate le proteine². Mentre i farmaci classici agiscono interrompendo stadi posti al termine della suddetta catena di eventi, ossia scegliendo come bersagli siti specifici che si trovano direttamente sulle proteine, la scoperta degli ON ha permesso di bloccare la stessa catena di eventi a stadi più precoci, cioè a livello del DNA o dell'RNA (Fig.1), attraverso meccanismi di inibizione genica che si realizzano in maniera altamente specifica.

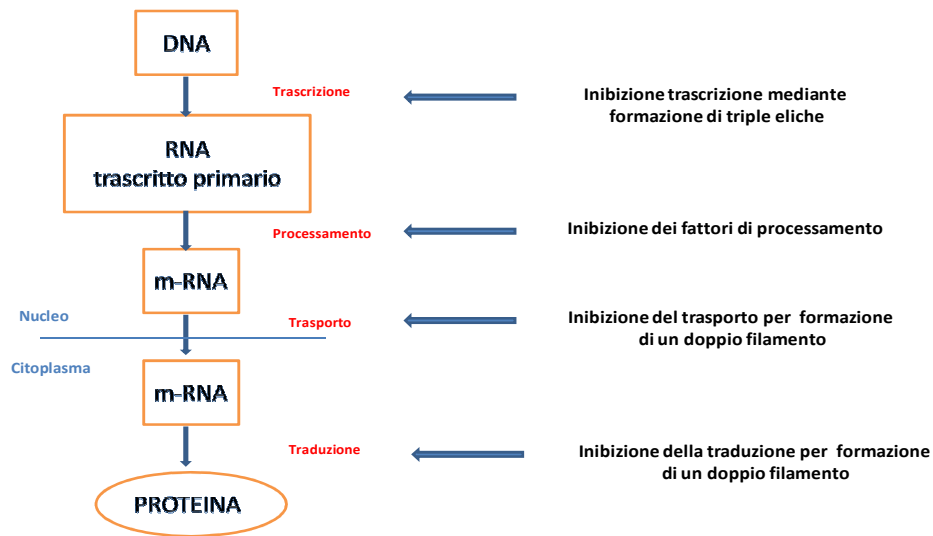


Fig.1 Possibili stadi di intervento degli ON durante la sintesi proteica

L'elevata specificità degli ON è legata alla loro capacità di riconoscere la sequenza nucleotidica bersaglio grazie alla formazione degli esatti legami a idrogeno caratteristici dell'appaiamento di basi secondo il modello di Watson e Crick³, cioè Guanina (G) con Citosina (C) e Adenina (A) con Timina (T) o Uracile (U), (Fig.2).

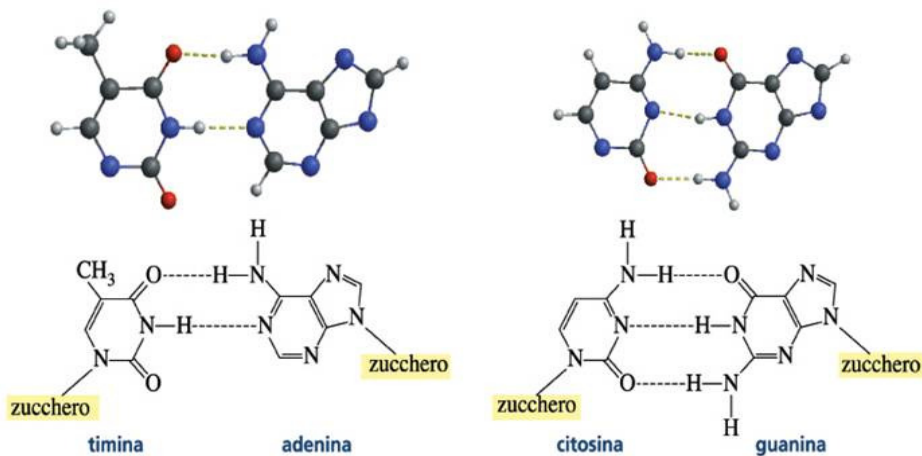


Fig.2 Accoppiamento della basi secondo il modello Watson - Crick

Quindi, gli ON sono molecole in grado di regolare l'espressione di geni a sequenza nucleotidica nota, sfruttando opportuni meccanismi d'azione definiti "code blockers"⁴. La prima di queste metodiche, nata ufficialmente ad Harvard (USA) nel 1978 è la tecnologia antisense⁵, così definita perché l'inattivazione genica si basa sulla formazione di un ibrido tra l'ON ed un tratto di DNA o di RNA ad esso complementare, scelto come bersaglio.

Il meccanismo d'azione attraverso il quale un ON antisense inibisce la sintesi proteica (che normalmente si realizza secondo le fasi riportate in Fig.3A), può basarsi o su un blocco di tipo sterico^{4a}, che impedisce a determinate proteine l'approccio a livello del DNA o dell' RNA (Fig. 3B, 3C e 3D); oppure sulla degradazione del filamento di m-RNA ad opera dell'enzima RNasi-H^{4b,6} (Fig. 3E), in grado di riconoscere e distruggere piccole sequenze nucleotidiche in *duplex*.

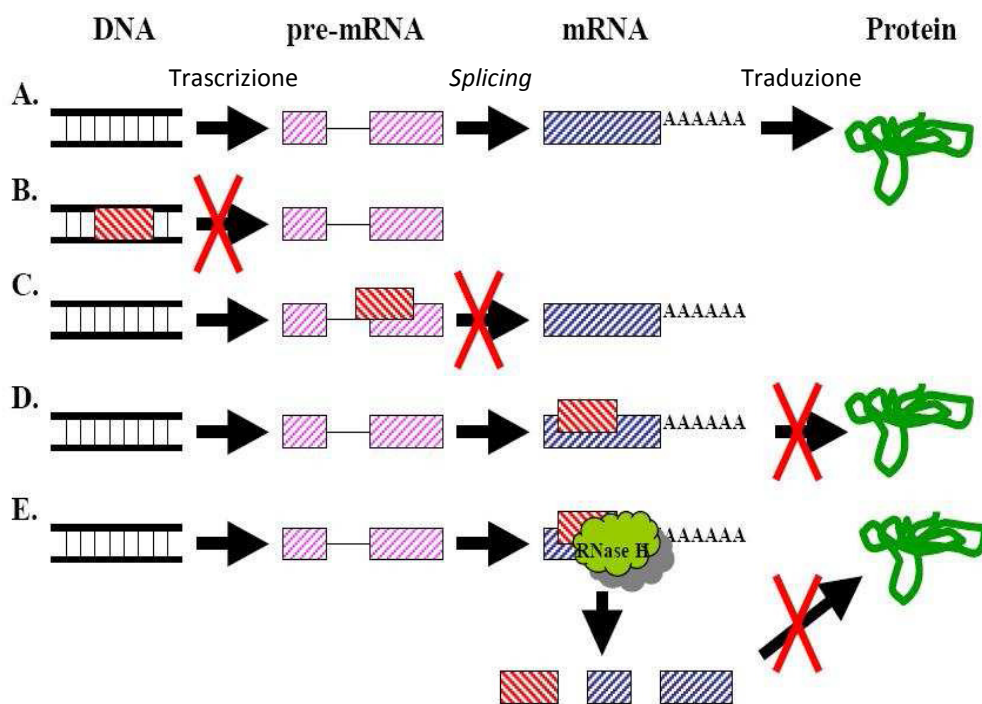


Fig.3 Meccanismo d'azione degli ON antisense

Un'altra importante strategia di inattivazione genica consiste nella tecnologia anti-gene⁷ secondo la quale gli ON vengono progettati per ibridare con il DNA, a formare un tratto di tripla elica (*triplex*). Nell'esempio riportato in Fig.4 l'oligonucleotide anti-gene (rosso) si lega a una regione di controllo del DNA con la quale forma un complesso a tripla elica,

impedendo all'RNA polimerasi di avvicinarsi e causando il blocco della sintesi proteica a livello della fase trascrizionale⁸.



Fig.4 Meccanismo d'azione degli ON anti-gene

Nel corso degli anni, Medicina e Chimica si sono sempre più interfacciate per studiare la capacità degli ON di modulare in maniera specifica l'espressione di singole sequenze codificanti, con la promessa di poterli un giorno utilizzare non solo a scopo terapeutico per la cura di varie patologie⁹ (cancro, cardiopatie, malattie infettive, distrofie muscolari, patologie infiammatorie, virali e genetiche); ma anche in campo diagnostico e nell'ambito della Biologia Molecolare¹⁰.

Ad oggi le possibilità di utilizzare oligonucleotidi sintetici come potenziali farmaci per nuovi approcci terapeutici sono molteplici^{11,12,13,14}; infatti oltre un centinaio di oligo è attualmente in fase di sperimentazione preclinica e clinica in diversi laboratori biomedici. In (Tab.1.1.1)¹⁵ sono elencati alcuni oligonucleotidi e le corrispondenti fasi di sviluppo pre-clinico e clinico. In particolare citiamo "Fomivirsen"¹⁶ di *ISIS Pharmaceutical*, che è stato il primo oligonucleotide sintetico approvato ed utilizzato come farmaco per la cura della retinite causata da Citomegalovirus (CMV), o ancora "Genasense"¹⁷ della società Genta (attualmente in fase III), studiato con particolare attenzione per le promettenti proprietà antitumorali.

Tab 1.1.1 Oligonucleotidi approvati o in fase di sviluppo clinico e preclinico

Compound	Company	Protein target	Indication	Development phase
Vitravene™ (Fomivirsen)	Isis Pharmaceuticals (http://www.isispharm.com) and Ciba Vision (http://www.cibavision.com)	CMV IE2	CMV retinitis	Approved
Genasense® (augmerosen, oblimersen and G3139)	Genta (http://www.genta.com)	Bcl-2	Malignant melanoma, B-cell CLL and multiple myeloma AML and NSCLC B-cell NHL SCLC and prostate, colon and breast, liver, renal and pancreatic cancers	Phase III Phase II/III Phase II Phase I/II
Affinitak™ (ISIS 3521 and LY900003)	Isis Pharmaceuticals and Eli Lilly Pharmaceuticals (http://www.lilly.com)	PKC α	NSCLC	Phase III
ISIS 5132	Isis Pharmaceuticals	Raf kinase	Solid cancers: ovarian and others	Phase II
LErafAON	NeoPharma (http://www.neopharm.com)	Raf kinase	Advanced cancer	Phase I
GEM231	Idera Pharmaceuticals* (http://www.iderapharma.com/)	PKA	Solid cancers	Phase I, II
MG98	MethylGene (http://www.methylgene.com)	DNA methyltransferase	Head and neck and metastatic renal cancers	Phase II
GTI 2040	Lorus Therapeutics (http://www.lorusthera.com)	R2 component of ribonucleotide reductase	Renal cancer	Phase II
GTI 2501	Lorus Therapeutics	R1 component of ribonucleotide reductase	Lymphomas and solid cancers	Phase I
AP 12009	Antisense Pharma (http://www.antisense-pharma.com)	TGF- β 2	Malignant glioma	Phase I/II
G 4460/LR 3001	Genta	c-myb	CML	Phase I
OGX-011	Onco Genex Technology (http://www.oncogenex.ca)	Clusterin	Prostate, breast and lung cancers	Phase I/II
LY 2181308/ISIS 23722	Eli-Lilly Pharmaceuticals and Isis Pharmaceuticals	Survivin	Solid cancers	Phase I
AEG 35156	Aegera Therapeutics (http://www.aegera.com)	XIAP	Solid tumours	Phase I
ISIS 345794	Isis Pharmaceuticals	STAT-3	Solid tumour cell lines	Preclinical
OGX-427	OncoGeneX	HSP 27	Prostate cancer	Preclinical
GEM 240	Idera Pharmaceuticals*	MDM2		Preclinical
OGX-225	OncoGeneX	IGFBP-2 and IGFBPP-5		Preclinical
LY 2275796	Eli-Lilly Pharmaceuticals and Isis Pharmaceuticals	eIF-4E	Solid tumour cell lines	Preclinical

Struttura degli ON

Gli ON sono brevi sequenze di acidi nucleici (DNA; RNA), costituite da un numero di unità nucleotidiche (unità monomeriche in successione), variabile da poche decine fino ad alcune centinaia (Fig.5).

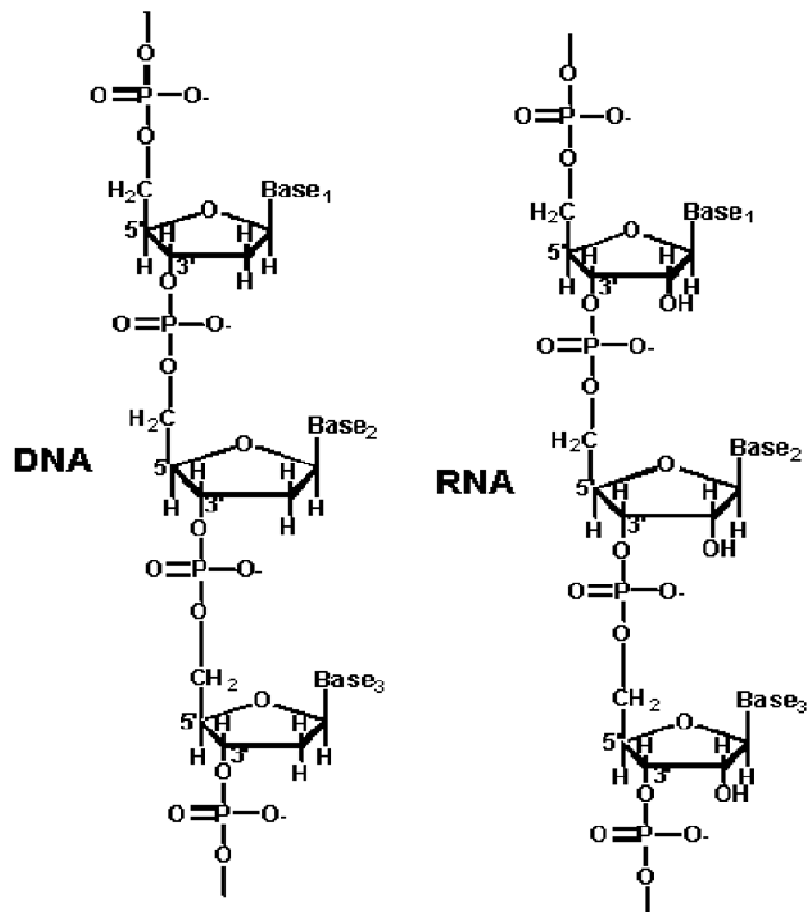


Fig. 5 Struttura degli ON

Ogni nucleotide contiene una base azotata “B” formata da un anello eterociclico di atomi di carbonio ed azoto, uno zucchero pentoso ed un gruppo fosfato¹⁸ (Fig.6).

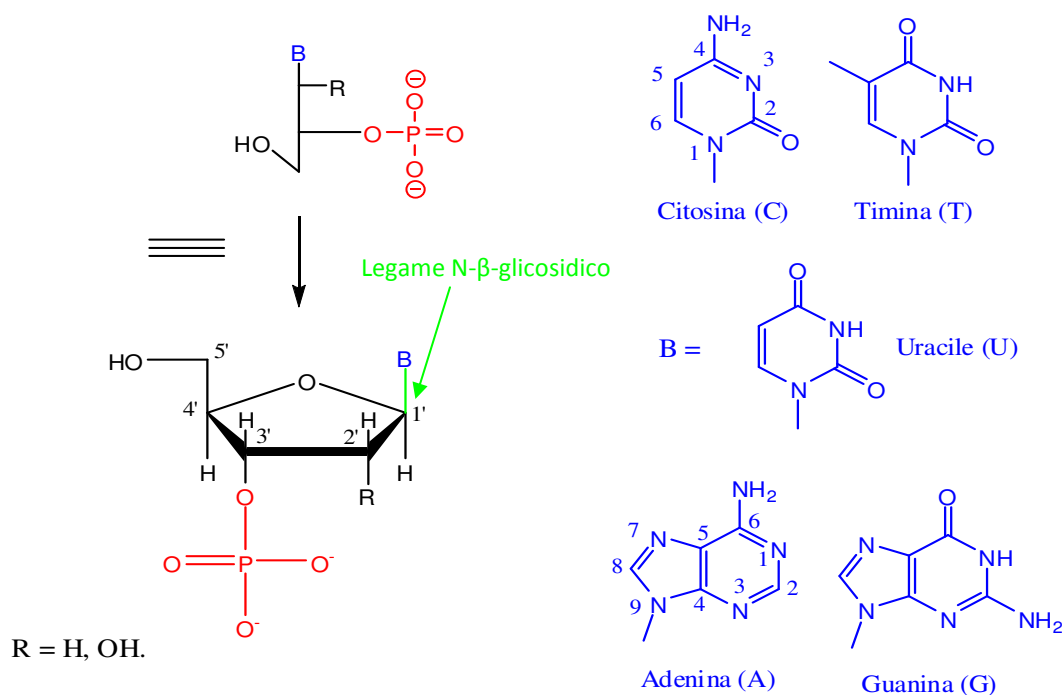


Fig. 6 Struttura dei nucleotidi costituenti gli acidi nucleici.

Le basi azotate rappresentate in blu in Fig.6, sono divise in due gruppi: puriniche e pirimidiniche. Le basi pirimidiniche possiedono un anello a sei atomi, mentre quelle puriniche presentano un anello a sei atomi fuso con uno a cinque atomi.

Ogni acido nucleico contiene due tipi di pirimidine e due tipi di purine: il DNA possiede le purine adenina (A) e guanina (G) e le pirimidine timina (T) e citosina (C), mentre nell'RNA è presente l'uracile (U) al posto della timina^{18a}.

Negli acidi nucleici sono inoltre presenti due tipi di zuccheri pentosi: nel DNA il 2'-desossiribosio, nell'RNA il ribosio. La differenza fra i due consiste nella presenza o meno di un gruppo ossidrilico in posizione 2'. I singoli nucleotidi si associano a formare un filamento di acido nucleico, mediante una serie di legami fosfodiesterici che si instaurano tra la posizione 5' di uno zucchero pentoso e la posizione 3' del pentoso successivo. Le basi azotate invece “sporgono” da questa impalcatura zucchero-fosfato.

In ogni catena nucleotidica, le funzioni ossidriliche presenti nelle estremità in 3' e in 5' sono libere^{1,18}.

Metodi di sintesi

Gli acidi nucleici sono molecole sensibili ad una vasta gamma di reazioni chimiche, le basi eterocicliche per esempio sono suscettibili di alchilazione¹⁹, mentre i legami fosfodiesterici internucleosidici vengono facilmente idrolizzati²⁰, inoltre condizioni di reazione acide possono causare la scissione del legame C1'-N β -glicosidico, particolarmente labile nei nucleotidi purinici, dando luogo all' indesiderata reazione di depurinazione²¹. Per questi motivi tutti i metodi impiegati per la sintesi di oligonucleotidi, si basano su condizioni di reazione piuttosto blande.

Sintesi del primo dinucleotide

Storicamente, la sintesi del primo dinucleotide **3** risale al 1955 quando Michelson e Todd⁴² accoppiarono due unità di timidina opportunamente funzionalizzate e protette, **1** e **2** (Fig.7). L'instabilità del 3'-fosforilcloruro **1** facilmente idrolizzabile, evidenziò immediatamente i limiti di tale reazione.

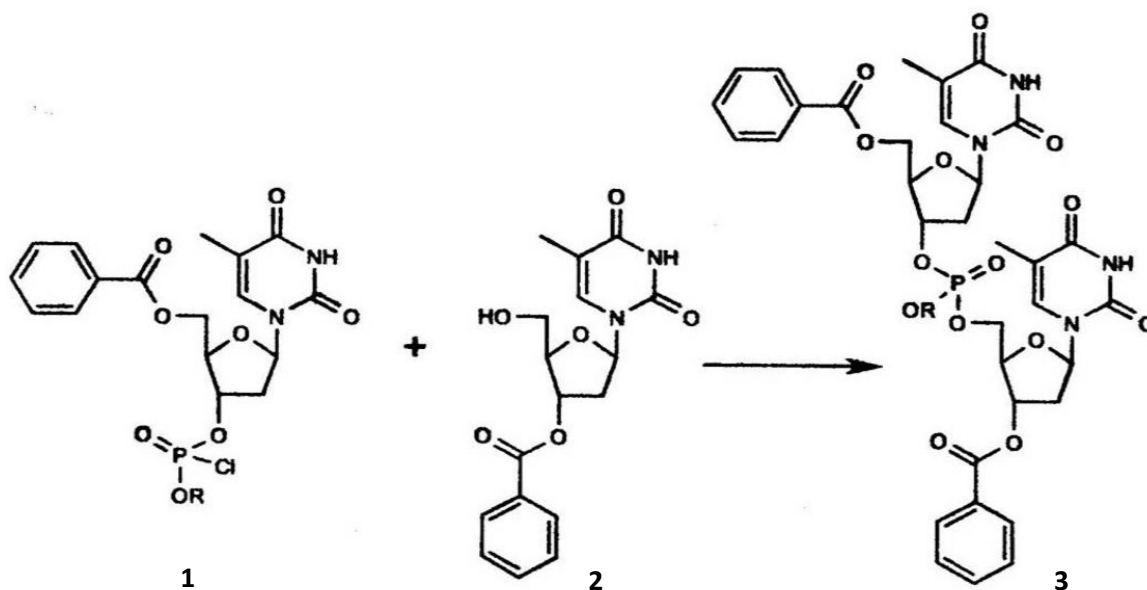


Fig. 7 Sintesi del primo dinucleotide.

Epoca di Khorana: concetto di protezione e metodo del fosfodiesteri

A partire dagli anni '50 e per tutto il ventennio successivo, un ricercatore lungimirante e creativo di nome H. Gobin Khorana (Università di Chicago), si interessò della sintesi di ON ed introdusse alcuni concetti fondamentali che si rivelarono poi necessari per sintetizzare sequenze oligonucleotidiche, con più di due unità monomeriche in successione²². Khorana prima di tutto intuì che il passaggio chiave della sintesi di oligonucleotidi, consiste nella formazione sequenziale e specifica di legami internucleosidici 3'-5'-fosfodiesteri.

L'accrescimento della catena oligonucleotidica può avvenire sia in direzione 5'- 3' che in direzione 3'- 5'. In particolare la biosintesi di acidi nucleici naturali, avviene a partire da unità di nucleosidi 5'-trifosfato e procede in direzione 5'- 3', mentre la sintesi chimica di oligonucleotidi, si realizza a partire da unità monomeriche di nucleosidi 3'-fosfato, al fine di sfruttare la maggiore reattività dell'ossidrile primario in 5', rispetto a quello secondario in 3', durante le reazioni di accoppiamento.

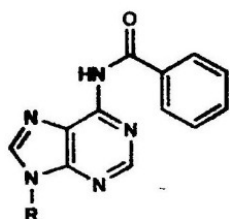
Quindi Khorana capì l'importanza di seguire un adeguato schema di protezione dei principali centri nucleofili presenti nelle unità nucleotidiche da assemblare (i gruppi ossidrilici in 5' e 3' e i gruppi amminici esociclici di adenosina, citidina e guanosina), per garantire la formazione specifica dei legami 3'- 5' fosfodiesteri, attraverso la rimozione selettiva e al momento desiderato dei corrispondenti gruppi protettori.

Ancora oggi le protezioni più largamente utilizzate sono proprio quelle introdotte da Khorana^{22,23} e si possono suddividere in due categorie: gruppi protettori "semipermanenti", rimovibili solo al termine delle reazioni di assemblaggio della intera catena oligonucleotidica, come quelli utilizzati per proteggere le funzioni amminiche esocicliche delle basi adenina, citosina e guanina²⁴ (Fig.8) e gruppi protettori "temporanei", che invece vengono eliminati alla fine di ogni ciclo di accoppiamento, ossia prima dell'aggiunta di una nuova unità monomerica (Fig.9).

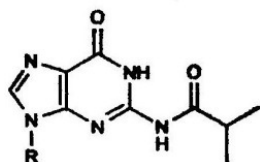
A quest'ultima categoria appartiene la protezione caratteristica dell'ossidrile in 5' sull'unità monomerica da assemblare, ossia il gruppo 4,4'-dimetossitriifenilmetile (dimetossitritile, DMT)²⁵.

Tra i gruppi trifenilmetilici quali tritile, monometossitritile e dimetossitritile (Fig.9), quest'ultimo è quello che viene più facilmente rimosso per blando trattamento acido, in presenza di acido tricloroacetico o dicloroacetico, in solventi non acquosi.

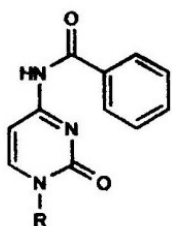
Il catione dimetossitritilico che scaturisce dalla scissione acida del legame etereo, è un cromoforo di colore rosso-arancio particolarmente stabile per via della delocalizzazione della carica positiva sugli anelli aromatici adiacenti.



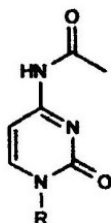
N-Benzoil Adenosina



N-Isobutirril Guanosina

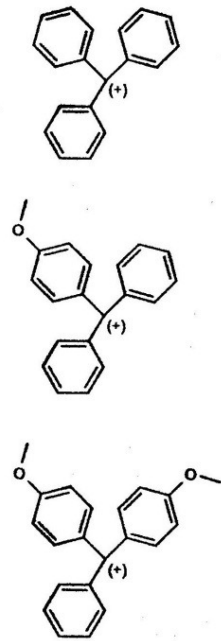


N-Benzoil Citidina



N-Acetil Citidina

Fig. 8 Gruppi protettori ammine esocicliche.



Catione tritilico "rosso"

Catione monometossitritilico "giallo"

Catione dimetossitritilico "arancio"

Fig. 9 Gruppi protettori trifenilmetilici.

Khorana inoltre mise a punto il primo importante approccio sintetico definito "metodo del fosfodiester" ²⁶ (Fig.10), in cui il nucleotide **4** (protetto in 5' e fosforilato in 3'), viene accoppiato ad un'unità nucleosidica **5** (protetta in 3' e con funzione ossidrilica in 5' libera), utilizzando l'agente condensante dicicloesil carbodiimmide (DCC).

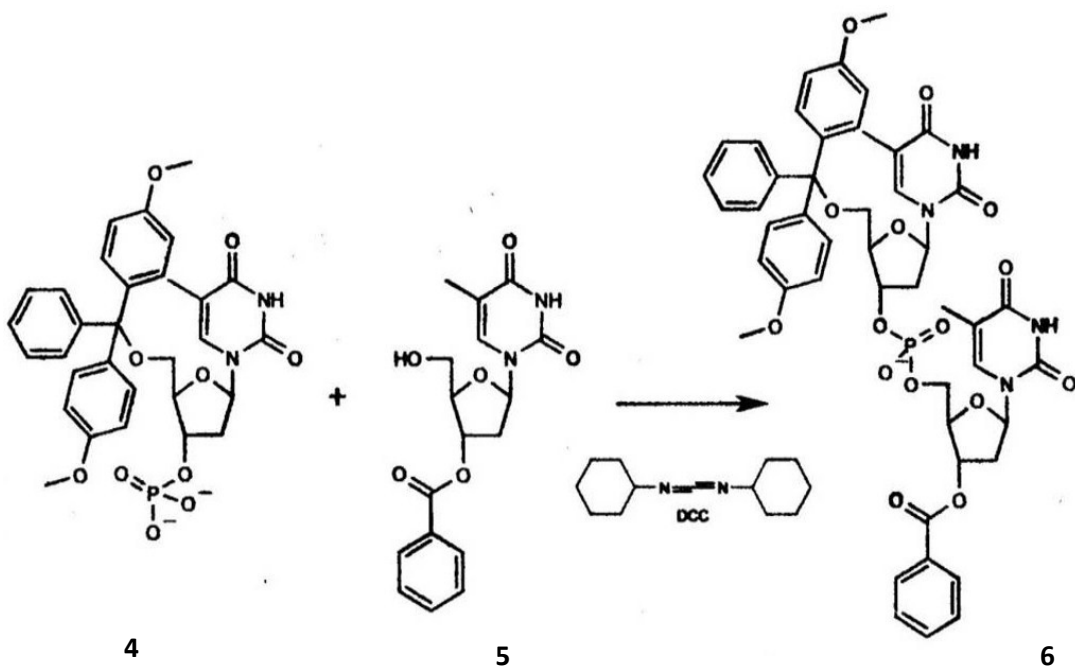


Fig. 10 Metodo del fosfodiester

Seppure rivoluzionario, questo metodo mostrò immediatamente un inconveniente piuttosto fastidioso, dovuto alla forte reattività del prodotto fosfodiesterico **6** che per successiva reazione di fosforilazione con un'altra unità nucleosidica **5**, forma molto facilmente pirofosfati trisostituiti **7** (Fig. 11). Negli anni a venire, l'introduzione di opportune protezioni anche sul gruppo fosfato, ha consentito di risolvere questi problemi e ha reso obsoleto il metodo del fosfodiesteri.

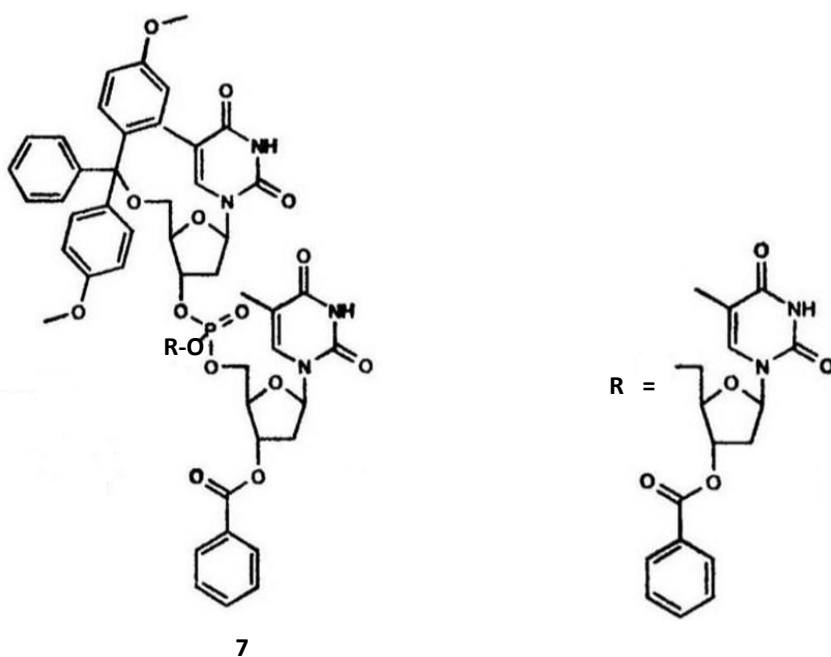


Fig.11 pirofosfato trisostituito

Epoca di Letsinger: sintesi in fase solida, metodo del fosfotriestere, metodo del fosfitotriestere e nascita dei primi sintetizzatori automatici

Negli anni '60 altri ricercatori come R.L. Letsinger e B. Merrifield, si interessarono della sintesi di biomacromolecole con particolare attenzione ai peptidi, la cui sintesi rappresentava a quei tempi un importante obiettivo.

Letsinger propose il primo schema ciclico di sintesi peptidica sfruttando la chimica in fase solida, ossia l'aggiunta sequenziale di unità monomeriche (in questo caso gli aminoacidi), a partire da un supporto solido direttamente funzionalizzato con il primo monomero aminoacidico. Merrifield però, pubblicò il primo lavoro in cui descriveva la sintesi peptidica in fase solida²⁷, che più tardi gli valse il premio Nobel.

Questo colpo di sfortuna non fece che spostare l'attenzione di Letsinger dalla chimica dei peptidi, alla nascente chimica degli oligonucleotidi. L'idea brillante fu quella di adattare il metodo di sintesi in fase solida proposto per i peptidi, alla sintesi di oligonucleotidi. A metà degli anni '60, venne descritto il primo esempio di materiale solido polimerico **8** funzionalizzato²⁸ con un'unità di 2'-desossicitidina **9**, mediante formazione di un legame ammidico grazie alla funzione amminica esociclica presente sulla base azotata (Fig.12).

Dal supporto solido così derivatizzato **10**, veniva assemblata la catena oligonucleotidica previa deprotezione della funzione ossidrilica in 5' **11**, in condizioni blandamente acide.

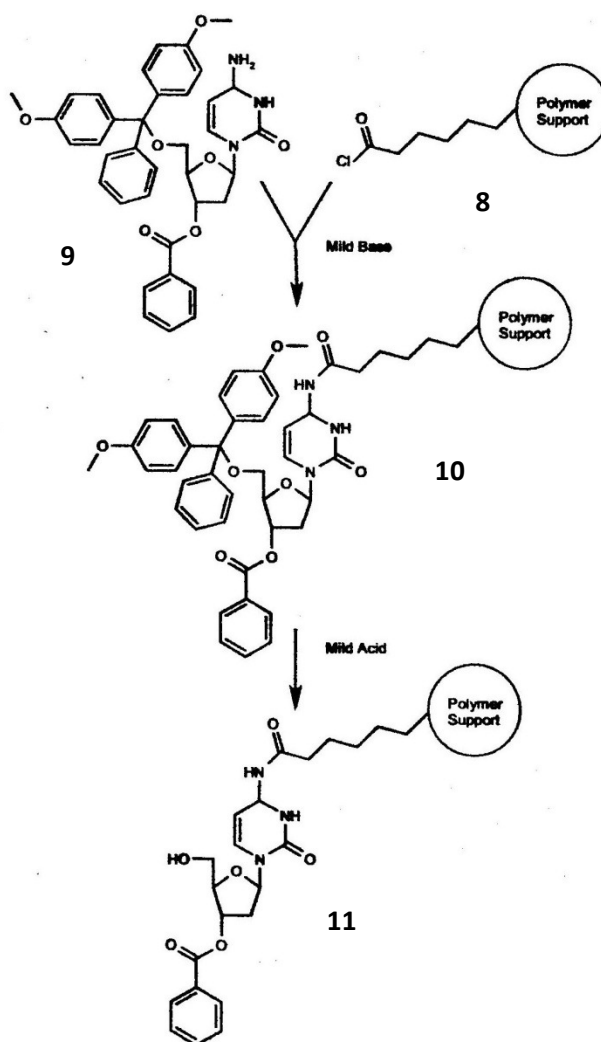


Fig.12 Esempio di supporto solido polimerico funzionalizzato

Continuando ad esplorare le tecniche di sintesi in fase solida, Letsinger dimostrò che il miglior approccio sintetico (ancora oggi utilizzato), si otteneva legando la prima unità nucleosidica al supporto solido, attraverso la funzione ossidrilica in posizione 3'²⁹, **13** (Fig.13). Egli inoltre sperimentò diverse matrici polimeriche, ma non riuscì mai a risolvere il problema dello "swelling", ossia l'effetto di rigonfiamento che le matrici stesse presentano in alcuni solventi organici, tanto da essere definite con disprezzo polimeri "popcorn". Questo problema sarebbe stato risolto all'inizio degli anni '80 da Marvin Caruthers (suo collaboratore nonché ex studente), con l'introduzione della matrice solida "controlled pore glass"³⁰ (CPG).

Senza ombra di dubbio, il contributo più importante di Letsinger fu la revisione del metodo di sintesi proposto dal Prof. Khorana, dal quale scaturì il nuovo "metodo del fosfotriestere"³¹ (Fig.13). Esso prevede la condensazione fra il nucleotide 5'-protetto, 3'-fosfodiestere **12**, ed il nucleoside **13** direttamente legato al supporto solido con funzione ossidrilica in 5' libera, per fornire il prodotto **14**.

L'aspetto innovativo ancora oggi utilizzato, consiste nella protezione del gruppo fosfato presente nel nucleotide **12** con β-cianoetile³², facilmente rimovibile post sintesi in soluzione di idrato di ammonio.

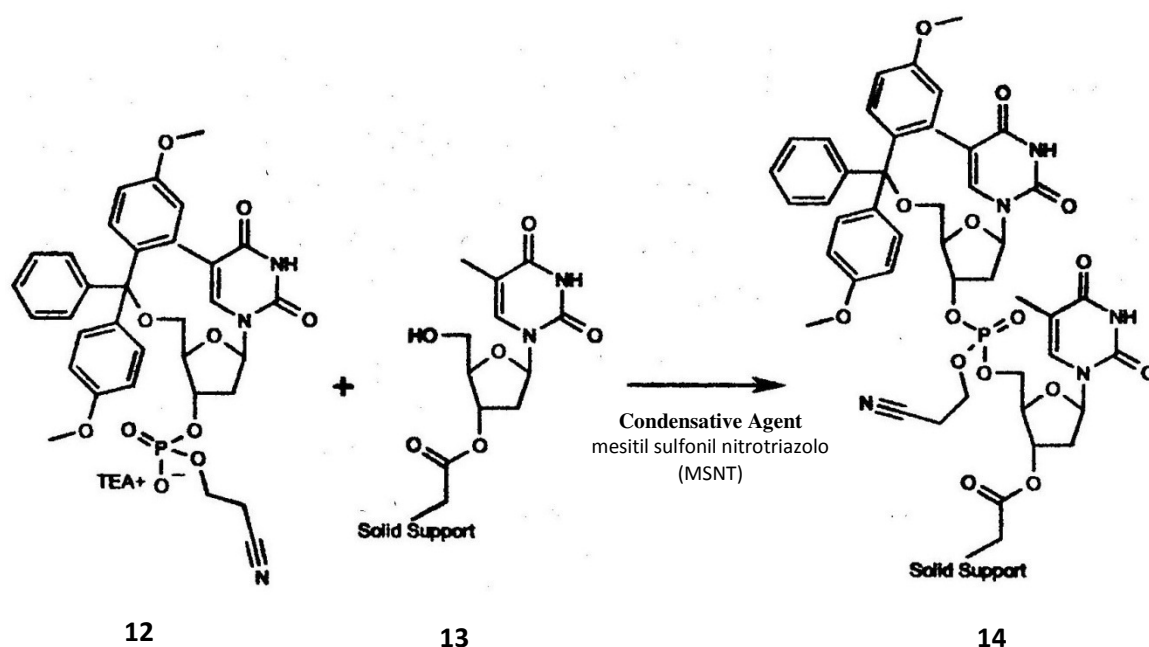


Fig.13 Metodo del fosfotriestere

Letsinger propose inoltre l'utilizzo di agenti attivanti più forti della dicicloesil carbodiimmide (DCC) e fra questi i più comunemente utilizzati furono arilsulfoniltriazol³² e tetrazoli³³, che ridussero fortemente i tempi di reazione fino ad un massimo di 15 minuti per ogni ciclo di accoppiamento.

L'ottimizzazione del metodo del fosfotriestere complessivamente ha richiesto una decina di anni³⁴ e al termine di questo periodo, la combinazione di una chimica relativamente semplice e riproducibile con la metodologia di sintesi in fase solida, ha portato all'automazione³⁵ del processo sintetico. Uno dei più famosi sistemi automatici di quell'epoca (fine anni '70) è stato "SAM I", sintetizzatore prodotto dall'azienda "Biosearch". In generale la semplicità di queste apparecchiature, permise anche i non chimici di realizzare la sintesi di sequenze oligonucleotidiche.

Purtroppo anche la chimica del fosfotriestere presentò ben presto alcuni punti deboli, principalmente legati alla scarsa efficienza della reazione di accoppiamento (95-97%), che non permetteva di sintetizzare catene oligonucleotidiche di lunghezza superiore a 20 residui. Per risolvere questo problema, Letsinger e collaboratori si adoperarono per sviluppare un più efficiente approccio di sintesi e nel 1976 definirono il metodo del "fosfito triestere"^{36,37} (Fig.14).

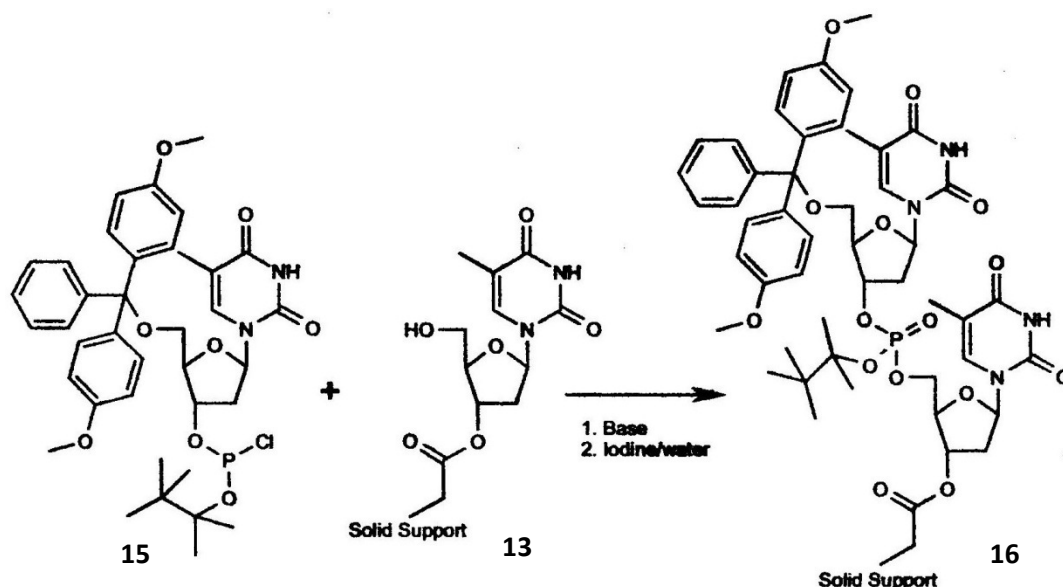


Fig 14 Metodo del fosfitotriestere

Il punto di forza di questa nuova strategia sintetica stava nella maggiore reattività dei fosfiti (P^{III}) **15** (Fig.14) rispetto ai fosfati (P^V) **12** (Fig. 13), con conseguente maggiore efficienza della reazione di accoppiamento che finalmente poteva raggiungere valori intorno al 98%, ulteriore riduzione dei tempi di reazione e possibilità di sintetizzare sequenze oligonucleotidiche con più di 20 residui. La stabilizzazione del ponte fosfato avveniva al termine di ogni fase di accoppiamento per ossidazione del fosfito triestere intermedio a fosfato triestere **16**, con iodio (I_2) in ambiente acquoso basico.

Purtroppo anche questo approccio sintetico presentò da subito alcuni inconvenienti, derivanti principalmente dall' eccessiva instabilità del composto **15** facilmente idrolizzabile, che per tale motivo doveva essere preparato in situ prima di ogni singola fase di accoppiamento e che per l' elevata reattività molto spesso causava la formazione del dimero 3'- 3' **17** (Fig.15).

Anche la chimica del fosfito triestere venne applicata su sistemi automatici di sintesi come quelli prodotti dalle società "Vega Biotechnologies" e "Biologics" (quest'ultima parzialmente costituita da studenti del prof. Letsinger).

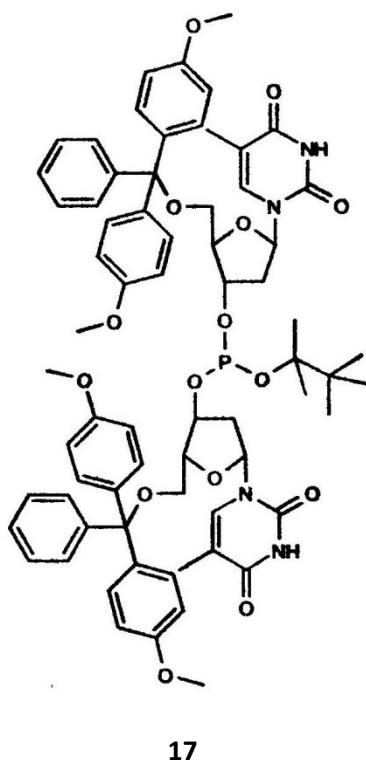


Fig 15 Addotto 3' – 3'

Epoca di Marvin Caruthers: metodo del fosforoamidito

L'approccio chimico del fosfito triestere venne acclissato nei primi anni '80 grazie alla introduzione di una nuova chimica, quella proposta da Marvin Caruthers con il metodo del "fosforoamidito"^{38,39}. Il contributo di Caruthers fu a dir poco triviale, egli si limitò semplicemente a sostituire il gruppo uscente cloruro nei nucleotidi di tipo 15 (Fig. 14), con un gruppo amminico e diede così origine ai famosi reattivi fosforoamiditi di tipo 19 (Fig.16). Ancora oggi i reattivi fosforoamiditi sono i più utilizzati per realizzare sintesi in fase solida su sistemi automatici, proprio in funzione della loro elevata stabilità sia allo stato solido (possono essere conservati per molti mesi a -20°C), che in soluzione in presenza di solventi anidri. Il ciclo di sintesi che corrisponde alla chimica del fosforoamidito, elegante nella sua semplicità, è rimasto invariato per circa un ventennio e ricalca quelli odierni (Fig.16).

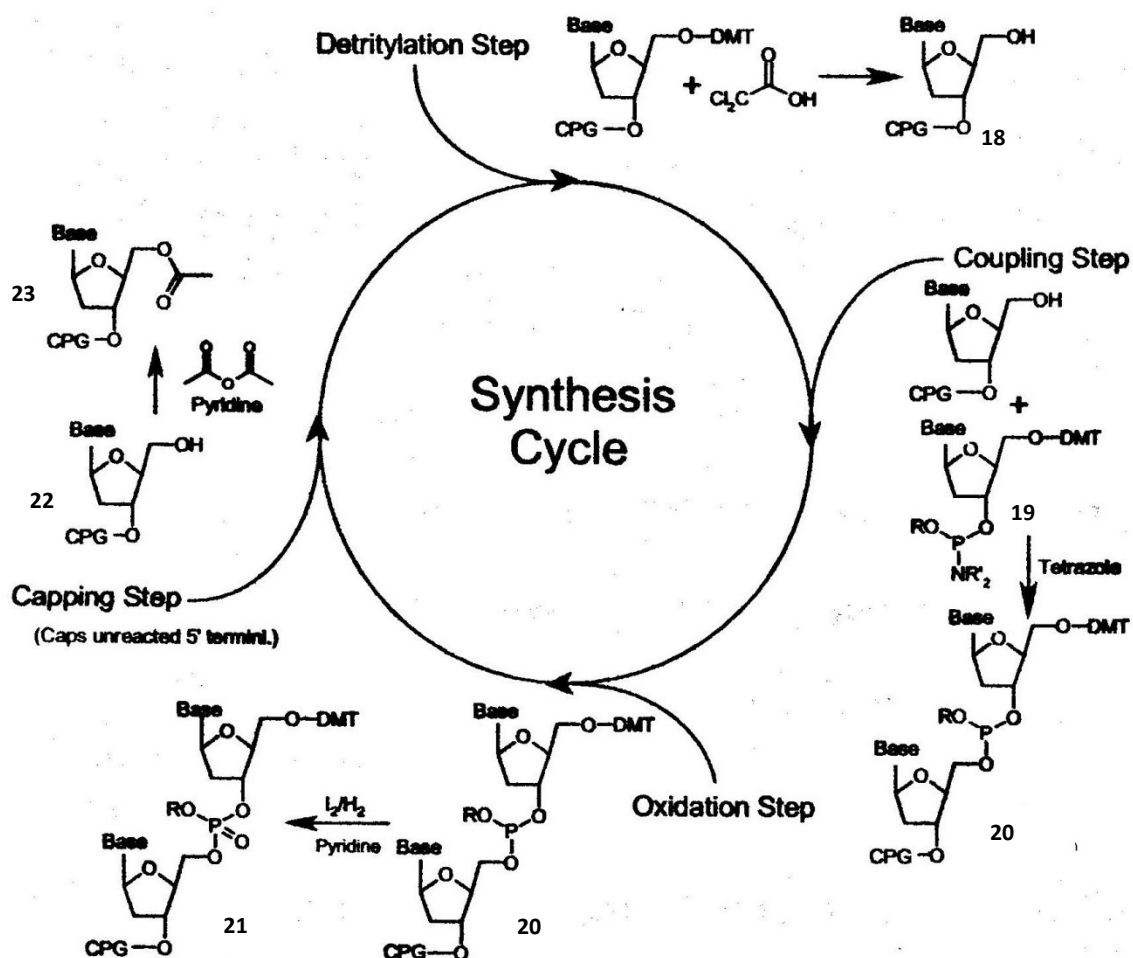


Fig 16 Sintesi ciclica metodo del fosforoamidito

La prima reazione detta detritilazione avviene in ambiente acido, (acido dicloroacetico al 2/3% in diclorometano) e consiste nella deprotezione dell' ossidrilica in 5' sulla prima unità nucleosidica direttamente legata al supporto solido (CPG) che fornisce il prodotto **18**. Successivamente il supporto viene lavato con acetonitrile anidro, per eliminare ogni traccia di acido e l'eventuale presenza di acqua.

Lo *step* più importante dell'intero ciclo di sintesi, è quello che consente di accoppiare un' unità fosforoamiditica entrante in forma attivata **19**, (attivazione mediante reattivi tetrazolici), determinando l'accrescimento della catena oligonucleotidica.

La reazione successiva è l'ossidazione del fosfito triestere **20** a fosfato **21** ed avviene nelle stesse condizioni proposte in origine da Letsinger (Fig.14, p. 21).

Infine la reazione con una miscela di anidride acetica e piridina, permette di bloccare le sequenze la cui funzione ossidrilica in 5' sia rimasta libera durante la fase di accoppiamento, fornendo sottoprodotti di tipo **23**. Ovviamente tutte le reazioni appena descritte si ripetono fino a garantire il completo assemblaggio della catena oligonucleotidica. Grazie alla chimica fruttuosa del fosforoamidito, l'interesse per la sintesi di oligonucleotidi è cresciuto in maniera esponenziale e sempre più aziende hanno immesso sul mercato nuovi sintetizzatori automatici. Sebbene la società che ha ottenuto i maggiori riscontri sia stata "ABI", che possedeva i diritti sul brevetto del Prof. Charutens, la crescente competizione ha avuto come conseguenza positiva, la riduzione dei costi delle apparecchiature di sintesi, diventate nel tempo sempre più accessibili. Molti ricercatori hanno quindi avuto a disposizione un elevato numero di sequenze oligonucleotidiche in quantità sufficiente per effettuare saggi in colture cellulari, sia acquistandole sul mercato, sia preparandole direttamente all'interno dei propri laboratori e la ricerca si è indirizzata sempre più sulle possibili e potenziali applicazioni degli oligonucleotidi a fini terapeutici⁵.

Gli oligonucleotidi modificati

Nonostante la razionalità del modello teorico per cui gli oligonucleotidi funzionano come regolatori dell'espressione genica, in pratica si presentano una serie di ostacoli evidenziati fin dal primo esperimento ad opera di Zamecnik e Stephenson^{5a}.

Tali problemi legati alla struttura degli oligonucleotidi, rimangono tutt'ora parzialmente irrisolti: si tratta della loro difficoltà di penetrare le membrane cellulari e della loro rapidità di degradazione ad opera di enzimi idrolitici.

Il problema della penetrazione cellulare "*up-take*" è dovuto alla natura poli-anionica dell'oligonucleotide⁴⁰, che non è in grado di attraversare per semplice diffusione le membrane cellulari lipidiche⁴¹. Discuteremo al capitolo 2 le modalità che consentono di superare questo limite.

Il problema della stabilità verso gli enzimi idrolitici invece, varia da caso a caso, in quanto dipende dalla presenza e dalla attività di tali enzimi, sia all'interno della cellula sia nei terreni di coltura, ma anche dalla velocità relativa con cui l'oligo è in grado di legarsi al suo bersaglio. Nel siero umano, così come nel citoplasma di vari sistemi cellulari, le nucleasi sono responsabili della rapida degradazione del DNA (e dell'RNA), con tempi di semivita dell'ordine di pochi minuti²⁴. Un modo per affrontare questi problemi è modificare la struttura dell'oligonucleotide, mantenendo la possibilità di riconoscimento delle basi complementari secondo Watson e Crick³. Le modifiche infatti cambiano la natura chimica dell'oligonucleotide e causano variazioni nella capacità di riconoscimento del filamento complementare (capacità ibridizzante) e nella stabilità dei complessi "*duplex*" e "*triplex*" (Fig.3, p.9 e Fig.4, p.10). La stabilità di una doppia e/o di una tripla elica, può essere analizzata seguendo le variazioni di assorbanza a lunghezza d'onda di 260 nanometri (nm), in funzione della temperatura. In corrispondenza della temperatura di fusione "*T_m*", le nucleo-basi prima impilate fra loro iniziano a muoversi liberamente con conseguente aumento dell'assorbanza (effetto ipercromico).

Vediamo a questo punto quali modifiche chimiche si possono apportare alla struttura oligonucleotidica (Fig.17), considerando che è possibile raggrupparle in tre diverse categorie, da ognuna delle quali scaturisce una generazione di oligonucleotidi.

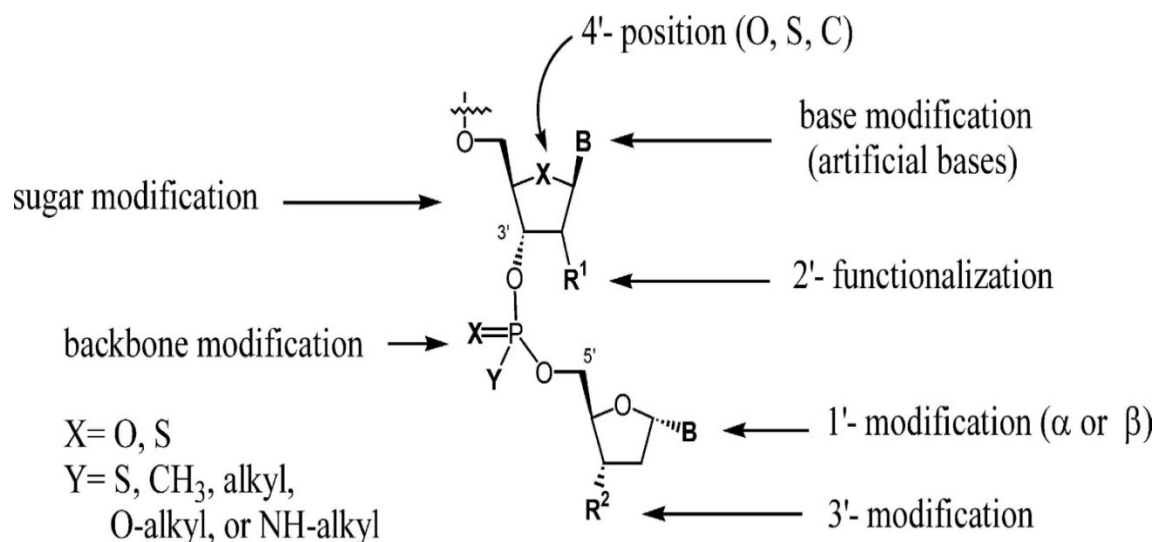
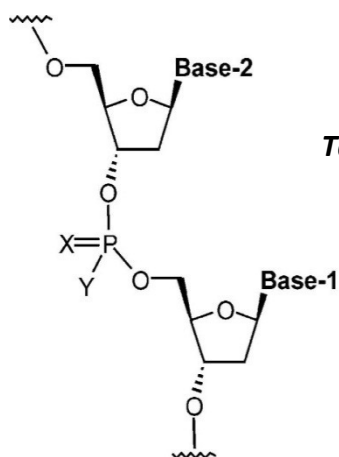


Fig. 17 Modifiche chimiche degli oligonucleotidi

Oligonucleotidi di 1^a generazione: modifiche del “ponte fosfato”

Gli ON di prima generazione sono analoghi degli ON naturali in cui uno o entrambi gli atomi di ossigeno non a ponte del gruppo fosfato (Fig.18), sono rimpiazzati da atomi di diversa tipologia (tab. 1.1.2).



Tab. 1.1.2 possibili modifiche ON 1^a generazione

X	Y	Trivial names
O	SH	Phosphorothioates
S	SH	Phosphorodithioates
O	Me	Methylphosphonates
O	OMe	Phosphoric acid triesters
O	NR ₂	Phosphoramidates

Fig. 18 ON di prima generazione a base DNA

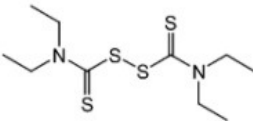
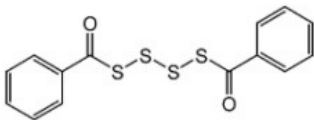
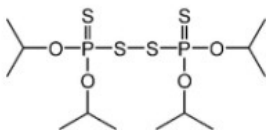
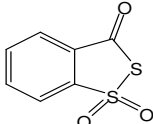
La principale conseguenza che deriva da queste modifiche, è l'introduzione di uno stereocentro sull'atomo di fosforo (P), che legato a quattro gruppi diversi fra loro (l'O-3', l'O-5', X e Y), può presentare configurazione R ed S⁴³.

Dato che la molecola possiede altri centri chirali come il C-1', il C-2' (solo nel ribosio), il C-3' e il C-4' dello zucchero, ne derivano composti con configurazioni diverse definiti "diastereoisomeri" con punti di fusione, solubilità, tempi di ritenzione e proprietà biologiche completamente diverse tra loro, in grado di interagire diversamente con il proprio *target*. Tra gli ON di prima generazione sono da ricordare i metilfosfonati⁴⁴ (Me-PS) e i fosfortioati^{44a,45} (PS), che presentano entrambi il fenomeno della diastereoisomeria al fosforo e che normalmente vengono impiegati come miscele diastereoisomeriche. In particolare i PS godono di grande popolarità per l'elevata stabilità alle nucleasi^{46,5c} e la discreta capacità ibridizzante⁴⁷, inoltre il loro funzionamento come antisense avviene mediante attivazione dell'enzima RNasi-H^{5c} e la loro sintesi si realizza semplicemente sostituendo lo stadio ossidativo del ciclo preparativo degli ON naturali, ottenibili via fosforoammidito (Fig.15, p.23), con uno stadio di sulfurizzazione ottenibile con diversi reagenti (Tab. 1.1.3)^{44a,45}.

L'*up-take* cellulare degli oligo-PS è più lento di quello degli oligo-fosfodiesteri, anche se sostanzialmente si realizza con lo stesso meccanismo: legame con recettori della superficie cellulare, processo di endocitosi con formazione di vescicole, rottura delle vescicole con liberazione dell'oligomero nel citoplasma e rapida entrata nel nucleo⁴⁸. I fosfortioati sono stati utilizzati la prima volta nel 1987 come potenziali inibitori di HIV⁴⁹ e dopo la loro comparsa in letteratura, la ricerca si è sbizzarrita nel sintetizzare le più svariate modifiche: fosforoselenolati⁵⁰, in cui il selenio sostituisce lo zolfo dei fosfortioati; α -fosfortioati⁵¹, in cui la base è diretta sotto il piano dello zucchero (cioè in direzione dell'OH in 3'); fosforoditioati^{44a,52} (PS2); ribofosfortioati⁵³; ecc.

Fra tali derivati i più studiati sono stati i fosforoditioati il cui principale vantaggio è di non essere chirali al fosforo. Un paragone fra l'uso di PS e PS2 come oligonucleotidi antisense è stato studiato da Cohen e collaboratori⁵⁴. Le conclusioni di tale lavoro hanno indicato che i PS2 non offrono particolari vantaggi in termini di efficacia rispetto all'uso dei PS a testimonianza del fatto che l'impiego di miscele diastereoisomeriche di oligo fosfortioati, non rappresenta un problema.

Tab. 1.1.3 reattivi tio-ossidanti per la sintesi di PS

Reagente	Descrizione	tempo di Tio-ossidazione
	Tetraethylthiuramdisulfide (= TETD Reagent) 0.5 M in anhydrous acetonitril	15 min
	Benzoyltetrasulfide 0.4 M in THF or dichloromethane	1 min
	Tetrakis-(2-methylethyl)-thioperoxy-diphosphate 0.5 M in acetonitril	15 sec
	3H-1,2-Benzodithiol-3-one (Beaucage reagent) 0.05 M in acetonitril	1 min

Oligonucleotidi di 2^a generazione: modifiche sull' -OH in 2' dello zucchero

I 2'-O-Alchilribonucleotidi^{44a,55} sono una classe di derivati dell'RNA in cui l'ossidrilico in 2' è eterificato con un gruppo alchilico (Fig.19). Tali oligomeri possono essere preparati sfruttando la chimica del fosforoamidato a partire da nucleotidi fosforoamidati come quelli mostrati in Fig.20. Le modifiche preferibili per la posizione 2' del ribosio sono la 2'-O-Metile⁵⁶ (2'-OMe) e 2'-O-Metossietile⁵⁶ (2'-OMOE).

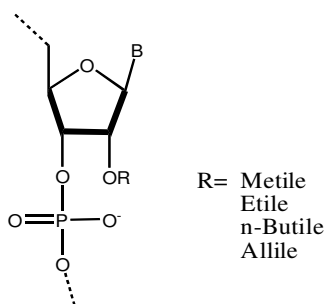


Fig. 19 2'-O-Alchilribonucleotidi

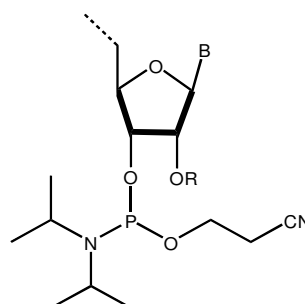


Fig. 20 Fosforoamiditi per sintesi di 2'-O-R

Tali modifiche, da una parte conferiscono all'oligo maggiore stabilità nei confronti della degradazione enzimatica, dall'altra non rendono possibile il meccanismo antisense in quanto non attivano l'enzima RNasi-H⁵⁷. Per quanto concerne la capacità ibridizzante, si riscontrano grosse variazioni in funzione del tipo di gruppo alchilico presente sull'-OH in 2' e a seconda che il filamento complementare sia un tratto di RNA o di DNA^{55,58,59,60}.

Più precisamente, la grandezza del gruppo sostituito in 2' contribuisce in maniera inversamente proporzionale alla capacità dell'ON di legare l'RNA o il DNA *target* e in maniera direttamente proporzionale alla resistenza dell'ON nei confronti degli attacchi delle nucleasi^{55,58,59,61}.

Oligonucleotidi di 3^a generazione:

La terza e più recente generazione di antisense è costituita da un insieme più eterogeneo di modifiche di cui riportiamo alcuni esempi.

Oligo-PNA

Gli oligo-PNA⁶² o acidi peptido nucleici (Fig.21), sono stati descritti per la prima volta da un gruppo di ricercatori danesi nel 1991⁶³. Essi mimano la struttura del DNA con uno scheletro di tipo peptidico a carattere non ionico, in cui le basi mantengono la distanza che avevano nel DNA originario e quindi sono in grado di riconoscere le basi complementari presenti sul filamento opposto. La sintesi di questi oligomeri segue i protocolli usati per la sintesi dei peptidi⁶⁵, essi presentano stabilità nei confronti di nucleasi, proteasi e peptidasi, inoltre non attivano l'RNasi-H⁶⁶. Il primo tentativo di impiego di PNA come inibitori della sintesi proteica è stato realizzato con successo nel 1992⁶⁷ e non essendo substrato per l'enzima RNasi-H, la loro azione antisense è legata ad effetti di ingombro sterico.

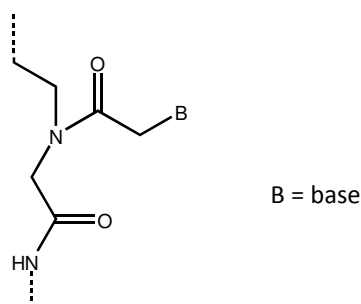


Fig. 21 Oligo-PNA

Oligo-MF

Gli oligo-MF⁶⁸ o fosforoammidati morfolino (Fig.22), sono analoghi del DNA non ionici, in cui il desossiribosio è rimpiazzato da un anello morfolinico e il legame fosfodiesterico da un fosforoammidato. Essi presentano ottima capacità di ibridizzare gli acidi nucleici⁶⁸, sono resistenti alle nucleasi^{68,69} e non attivano l' RNasi-H⁷⁰. Purtroppo essendo composti neutri presentano una scarsissima capacità di diffondere attraverso le membrane cellulari⁷¹ e per garantirne l'*uptake* cellulare è necessario utilizzarli in dosi massicce o in combinazione con molecole di DNA/RNA complementari⁷².

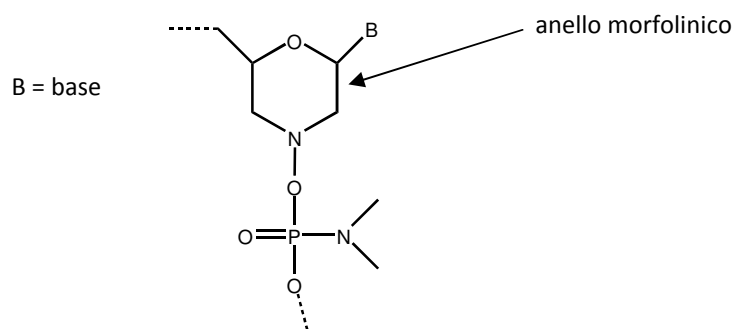


Fig. 22 Oligo-MF

Oligo-LNA

Gli oligo-LNA⁷³ o acidi nucleici bloccati (Fig.23) sono analoghi dell'RNA, sintetizzati per la prima volta nel 1998 e contenenti un ponte metilenico che connette l'ossigeno 2' del ribosio con il carbonio 4'. Tali oligomeri presentano elevata capacità di ibridizzare filamenti complementari di DNA/RNA⁷³, stabilità nei confronti delle nucleasi⁷³, elevata solubilità in ambiente acquoso⁷³ e la loro sintesi mediante sistemi automatici avviene con ottima efficienza⁷³. Oligomeri in forma chimerica LNA/DNA sono in grado di attivare l'enzima RNasi-H⁷⁴, inoltre esperimenti condotti su ratti hanno dimostrato che la loro attività biologica viene esibita senza problemi di tossicità⁷⁵.

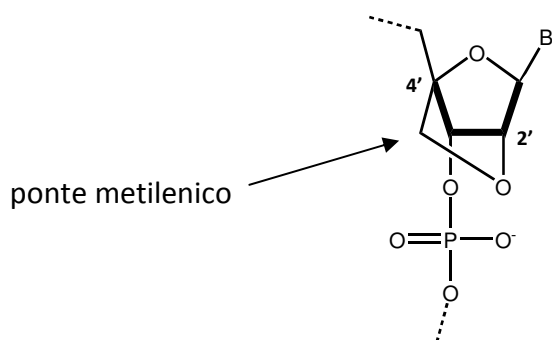


Fig. 23 Oligo-LNA

1.2 Risultati e discussione

Oligonucleotidi 2'-O-Metilefosforotioati (2'-OMePS)

Abbiamo visto precedentemente (p.25-30), come specifiche modifiche chimiche apportate alla struttura oligonucleotidica, consentano di preservarne l'integrità nei confronti di attacchi da parte di enzimi idrolitici (eso ed endo nucleasi).

In realtà tali modifiche influenzano anche un'altra importante caratteristica degli ON, ossia la loro capacità di attuare l'inibizione genica, secondo specifici meccanismi "*code blockers*"⁴. Per esempio, la Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD), è una malattia genetica causata da una mutazione del gene che codifica per la proteina distrofina, la cui sintesi viene drasticamente compromessa. Per un sottoinsieme di mutazioni che causano DMD, l'utilizzo di ON il cui meccanismo di inibizione genica avviene mediante "*Exon Skipping*" si è dimostrato particolarmente efficace nella modulazione dello "*splicing*", operazione di "taglia e cuci" che permette di passare dal pre-mRNA (in questo caso contenente il "difetto genico"), al m-RNA maturo (in cui tale difetto risulti soppresso), al fine di ripristinare una proteina distrofina di tipo funzionale, (vedi articolo allegato: "*Cationic PMMA nanoparticles bind and deliver antisense oligoribonucleotides allowing restoration of dystrophin expression in the mdx mouse*").

Vediamo più precisamente cosa si intende per modulazione dello *splicing* mediante *exon skipping*. In Fig.24 A (riquadro in alto a sinistra), si riporta uno schema che esemplifica quello che accade quando la sintesi di una generica proteina avviene senza problemi. L'informazione genetica trasportata dai geni viene trascritta nell'RNA messaggero primario, costituito da regioni esoniche contenenti l'informazione genetica (zone verdi) alternate a regioni introniche la cui funzione è di semplice regolazione. In seguito a *splicing* le regioni introniche vengono tagliate e quelle esoniche vengono assemblate a costituire l'RNA messaggero maturo, contenente un "messaggio" dotato di senso compiuto ossia "in lettura", che successivamente viene tradotto nella proteina corrispondente. Quando un esone presenta una mutazione (Fig. 24 B, lettera rossa nel riquadro in alto a destra), in seguito a *splicing* si ottiene un RNA messaggero il cui messaggio è privo di senso compiuto ossia è "fuori lettura" e non porta alla sintesi della proteina corrispondente. L'*Exon Skipping* (riquadro in basso a destra, Fig. 24 C) è un approccio di terapia genica che mira ad eliminare il "danno molecolare" agendo

direttamente sul pre-mRNA che codifica per una determinata proteina.

Più dettagliatamente, in Fig.25 viene mostrato come l' ON (rappresentato da un segmento giallo) appaiandosi al pre-mRNA, favorisca l'omissione (*SKIPPING*) dell'esone corrispondente alla regione geneticamente mutata. Il ripristino di uno schema di lettura corretto del gene, ristabilisce la sintesi proteica.

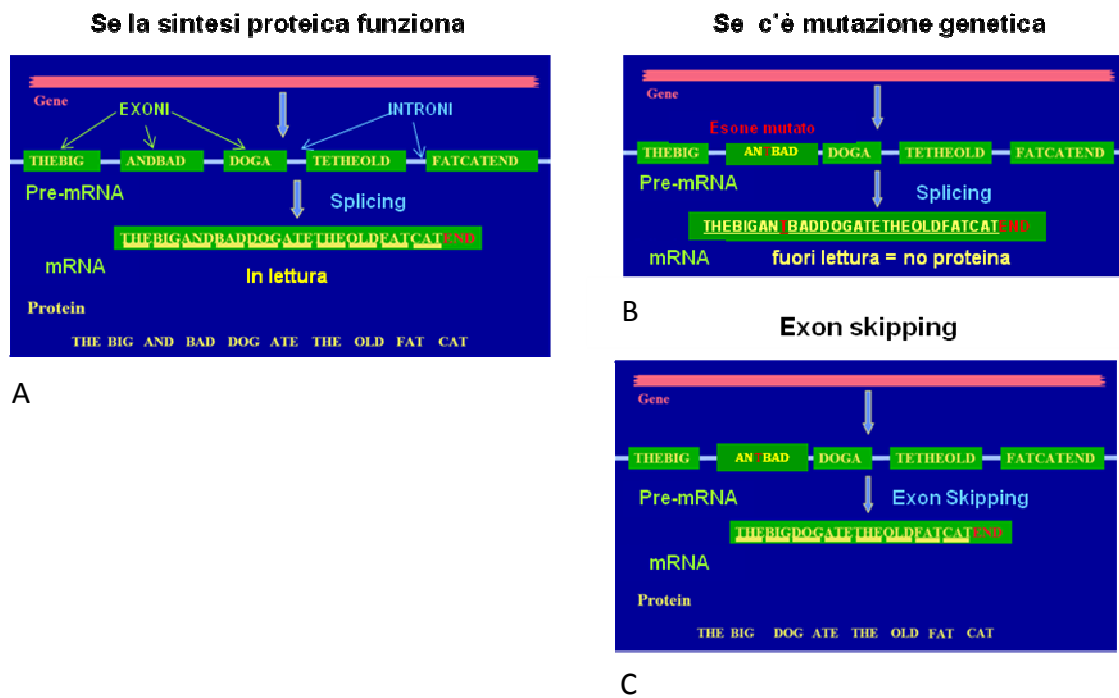


Fig.24 Sintesi proteica: quando avviene e quando no

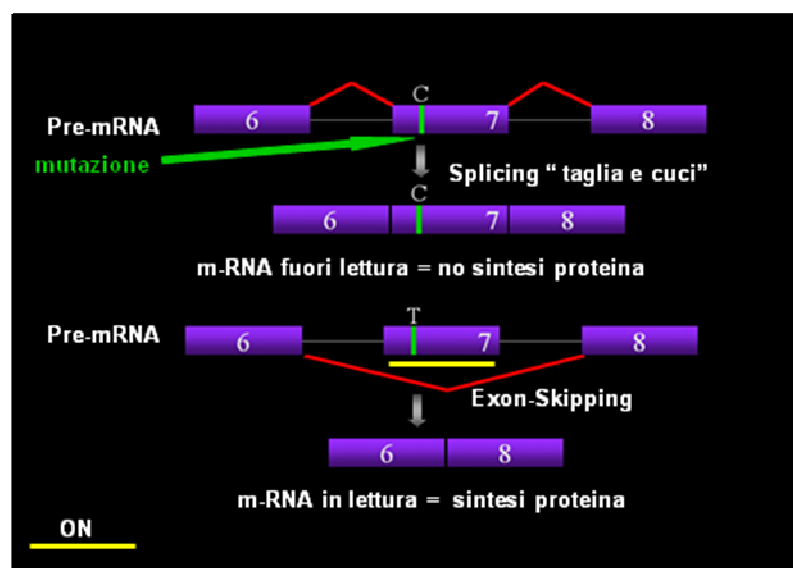


Fig25. Meccanismo dell'exon skipping

La proteina sintetizzata, pur essendo più corta di quella originale, è comunque funzionale e permette di passare da una distrofia muscolare grave di tipo Duchenne (DMD) ad una meno grave di tipo Becker (BMD). Grazie alla ricerca scientifica sono state delineate una serie di proprietà che gli ON il cui meccanismo di inattivazione genica avviene mediante *exon skipping* devono necessariamente possedere: essi devono esibire stabilità nei confronti delle nucleasi, capacità di penetrare ed accumularsi nel nucleo delle cellule, elevata affinità e specificità nei confronti del pre-m-RNA target; ma soprattutto non devono attivare l'RNasi-H (Fig.3E, p.9), enzima idrolitico che causerebbe la degradazione del filamento di m-RNA *target*, con blocco anticipato della sintesi proteica. Gli oligonucleotidi fosforotioati (PS), che fra quelli di prima generazione sono i più ampiamente studiati (p.26-27), presentano diverse limitazioni riguardo il loro impiego nella modulazione dello *splicing*. Infatti a dispetto dell'elevata resistenza nei confronti delle nucleasi⁴⁶ (se comparati con gli ON naturali fosfodiesterici), essi stimolano la degradazione dell'm-RNA mediante meccanismo RNasi-H dipendente^{5c}; inoltre la presenza del legame P=S sul ponte fosfato, ne riduce l'affinità nei confronti dell' RNA *target* (si stima infatti che per ogni legame P=S, la temperatura di fusione "Tm" subisca una variazione $\Delta Tm = -0.5/-1^\circ C$)⁴⁷ e produce effetti tossici riferibili a interazioni proteina-oligo(PS) non specifiche^{76,77}. D'altra parte anche gli oligonucleotidi di seconda generazione (2'-O-Alchili, p.28-29) che rispetto agli oligo-PS presentano maggiore affinità nei confronti del RNA target⁶⁰, maggiore resistenza rispetto alle nucleasi⁶¹, non danno problemi di tossicità e non attivano l'RNasi-H⁵⁷, non offrono comunque risultati soddisfacenti, perché presentano tuttavia una minore specificità nei confronti dell'RNA target⁶⁰. Come dimostra la letteratura⁷⁸, soltanto ON contenenti entrambe le modifiche P=S e 2'-OMe (oligo 2'-OMePS) (Fig.26), permettono di ottenere buoni risultati nella modulazione dello *splicing* del pre-mRNA attraverso il meccanismo di "Exon skipping".

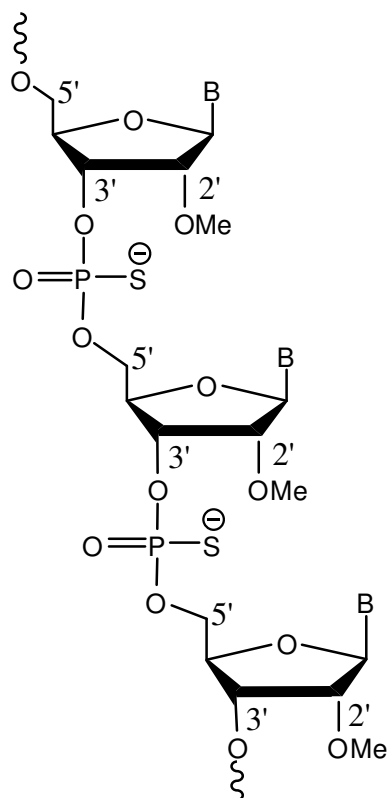


Fig. 26 ON 2'-OMePS

Il lavoro svolto in questa tesi si inserisce in un progetto interdisciplinare, che coinvolge diversi gruppi di ricerca fra i quali in particolare il gruppo di Genetica Medica di Ferrara, diretto dalla Prof. Alessandra Ferlini. Tale progetto prevede lo studio di un approccio terapeutico innovativo per la cura delle distrofie muscolari su base genetica.

Per quanto riguarda il nostro contributo, nella prima parte del dottorato di ricerca si è focalizzata l'attenzione sullo studio e sulla messa a punto di una propria metodologia per la sintesi automatizzata e per la successiva purificazione di oligonucleotidi a base RNA lunghi dai 20 ai 25 nucleotidi, modificati in tutta la loro lunghezza come 2'-OMePS.

In un secondo momento invece, è stato avviato uno studio riguardante la sintesi di nuovi nucleosidi 2'-funzionalizzati, da poter successivamente utilizzare come *building blocks* nell'ambito della sintesi di nuovi oligonucleotidi chimicamente modificati, di cui discuteremo al capitolo 2.

Il sintetizzatore automatico "AKTA oligopilot 10 PLUS"

L'assemblaggio chimico di ogni singola catena oligonucleotidica si può suddividere in due stadi: il primo, di cui parleremo nei paragrafi successivi, consiste nella sintesi automatica in fase solida dell'ON, il secondo invece consiste in una operazione manuale di deprotezione e distacco dell'oligo dal supporto solido sul quale si è sviluppato (p. 67).

Le sintesi in fase solida, sono state realizzate utilizzando un oligosintetizzatore automatico di ultima generazione "AKTA oligopilot 10 PLUS" della *General Electric "GE Healthcare"* (Fig. 27).

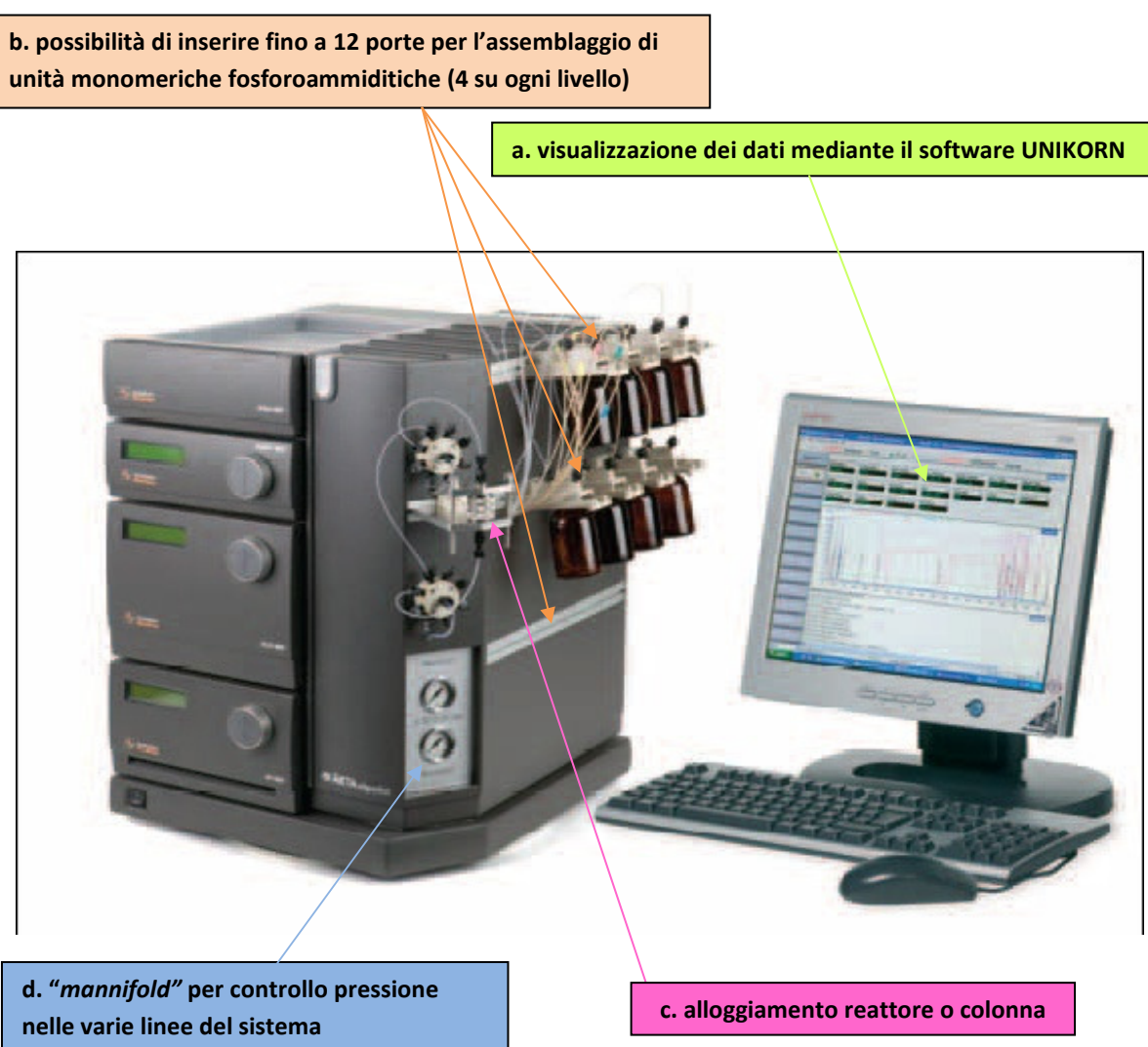


Fig. 27 Sintetizzatore "AKTA oligopilot 10 PLUS"

L'oligosintetizzatore *AKTA oligopilot 10 plus*, a differenza della maggior parte degli oligosintetizzatori più datati, permette di lavorare in un ampio intervallo di scala di sintesi da 1 a 50 μmolare senza eccessivi consumi di reagenti.

Presenta inoltre elevata flessibilità riguardo la scelta e programmazione dei metodi di sintesi, che vengono di volta in volta impostati utilizzando il "software UNIKORN" (Fig. 27a). Tale *software* permette inoltre di programmare fino a sette sintesi in sequenza e consente un costante monitoraggio "on-line" dei parametri più importanti legati al processo di sintesi come la pressione del sistema, la conducibilità dei reagenti, il loro assorbimento UV-Visibile, nonché l'andamento dell'efficienza della reazione di "coupling". La possibilità di impostare il metodo di sintesi più adeguato, unitamente alla disponibilità di ben 12 "porte" per l'entrata delle singole unità monomeriche fosforoamiditiche (Fig.27b), permette di realizzare la sintesi di molte tipologie di oligonucleotidi, da quelli a base DNA e/o RNA fosfodiesteri classici, a quelli modificati (ad es.: fosforotioati "full length" o "chimerici"), a quelli contenenti una o più unità nucleotidiche funzionalizzate (possibilità di cui discuteremo al capitolo 2).

AKTA oligopilot 10 plus è un sintetizzatore compatto che grazie ad un doppio sistema di pompe, (pompe A e B "P-903", Fig.28), funziona a pressione variabile da 0-250 bar mantenendo costante il flusso dei reagenti all'interno della colonna di reazione, il cui valore può raggiungere un massimo di 10ml/min.

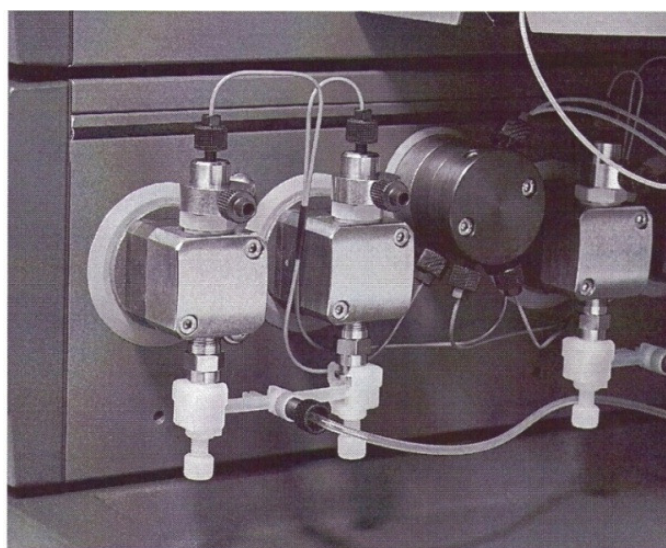


Fig. 28 Pompe P-903 A e B

Sintesi in fase solida

Il supporto solido utilizzabile per la sintesi in fase solida deve possedere una serie di requisiti fra i quali: sufficiente rigidità e resistenza alla pressione, derivatizzabilità con gruppi funzionali, insolubilità ed inerzia nei confronti di reagenti e solventi impiegati, non deve rigonfiare ed deve possedere elevata porosità, al fine di facilitare l'accesso ai reagenti grazie ad una maggiore area superficiale a disposizione.

Tra i molti tipi di supporto proposti ha trovato diffuso impiego il vetro a porosità controllata (CPG)⁷⁹: rigido, non rigonfiabile, chimicamente inerte, con capacità di caricamento variabile da 10 a 50 $\mu\text{moli/g}$. Esso generalmente è funzionalizzato con molecole spaziatrici (Fig.29), capaci di portare i gruppi funzionali ai quali è ancorato l'OH-3' del primo nucleoside lontano dalla superficie del supporto stesso, così da facilitare l'accesso delle varie specie chimiche reattive.

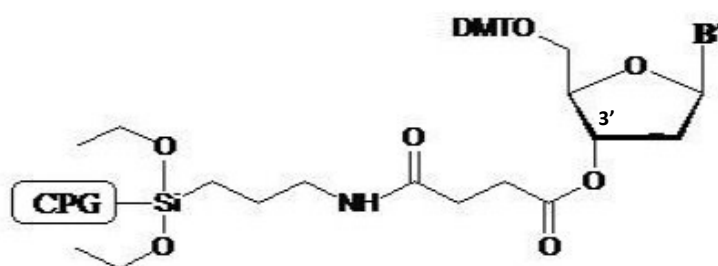


Fig. 29 CPG funzionalizzato con molecole spaziatrici

Qual'ora la sintesi chimica in fase solida sia incompatibile o inefficace se effettuata su microsfere di vetro (CPG), è possibile utilizzare supporti solidi di natura polimerica.

Allo stesso modo di CPG, la maggior parte dei supporti solidi polimerici viene funzionalizzata con la prima unità 3'-nucleosidica, che generalmente si lega ad essi attraverso una molecola spaziatrice che fa da "linker". Nel nostro caso il materiale polimerico utilizzato "Primer Support 200TM" (Fig.30a), costituito da microsfere di polistirene inerti di dimensione pari a 30 μm , funzionalizzate con unità 3'-nucleosidiche attraverso ponti succinici (Fig.30b), permette di realizzare sintesi di oligonucleotidi secondo la chimica del fosforoamidito, garantendo rese superiori rispetto a quelle ottenibili con CPG vista la maggiore capacità di caricamento (per CPG da 10 a 50 $\mu\text{moli/g}$ massimo; per Primer Support 200TM fino ad un massimo di 200 $\mu\text{moli/g}$), la riduzione dei

consumi di solventi e di ammiditi e la conseguente riduzione dei costi. A parità di volume di colonna, il valore massimo di scala di sintesi ottenibile utilizzando CPG è di gran lunga inferiore rispetto a quello che si ottiene con *Primer Support 200TM* (ES.: utilizzando colonne di tipo *small cassette* (Fig.32b, p.39), il cui volume è variabile fino ad un massimo di 0.6ml, la maggior scala di sintesi raggiungibile con *primer support 200TM* è pari a 7 μ molare, mentre con CPG al massimo si possono effettuare sintesi su scala variabile da 1 a 1.5 μ molare). *Primer Support 200TM*, possiede inoltre caratteristiche di resistenza ed inerzia chimica tali da evitare contaminazioni del prodotto di sintesi con sottoprodotti derivanti dalla decomposizione del supporto stesso. In questo modo viene garantito un maggior grado di purezza degli oligo sintetizzati, che pertanto possono essere utilizzati anche per applicazioni in campo terapeutico.

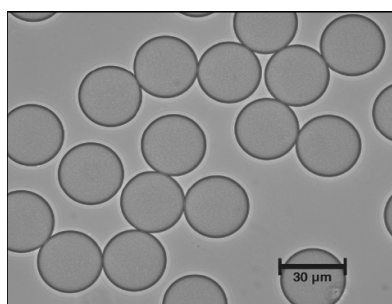


Fig. 30a Microsfere in polistirene del *Primer Support 200*

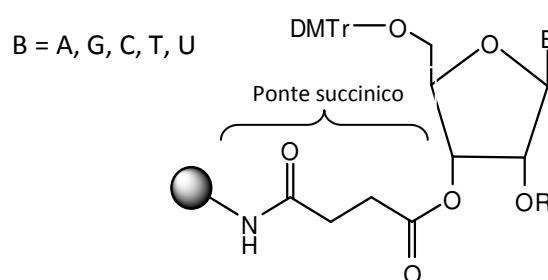


Fig. 30b Supporto solido polimerico funzionalizzato con la 1^a unità nucleosidica

Ad oggi per soddisfare le più disparate esigenze di sintesi, *Primer Support 200TM* prodotto direttamente presso l'azienda *GE Healthcare*, è reperibile in diverse tipologie recanti le più svariate funzionalizzazioni sull'unità nucleosidica direttamente legata al supporto stesso: da molecole spaziatrici, a modifiche sulle basi azotate, alla presenza di gruppi protettori o altre molecole di varia natura.

In particolare per sintesi di oligo a base RNA 2'-OMePS, i 4 "*primer supports*" necessari, sono riportati in Fig.31. Si noti come le funzioni amminiche esociliche presenti sulle basi azotate e gli ossidrili in posizione 2' e 5' siano adeguatamente protetti. *Primer Support 200TM* infine, presenta diverse capacità di caricamento espresse in μ mol per grammo di supporto. Fra queste quelle che noi abbiamo utilizzato sono le capacità 80 μ mol/g e 200 μ mol/g, scelte di volta in volta in base alle esigenze di scala di sintesi.

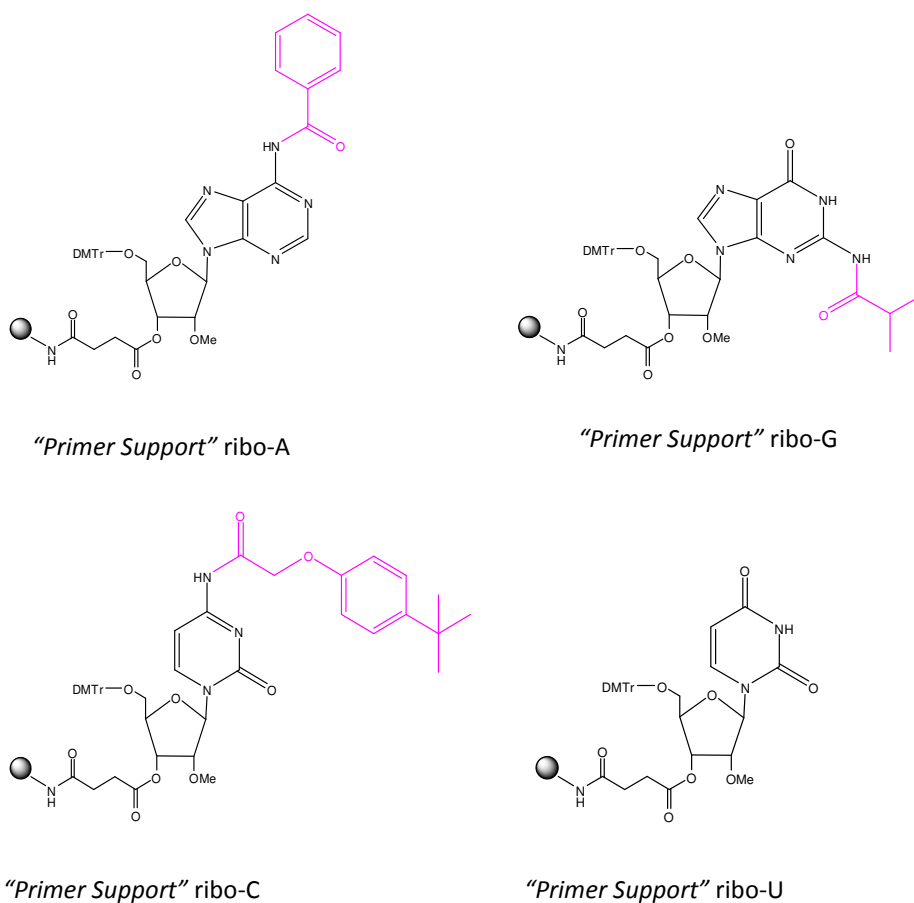


Fig. 31 *Primer Support 200TM* per la sintesi di oligoribonucleotidi 2'-OMePS

Le colonne di reazione a nostra disposizione, necessarie per caricare il supporto solido, sono di due tipologie e la loro dimensione è ancora una volta legata alla scala di sintesi. In particolare in Fig.32a si riporta la colonna in acciaio (*steel column*) a volume fisso di 1.2ml che può essere utilizzata per sintesi su scala 10, 20 o 50 μ molare e in Fig. 32b, la colonna in materiale polimerico (*small cassette*), a volume variabile fino ad un massimo di 0.6ml, impiegata per realizzare sintesi nell'intervallo di scala 1-7 μ molare.



Fig.32a
“Steel column” per sintesi su scala
10-50 μ molare

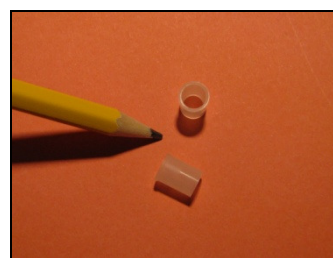


Fig.32b
“Small cassette” per sintesi
su scala 1-7 μ molare

In tabella 1.2.1 sono riportate le scale di sintesi riconducibili alla tipologia di colonna e al *loading* del *Primer Support 200TM*. L'equazione che ci consente di "settare" con precisione i vari parametri di sintesi è:

$$\text{Scala di sintesi } (\mu\text{mol}) = \text{Quantità di } \textit{Primer Support 200}^{\text{TM}} \text{ (g)} \times \text{Loading di } \textit{Primer Support 200}^{\text{TM}} \text{ } (\mu\text{mol/g}).$$

Tab. 1.2.1 scala di sintesi, tipo di colonna e *loading* *Primer Support 200TM*.

Capacità della colonna	Scala di sintesi in μmoli con <i>Primer Support 200</i> a capacità di caricamento:		
	40 $\mu\text{moli/g}$	80 $\mu\text{moli/g}$	200 $\mu\text{moli/g}$
<i>small cassette</i> (5-35mg) CV = 0.6ml max	0.2-1.4	0.4-2.8	1-7
<i>steell column</i> (250mg) CV = 1.2 ml	10	20	50

Quindi riassumendo, prima di ogni sintesi è necessario scegliere un supporto solido che presenti adeguata capacità di caricamento e che sia funzionalizzato con la giusta unità nucleosidica opportunamente protetta, la quale diventerà l'unità nucleotidica 3' terminale dell' oligo sintetizzato. Una volta effettuata tale scelta si procede pesando accuratamente il *Primer Support 200TM*, lo si carica nella colonna di reazione e lo si impacca con solvente acetonitrile (CH_3CN). La colonna di sintesi viene successivamente alloggiata nel reattore del sintetizzatore (Fig.27c, p.35) e collegata al resto della macchina. Un sistema di filtri di adeguata porosità, posizionati all'estremità inferiore e superiore della colonna (Fig.33), assicura che il supporto solido non fuoriesca dal reattore, entrando nelle linee del sistema automatico e causandone l'ostruzione.

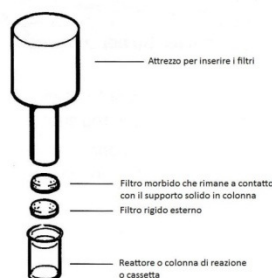


Fig.33 Disposizione filtri in colonna

Messa a punto della sintesi di oligonucleotidi 2'-OMePS

Nell'esecuzione di questo lavoro di messa a punto dei parametri da impiegare nella sintesi in fase solida di oligonucleotidi a base RNA 2'-OMePS, si è deciso di studiare prima le sintesi comprese nell'intervallo da 1 a 7 μ molare che impiegano una colonna a volume variabile, per poi passare in un secondo tempo alla definizione dei parametri per le sintesi su scala maggiore che avvengono nella "steel column" a volume fisso.

In particolare, per sintesi su scala 2 μ molare si è scelto di impiegare un supporto solido con capacità di caricamento pari a 80 μ mol/g, mentre per sintesi su scala 7 è stato impiegato il supporto con capacità 200 μ mol/g. La scelta di queste capacità di *loading* è stata fatta anche sulla base della lunghezza degli oligonucleotidi che in entrambi i casi contengono dai 20 ai 25 nucleotidi (N= 20-25).

Lo studio iniziale è stato effettuato su un oligomero lungo 25 unità nucleotidiche (25-mer) siglato in questo lavoro come M23D, utilizzato per studi di *exon skipping* su topo *mdx* (modello animale per la Distrofia Muscolare di Duchenne, il cui gene codificante per la proteina distrofina, presenta una mutazione in corrispondenza dell'esone 23), con sequenza in direzione 5'-3' pari a "ggccaaaccucggcuuaccugaaau".

La sintesi di oligo 2'-OMePS si basa sulla chimica del fosforoammidito^{38,39} (p.23-24) e lo schema di sintesi ricalca quello proposto da Caruthers e McBride^{39a} negli anni '80. Esso consiste nell'accoppiamento successivo di nucleotidi fosforoammiditi per ottenere oligomeri N-mer, (dove N=numero dei nucleotidi della catena oligonucleotidica), di lunghezza e sequenza desiderate ed è suddiviso in quattro *steps* (Fig.34).

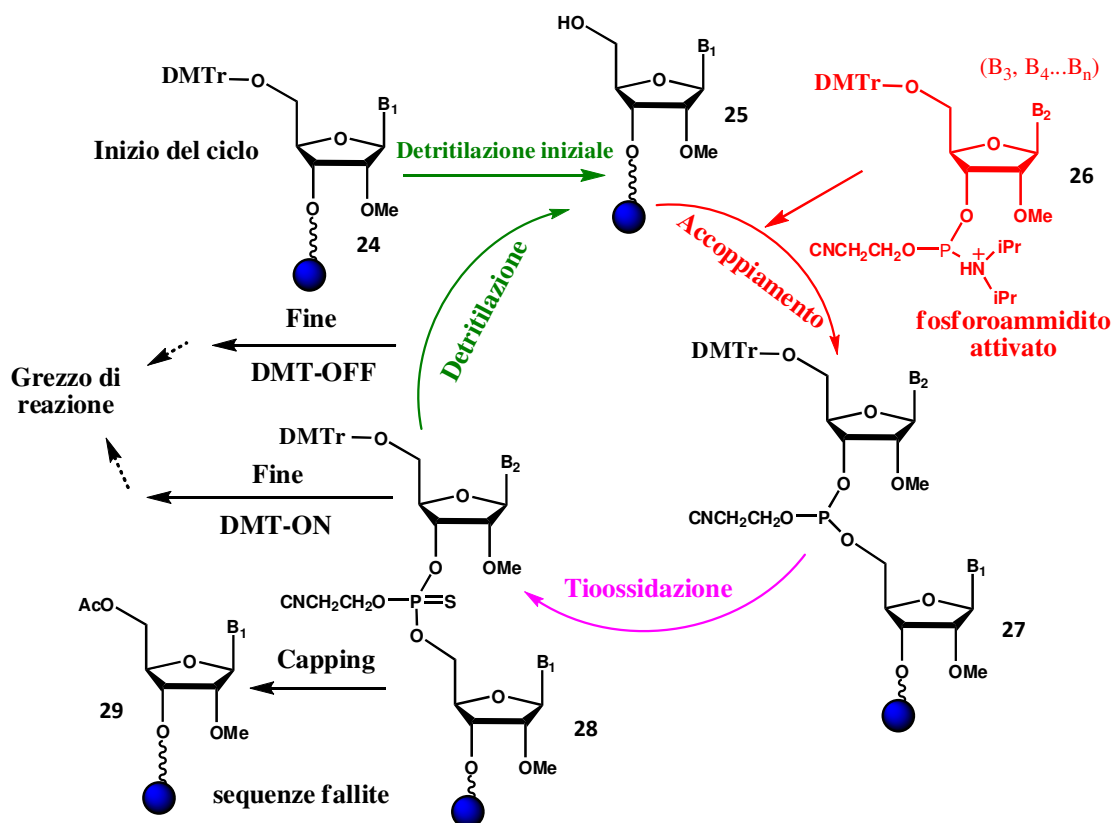


Fig. 34 Schema ciclico di sintesi

1. Rimozione del gruppo protettore DMT (dimetossitritile) sull'–OH in 5' del primo nucleoside legato al supporto solido (se si tratta del primo ciclo di sintesi) o sul nucleotide precedentemente accoppiato (nei cicli di sintesi successivi), per mezzo di una soluzione acida;
2. Reazione di condensazione con un' unità di fosforoammidito entrante in forma attivata;
3. Stadio di *capping* che modifica irreversibilmente ogni –OH 5' libero residuo, in modo da eliminare la crescita di catene incomplete o errate;
4. Tio-ossidazione dell'estere fosfito così ottenuto ad estere tiofosfato, stadio reso necessario per l'instabilità chimica del P^{III} nel fosfito.

Se per esempio, la catena oligonucleotidica da assemblare è lunga 20 unità nucleotidiche "20-mer" (con N=20), saranno necessari N-1 = 19 cicli complessivi.

Ottimizzazione della reazione di detritilazione

La prima reazione di ogni ciclo del processo di sintesi (*step1*, Fig.34), qui riportata in dettaglio (Fig.35), prevede la rimozione del gruppo protettore acido labile dimetossitritile (DMTr) **24**, per liberare l'ossidrilico in 5' **25** e consentirne l'attacco nucleofilo nella successiva reazione di accoppiamento (p.50).

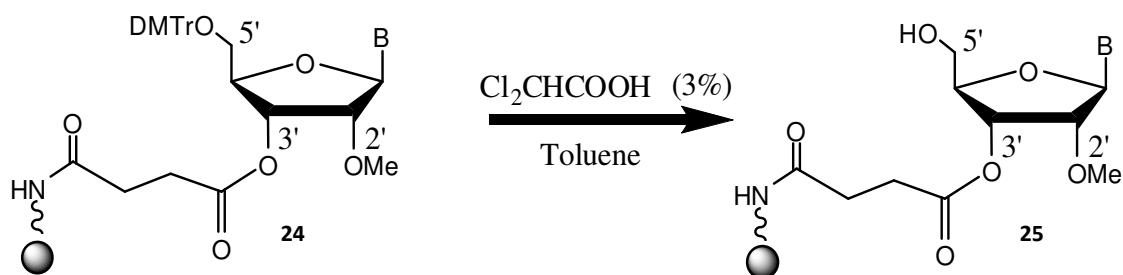


Fig. 35 Reazione di detritilazione

L'efficienza di questo *step*, gioca un ruolo cruciale sulla resa e sulla qualità del prodotto finale. Infatti solo la rimozione quantitativa della protezione in 5' può garantire ottima resa e qualità del prodotto di sintesi, mentre è invece risaputo che lo *step* di detritilazione molto spesso è incompleto⁸⁰. In tal caso la sequenza risultante (non subendo la reazione di *capping* (fase 4, Fig. 34)), può continuare a propagarsi durante il ciclo successivo causando la formazione di sottoprodotti definiti "sequenze fallite" (p.75), ossia di catene oligonucleotidiche di lunghezza inferiore rispetto a quella desiderata e pari a "N-n", (n=numero di unità nucleotidiche mancanti).

Poiché i reagenti detritilanti più comunemente usati⁸¹ sono soluzioni diluite (2-15%) di acidi organici come acido tricloroacetico (TCA = Cl_3COOH , $\text{pKa}=0.8$) o acido dicloroacetico (DCA = Cl_2CHCOOH , $\text{pKa}=1.5$) in solventi alogenati o in toluene, per assicurare una completa reazione di detritilazione sarebbe apparentemente sufficiente aumentare la concentrazione di acido in soluzione, o magari lavorare con acidi più forti (cioè con valori di $\text{pKa}<0.8-1.5$).

In realtà diversi reagenti sono stati testati per la rimozione del gruppo DMTr, ma un gran numero di essi ha presentato limiti riguardo l'applicazione all'interno di sistemi automatici per sintesi in fase solida⁸². Molti protocolli di sintesi inoltre, utilizzano volutamente basse concentrazioni di acido⁸³ per minimizzare i rischi di

depurinazione^{21,84}, reazione collaterale che causa il distacco di una base azotata generalmente purinica (adenina o guanina) da una o più unità nucleotidiche, mediante rottura del legame N-β glicosidico rappresentato in Fig.6 a p.13. Risulta quindi evidente la necessità di monitorare adeguatamente questa reazione che condiziona la resa e la qualità dell'oligonucleotide di sintesi.

Per quanto ci riguarda, il reagente detritilante che abbiamo scelto di utilizzare è una soluzione al 3% di acido dicloroacetico (Cl₂CHCOOH) in toluene, in accordo con le osservazioni riportate da Krotz in un lavoro intitolato *"Synthesis of oligonucleotides using environmentally friendly and safe deprotection"*⁸¹. E' infatti dimostrato che il solvente aromatico toluene (C₇H₈) ha una *"performance"* confrontabile con quella dei solventi clorurati che sono i più comunemente utilizzati per la reazione di detritilazione (solitamente diclorometano (CH₂Cl₂)); inoltre è molto meno pericoloso di tali solventi estremamente volatili, ed i relativi costi di smaltimento sono nettamente inferiori.

La messa a punto della fase di detritilazione ha richiesto la definizione di parametri importanti come quelli riportati in tab.1.2.2.

Tab. 1.2.2

Parametri ottimizzati per la reazione di detritilazione:	
scala di sintesi 2 e 7 μmol; oligo 25-mer M23D; <i>primer support</i> 80 μmol/g e 200 μmol/g	
Reagente	soluzione al 3% di acido dicloroacetico (Cl ₂ CHCOOH) in toluene.
Volume di detritilante (ml.)	5
Tempo contatto (min.)	0.5 (30")
Flusso (ml/min)	10

Lavorando ad un flusso di 10ml/min (valore massimo raggiungibile dal sistema di sintesi AKTA) è possibile garantire una buona efficienza di reazione di detritilazione, riducendo al minimo indispensabile i tempi di contatto, onde evitare i suddetti fenomeni di depurinazione. L'oligosintetizzatore AKTA *oligopilot 10 plus* permette di controllare in tempi reali l'efficienza di ogni singola reazione di detritilazione che viene monitorata *on-line* mediante lettura spettrofotometrica UV-VIS.

Infatti, il catione DMTr (Fig.9, p.10) che si forma in seguito a detritilazione, assorbe a lunghezza d'onda $\lambda_{\max} = 498\text{nm}$ e presenta una caratteristica colorazione rosso/arancio dovuta alla totale delocalizzazione della carica positiva sugli anelli aromatici adiacenti.

Il cromatogramma in Fig.36 relativo all'oligonucleotide M23D, di cui per comodità riportiamo nuovamente la sequenza 5'-ggccaaaccucggcuaccugaaa-3', è significativo di tutti gli assorbimenti UV-VIS del catione dimetossitritilico durante i singoli *step* di detritilazione dell'intero processo di sintesi. L'ultimo nucleotide che viene accoppiato (in Fig. 36 il nucleotide "g"), non viene appositamente detritilato, spiegheremo dettagliatamente nel paragrafo dedicato alla purificazione (p.68), le motivazioni di questa scelta.

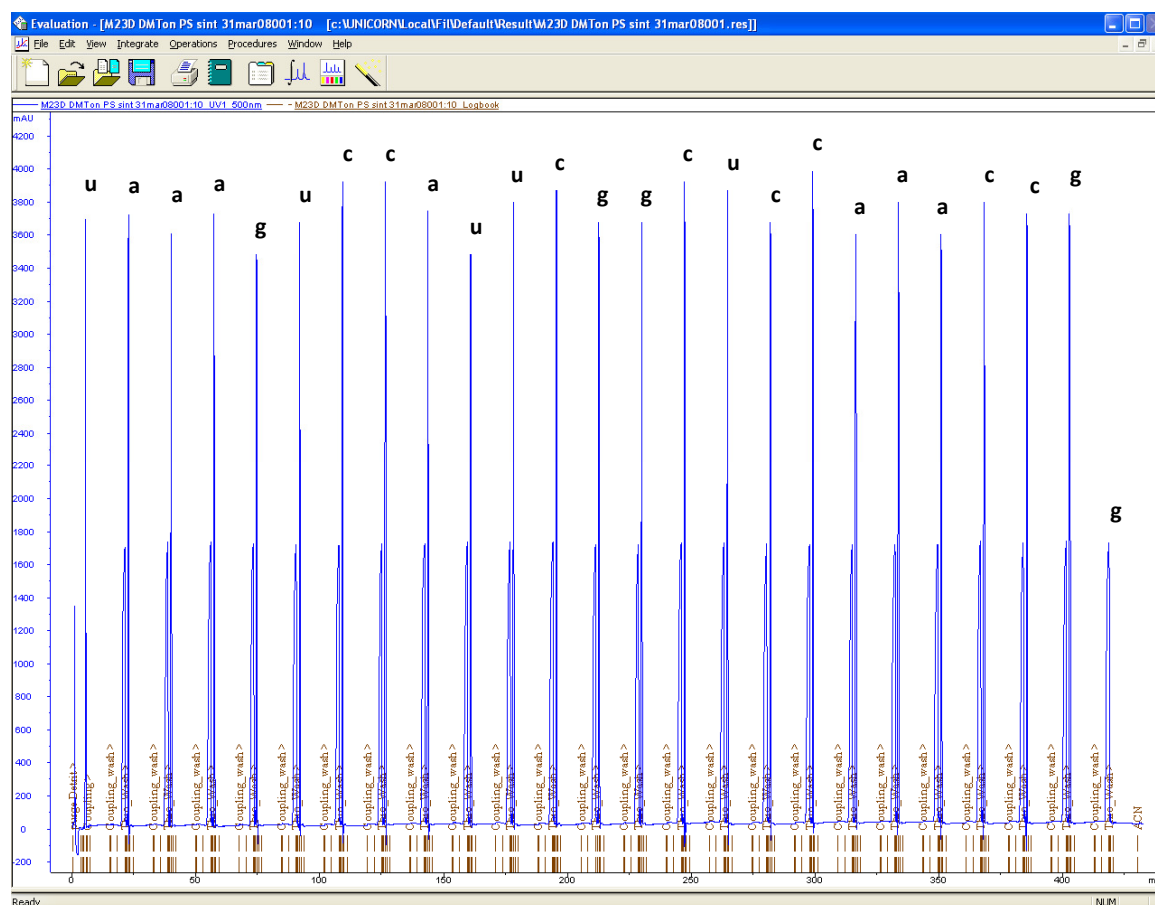


Fig. 36 Caratteristici assorbimenti del catione DMTr, monitorati durante le singole fasi di detritilazione della di sintesi di M23D

Il cromatogramma di Fig.37 invece, mostra in dettaglio il picco di assorbimento UV-VIS di un singolo *step* di detritilazione.

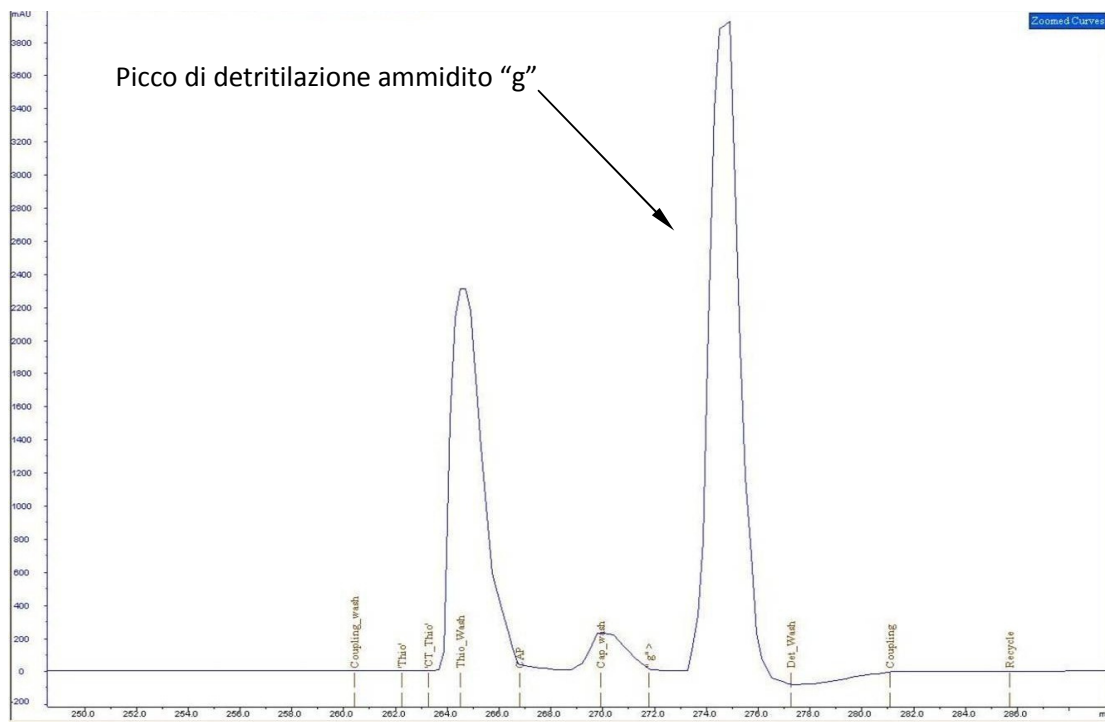


Fig. 37 Picco di assorbimento UV-VIS, *step* di detritilazione per un nucleotide “g”

Oltre al controllo della corretta detritilazione mediante l’ausilio delle curve UV-VIS, durante la sintesi è possibile monitorare più accuratamente la reazione mediante l’analisi di una tabella detta “*synthesis data*” (Fig.38), in cui sono riportati in ordine da sinistra verso destra, i seguenti parametri:

- posizione di accoppiamento (1,2,3...7,8.....17,18,19,20,...24)
- tipo di nucleotide coinvolto nell’accoppiamento (a,g,c,u)
- tempo di ritenzione (espresso in ml e corrispondente al massimo assorbimento del picco di detritilazione in Fig. 37)
- durata della reazione di detritilazione (in Fig.37 è l’intervallo espresso in ml compreso fra l’ inizio e la fine del picco di detritilazione)
- altezza del picco di detritilazione
- area di detritilazione
- efficienza dell’ultimo accoppiamento espressa in valore % (Last efficiency.)
- efficienza media % (Average efficiency)

Table

Pos.	Base.	Retention ml	Duration ml	Peak Ht	Detrit Area	Last eff. %	Ave eff. %
1	U	3.39	7.53	3873.0	11401.6	100.0	100.0
2	U	3.69	7.57	3962.0	10213.0	100.0	100.0
3	U	3.73	7.58	4174.0	10938.0	107.1	102.4
4	U	4.37	7.52	3762.0	11342.2	103.7	102.7
5	U	4.18	7.57	3731.0	9231.4	100.0	102.2
6	U	4.72	7.05	4099.0	12856.8	100.0	101.8
7	U	4.77	7.55	4008.0	15159.5	100.0	101.5
8	U	5.41	7.57	4001.0	14755.5	97.3	101.0
9	U	3.12	7.53	3897.0	10788.2	99.0	100.8
10	U	3.01	6.89	3719.0	11961.4	98.2	100.5
11	U	3.98	7.21	3850.0	12587.1	105.2	101.0
12	U	2.86	7.55	3903.0	15358.4	101.0	101.0
13	U	3.25	7.58	3772.0	9801.2	100.8	100.9
14	U	2.88	7.51	3770.0	10042.9	102.5	101.1
15	U	3.60	7.55	4026.0	15271.6	99.8	101.0
16	U	4.73	6.95	4021.0	14131.0	102.3	101.1
17	U	4.20	6.81	3900.0	16143.6	102.8	101.2
18	U	3.76	7.56	4017.0	16177.4	100.2	101.1
19	U	3.39	7.51	3736.0	13716.1	102.4	101.2
20	U	4.19	7.53	3859.0	14296.2	104.2	101.3
21	U	3.49	7.59	3910.0	15264.1	106.8	101.6
22	U	3.46	7.56	4051.0	16247.3	100.1	101.5
23	U	3.35	6.91	3748.0	15814.9	97.3	101.3
24	U	3.65	7.57	3883.0	14778.3	103.9	101.4

Fig. 38 Synthesis data

Imparare a leggere questa tabella è fondamentale per la comprensione di ciò che sta avvenendo durante la sintesi. I valori di *Last efficiency* riportati nel *synthesis data*, tengono conto della diversa cinetica di detritilazione esibita da ciascun nucleotide fosforoammidato (a,g,c,u)⁸¹ e la corretta efficienza della reazione di detritilazione, può essere definita soltanto confrontando i parametri corrispondenti a nucleotidi appartenenti alla stessa tipologia (g con g; c con c; a con a e u con u). Per esempio l'efficienza di detritilazione del nucleotide "a" in posizione 19, è calcolata in base al valore di efficienza del precedente nucleotide "a" in posizione 9.

La formula matematica che permette di calcolare il valore di "Last efficiency %" è la seguente:

$$\text{Last efficiency \%} = [A(x)_n / A(x)_z]^{1/y} * 100$$

dove A(x) = area del picco di detritilazione del nucleotide x.

x = tipo di nucleotide monomero (a,g,c,u)

n = posizione nella sequenza del nucleotide x di cui si deve calcolare la Last Eff.

z = posizione del primo nucleotide di tipo x, che precede x in posizione n.

y = numero di basi che precedono x.

Es: x = a; n = 19; z = 9; y = 10

$$\text{Last efficiency \%} = (13716.1 / 10788.2)^{1/10} * 100 = 102.4 \%$$

Anche i valori di Average efficiency % si possono semplicemente ricavare con la seguente formula:

$$\text{Average efficiency \%} = \sum \text{Last efficiency\%} / n \text{ Last efficiency}$$

n = numero delle Last efficiency% sommate

Es: calcolo della Average efficiency per il nucleotide "c" in posizione 7

$$\text{Average efficiency\%} = [(100*5) + 107.1 + 103.7] / 7 = 101.5\%$$

Un' analisi ancora più attenta del *synthesis data* permette di osservare che:

1. il valore di area di detritilazione del primo nucleoside direttamente legato al supporto solido (nel *synthesis data* di Fig.38 è il nucleoside "u" in posizione 1), deve essere compreso in un "range" atteso, al di sotto del quale la sintesi viene irrimediabilmente compromessa. Quindi lo studio della messa a punto della reazione di detritilazione viene proprio effettuato in questa fase, nella quale i valori di Last efficiency e di Average efficiency non danno nessuna informazione.
2. La prima volta che nel *synthesis data* compare uno dei quattro fosfoammiditi (a, g, c, u), il corrispondente valore di Last efficiency % è sempre pari a 100%, indipendentemente dalla posizione del nucleotide nella sequenza. L'ovvia mancanza di precedenti nucleotidi di stessa tipologia, non consente di confrontare il valore di Last efficiency % che pertanto assume il valore 100% (in Fig.38: primo nucleotide "u" in posizione 1, Last eff.=100%; primo nucleotide "a" in posizione 2, Last eff.=100%; primo nucleotide "g" in posizione 5, Last eff.=100%; primo nucleotide "c" in posizione 7, Last eff.=100%). Ancora le maggiori informazioni si ottengono dai corrispondenti valori di area di detritilazione.

3. I valori di tempo di ritenzione e di durata della reazione di detritilazione sono pressoché stabili durante tutto il processo di sintesi e seguono un *trend* che dipende principalmente dal tipo di nucleotide da accoppiare. Può accadere che nel *synthesis data* compaiano valori di ritenzione e durata della detritilazione troppo discordanti dal resto dei dati tabulati, in questi casi è necessario ignorare i corrispondenti dati di area di detritilazione e Last efficiency %, poichè non veritieri e probabilmente legati ai così detti “falsi picchi”, dovuti per esempio a bolle di gas nel sistema.
4. normalmente si osserva che il fosforoammidito “g” presenta mediamente tempi di ritenzione e durata della reazione di detritilazione inferiori rispetto agli altri nucleotidi fosforoammiditi “c”, “a”, e “u”, perciò i valori di area di detritilazione degli ammiditi “g” sono solitamente minori di quelli degli altri ammiditi.
5. Infine, in alcuni casi i valori di Last efficiency % sono > di 100%, ciò accade quando l’area di detritilazione del fosforoammidito in questione è maggiore dell’area del nucleotide precedente di stessa tipologia, es: Il nucleotide “u” in posizione 11 nel *synthesis data* di Fig.38, presenta area di detritilazione pari a 12587.1 e la corrispondente Last Efficiency il cui valore è 105.2% è stata calcolata basandosi sul valore di area di detritilazione dell’ammidito “u” in posizione 10, il cui valore è molto più basso e pari a 11961.4).

Ottimizzazione della reazione di accoppiamento

Sebbene la reazione di detritilazione precedentemente descritta giochi un ruolo importante nel processo di sintesi, la fase fondamentale per l'assemblaggio di catene oligonucleotidiche consiste nella reazione di accoppiamento o *coupling* (step2 di Fig.34, dettaglio in Fig.39).

L'ossidrilico in 5' libero **25**, dell'unità nucleosidica direttamente legata al *primer support* o dell'unità nucleotidica precedentemente accoppiata, reagisce per sostituzione nucleofila con un'unità fosforoamiditica entrante **26** (solitamente attivata in presenza di reattivi tetrazolici), favorendo l'allungamento della catena oligonucleotidica **27**.

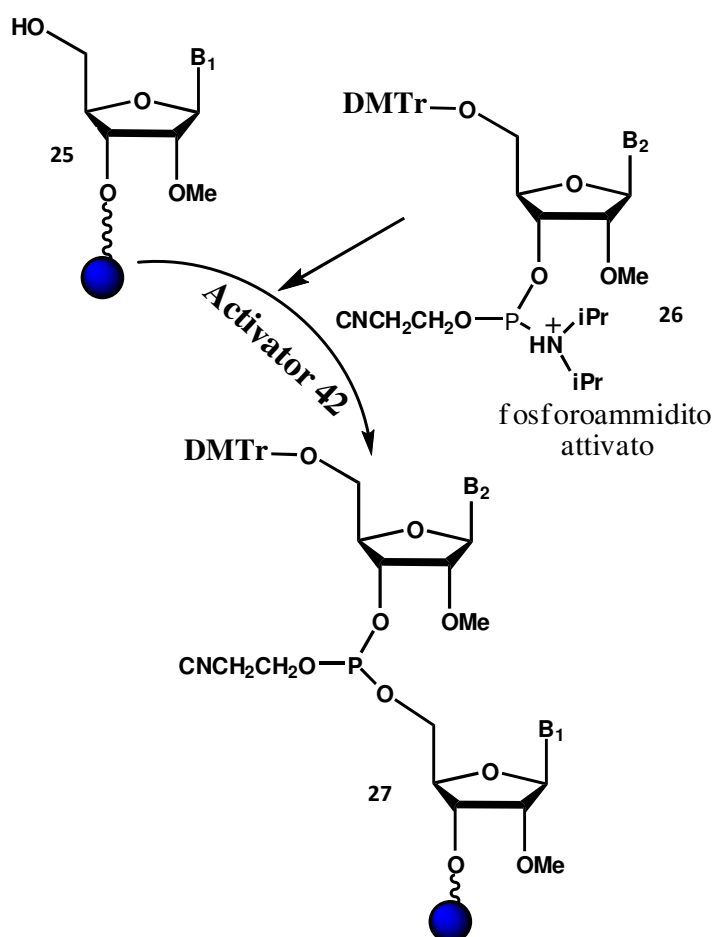


Fig. 39 Reazione di accoppiamento

In accordo con l'intuizione di Khorana^{22,23} (p.15), anche la sintesi di oligo 2'-OMePS si basa su una chimica di protezione, per cui i gruppi funzionali presenti nei reattivi fosfoammiditi, devono essere adeguatamente protetti (Fig.40a e Fig.40b).

R = zucchero-fosfito

B = base azotata

-N(iPr)₂ = diisopropilammina

-(CH₂)₂-CN = ciano etile

-Me = metile

DMTr = dimetossitritile =

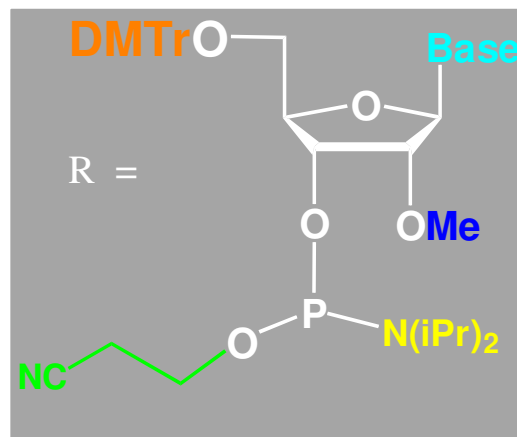
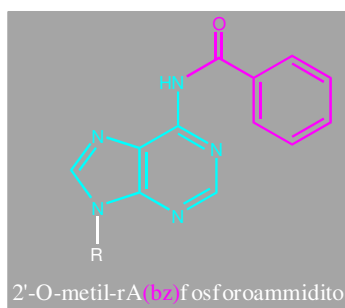
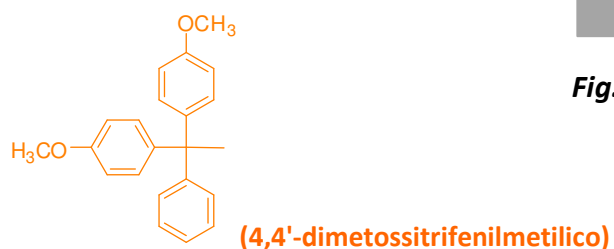
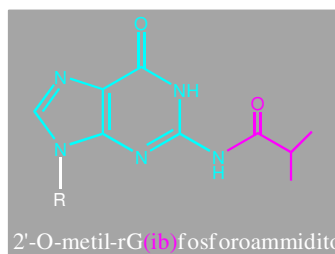


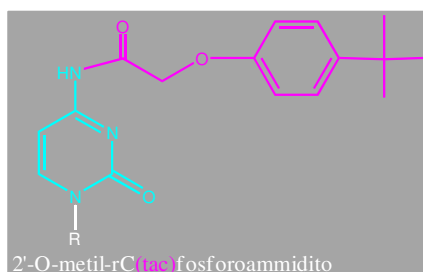
Fig. 40a Reattivi fosfoammiditi protetti



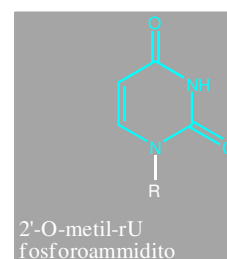
bz = benzoile



ib = isobutirile



tac = tert-butilfenossiacetile



non richiede protezione

Fig. 40b Caratteristiche protezioni delle basi

In questo modo si assicura l'accrescimento della catena oligonucleotidica in direzione 3'-5', sfruttando la maggiore nucleofilicità dell'ossidrilico primario in 5', rispetto a quello secondario in 3' sullo zucchero. I nucleotidi fosforoamiditi sono reattivi particolarmente sensibili, che allo stato solido si possono conservare a lungo solo a basse temperature (-20°C). Inoltre è buona norma prepararne le soluzioni alla concentrazione desiderata, solo al momento dell'utilizzo e con solvente acetonitrile anidro (conc. ≤ 30ppm di acqua). Infatti, solo in assenza d'acqua l'unità fosforoamiditica entrante può essere accoppiata in maniera fruttuosa durante la fase di *coupling*. Per assicurare le condizioni di anidricità occorre mantenere tutto il sistema costantemente in pressione di gas inerte anidro. Come mostrato in Fig. 39 a p.50, durante la fase di accoppiamento è necessario l'utilizzo di un reattivo attivante che deve rispondere a tutta una serie di requisiti. Storicamente, il primo reagente attivante usato per la sintesi automatica di oligo a base DNA e/o RNA, sfruttando la chimica del fosforoamidito, è stato l'1*H*-tetrazolo **A** (tab.1.2.3).

Purtroppo tale reagente presenta alcuni inconvenienti che ne limitano il suo impiego. Infatti le soluzioni di 1*H*-tetrazolo sono sature già alla concentrazione di 0.5M e a partire da temperature di circa 20°C in giù (temperature di lavoro tipiche della maggior parte dei laboratori di ricerca), si riscontrano sovente fenomeni di cristallizzazione.

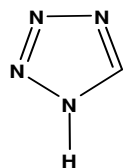
Ciò può costituire un grave problema, perché oltre a diminuire la concentrazione di tetrazolo presente durante la fase di *coupling*, il solido cristallizzato può ostruire le linee del sistema automatico bloccando la sintesi e/o provocando danni alle pompe.

Tale reattivo inoltre, ha natura esplosiva che ne vincola la commercializzazione sottoforma di soluzione, evitandone nella maniera più assoluta il trasporto aereo. Ancora, l'acidità dell' 1*H*-tetrazolo^{85c} (pKa=4.89) è sufficiente per causare la rimozione del gruppo DMTr sia su unità di fosforoamidito entranti (presenti nell'ambiente di reazione), sia su unità di fosforoamidito appena accoppiate. Rispettivamente ciò può causare la formazione di specie dimere⁸⁶ indesiderate, o/e di catene oligonucleotidiche più lunghe della sequenza richiesta, contenenti accoppiamenti multipli (N+m), (m=numero di unità nucleotidiche multiple accoppiate) (p.76 e fig. 58, p.77).

Per tutti questi motivi è stato indispensabile nel corso del tempo individuare reagenti attivanti alternativi, di seguito si citano i più comuni:

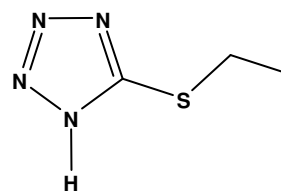
- 5-etiltio-1*H*-tetrazolo⁸⁵ (ETT) **B** (tab.1.2.3) presenta ottima capacità attivante, riduce i tempi di accoppiamento per sintesi di RNA e non presenta problemi di cristallizzazione (infatti è solubile fino alla concentrazione di 0.75M in CH₃CN), ma purtroppo come 1*H*-tetrazolo manifesta limiti legati al trasporto per motivi di sicurezza.
- 4,5-dicianoimidazolo⁸⁷ (DCI) **C** (tab.1.2.3) è un reagente attivante non tetrazolico di ottima qualità, che per le sue caratteristiche di minore acidità e maggiore nucleofilicità rispetto a 1*H*-tetrazolo non dà luogo a fenomeni indesiderati di dimerizzazione⁸⁸, inoltre è particolarmente solubile in CH₃CN (fino a conc. 1.2M), ma purtroppo è un reagente eccessivamente costoso.
- 5-benziltio-1*H*-tetrazolo⁸⁹ (BTT) **D** (tab.1.2.3) non è esplosivo quindi non presenta limiti di reperibilità e di trasporto, le soluzioni di tale reagente sono omogenee a temperature > 11°C e stabili a temperatura ambiente per circa due mesi, presenta buona capacità attivante e riduce fortemente i tempi di accoppiamento caratteristici della sintesi di RNA⁹⁰.
- 5-(bis-3,5-trifluorometilfenil)-1*H*-tetrazolo, più comunemente detto “*Activator 42*” **E** (tab.1.2.3), commercializzato dalla ditta *Proligo Reagents* che presenta elevata capacità attivante, rapidi tempi di accoppiamento anche per sintesi di oligo a base RNA, non è igroscopico, non è esplosivo e permette di ottenere buone rese del prodotto desiderato.

Tab. 1.2.3: Struttura chimica dei più comuni agenti attivanti



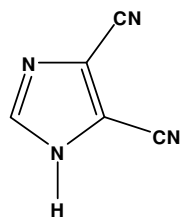
A

1H-tetrazolo



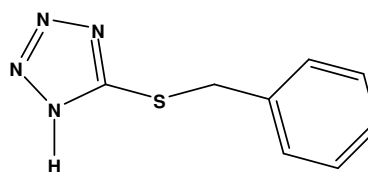
B

5-etiltio-1H-tetrazolo (ETT)



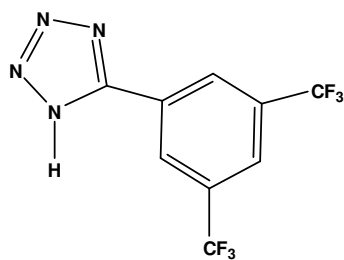
C

4,5-dicianoimidazolo (DCI)



D

5-benziltio-1H-tetrazolo (BTT)



E

5-(bis-3,5-trifluorometilfenil)-1H-tetrazolo: "**Activator 42**"

In questo lavoro abbiamo impiegato il 5-benziltio-1H-tetrazolo⁸⁹ (BTT) e il 5-(bis-3,5-trifluorometilfenil)-1H-tetrazolo (*Activator 42*). Entrambi hanno dimostrato elevata efficienza nell'effettuare la reazione di *coupling* di oligonucleotidi 2' O-MePS.

Il meccanismo di attivazione dei reagenti tetrazolici consiste in un processo di catalisi acida/nucleofila come rappresentato in Fig. 41. Ciò è stato evidenziato mediante esperimenti di risonanza magnetica nucleare al fosforo 31 ($^{31}\text{PNMR}$)⁹¹.

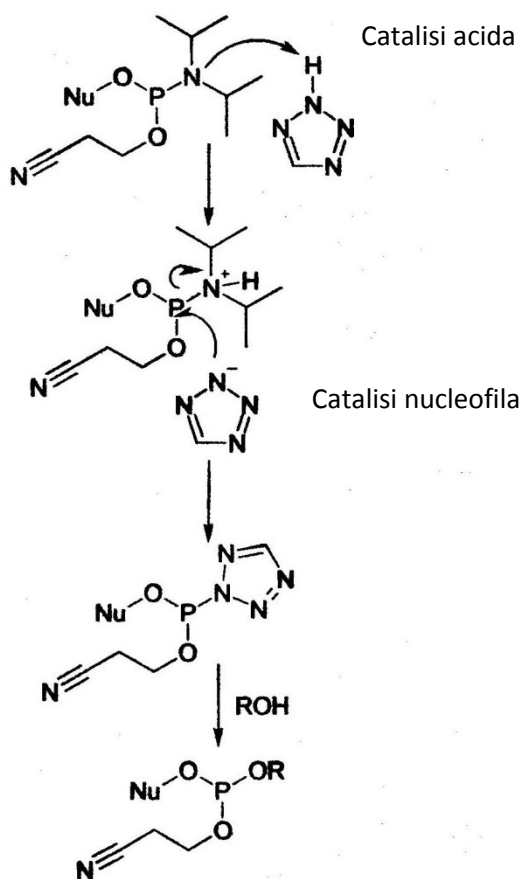


Fig.41 Meccanismo di attivazione dei reattivi tetrazolici

Quindi durante la fase di *coupling* la miscela di reazione contiene specie cariche che si formano in seguito alla catalisi acida (Fig.41), pertanto è possibile monitorarne le variazioni di conducibilità (Fig.42). L'andamento della conducibilità si può spiegare considerando che durante ogni fase di *coupling*, la miscela di reazione ammidito/attivante inizialmente eterogenea, viene più volte riciclata in colonna al fine di garantire il maggior numero possibile di accoppiamenti in un intervallo di tempo ben definito, anche detto tempo di riciclo, di cui di seguito parleremo in maniera più approfondita. In questo lasso di tempo la miscela di reazione diventa omogenea, perciò l'andamento della curva di conducibilità inizialmente oscillante, lascia il posto ad un andamento lineare (Fig.42).

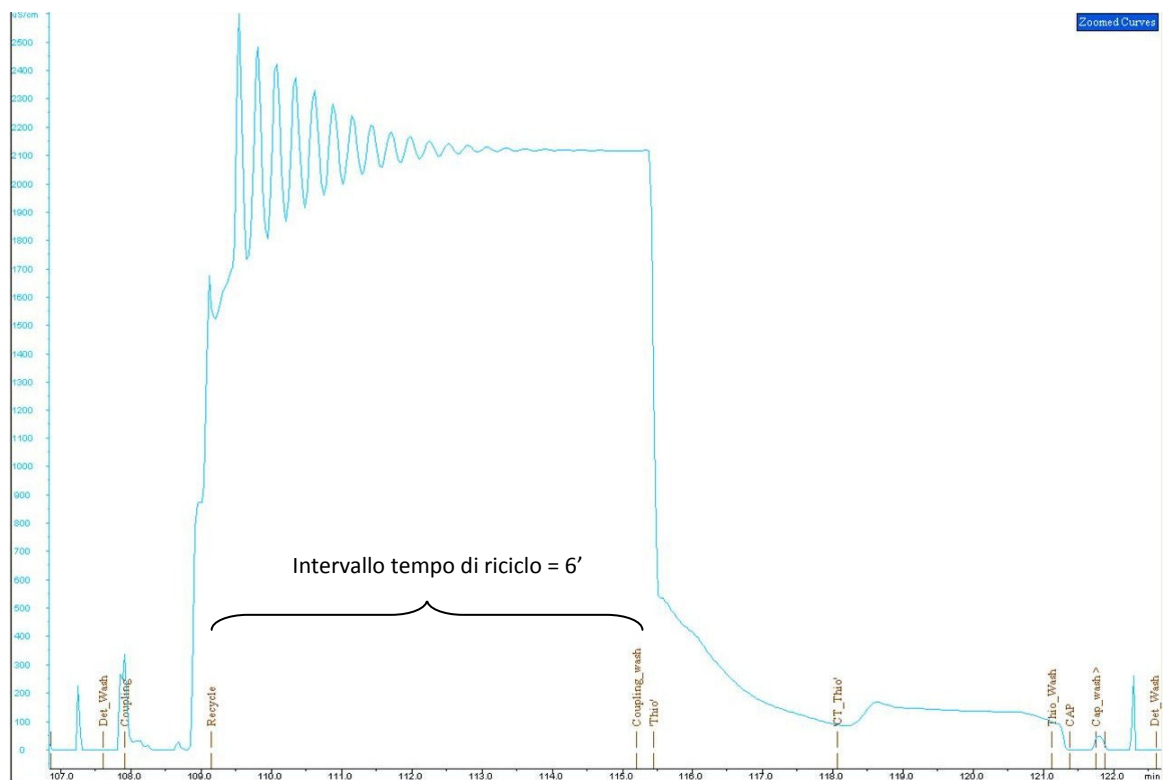


Fig. 42 Andamento della cond. durante la fase di accoppiamento per la sintesi 7 μ mol di M23D DMT-on

La resa della reazione di accoppiamento è una conseguenza diretta dell'efficienza della reazione di detritilazione descritta a p.43. Infatti più funzioni ossidriliche in 5' vengono liberate durante la fase di detritilazione, maggiore è la probabilità che le unità di fosforoammidito entranti si accoppino e minore è la possibilità di dare origine a sequenze fallite (p.75). Durante la sintesi, gli accoppiamenti non fruttuosi si possono verificare in maniera casuale in qualsiasi posizione dell'oligo, indipendentemente dall'ammidito che si sta accoppiando⁹². Uno dei parametri più importanti da definire per assicurare una buona efficienza di *coupling* è proprio il tempo di riciclo. Infatti abbiamo constatato che tempi di riciclo troppo corti non garantiscono una buona resa della reazione di accoppiamento e sono causa della formazione di "cortameri" (p.75), mentre al contrario tempi di riciclo esageratamente lunghi sono causa di accoppiamenti multipli ossia della formazione di catene oligonucleotidiche più lunghe di quella desiderata (N+m) (p.76), definite in gergo "longameri". Quest'ultimo fenomeno si riscontra principalmente quando le sequenze da sintetizzare sono ricche di nucleotidi fosforoammiditi di tipo "g" che sono più suscettibili dell'acidità del reattivo tetrazolico e

quindi possono accoppiare anche più volte all'interno dello stesso ciclo di *coupling*. Inoltre, abbiamo evidenziato che l'ottimizzazione di questo tempo è scala di sintesi dipendente e varia rispetto ad essa in maniera inversamente proporzionale: minore è la scala di sintesi maggiore è il tempo di accoppiamento, viceversa maggiore è la scala di sintesi minore è il tempo di accoppiamento.

I parametri ottimizzati della reazione di accoppiamento, per la sintesi di M23D 2'-OMePS 25-mer, su scala 2 e 7 μmol utilizzando supporti solidi con capacità di *loading* pari a 80 $\mu\text{mol/g}$ e 200 $\mu\text{mol/g}$ rispettivamente, sono riportati in tab. 1.2.4 e tab. 1.2.5.

Tab. 1.2.4

Parametri ottimizzati reazione di accoppiamento:	
scala di sintesi 2 μmol ; oligo M23D 25-mer; <i>primer support</i> 80 $\mu\text{mol/g}$	
Reagente (Activator 42)	Soluzione 0.25 M in CH_3CN di 5-(Bis-3,5-trifluorometilfenil)-1H-tetrazolo
Eq. ammidito 2'-OMe-RNA (eq.)	10 eq.
Conc. ammidito 2'-OMe-RNA (M)	0.05 M
Reagente attivante (%)	60%
Tempo di riciclo (min)	12 min

Tab. 1.2.5

Parametri ottimizzati reazione di accoppiamento:	
scala di sintesi 7 μmol ; oligo M23D 25-mer; <i>primer support</i> 200 $\mu\text{mol/g}$	
Reagente (Activator 42)	Soluzione 0.25 M in CH_3CN di 5-(Bis-3,5-trifluorometilfenil)-1H-tetrazolo
Eq. ammidito 2'-OMe-RNA (eq.)	6 eq.
Conc. ammidito 2'-OMe-RNA (M)	0.1 M
Reagente attivante (%)	60 %
Tempo di riciclo (min.)	6min

La quantità di reagente attivante per ciascun ciclo, viene espressa in volume %.

I calcoli esemplificativi sono riportati qui di seguito per una sintesi con i seguenti parametri:

- scala di sintesi: 2 micromolare;
- concentrazione di ammidito: 0.05M;
- equivalenti di ammidito: 10.

Volume di ammidito = scala di sintesi in moli * n° equivalenti / concentrazione molare

Es.: $V(\text{ml}) = 2 \cdot 10^{-6} \text{ moli} \cdot 10 / 0.05 \text{ M} = 0.4 \text{ ml di ammidito}$

Volume di activator corrispondente al 60% :

0.4 ml ammidito : 40 % = (x) ml activator : 60% x = 0.6 ml

Concludendo, i dati riportati nelle tabelle 1.2.4 e 1.2.5, sono stati ottimizzati cercando di raggiungere un'efficienza di accoppiamento $\geq 98\%$, che per la sintesi di oligo modificati a base RNA è un valore molto elevato, visto e considerato che per gli oligo a base DNA di più semplice manifattura, tale valore è \geq al 99%.

Per sintesi su scala 2 μmolare , tali valori di efficienza si possono raggiungere lavorando in presenza di un maggior numero di equivalenti ed utilizzando volumi di ammidito e di *activator* che in proporzione sono superiori rispetto a quelli necessari per realizzare sintesi su scala 7 μmolare . Infatti maggiore è la scala di sintesi, maggiore è la concentrazione di ammidito che conviene usare per ridurre i volumi in gioco ed il numero di equivalenti necessari. Per quanto concerne i tempi di riciclo e la % di *activator*, abbiamo verificato sperimentalmente che valori anche leggermente al di sotto di quelli riportati nelle corrispondenti tabelle, riducono drasticamente l'efficienza della reazione di accoppiamento, mentre al contrario valori anche molto più elevati di quelli tabulati, non hanno portato ad ulteriori miglioramenti in termini di efficienza.

Ottimizzazione della reazione di tio-ossidazione

Terminata la reazione di accoppiamento, il supporto solido viene lavato con acetonitrile e in questo modo si rimuovono eventuali residui sia di reagente attivante che di fosforoammidito non reagito. La successiva fase di tio-ossidazione (*Step 3*, Fig.34; dettaglio in Fig.43) trasforma il prodotto di *coupling* **27** da fosfito triestere (P^{III}) instabile, a tiofosfato **28** (P^V) stabile. In questo modo uno degli atomi di ossigeno non a ponte di un classico gruppo fosfato, viene rimpiazzato con un atomo di zolfo e si introduce una tipica modifica di prima generazione, di cui si è discusso a p. 26.

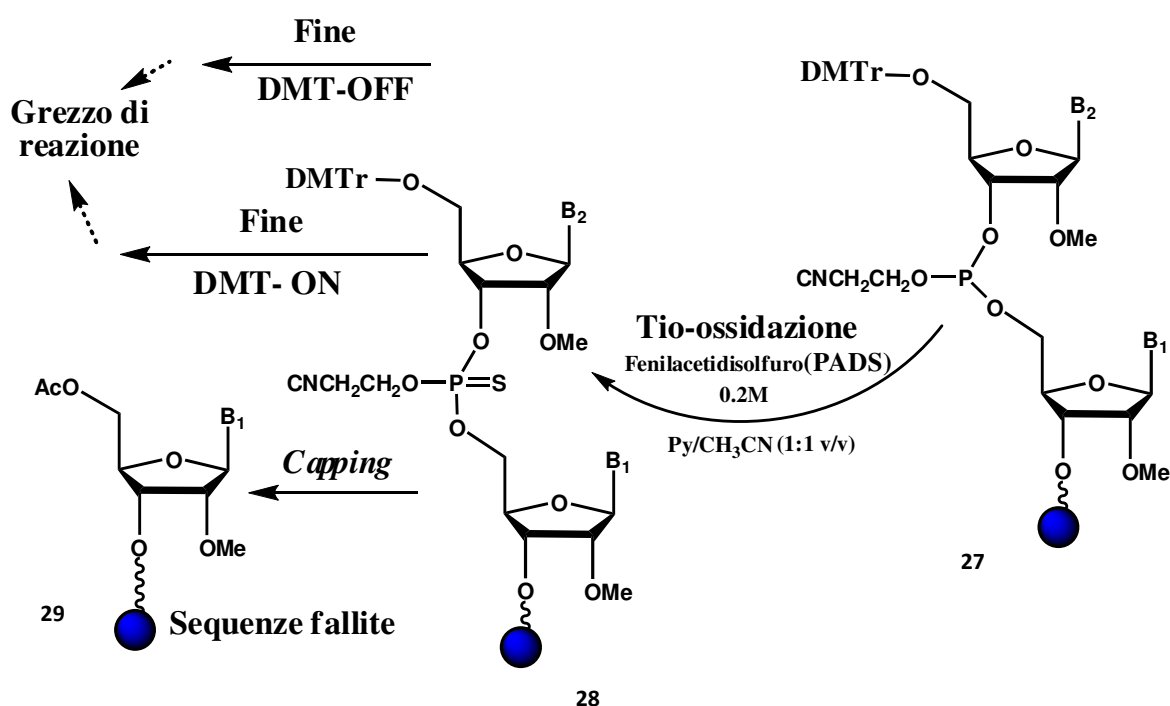


Fig. 43 reazione di tio-ossidazione

In letteratura la reazione di tio-ossidazione di oligoribonucleotidi, è descritta in diversi modi⁹³. In particolare la sintesi di oligomeri a base RNA in fase solida mediante sistemi automatici, richiede reagenti tio-ossidanti particolarmente efficienti.

Reattivi come 3H-1,2-benzoditiol-3-one-1,1-diossido (più comunemente noto come *Beaucage Reagent*)⁹⁴, dimethylthiarum disulfide (DTD)⁹⁵ e molti altri reagenti⁹⁶, hanno efficienza sulfurizzante discutibile, tant'è vero che i corrispondenti prodotti di sintesi non sono fosfortioati in tutta la loro lunghezza e presentano scarsa qualità dovuta a

molteplici contaminazioni. Le principali impurezze derivanti da una scarsa efficienza di sulfurizzazione sono catene oligonucleotidiche identiche a quella richiesta, ma contenenti uno o più gruppi fosfato (PO) al posto dei gruppi fosforotioato (PS), pertanto esse vengono indicate con la sigla [(PO)n-oligonucleotidi, n=numero dei PO nella catena]⁹⁷, discuteremo di tali impurezze a p.88. Un' altra categoria meno importante, ma comunque non trascurabile di impurezze, può invece derivare da condizioni inadeguate di reazione di sulfurizzazione, come insufficienza di reagente sulfurizzante o tempi di reazione "contact time" troppo brevi. Tali impurezze vengono identificate come derivati DMTr-C-fosfonati⁹⁸ monoesteri e/o diesteri (Fig.44). Non sono comunque noti in letteratura esempi di formazione di DMTr-C-fosfonati, per sintesi di catene oligonucleotidiche a partire da nucleotidi β-cianoetil-fosforoammiditi⁹⁹, come quelli da noi utilizzati per la sintesi di oligo 2'-OMePS.

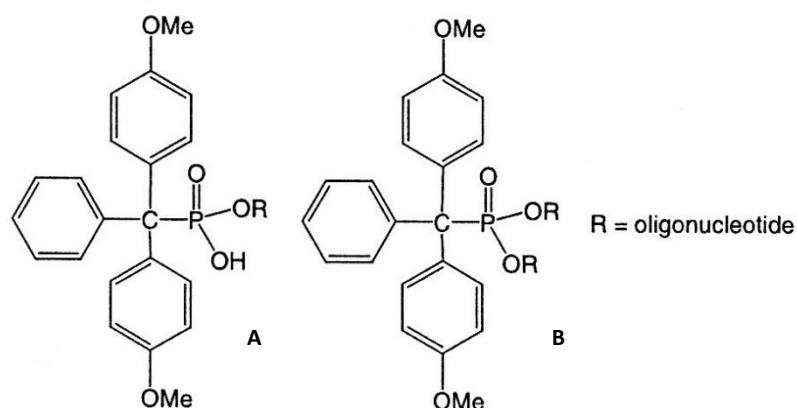


Fig. 44 A = DMTr-C-fosfonato monoestere; B = DMTr-C-fosfonato diestere

Altri reattivi come 3-etossi-1,2,4-ditiazolin-5-one (EDITH)¹⁰⁰, offrono risultati accettabili con buone efficienze di sulfurizzazione, ma hanno costi eccessivi.

E' nata allora la necessità di ricercare un reagente sulfurizzante alternativo più efficiente, in grado di trasferire facilmente un atomo di zolfo, poco costoso, con possibilità di applicazione in processi su larga scala, anche per sintesi di oligonucleotidi 2'-O-modificati e in grado di fornire prodotti oligomeri di buona qualità.

Tutte queste proprietà sono caratteristiche del reagente tio-ossidante fenilacetil disolfuro (PADS)¹⁰¹ (Fig.45).

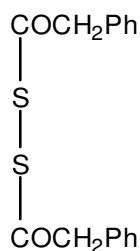


Fig. 45 Fenilacetil disolfuro (PADS)

Il meccanismo di tio-ossidazione ipotizzato^{101a} è raffigurato in Fig. 46 e prevede l'attacco iniziale di un fosfito triestere di tipo **27** sul reagente sulfurizzante (PADS), con formazione di un sale di fosfonio intermedio **30**, dal quale deriva il tio-fosfato triestere corrispondente di tipo **28**. In realtà l'intermedio **30** è sensibile alla miscela di reazione e può subire l'attacco d'acqua, con conseguente formazione del fosfato triestere **31**. In ogni caso è stato osservato che l'aggiunta di H₂O in quantità superiore a 1200 ppm alla soluzione di reagente sulfurizzante PADS, riduce inevitabilmente la resa del prodotto di interesse, ma non incrementa la quantità di impurezze di tipo (PO) n-oligonucleotidi¹⁰².

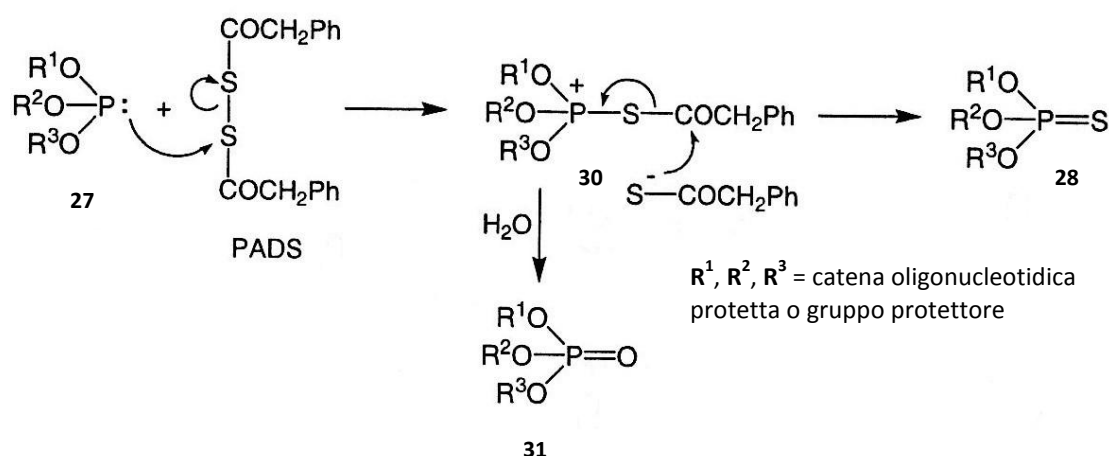


Fig. 46 Meccanismo di sulfurizzazione

Un maggiore contenuto di fosfodiesteri (PO) nella catena oligonucleotidica, può infine dipendere dall'utilizzo di soluzione fresche di reattivo sulfurizzante PADS.

E' infatti necessario un periodo di "invecchiamento" delle soluzioni sulfurizzanti a base di

fenilacetil disolfuro pari ad almeno un giorno, tempo durante il quale la soluzione tio-ossidante subisce mutazioni cromatiche indicative di cambiamenti della composizione chimica, con formazione di specie come acildisolfuri, polisolfuri, e solfuri che contribuiscono a migliorare l'efficienza della reazione di sulfurizzazione¹⁰³.

Infine, l'aggiunta al reattivo tio-ossidante di basi organiche con funzione di co-solventi, migliora nettamente la *performance* del reagente stesso¹⁰⁴. Sulla base di tutte queste considerazioni si è scelto come agente sulfurizzante il reattivo PADS, del quale è stata preparata una soluzione 0.2M in acetonitrile come solvente e piridina come co-solvente, in rapporto 1:1. In tab.1.2.6 sono riportati i parametri ottimizzati della reazione di tio-ossidazione per la sintesi dell'oligo M23D DMT-on 2'-OMePS 25-mer, su scala 2 e 7 µmolare utilizzando supporti solidi con capacità di *loading* pari a 80 µmol/g e 200 µmol/g rispettivamente.

Tab. 1.2.6

Parametri ottimizzati reazione di sulfurizzazione:	
scala di sintesi 2 e 7 µmol; oligo 25-mer M23D; <i>primer support</i> 80 µmol/g e 200 µmol/g	
Reagente (PADS)	Soluzione 0.2 M in CH ₃ CN/ Piridina(Py)(1:1)
Volume tio (CV)	2
Tempo di contatto (min)	3 min
Flusso tio-ossidante (ml/min)	0.4 ml/min

Nel cromatogramma di Fig.47, viene rappresentato l'andamento della curva di conducibilità durante la reazione di tio-ossidazione ed il corrispondente intervallo di tempo di contatto.

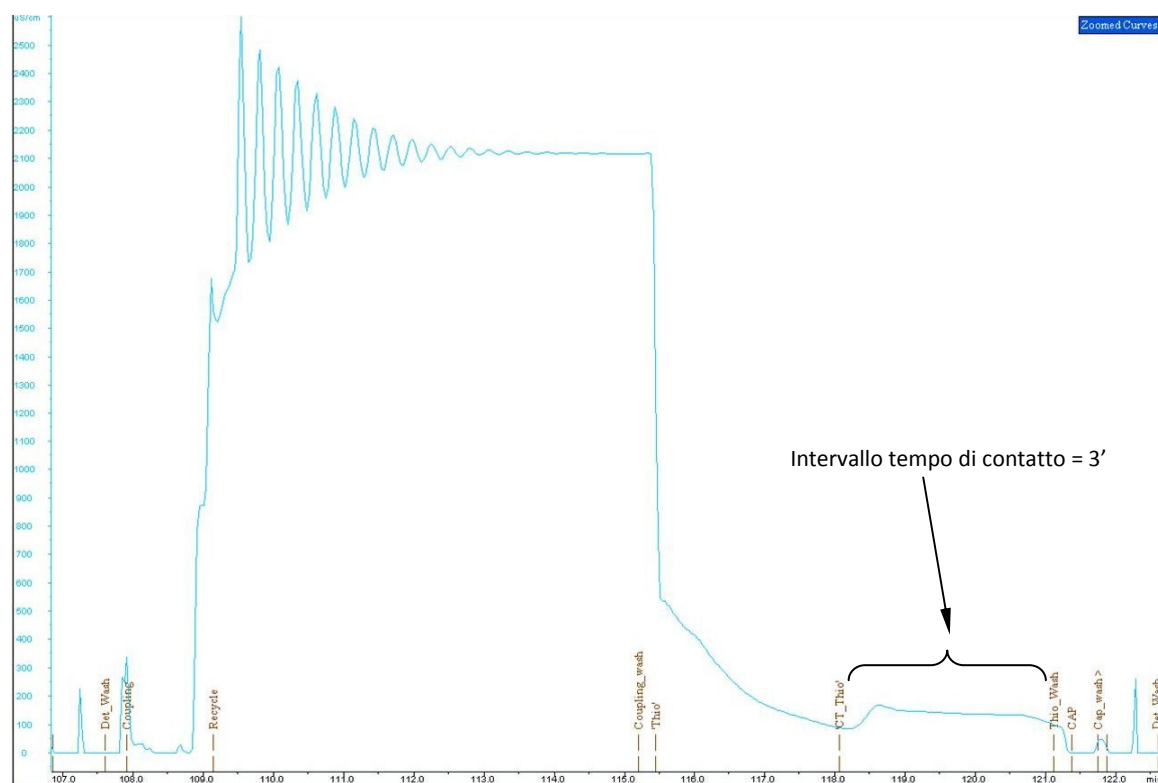


Fig. 47 Tempo di contatto reazione di tio-ox per sintesi 2 e 7 μ mol di M23D DMT-on

I parametri di tutte le reazioni del ciclo di sintesi sono stati ottimizzati in funzione della efficienza della reazione di accoppiamento, che come detto in precedenza deve sempre essere $\geq 98\%$ e per quanto concerne la reazione di tio-ossidazione si è osservato che i parametri settati su scala 2 micromolare sono ottimali anche per sintesi realizzate su scala 7 micromolare. L'analisi spettroscopica di Risonanza Magnetica Nucleare al ^{31}P realizzata sugli oligo sintetizzati e successivamente purificati mediante RP-HPLC, ha fornito informazioni utili riguardo la stima finale dell'efficienza della reazione di tio-ossidazione il cui valore risulta compreso nell'intervallo 95-98%, p.88.

Ottimizzazione della reazione di *Capping*

L'ultimo *step* di ogni ciclo di reazione è la fase di *capping* (Fase 4 in Fig.34, dettaglio in Fig.48), grazie alla quale ogni unità ossidrilica in 5' non accoppiata nella precedente fase di *coupling*, viene bloccata per assicurare che solo le catene complete possano continuare a svilupparsi nelle successive fasi del ciclo di sintesi.

La reazione coinvolta è una semplice acetilazione che il sistema AKTA consente di realizzare, miscelando la soluzione Cap A (soluzione al 20% (V/V) di N-metilimidazolo in CH₃CN) con la soluzione Cap B (soluzione al 20% (V/V) di anidride acetica e soluzione al 30% (V/V) di 2,6-lutidina in CH₃CN) ed inviando tale miscela di reazione all'interno del reattore.

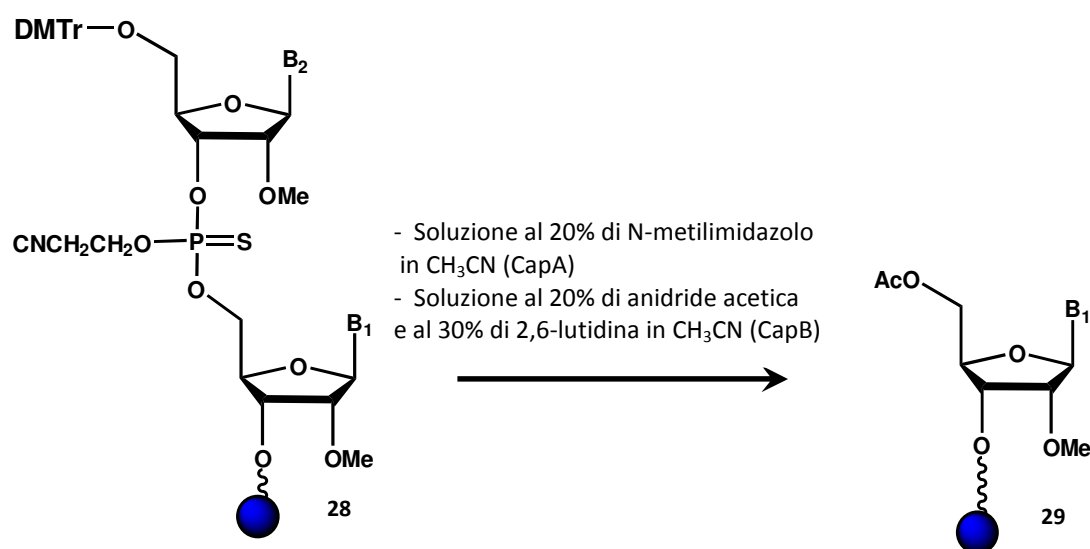


Fig. 48 Fase di *capping*

In tab.1.2.7 sono riportati i parametri caratteristici della reazione di *capping* per la sintesi dell' oligo M23D 2'-O-MePS 25-mer, su scala 2 e 7 μ molare utilizzando supporti solidi con capacità di *loading* pari a 80 μ mol/g e 200 μ mol/g rispettivamente.

Tab. 1.2.7

Parametri reazione di <i>capping</i>:	
scala di sintesi 2 e 7 μmol ; oligo 25-mer M23D; <i>primer support</i> 80 $\mu\text{mol/g}$ e 200 $\mu\text{mol/g}$	
Reagente CapA+CapB	CapA: soluzione al 20% (V/V) di N-metil imidazolo in CH_3CN ; CapB: soluzione al 20% (V/V) di anidride acetica e soluzione al 30% (V/V) di 2,6-lutidina in CH_3CN
Volume CapAB (CV)	2
Tempo di contatto (min)	0.24
Flusso(ml/min.)	5

Anche in questo caso, indipendentemente dalla scala di sintesi (2 o 7 micromolare) i parametri ottimizzati per la reazione di *capping* sono gli stessi, poiché non sono state riscontrate variazioni riguardo l'efficienza della reazione di coupling, che si mantiene in entrambe i casi intorno al 98%. L'eccesso di reagente di *capping*, viene successivamente rimosso dopo lavaggio con acetonitrile e l'oligonucleotide ottenuto è pronto per un ulteriore ciclo di sintesi o per essere sottoposto alle procedure post sintesi.

Trattamento con dietilammina (DEA)

Al termine di ogni processo di sintesi, prima della fase di deprotezione e distacco dell'oligo dal supporto solido in ambiente basico (p.67) abbiamo osservato, come già descritto da altri¹⁰⁵ che il trattamento con una soluzione basica, nel nostro caso una soluzione di dietilammina (DEA) al 20% (V/V) in acetonitrile anidro, previene la formazione di sottoprodotti.

Tale trattamento effettuato sull'oligo ancora legato al supporto solido contenuto nella colonna all'interno del reattore, si rende necessario per ridurre al minimo la formazione di impurezze definite "N+cianoetile" rappresentate in (Fig.49) e derivanti dallo *step* di ammonolisi. Infatti durante la deprotezione in idrato d'ammonio (NH_4OH), i gruppi protettori cianoetili sui ponti tio-fosfato dell'oligo, vengono rimossi mediante meccanismo di β -eliminazione generando acrilonitrile (AN). Tale specie a sua volta viene catturata dall'azoto in posizione 3 (N^3) delle basi timidiniche presenti sulla catena oligonucleotidica e mediante reazione di Michael¹⁰⁶, origina i corrispondenti residui

alchilati di tipo 32.

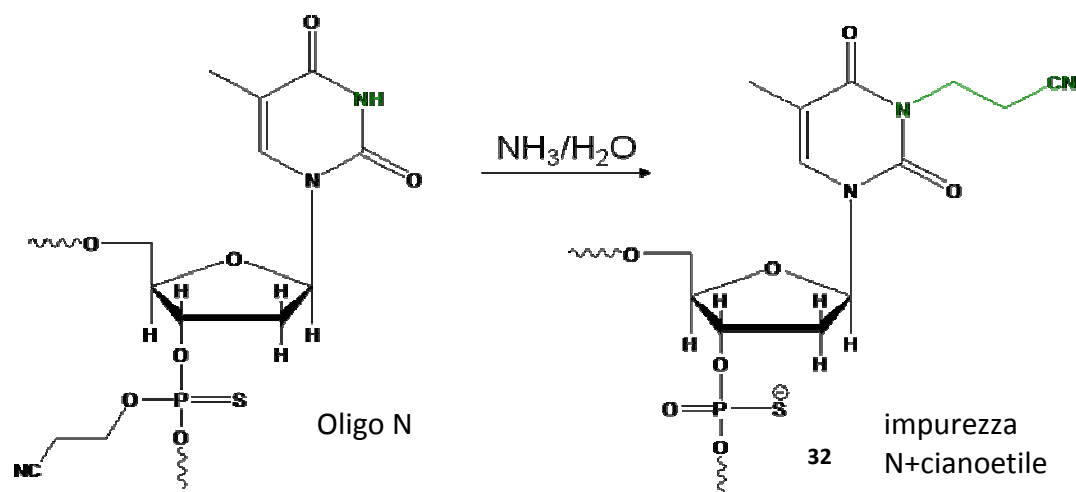


Fig. 49 Alchilazione di N³ nei residui timidinici

In tab.1.2.8 sono riportati i parametri caratteristici del trattamento con DEA, per la sintesi dell' oligo M23D DMT-on 2'-OMePS 25-mer, su scala 2 e 7 μmol utilizzando supporti solidi con capacità di *loading* pari a 80 $\mu\text{mol/g}$ e 200 $\mu\text{mol/g}$ rispettivamente.

Tab. 1.2.8

Parametri trattamento con dietilammina (DEA):	
scala di sintesi 2 e 7 μmol ; oligo 25-mer M23D; <i>primer support</i> 80 $\mu\text{mol/g}$ e 200 $\mu\text{mol/g}$	
Reagente (DEA)	Soluzione di dietilammina (DEA) al 20% (V/V) in acetonitrile anidro
Volume (ml)	10
Tempo di reazione (min)	10
Flusso (ml/min)	1

I parametri ottimizzati per la reazione di DEA *treatment* garantiscono il distacco del maggior numero possibile di gruppi cianoetile, per evitare che questo avvenga durante la successiva fase di distacco e deprotezione dell'oligo dal supporto solido.

Distacco e deprotezione dell'oligo dal supporto solido.

Una volta assemblata l'intera catena oligonucleotidica e completato il processo automatico di sintesi è necessario disconnettere la colonna di reazione, estrarne il supporto solido sul quale è legato il prodotto di sintesi in forma protetta e procedere con un trattamento basico in presenza di una soluzione ammoniacale concentrata (idrato d'ammonio "NH₄OH" al 33%), a caldo (temperatura di ~ 60°C) per diverse ore (~ 10h). Sebbene diversi reagenti siano stati proposti per lo sblocco e la deprotezione dell'oligo, come ammoniaca gassosa¹⁰⁷ o metilammina¹⁰⁸, il trattamento con NH₄OH¹⁰⁹ è quello da noi preferito.

Il risultato di questo trattamento è prima di tutto la rottura del ponte succinico che fa da *linker* tra la catena oligonucleotidica ed il supporto solido, con conseguente rilascio dell'oligo e successivamente la deprotezione di tutte le funzioni amminiche esocicliche presenti sulle basi azotate (Fig. 50), anche dette protezioni "semipermanenti", in quanto vengono rimosse solo al termine di tutto il processo sintetico.

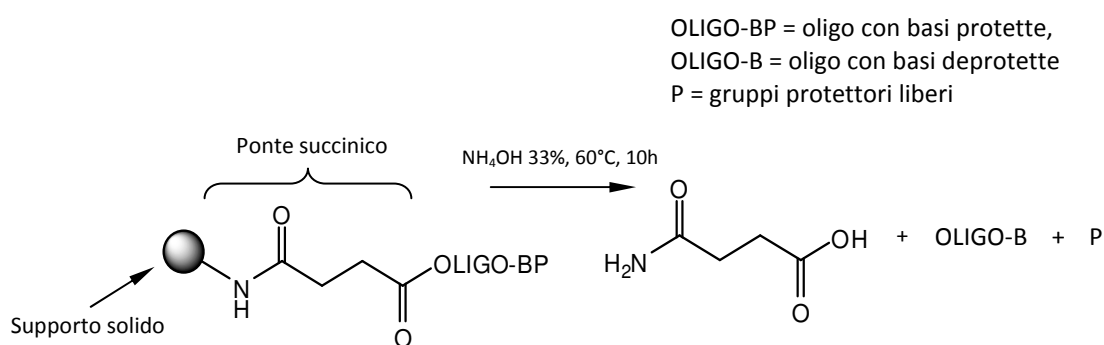


Fig.50 Distacco oligo dal supporto solido e deprotezione delle funzioni amminiche esocicliche sulle basi azotate

Quindi, il grezzo di reazione in soluzione basica contiene come prodotto principale l'oligonucleotide rappresentato in Fig. 51, in cui sono mantenute tutte le protezioni "permanenti", cioè quelle sugli -OH in posizione 2' dello zucchero (2'-OMe) ed i legami P-S nei ponti tio-fosfato, mentre la funzione ossidrilica in posizione 3'-terminale è libera e la funzione ossidrilica 5'-terminale mantiene la protezione come dimetossitritile (DMTr-O-R, con R = oligonucleotide).

Le sintesi di oligonucleotidi 2'-OMePS da noi effettuate, sono state volutamente realizzate nella modalità DMT-on che permette di mantenere la protezione sull'-OH 5'-terminale. Avremo modo di vedere nei paragrafi successivi come questa scelta sia in grado di facilitare alcuni passaggi relativi al processo di purificazione.

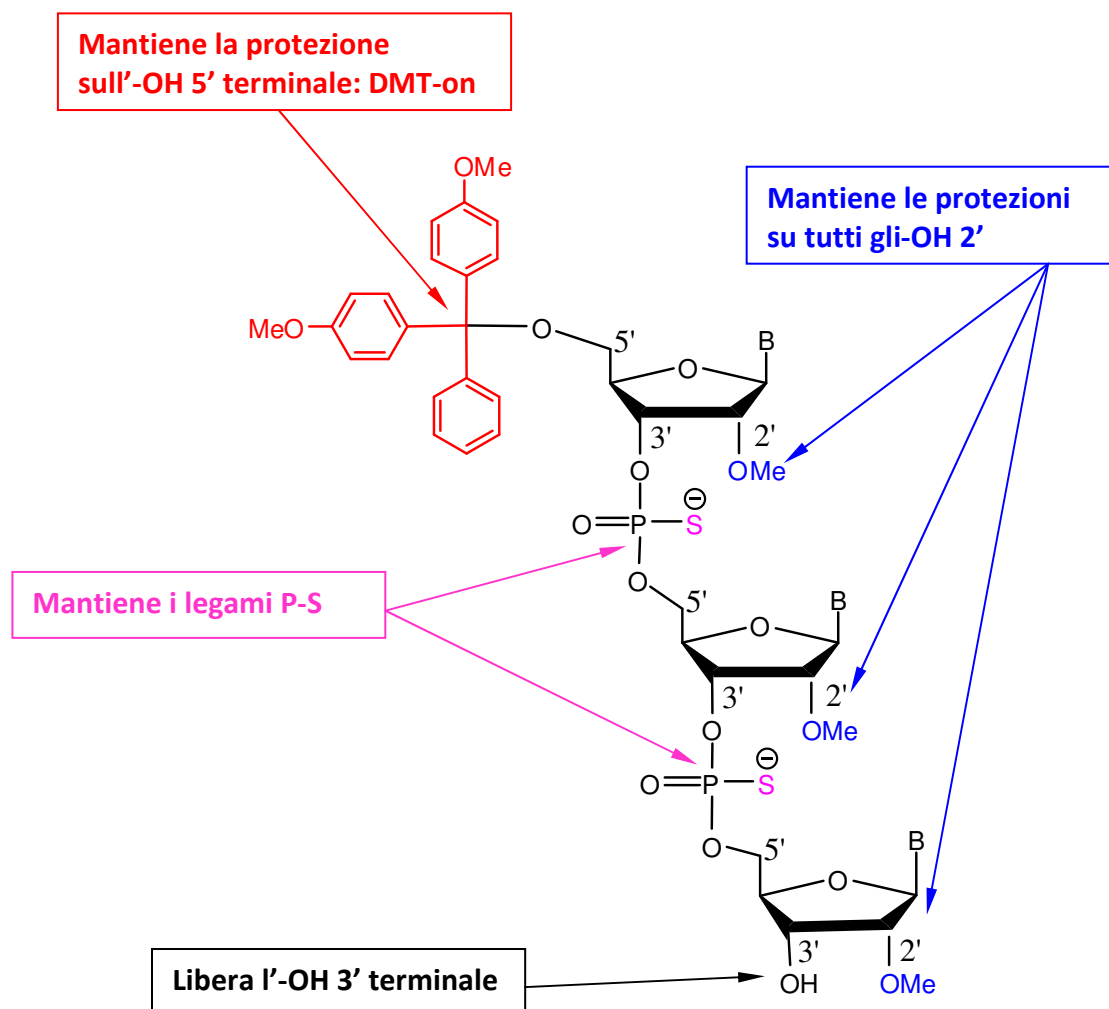


Fig. 51 Oligo DMT-on post deprotezione e distacco dal supporto solido

Messa a punto della purificazione di ON 2'-OMePS

In passato l'importanza di sviluppare adeguate procedure post-sintetiche necessarie per la purificazione degli oligonucleotidi, è stata molto spesso trascurata principalmente per i seguenti motivi. Le sintesi di oligonucleotidi avvenivano utilizzando larghi eccessi di reattivi coinvolti nella reazione di *coupling* (ammiditi e attivante), pertanto il grezzo di

reazione conteneva quasi totalmente il prodotto *full length* desiderato. In prima analisi ciò mascherava la necessità di purificare il prodotto ottenuto, ma d'altra parte gli esagerati costi legati all'utilizzo di grandi quantità di reattivi (ammiditi monomeri e attivante) rendevano improponibile effettuare sintesi su larga scala; inoltre la mancata fase di purificazione non consentiva l'utilizzo di tali prodotti per successive applicazioni in campo medico. Quindi, fu necessario prima di tutto ottimizzare la fase di sintesi per ridurre i consumi di ammidito, pur mantenendo elevate le efficienze di accoppiamento e in un secondo momento sviluppare adeguati metodi cromatografici per eliminare le impurezze che accompagnavano il grezzo di reazione. In generale, le metodologie di purificazione possono sfruttare tecniche di cromatografia su fase inversa (RP-HPLC), tecniche di cromatografia a scambio ionico (IEX-HPLC), o addirittura una combinazione di entrambe le metodologie. Per quanto riguarda la cromatografia in fase inversa RP-HPLC, essa è stata utilizzata per l'analisi e la purificazione di una grande varietà di oligonucleotidi¹¹⁰. Il principale vantaggio di questa tecnica sta nella possibilità di separare con estrema facilità il prodotto oligonucleotide DMT-on da tutte le sequenze fallite DMT-off presenti nel grezzo di reazione, semplicemente sfruttando la natura idrofobica caratteristica degli oligomeri contenenti il gruppo dimetossitritilico in posizione 5'-OH (DMT-on)¹¹¹. Il maggior inconveniente legato a questa procedura sta però nell'elevato numero di *step* post-purificazione che sono richiesti per ottenere il prodotto finale, come la reazione di detritilazione necessaria per deproteggere la funzione ossidrilica 5'-terminale e la successiva purificazione cromatografica del prodotto. Per quanto concerne la cromatografia a scambio ionico IEX-HPLC, essa presenta molteplici vantaggi come per esempio il mancato utilizzo di solventi organici e la possibilità di lavorare direttamente sul grezzo di reazione contenente l'oligo di sintesi ottenuto in modalità DMT-off (cioè senza la protezione sulla funzione ossidrilica 5'-terminale). Ovviamente ciò consente di risparmiare lo *step* di detritilazione e l'oligo viene separato dalle altre impurezze semplicemente sfruttandone le maggiori interazioni di natura elettrostatica¹¹² con la fase stazionaria.

In questo caso però sono sfavorevoli le elevate quantità di soluzioni acquose saline necessarie per sbloccare l'oligo dalla colonna cromatografica, infatti avendo l'oligonucleotide carica negativa, si lega fortemente alla fase stazionaria (che al contrario presenta carica positiva) e molto spesso non ne viene completamente recuperato

compromettendo le rese di sintesi. E' inoltre necessaria una tediosa fase di desalificazione dell'oligo, che ancora una volta richiede utilizzo di elevatissime quantità di solvente acquoso ed allunga i tempi di lavoro.

Infine, combinando tecniche cromatografiche su fase inversa e a scambio ionico il grezzo di reazione viene prima cromatografato su RP-HPLC per ottenere l'oligo DMT-on purificato, successivamente viene detritilato ed infine ripurificato su colonna a scambio ionico. Gli ON così purificati, presentano elevata purezza e bassi contenuti di impurezze fosfodiesteriche (PO)¹¹³; ma purtroppo la resa complessiva è fortemente ridotta per via degli inconvenienti sopra descritti legati alla cromatografia a scambio ionico, inoltre la combinazione di più tecniche cromatografiche richiede la messa a punto e l'ottimizzazione di molteplici apparecchiature, con elevati investimenti in termini di tempo e di denaro. Per quanto ci riguarda, tenuto conto degli svantaggi e dei vantaggi di ogni singola metodologia di purificazione, abbiamo optato per la cromatografia in fase inversa e lo schema rappresentato in Fig.52 a p.71, mostra l'insieme dei passaggi ottimizzati necessari per la purificazione degli oligonucleotidi 2'-OMePS da noi prodotti.

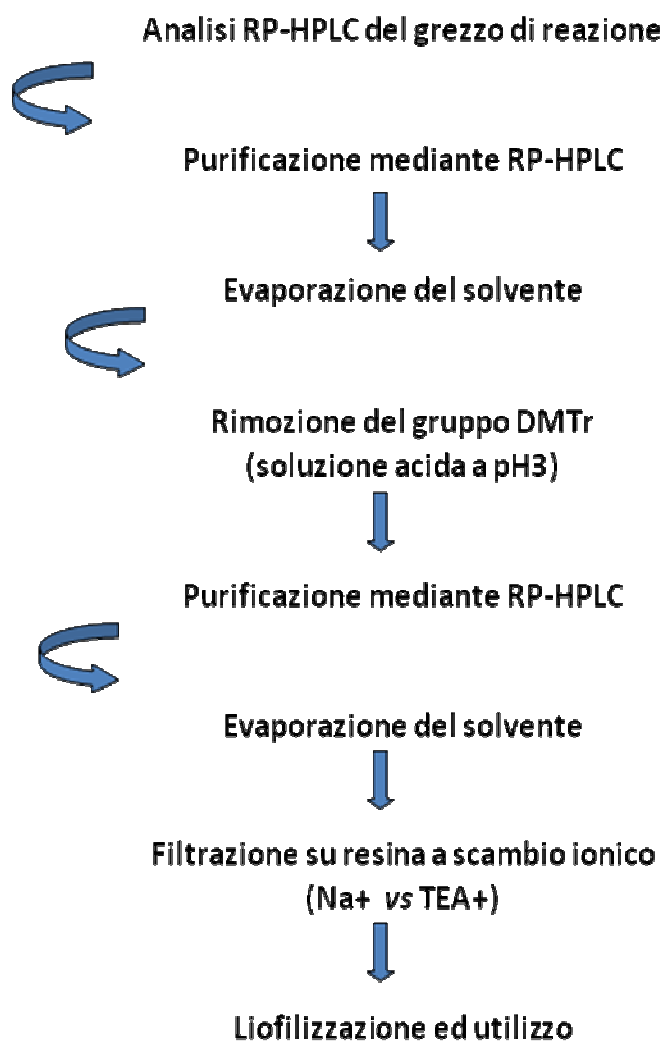


Fig. 52 Fasi del processo di purificazione

Analisi RP-HPLC del grezzo di sintesi di oligonucleotidi 2'-OMePS

Come anticipato a p.68, la necessità di lavorare in modalità DMT-on piuttosto che DMT-off (Fig.53), è una conseguenza diretta della nostra scelta di purificare il prodotto di sintesi mediante RP-HPLC.

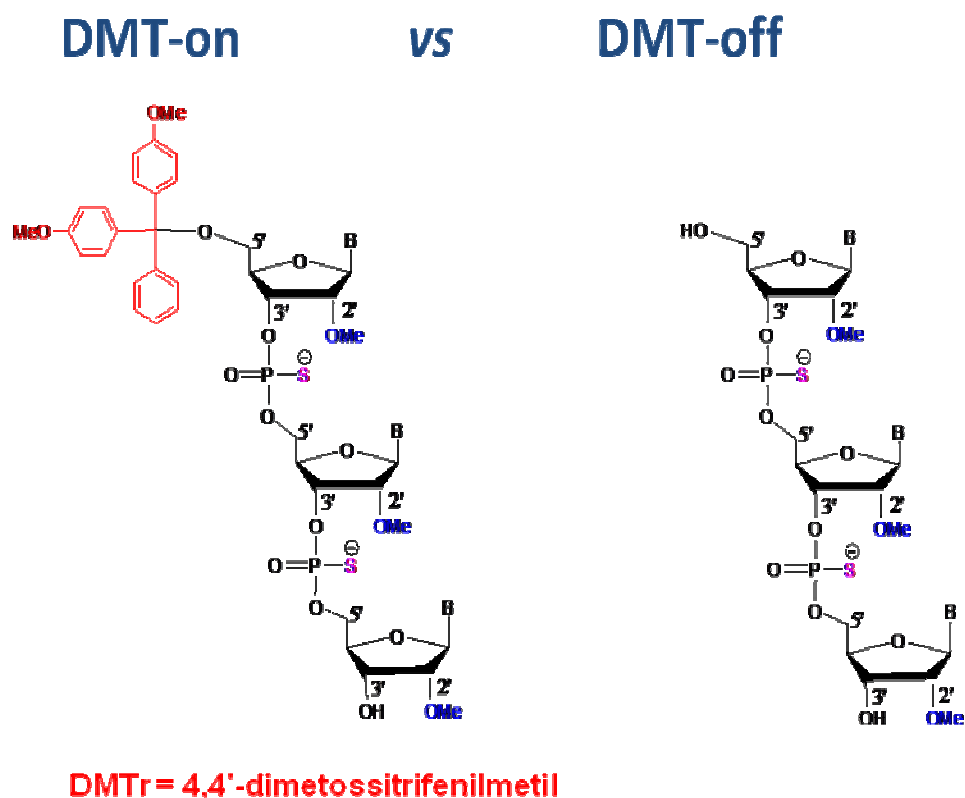


Fig. 53 Oligo DMT-on vs oligo-DMT-off

Tutti i grezzi di reazione che si ottengono dalla sintesi in fase solida su scala 2 e/o 7 μ molare di oligonucleotidi 2'-OMePS lunghi 20/25-mer, contengono l'oligonucleotide DMT-on in miscela con una serie di impurezze. In particolare il cromatogramma di Fig. 54, ottenuto in seguito ad analisi RP-HPLC su colonna "Resource RPC 3ml" a fase inversa a base di polistirene/divinilbenzene, mostra le impurezze relative alla sintesi dell'oligo M23D DMT-on 25mer.

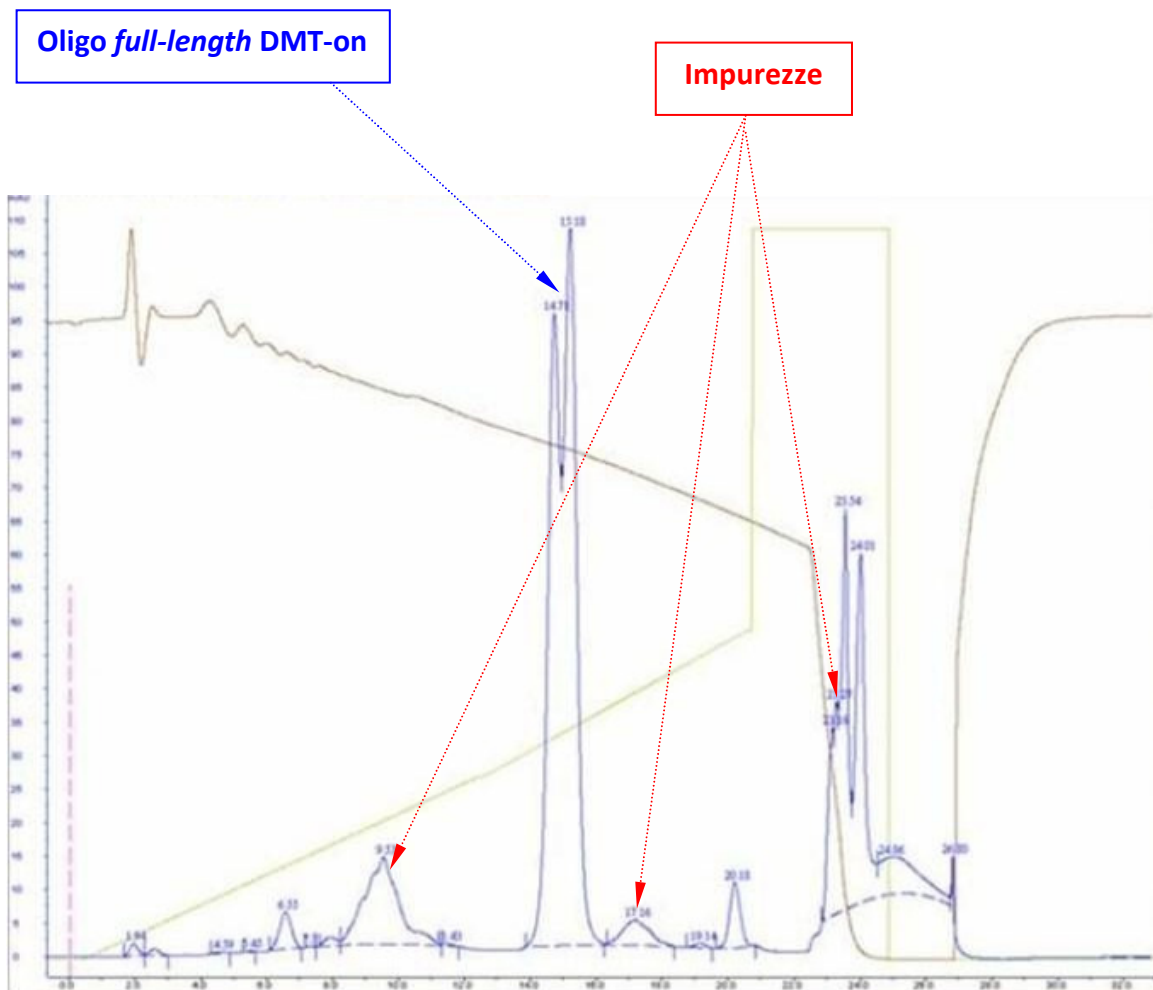


Fig. 54 Analisi RP-HPLC del grezzo di reazione dell' oligo M23D 25mer DMT-on

Se a questo punto si confrontano i cromatogrammi RP-HPLC dell'oligo M23D ottenuto nelle due modalità di sintesi, DMT-on in Fig.54 e DMT-off in Fig.55, è possibile evidenziare tutte le differenze nonché i vantaggi della sintesi effettuata secondo la modalità DMT-on. E' infatti confermato che M23D DMT-on, grazie alla maggiore idrofobicità conferitagli dal gruppo 4,4'-dimetossitriifenilmetile¹¹¹, si separa facilmente dalle impurezze presenti nel grezzo di reazione e in particolare dalle sequenze fallite; mentre invece il picco corrispondente all'oligo M23D DMT-off (Fig. 55) cade proprio a ridosso dei picchi di tali impurezze, poiché esse possiedono caratteristiche di idrofobicità paragonabili a quelle dell'oligo stesso.

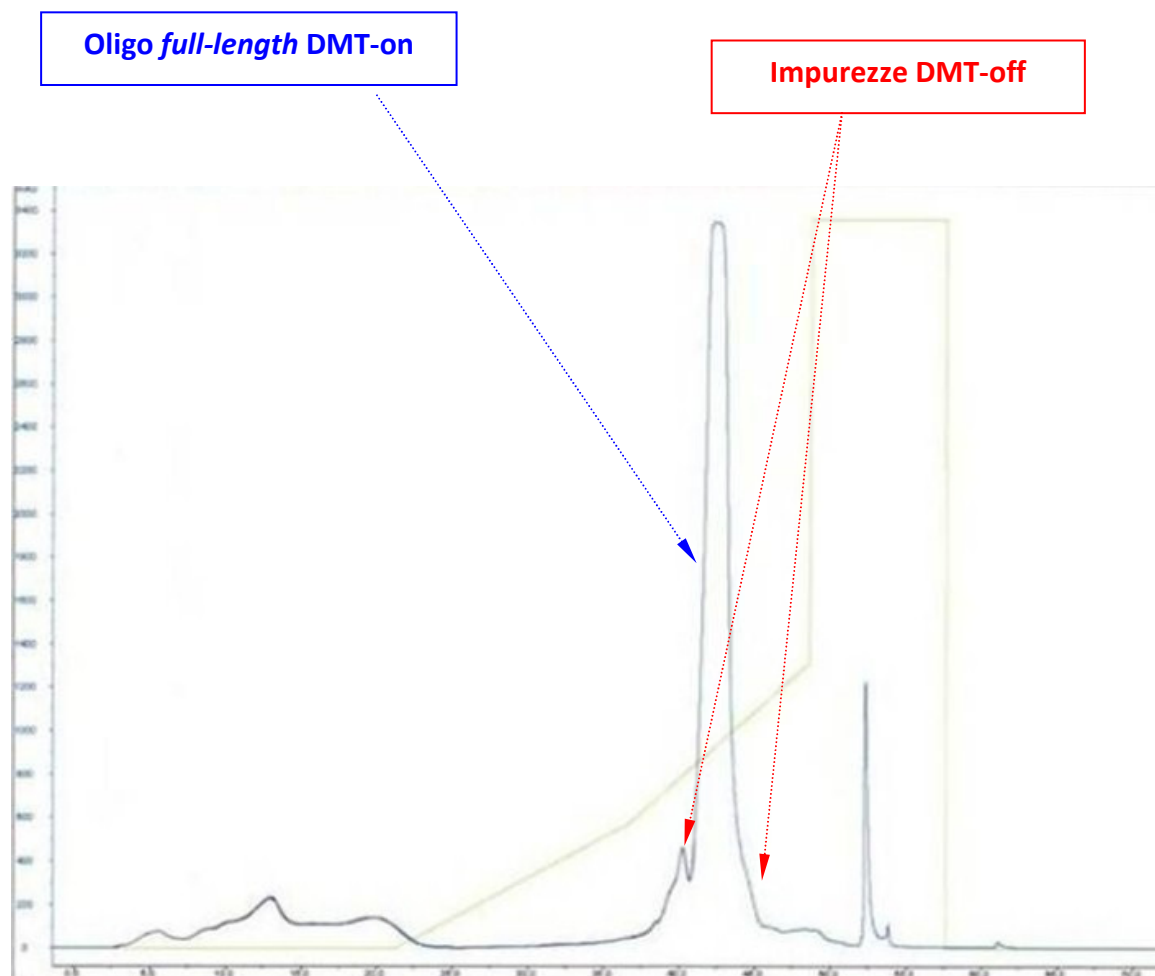


Fig. 55 Analisi RP-HPLC del grezzo di reazione di M23D 25mer DMT-off

La prova che le impurezze corrispondenti a fallimenti non sono separabili dall'oligo DMT-off mediante cromatografia a fase inversa, si ottiene sottoponendo ad indagine di spettroscopia di massa (Fig. 56), il prodotto M23D DMT-off purificato.

Essa evidenzia una serie di impurezze a sinistra del picco di interesse riconducibili a sequenze oligonucleotidiche più corte dell'oligonucleotide *target* (sequenze fallite o cortameri). Si conclude pertanto che la sintesi di oligonucleotidi in modalità DMT-off non dà risultati soddisfacenti se la successiva purificazione avviene mediante cromatografia in fase inversa (RP), perchè inevitabilmente il prodotto DMT-off risulta contaminato dalle sequenze fallite (N-n).

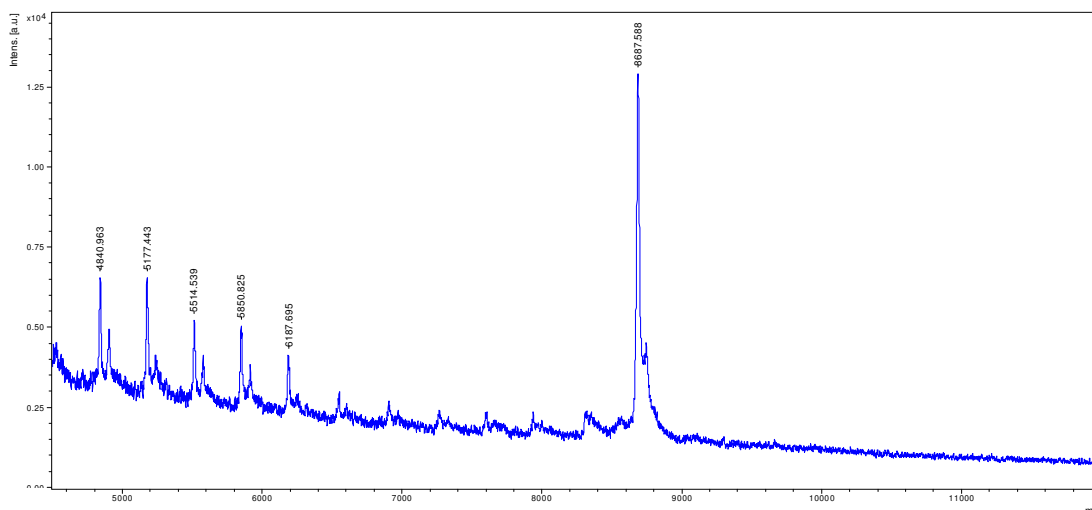


Fig. 56 Spettro MALDI-TOF di M23D sintetizzato in modalità DMT-off, post purificazione RP

Vediamo a questo punto come un esame più dettagliato del cromatogramma di Fig.54, consenta di mettere in luce alcune peculiarità. Il segnale corrispondente al prodotto M23D DMT-on, presenta un caratteristico profilo di doppio picco di assorbimento ($\lambda = 260\text{nm}$) dovuto alla stereoisomeria del fosforo (P^{V})³⁹ più vicino all'estremità 5'-terminale. Si possono inoltre distinguere all'interno del cromatogramma, assorbimenti corrispondenti a diverse tipologie di impurezze. Per esempio tutti i segnali che cadono a sinistra del picco di interesse, sono attribuibili agli assorbimenti caratteristici delle sequenze fallite (N-n), anche dette "cortameri", che come visto a p. 43 possono derivare da uno *step* di detritilazione incompleto, o ancora come discusso a p. 56, possono essere il frutto di accoppiamenti non fruttuosi o di tempi di riciclo troppo brevi durante la fase di *coupling*. In Fig.57 si riporta per esempio il cromatogramma RP-HPLC del grezzo di sintesi dell'oligo M23D 2'-OMePS 25-mer, ottenuto impostando brevi tempi di riciclo che causano la formazione di un' ingente quantità di prodotto cortamero.

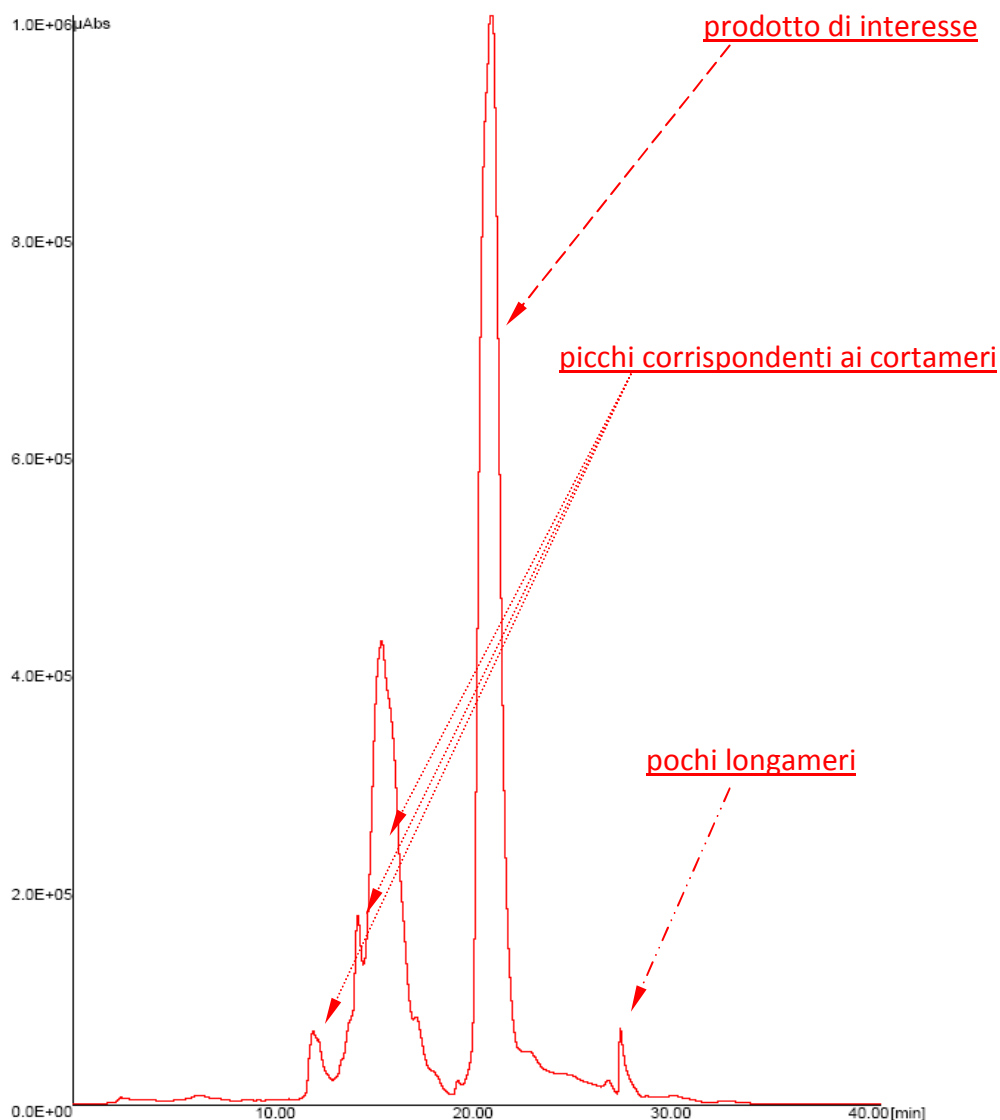


Fig. 57 Analisi RP-HPLC del grezzo di M23D 25mer DMT-on contenente “cortameri”

Al contrario, i segnali che cadono a destra del picco di interesse sono attribuibili agli assorbimenti delle sequenze derivanti da accoppiamenti multipli ($N+m$) anche dette “longameri” (p. 56) o delle impurezze definite “ N +cianoetile” (p.65), che si possono creare durante lo *step* di ammonolisi. In Fig.58 è riportato il cromatogramma RP-HPLC del grezzo di sintesi dell’oligo M23D DMT-on 25-mer, ottenuto per esempio impostando tempi di riciclo molto lunghi, che possono causare la formazione di elevate quantità di prodotto longamero.

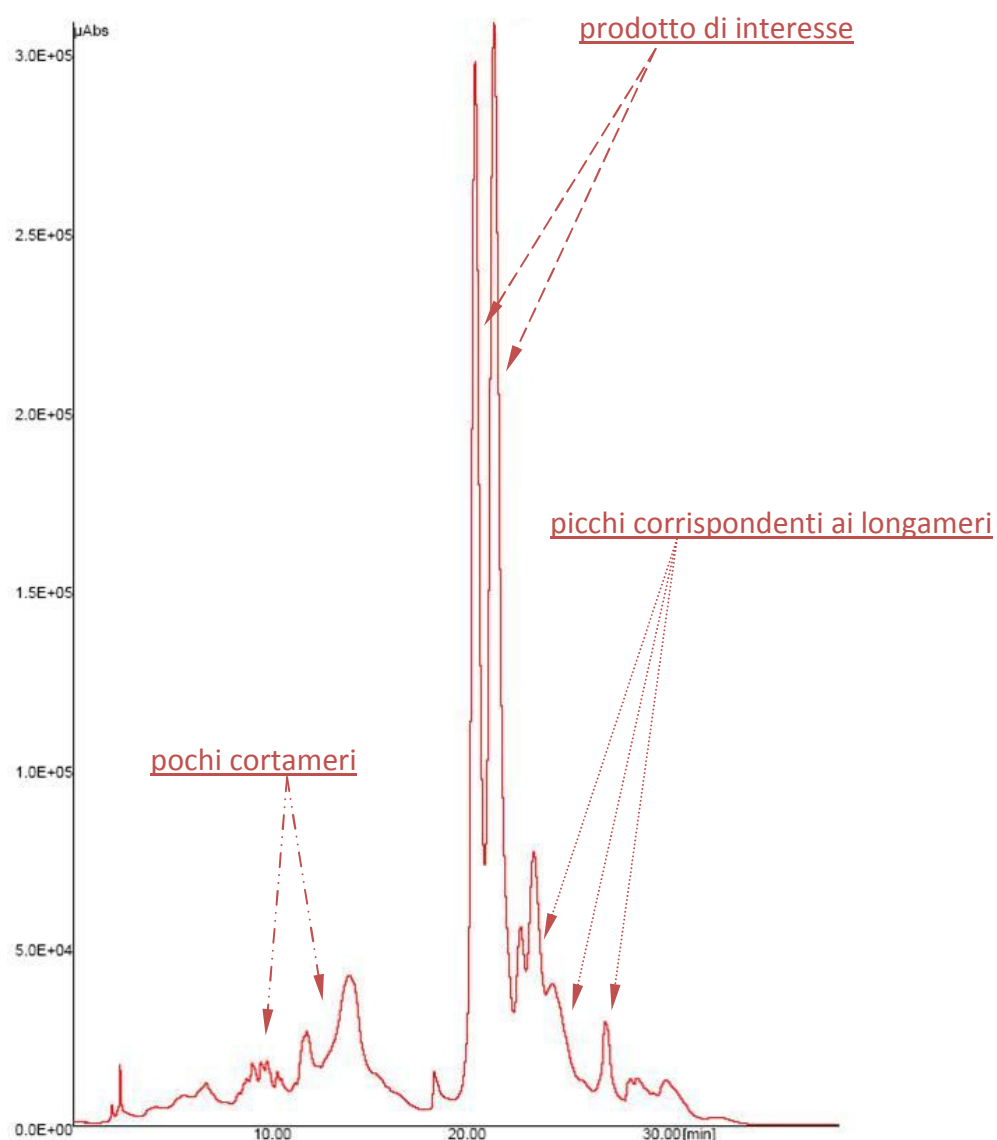


Fig. 58 Analisi RP-HPLC del grezzo di M23D 25mer DMT-on contenente “longameri”

Purificazione RP-HPLC di oligonucleotidi 2'-OMePS DMT-on

Una volta analizzata la qualità del grezzo di sintesi, si procede con il successivo *step* di purificazione (*step2*, Fig.52, p.71). Come noto in letteratura, la purificazione in fase inversa di catene oligonucleotidiche avviene utilizzando tamponi salini molto spesso a base di trietilammonio acetato (TEAA)¹¹⁴. In particolare se l'oligo in questione è fosforotioato (PS) è conveniente lavorare con soluzioni tampone contenenti opportune % di solvente organico (per esempio acetonitrile (CH₃CN)), al fine di facilitare l'eluizione

dell'oligo in colonna. Non è invece consigliabile utilizzare soluzioni eluenti a base di soli solventi organici, perché in tali condizioni gli oligonucleotidi sono scarsamente solubili e non ne è garantito il completo recupero dalla colonna cromatografica¹¹⁵.

E' inoltre risaputo che, sia la cromatografia a scambio ionico (IEX) che quella in fase inversa (RP), risentono dei lenti trasferimenti di massa degli oligonucleotidi tra fase stazionaria e fase mobile. Un miglioramento in questo senso si può ottenere utilizzando fasi stazionarie non porose¹¹⁶. D'altro canto, la scarsa capacità di caricamento caratteristica di tali fasi, riduce fortemente la quantità di oligonucleotide purificabile in ogni passaggio cromatografico^{114b}. E' stato infine dimostrato che caricare ed eluire l'oligo in colonna con soluzioni a base di idrato d'ammonio (NH₄OH), come quella utilizzata per lo sblocco e la deprotezione, riduce l'affinità delle specie DMT-off e DMT-on nei confronti della fase stazionaria, rispettivamente a valori pari al 62,4% e 80%¹¹⁵. Evidentemente l'elevato pH (~12) di tale soluzione, ne conferisce le potenzialità di fase mobile ad elevata capacità eluente¹¹⁵. E' quindi preferibile caricare il grezzo di sintesi sciolto in una soluzione di TEAA 0.1M a pH=8, anziché in soluzione di idrato d'ammonio e successivamente cromatografarlo utilizzando soluzioni eluenti a base di TEAA e di solventi organici come CH₃CN, seguendo un opportuno gradiente di concentrazione¹¹⁷.

Il grezzo dell'oligo M23D DMT-on 25mer, previa dissoluzione in alcuni ml di soluzione tampone A = TEAA 0.1M, pH = 8, al 5% CH₃CN, è stato cromatografato utilizzando una colonna "Resource RPC 3 ml" a fase inversa a base di polistirene/divinilbenzene. Lavorare a pH controllato evita che durante la fase di purificazione si possano verificare fenomeni indesiderati di depurinazione^{21,84}. Il gradiente di eluizione (tab. 1.2.9) è stato costruito *ad hoc* impostando il *software UNIKORN*, ed è rappresentato dai segmenti rossi riportati in Fig.59.

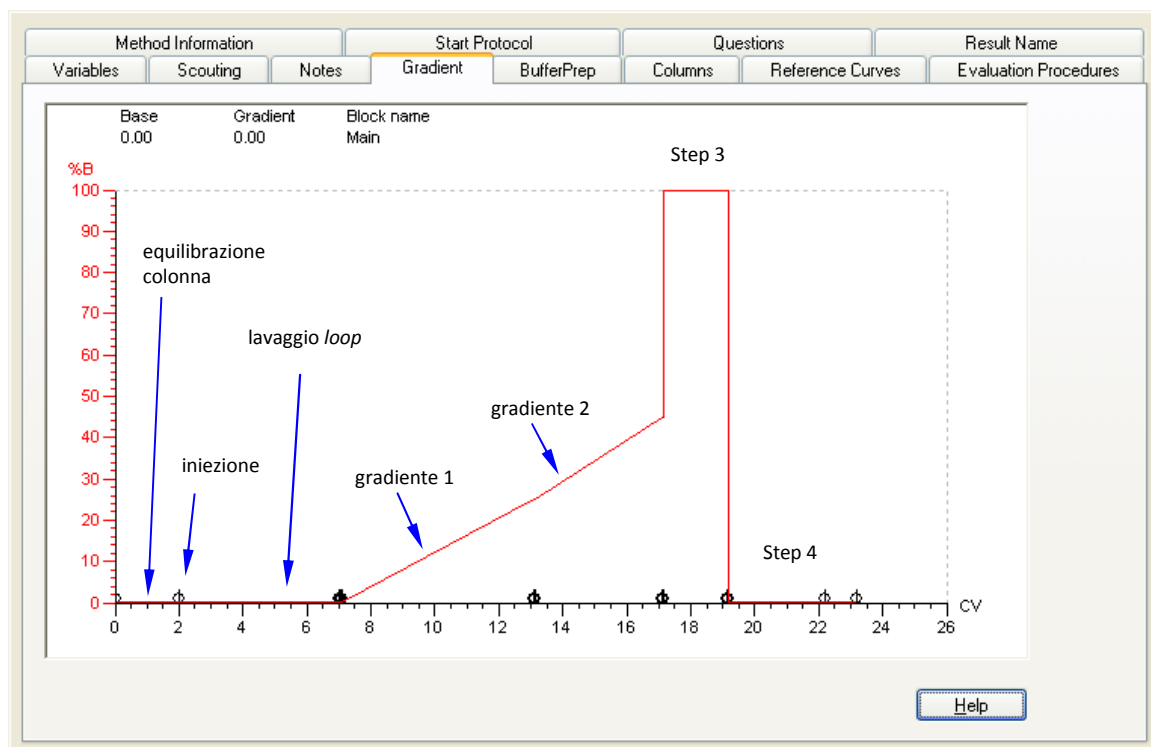


Fig. 59 Gradiente di conc. in CH₃CN per la purificazione di M23D 2'-OMePS DMT-on 25mer

Tab. 1.2.9 Purificazione RP-HPLC dell' oligo M23D DMT-on 25mer.

colonna "Resource RPC 3 ml": fase stazionaria polistirene/divinilbenzene; porosità=15µm, pH =1-12, capacità di caricamento =0.5 µmoli; **Tamponi**: A = TEAA 0.1M, pH = 8, 5% CH₃CN; B = acetonitrile (CH₃CN); **Flusso** = 1.5 ml/min; **Temperatura** = 20°C; **volume Loop** (ml) = variabile in base alle necessità di purificazione da 1 a 8ml.

Step	% B	Durata in volumi colonna (CV)
Equilibratura colonna	0	2
Gradiente 1	25	6
gradiente 2	45	4
Step 3	100	2
Step 4	0	3

Il caratteristico profilo di assorbimento a lunghezza d'onda $\lambda=260$ nm, dell'oligo M23D DMT-on 25 mer purificato, è rappresentato in Fig.60. Un adeguato sistema di frazionamento permette di raccogliere le singole porzioni cromatografate.

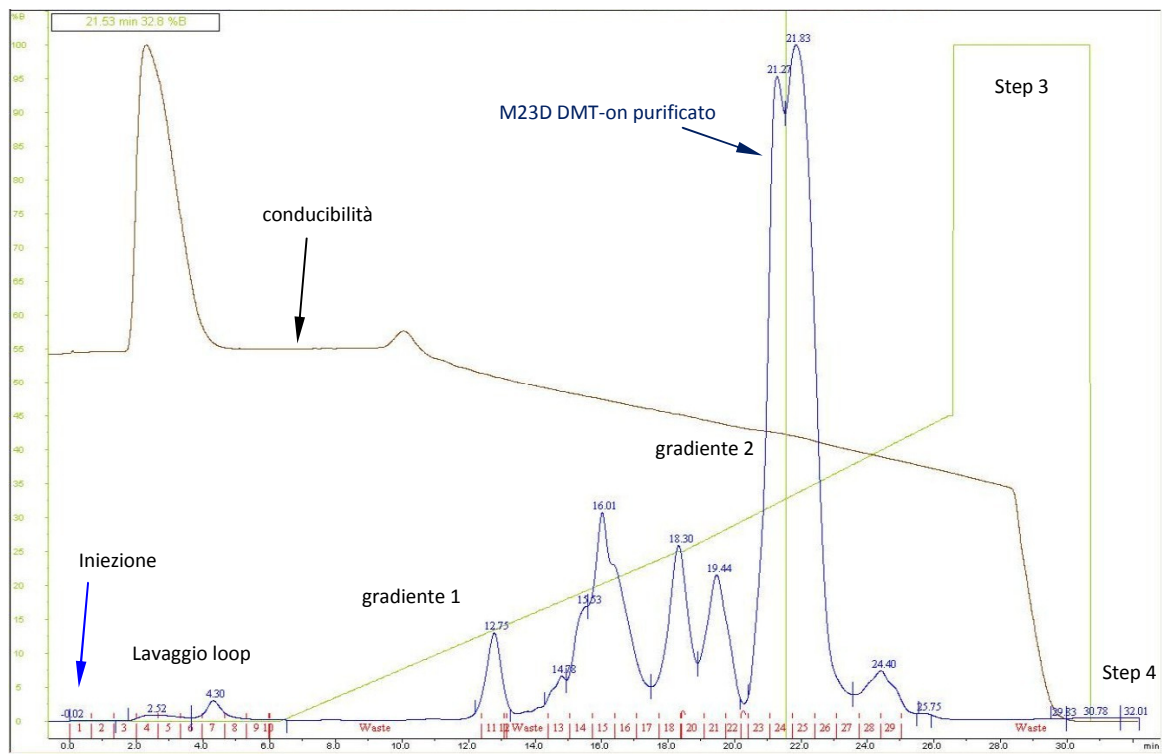


Fig.60 Cromatogramma dell'oligo M23D DMT-on 25 mer purificato in RP-HPLC

- Profilo cromatografico ($\lambda=260\text{nm}$)
- Frazioni raccolte
- Variazione della %B nei gradienti e negli steps
- Andamento della conducibilità ($\mu\text{S/cm}$)

Inizialmente la colonna cromatografica deve essere equilibrata con 2 volumi colonna (CV) di soluzione tampone A, al termine di questa fase il grezzo di sintesi precedentemente iniettato nel *loop* passa in colonna e prima che inizi il vero e proprio gradiente di eluizione, è necessario che il *loop* stesso venga lavato con un volume di soluzione tampone A, pari ad almeno 3 volte il volume del *loop*. Ciò garantisce il totale recupero del prodotto iniettato da cromatografare. Durante il gradiente, all'aumentare della concentrazione del tampone B (segmenti verdi, Fig. 60), diminuisce la conducibilità della miscela di eluizione (linea marron , Fig.60) la cui % di tampone salino A cala nel tempo. Gli step 3 e 4 sono necessari per il lavaggio della colonna cromatografica e per ristabilire le condizioni di eluizione iniziali.

In un intervallo di % di B che va circa dal 28 al 35%, viene raccolto il prodotto M23D DMT-on purificato.

Rimozione del gruppo DMTr dall'oligo 2'-OMePS DMT-on purificato

Tutte le frazioni di oligo DMT-on purificato, devono essere concentrate evaporando il tampone volatile TEAA ed il solvente organico acetonitrile. Quindi il prodotto che si ottiene è pronto per essere sottoposto alla successiva fase di detritilazione (*step 4*, Fig. 52, p.71). La rimozione del gruppo DMTr in 5'-terminale, permette di ottenere l'oligonucleotide in forma completamente deprotetta. Il maggior inconveniente che si può riscontrare durante questa operazione condotta in condizioni acide, è la possibile depurinazione dei nucleotidi purinici^{84b,c}. Sebbene siano note diverse procedure per la separazione delle sequenze apuriche¹¹⁸, è preferibile produrre oligonucleotidi di elevata qualità senza ulteriori *steps* di purificazione.

La reazione di detritilazione è stata effettuata in base alle indicazioni riportate da Krotz in un lavoro del 2003, intitolato "*Controlled Detrytilation of Antisense Oligonucleotides*"¹¹⁹ dove viene proposta una procedura pratica, efficiente, sicura, economica e riproducibile, per rimuovere il gruppo dimetossitritile da oligonucleotidi fosforotioati (PS) a base DNA, che fa uso di una soluzione acquosa di acetato di sodio (NaOAc) a pH = 3. Per effettuare la reazione di detritilazione è innanzi tutto necessario determinare il valore di densità ottica (OD) dell'oligo DMT-on purificato, in quanto la cinetica di questa reazione è legata alla concentrazione dell'oligonucleotide¹¹⁹.

Dal valore della densità ottica totale, è possibile quindi calcolare la quantità di acqua nella quale l'oligo da detritilare deve essere sciolto, tenuto conto che la reazione ha una buona cinetica quando viene rispettata una concentrazione pari a 1000 OD/ml H₂O.

Rispettando queste proporzioni, la reazione di detritilazione avviene in maniera pressoché quantitativa in poco più di un'ora. Diluizioni eccessive infatti causerebbero il rallentamento della reazione di detritilazione, con maggiore probabilità di riscontrare fenomeni di depurinazione^{84b,c}.

L'oligo sciolto nella giusta quantità di acqua, viene quindi addizionato di un volume di acetato di sodio (NaOAc) a concentrazione 0.1M e a pH = 3 e la reazione di detritilazione viene seguita mediante analisi RP-HPLC.

Al termine della reazione di detritilazione, l'acidità della soluzione viene tamponata aggiungendo un volume di acetato di sodio (NaOAc) a pH = 8.5

Purificazione RP-HPLC dell'ON 2'-OMePS DMT-off, concentrazione, filtrazione su resina a scambio ionico e analisi qualitativa.

Un secondo passaggio cromatografico su RP-HPLC è richiesto per purificare l'oligonucleotide M23D detritilato, al fine di eliminare i sali di sodio acetato introdotti con la reazione di detritilazione e l'alcool dimetossitritanololo (DMTr-OH) che si forma dal catione dimetossitritilico liberato dall' -OH in 5' terminale. In questo caso il gradiente di concentrazione messo a punto per la purificazione è rappresentato in Fig.61 e le singole fasi sono dettagliate in tab. 1.2.10.

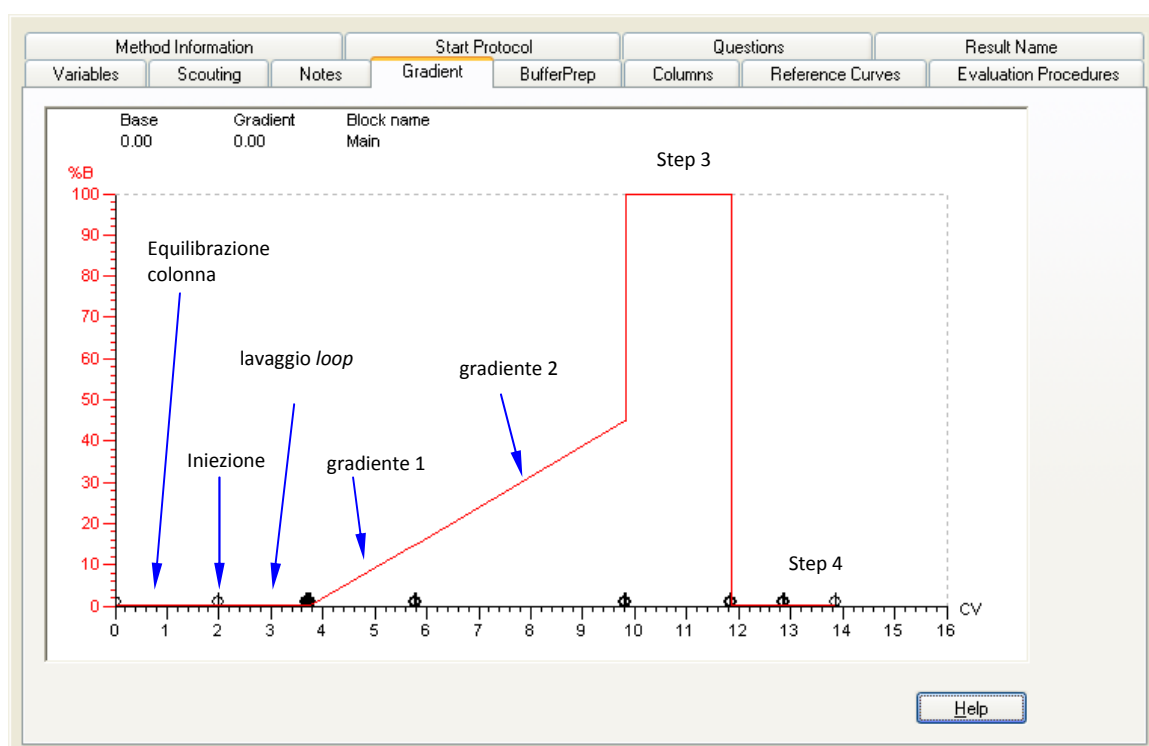


Fig. 61 Gradiente di conc. in CH₃CN per la purificazione di M23D 2'-OMePS 25mer post detritilazione

Tab. 1.2.10 Purificazione RP-HPLC dell' oligo M23D 25mer post detritilazione.

colonna "Resource RPC 3 ml": fase stazionaria polistirene/divinilbenzene; porosità=15µm, pH =1-12, capacità di caricamento =0.5 µmoli; **Tamponi:** A = TEAA 0.1M, pH = 8, 5% CH₃CN; B = acetonitrile (CH₃CN); **Flusso** = 1.5 ml/min; **Temperatura** = 20°C; **volume(ml) Loop** variabile in base alle necessità di purificazione da 1 a 8ml.

Step	% B	Durata in volumi colonna (CV)
Column equilibration	0	2
Gradiente 1	15	2
gradiente 2	45	4
Step 3	100	2
Step 4	0	1

Il profilo di assorbimento a lunghezza d'onda $\lambda=260$ nm, caratteristico dell'oligo M23D 2'-OMePS 25 mer, post detritilazione è rappresentato in (Fig.62).

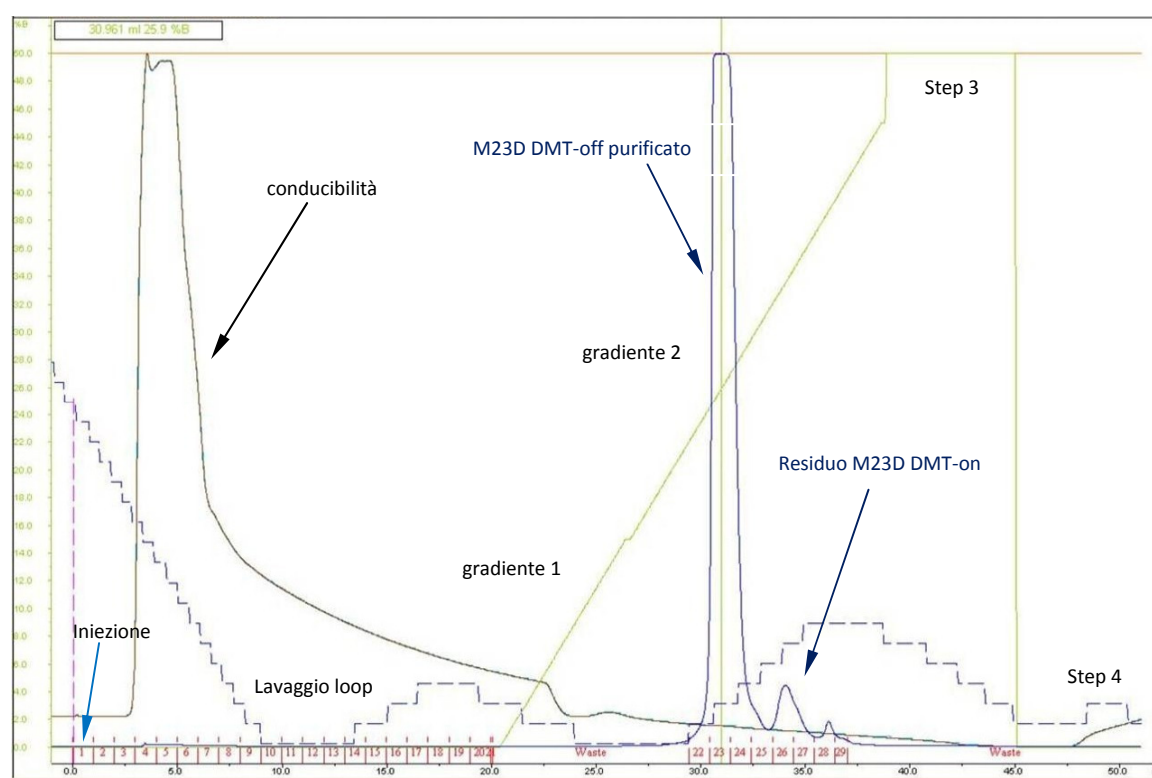


Fig. 62 Cromatogramma purificazione oligo M23D 2'-OMePS 25mer, post detritilazione

- Profilo cromatografico ($\lambda=260\text{nm}$)
- Frazioni raccolte
- Variazione della %B nei gradienti e negli *steps*
- Andamento della conducibilità ($\mu\text{S/cm}$)

Dopo aver equilibrato la colonna cromatografica (2CV), il grezzo di sintesi viene iniettato e durante la fase di lavaggio del *loop*, si nota un aumento improvviso della curva di conducibilità. Questo andamento è significativo dell'eliminazione dei sali di acetato di sodio introdotti durante la fase di detritilazione.

Sebbene non sia stato identificato un picco di assorbimento preciso corrispondente al dimetossitritanolo (DMTr-OH) lavorando a $\lambda = 260 \text{ nm}$, riteniamo che anche questo sottoprodotto sia completamente eliminato durante tale fase di purificazione RP-HPLC, poiché le analisi qualitative dell'oligo così purificato, non hanno mai evidenziato la presenza di questa specie. L'intervallo di concentrazione di B espresso in valore % all'interno del quale è stato raccolto il prodotto M23D purificato, va circa dal 23 al 27%. Dovendo essere utilizzato per prove in vivo e su cellula, è stato necessario scambiare gli ioni trietilammonio (TEA^+) dell'oligo M23D purificato, con ioni Na^+ . Ciò è stato realizzato mediante filtrazione su resina a scambio ionico di tipo Dowex 50 W X 8 (Na^+). La relazione matematica che ci ha permesso di calcolare la quantità di resina più opportuna, al fine di garantire uno scambio quantitativo degli ioni in questione, è di seguito riportata:

$$\text{meq. di oligo} * 100 : (\text{x}) \text{ g resina} = 4.8 \text{ meq. di Na}^+ : 1 \text{ g resina.}$$

Sebbene le procedure di sintesi e purificazione siano state settate sull'oligo M23D utilizzato come modello, molti altri oligonucleotidi sono stati sintetizzati durante il dottorato di ricerca su scala 2 e/o 7 μmolare . Per la realizzazione di queste sequenze, riportate in tab. 1.2.11, sono stati impiegati gli stessi parametri di sintesi e purificazione messi a punto per l'oligo M23D.

Tab. 1.2.11

Nome	Sequenza	Resa media in mg. e purezza media (%) per sintesi su scala 2 μ molare	Resa media in mg. e purezza media (%) per sintesi su scala 7 μ molare
M23D	ggccaaaccucggcuuaccugaaau	4.9 (92)	19.7 (92)
Ex16AON1	ucuuuuucagauccguuuuaa	4.7 (94)	18.5 (91)
Ex26AON1	cucccuucaaggccuaauuuc	5.2 (91)	-----
Ex26AON2	ucuguaauucaucuggaguu	4.9 (90)	18.7 (91)
Ex33AON1	cuuuaucccauuuccacuucag	5.1 (91)	18.8 (94)
Ex33AON2	ccgucugcuuuucuguaca	5.0 (94)	18.7 (92)
Ex34AON1	ucuccaacuguuacuucuuuc	4.6 (93)	18.4 (91)
Ex34AON2	cuuucacauuuacgggac	5.5 (92)	-----
Ex34AON3	uccauaucuguagcugccag	5.0 (91)	-----
Ex51AON1	ccaucaccucugauuuu	5.3 (90)	19.2 (91)
Ex51AON2	ccuuaguaaccacagguuguguc	5.0 (91)	-----
ESEV1	aggaaaauauggcuuccgac	4.3 (92)	18.3 (93)
ESEV2	agguuuggcuuaggcaggaaau	4.1 (90)	18.1 (90)
ESEN1	uuuuuaagauugaagaacgcc	5.3 (90)	-----
ESEN2	cauccuuuuuuauuguuug	4.1 (93)	18.7 (92)
SRBV1	cuuaaacacuuccauuuug	5.2 (91)	-----
SRBV2	ucauucucucuuccuuccug	4.3 (92)	18.4 (91)
SRBN1	uuacuauuaaagaaauuuu	4.5 (94)	18.5 (90)
SRBN2	uuuugcuauuuuccuucguug	3.7 (91)	17.7 (91)
SRBN3	uuuugcuauuuuccuucguug	4.0 (92)	18.0 (90)
SRBN4	uuuuuaguaccugaguacauu	4.7 (90)	-----
SRBN5	ccuuucugguuuuuugggcc	4.5 (90)	18.3 (91)
Ex10AON1	guccucagcagaaagaagcc	5.5 (93)	20.8 (92)
Ex10AON2	guaugaaacugacuggucuu	5.2 (92)	20.1 (90)
Ex10AON3	acuucuuuaaagcuguuug	5.1 (92)	18.6 (93)
Ex39AON1	cucucguuuucucuacucug	4.6 (93)	-----
Ex39AON2	gucuguaacagcugcauuu	5.3 (91)	-----

Raccogliamo nelle tabelle tab. 1.2.12 e 1.2.13 , tutti i parametri di messa a punto validi per la sintesi di M23D DMT-on 25-mer su scala 2 e 7 μ molare, e per la sintesi su scala 2 e 7 μ molare delle sequenze riportate in Tab. 1.2.11, corrispondenti ad oligo 2'-OMePS di lunghezza compresa nell'intervallo 20-25-mer.

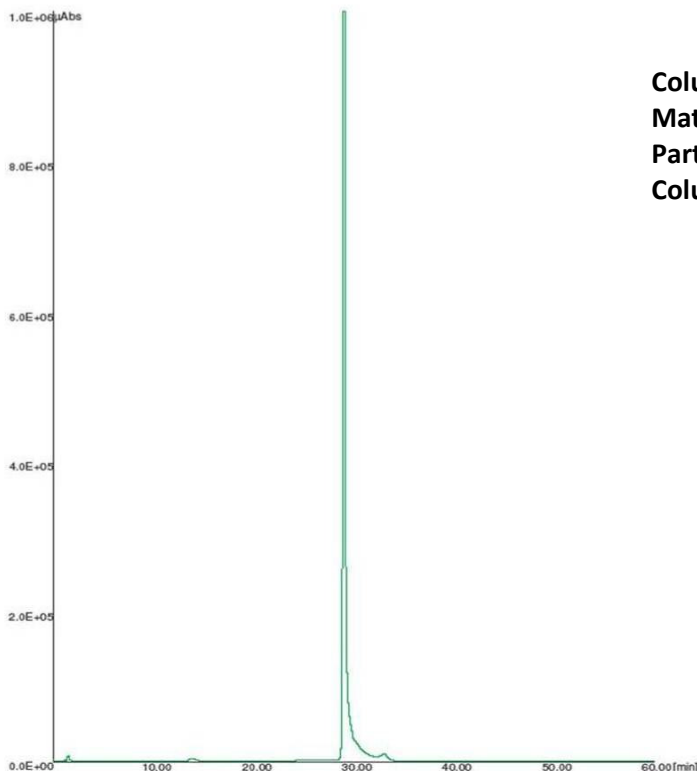
Tab. 1.2.12

Ottimizzazione sintesi di M23D DMT-on PS full length su scala 2 μmolare	
scala di sintesi 2 μ mol; oligo 25-mer; <i>primer support</i> 80 μ mol/g	
Reazione di detritilazione	Reagente detritilante: soluzione al 3% di acido dicloroacetico (Cl ₂ CHCOOH) in toluene.
Volume di detritilante (ml.)	5
Tempo contatto (min.)	0.5 (30")
Flusso (ml/min)	10
Reazione di <i>coupling</i>	Reagente Activator 42: soluzione 0.25 M in CH ₃ CN di 5-(Bis-3,5-trifluorometilfenil)-1H-tetrazolo
Eq. ammidito 2'-OMe-RNA (eq.)	10 eq.
Conc. ammidito 2'-OMe-RNA (M)	0.05 M
Reagente attivante (%)	60%
Tempo di riciclo (min)	12 min
Reazione di tio-ossidazione	Reagente PADS: Soluzione 0.2 M in CH ₃ CN/ Piridina(Py)(1:1)
Volume tio (CV)	2
Tempo di contatto (min)	3 min
Flusso tio-ossidante (ml/min)	0.4 ml/min
Reazione di <i>capping</i>	Reagenti: capA (soluzione al 20% (V/V) di N-metil imidazolo in CH ₃ CN); capB (soluzione al 20% (V/V) di anidride acetica e soluzione al 30% (V/V) di 2,6-lutidina in CH ₃ CN)
Volume capAB (CV)	2
Tempo di contatto (min)	0.24
Flusso(ml/min.)	5
Reazione con DEA	Reagente: soluzione di dietilammina (DEA) al 20% (V/V) in acetonitrile anidro
Volume (ml)	10
Tempo di reazione (min)	10
Flusso (ml/min)	1

Tab. 1.2.13

Ottimizzazione sintesi di M23D DMT-on PS <i>full length</i> su scala 7 μmolare	
oligo 25-mer; <i>primer support</i> 200 μ mol/g	
Reazione di detritilazione	Reagente detritilante: soluzione al 3% di acido dicloroacetico (Cl_2CHCOOH) in toluene.
Volume di detritilante (ml.)	5
Tempo contatto (min.)	0.5 (30")
Flusso (ml/min)	10
Reazione di <i>coupling</i>	Reagente Activator 42: soluzione 0.25 M in CH_3CN di 5-(Bis-3,5-trifluorometilfenil)-1H-tetrazolo
Eq. ammidito 2'-OMe-RNA (eq.)	6 eq.
Conc. ammidito 2'-OMe-RNA (M)	0.1 M
Reagente attivante (%)	60%
Tempo di riciclo (min)	6 min
Reazione di tio-ossidazione	Reagente PADS: Soluzione 0.2 M in CH_3CN / Piridina(Py)(1:1)
Volume tio (CV)	2
Tempo di contatto (min)	3 min
Flusso tio-ossidante (ml/min)	0.4 ml/min
Reazione di <i>capping</i>	Reagenti: capA (soluzione al 20% (V/V) di N-metil imidazolo in CH_3CN); capB (soluzione al 20% (V/V) di anidride acetica e soluzione al 30% (V/V) di 2,6-lutidina in CH_3CN)
Volume capAB (CV)	2
Tempo di contatto (min)	0.24
Flusso(ml/min.)	5
Reazione con DEA	Reagente: soluzione di dietilammina (DEA) al 20% (V/V) in acetonitrile anidro
Volume (ml)	10
Tempo di reazione (min)	10
Flusso (ml/min)	1

La qualità degli oligo sintetizzati con i parametri appena discussi, è stata verificata con l'aiuto di una serie di analisi. In particolare, l'analisi RP-HPLC dell'oligo M23D purificato, realizzata su colonna SOURCE 5RPC ST a base di polistirene/divinilbenzene, ha fornito una stima approssimativa delle impurezze, probabilmente corrispondenti a sequenze fallite, pari a circa il 4%, (Fig.63).



Column: SOURCE 5RPC ST 4.6/150mm
Matrix: polistirene/divinil benzene
Particle size: 5 μm
Column Volume (CV) = 2.5ml

Peak Information	
Peak Name :	M23D Group :
Ret. Time :	28.950 [min]
Peak Start :	28.358 Peak End : 33.767
Peak Width :	0.276
Area Calculated In :	$\mu\text{Abs} \times \text{s}$
Peak Area :	22054734.95 Height : 999497
Corr. Area :	22054734.9492
% Area / Sum :	95.96 %
Quantity :	0.000
Weight % :	0.000 %
Integration Mode :	Manual

22-Nov-2007 16:31:44 LARA.Pase N° 1/1

Fig. 63 Analisi RP-HPLC di M23D purificato

Mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare al ^{31}P (^{31}P -NMR), è stato inoltre stimato il grado di impurezza attribuibile a una parte di prodotto non completamente fosforotioato (presenza di parziali mono, di, tri, ecc. fosfodiesteri (PO)), derivante da una reazione di sulfurizzazione inefficiente, o generato durante lo step di ammonolisi, il cui valore si aggira intorno al 3-5%, (Fig.64).

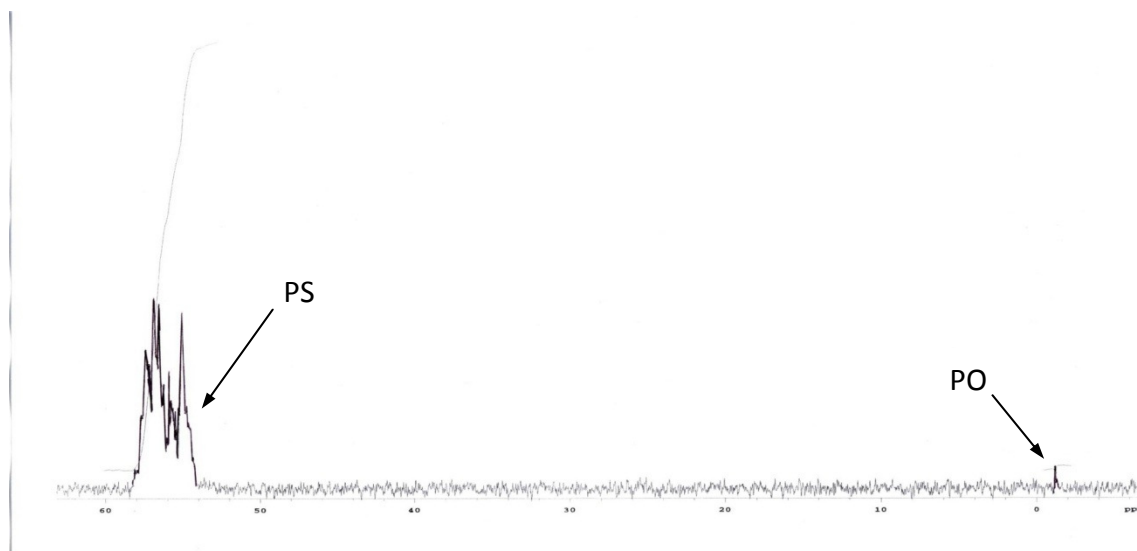


Fig. 64 Spettro ^{31}P -NMR di M23D purificato

Infine l'analisi di spettroscopia di massa MALDI-TOF, effettuata utilizzando come matrice l'acido picolinico (PA), ha fornito il valore di 8667.6 u.m.a. che è la dimostrazione della buona riuscita della sintesi (Fig. 65).

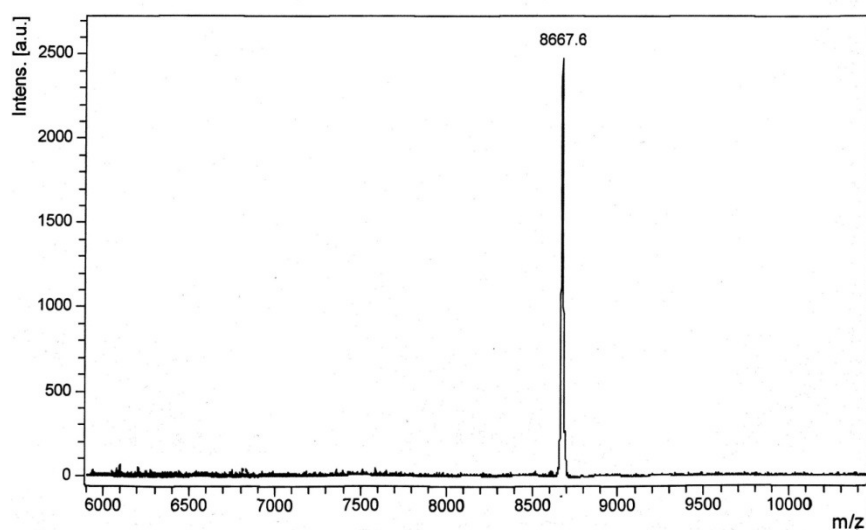


Fig. 65 Spettro MALDI-TOF di M23D post purificazione su RP

L'oligonucleotide M23D 2'-OMePS *full length* da noi realizzato, è stato utilizzato per prove di *binding* su nanoparticelle cationiche a base di polimetilmetacrilato (PMMA) presso il CNR ISOF di Bologna. Successivamente le nanoparticelle così funzionalizzate sono state impiegate per prove di *Exon skipping* su modello animale murino *mdx*, presso

il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Ferrara. Tutti i risultati sperimentali pubblicati su *Molecular Therapy* (vedi articolo allegato: "*Cationic PMMA nanoparticles bind and deliver antisense oligoribonucleotides allowing restoration of dystrophin expression in the mdx mouse*"), dimostrano quanto M23D 2'-OMePS *full length* così veicolato, sia efficace nell'attuare il meccanismo di *Exon skipping* e consenta il ripristino di una proteina distrofina di tipo funzionale.

Conclusioni

Concludendo tutti gli oligonucleotidi riportati in tab. 1.2.11, sintetizzati e purificati secondo le modalità discusse nei paragrafi precedenti, sono stati ottenuti in miscela diastereoisomerica (2^n diastereoisomeri con n =numero di atomi di fosforo (P) asimmetrici), con rese di prodotto finale purificato comprese fra il 30-35% per sintesi su scala 2 μ molare e fra il 35-40%, per sintesi su scala 7 μ molare.

In particolare si riportano di seguito i risultati ottenuti relativamente all'oligonucleotide M23D 2'-OMePS *full length* 25-mer, il cui numero di diastereoisomeri è pari a $2^{24} = 16'777'216$. Tenendo presente che mediamente l'efficienza della reazione di *coupling* è superiore al 98%, la resa teorica grezza è stimabile nel seguente modo: $0.98^{24} = 61.6\%$.

Sperimentalmente, dopo la messa a punto delle fasi di sintesi si è ottenuta una resa grezza di 15mg e di 52.5mg rispettivamente per sintesi su scala 2-7 μ molare (la stima è stata effettuata mediante lettura spettrofotometrica UV-VIS a $\lambda = 260\text{nm}$).

Le rese effettive ottenute dopo i vari passaggi post sintesi (purificazione RP-HPLC, detritilazione, ulteriore purificazione RP-HPLC e filtrazione su resina a scambio ionico), hanno fornito per sintesi su scala 2 μ molare una resa del 30-35%, corrispondente a 4.5-5.3 mg pari a 0.52-0.60 μ moli di oligo M23D. Per sintesi su scala 7 μ molare le rese effettive di oligo M23D hanno fornito il 35-40% di prodotto purificato, corrispondenti a 18.4-21.0 mg pari a 2.12-2.42 μ moli.

Il grado di purezza, stimato in entrambe i casi mediante analisi RP-HPLC, spettroscopia di risonanza magnetica nucleare al ^{31}P (^{31}P -NMR) e spettroscopia di massa MALDI-TOF, è rientrato in un *range* compreso fra 91-93%. Le impurezze riscontrate si possono riferire a sequenze fallite circa 4% e ad una piccola percentuale di prodotto non completamente fosforotioato 3-5%.

Si è inoltre osservato che, come atteso, le migliori rese di sintesi sono state osservate assemblando sequenze oligonucleotidiche più corte, per esempio di lunghezza pari a 20-mer piuttosto che 25-mer. Infatti, come in precedenza spiegato, maggiore è il numero di cicli di accoppiamento maggiore è il numero di fallimenti che si possono riscontrare e minore è la probabilità di ottenere la catena oligonucleotidica *full length* desiderata.

Inoltre, le rese di sintesi per catene oligonucleotidiche contenenti un elevato numero di residui di uridina, sono risultate mediamente più basse. Si è ipotizzato che ciò sia dovuto ad un non completo distacco dei gruppi cianoetile durante il trattamento con dietilammina. Inoltre, sequenze ricche di nucleotidi "g", hanno presentato rese mediamente più basse, attribuibili probabilmente alla formazione di catene oligonucleotidiche contenenti accoppiamenti multipli (N+m), data l'elevata sensibilità del fosforoamidato "g" nei confronti della reazione di detritilazione.

Sintesi di nucleosidi

2'-funzionalizzati con acidi biliari (AB)

2.1 – Introduzione

Oligonucleotidi coniugati con molecole *carriers*

Come anticipato al capitolo 1, p.25, gli oligonucleotidi naturali non sono in grado di modulare in maniera soddisfacente i processi biochimici dei sistemi cellulari, pertanto è stata necessaria l'introduzione di adeguate modifiche chimiche strutturali, sia per permettere all'oligo di esplicare la propria funzione biologica raggiungendo l'interno della cellula inalterato, sia per consentirne l'attraversamento della membrana cellulare lipofila, al fine di raggiungere le concentrazioni intracellulari ottimali¹²⁰.

Nel nostro lavoro pubblicato su "*Molecular Therapy*" (vedi articolo allegato a fine tesi), è stato dimostrato come l'oligo polianione M23D, coniugato attraverso la formazione di legami elettrostatici a specie policationiche come le nanoparticelle di polimetilmetacrilato (PMMA), sia in grado di penetrare più facilmente le membrane cellulari e svolgere senza problemi la propria attività biologica. Un altro esempio noto di coniugazione elettrostatica, è quello che si riscontra fra oligonucleotidi e liposomi opportunamente funzionalizzati¹²¹. Oltre che attraverso legami di natura elettrostatica, la coniugazione di una molecola con un oligonucleotide può avvenire mediante formazione di un legame di tipo covalente. In particolare oligo legati covalentemente a molecole che fungono da *carriers* quali lipidi¹²², colesterolo¹²³, catene alchiliche¹²⁴, polietilen glicole (PEG)¹²⁵ e una varietà di peptidi¹²⁶, penetrano più facilmente le membrane cellulari data la loro aumentata lipofilità.

Sulla base di tali considerazioni, si è pensato di sintetizzare nuovi nucleosidi coniugati covalentemente in posizione 2' con un residuo di un acido biliare (AB) (Fig. 66 a, Fig. 66 b), sui quali costruire successivamente la chimica del fosforoammidito per ottenere nuovi nucleotidi fosforoammiditi monomeri (Fig. 67) da utilizzare nell'ambito della sintesi di oligo 2'-funzionalizzati, contenenti uno o più residui di acido biliare (AB).

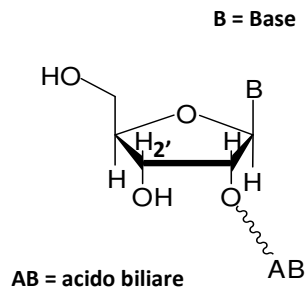


Fig. 66 a Nucleoside coniugato

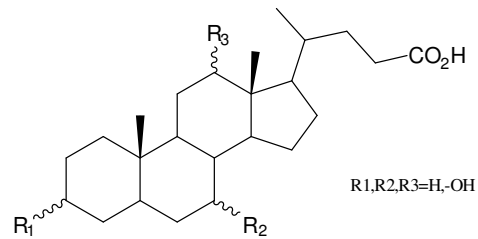


Fig. 66 b AB

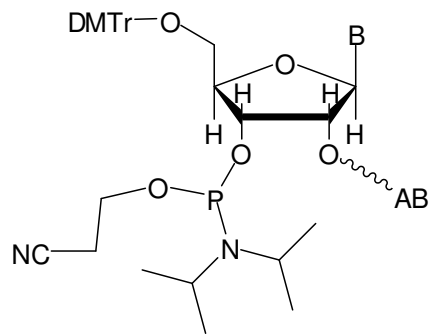
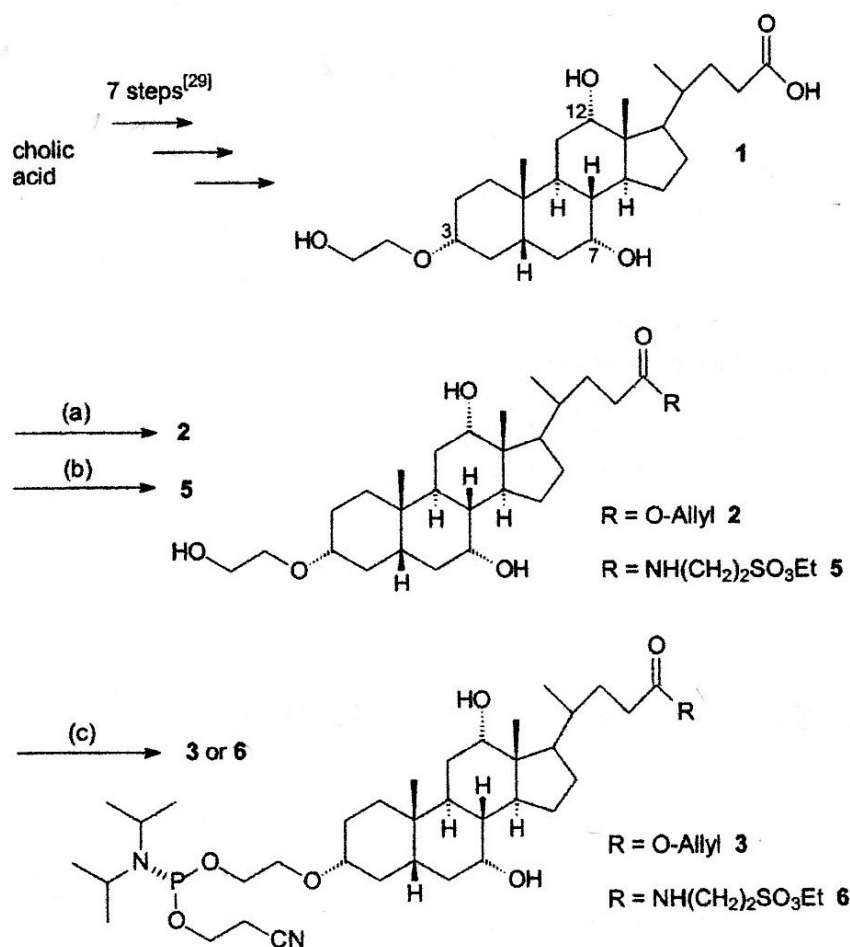


Fig. 67 Nucleotide fosforoamidito coniugato AB

Le motivazioni che ci hanno spinto a scegliere proprio la coniugazione con AB, sono molteplici:

- ✓ E' atteso un aumento della lipofilità dell'ON così coniugato.
- ✓ Le membrane cellulari e nucleari presentano i recettori per alcuni acidi biliari¹²⁷.
- ✓ Acidi biliari come ursodesossicolico (UDCA), colico (CA), tauroursodesossicolico (TUDCA) e chenodesossicolico (CDCA) sono largamente impiegati in campo medico¹²⁸.
- ✓ L' UDCA è stato impiegato negli ultimi anni anche per applicazioni extra epatiche: "apoptosi"¹²⁹ e "drug carrier"¹³⁰.
- ✓ Sono composti naturali.
- ✓ Hanno buona disponibilità e basso costo.

In letteratura esistono alcuni esempi di coniugazione di oligonucleotidi con acidi biliari, i casi più significativi sono di seguito riportati. In un articolo pubblicato nel 2001 su "Bioorganic and Medicinal Chemistry"¹³¹, si descrive la sintesi dei fosfoammiditi dell'acido colico (CA) e dell'acido taurocolico (TCA) (Fig.68), successivamente utilizzati come *building blocks* da coniugare sul ponte fosfato all'estremità 5'-terminale di ON (Fig. 69, Fig. 70). Gli ON coniugati risultanti, presentano una maggiore attività biologica nonché un migliore *up-take* cellulare nei confronti di uno specifico *target* quale il Virus dell'epatite C (HCV).

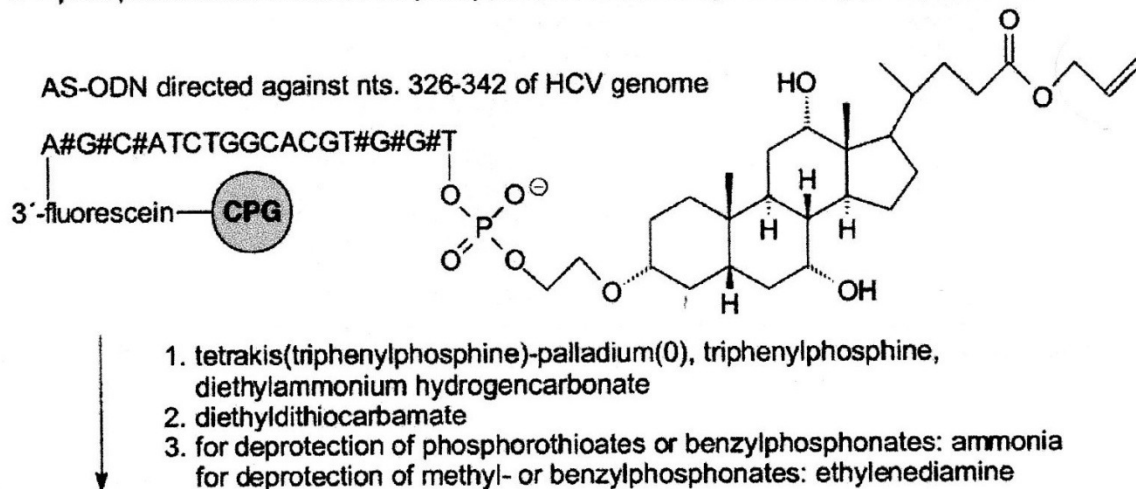


Scheme 1. Synthesis of monomeric phosphoramidites of cholic- and taurocholic acid **3** and **6** [R/S]. Reagents and conditions: (a) 1% HCl in allyl alcohol, 20 h, rt; (b) *n*-tributylamine, ethyl chloroformate, 2-aminoethanesulfonic acid ethylester **4**, dioxane, 2 h, rt; (c) *rac*-chloro-(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphine, DIPEA, CH₂Cl₂, 2 h, rt; compounds **3** and **6** are mixtures of two diastereomers.

Fig. 68 Acido Colico e Acido Taurocolico fosfoammiditi

5'-cholic acid derivatives:

= phosphodiester modified as phosphorothioates, methyl- or benzylphosphonates



3'- fluorescein - A#G#C#ATCTGGCACGT#G#G#T - cholic acid -5'

Fig. 69 Oligo modificato coniugato in 5'-terminale con Acido Colico

5'-taurocholic acid derivatives and cholesterol derivatization:

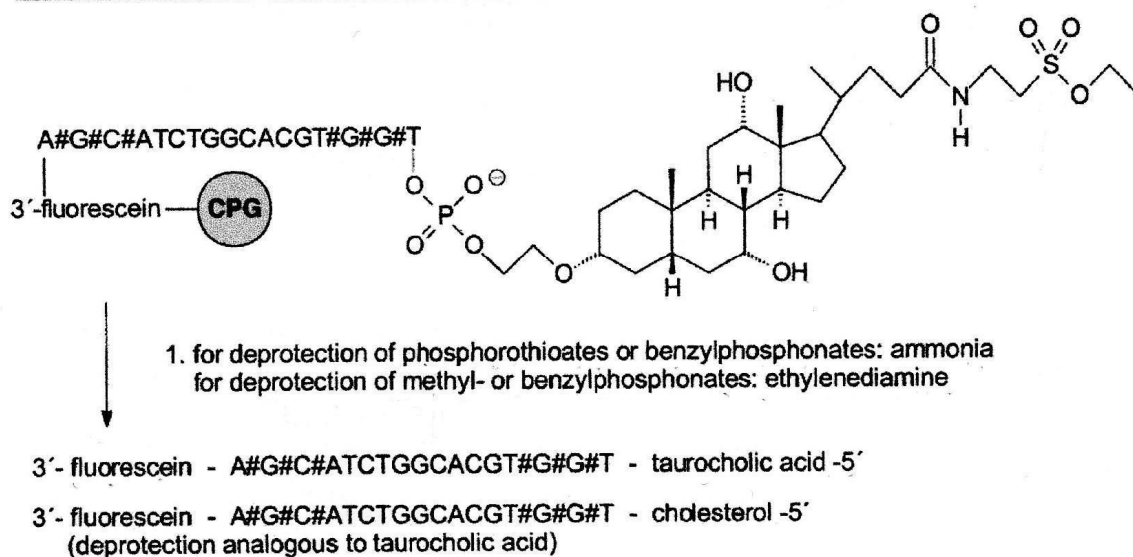


Fig. 70 Oligo modificato coniugato in 5'-terminale con Acido Taurocolico

In un secondo articolo pubblicato nel 2001 su *"Bioorganic and Medicinal Chemistry"*¹³², viene descritta la sintesi di ON coniugati con acido colico. In particolare la coniugazione è presente in entrambe le estremità della catena oligonucleotidica (Fig. 71) ed avviene attraverso molecole *spacer* che si dispongono a ponte fra la nucleo-base in 5'-terminale e una prima unità di AB e fra il ponte fosfato 3'-terminale e una seconda unità di AB. L'oligo così coniugato **33**, presenta elevata specificità nei confronti delle cellule di epatocita *target* e le maggiori caratteristiche lipofile ne aumentano la capacità di penetrazione cellulare rispetto ai corrispondenti oligo non modificati.

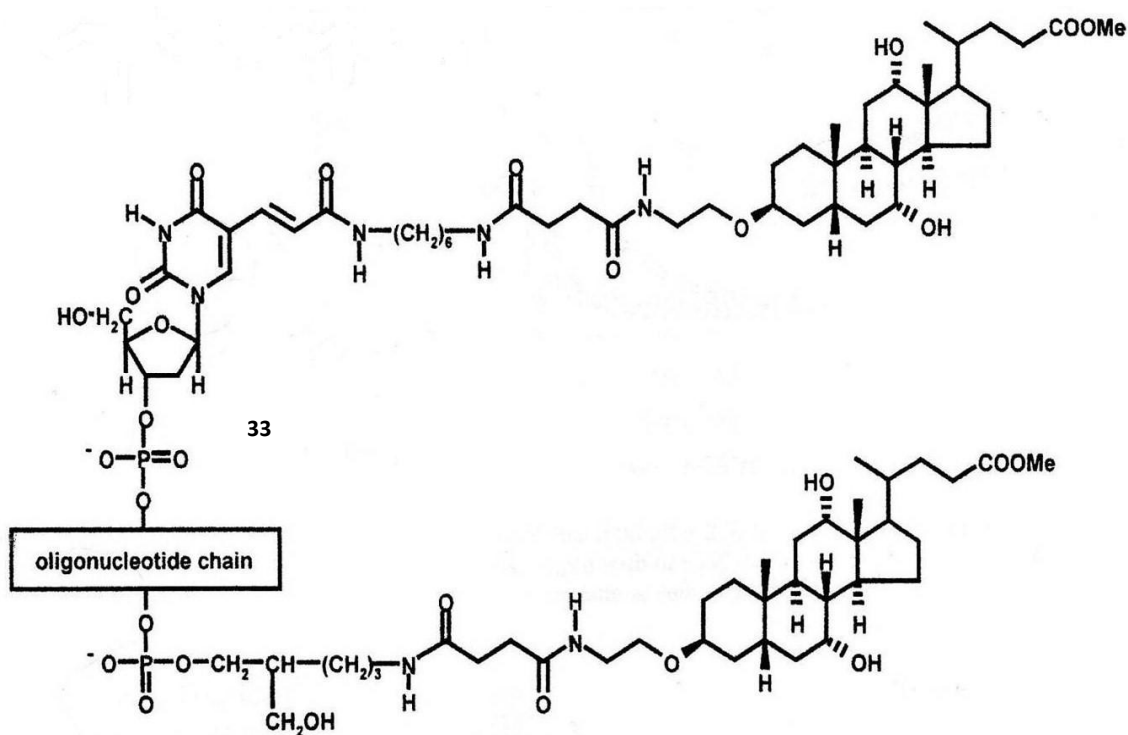
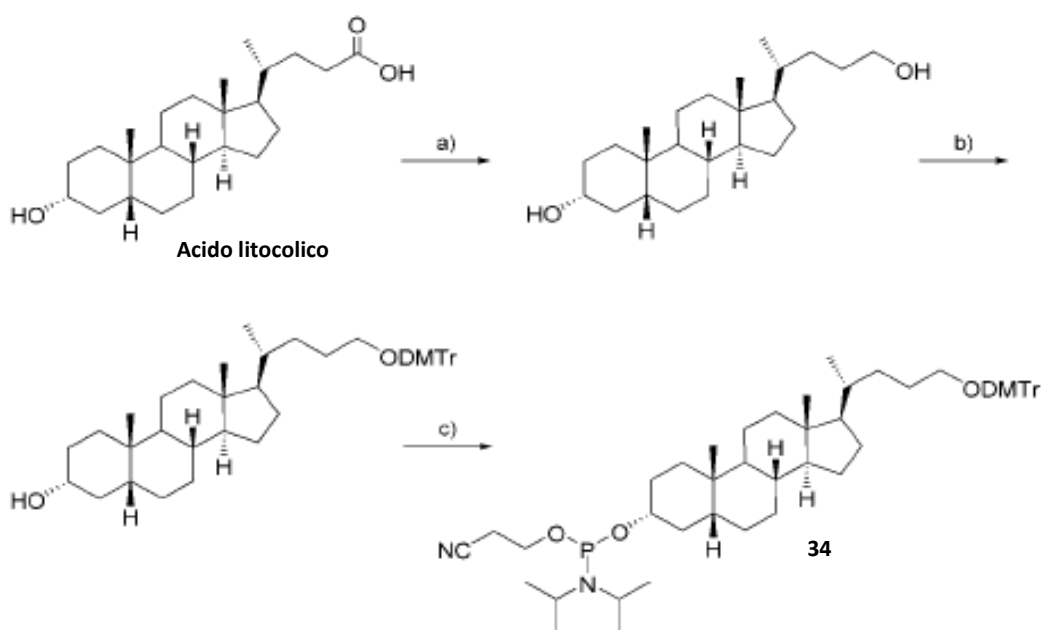


Fig. 71 Coniugazione AB – ON, ad entrambe le estremità dell'oligo attraverso molecole *spacer*

Infine in un terzo lavoro pubblicato su *ChemBioChem*¹³³ nel 2004, gli autori descrivono la sintesi di un fosforoammidito dell'acido litocolico (LA) **34** (Fig. 71) che a sua volta viene impiegato nella sintesi di una sequenza oligonucleotidica (Fig. 72).



Scheme 1. Synthesis of phosphoramidite derivative 4. a) LiAlH₄ (4.6 equiv), THF, 4 h, 96%. b) DMTrCl (1.9 equiv), DMAP, Et₃N, pyridine, 89%. c) Chloro-(2-cyanoethoxy)-N,N-diisopropylaminophosphine (1.5 equiv), DIPEA (3 equiv), CH₂Cl₂, 54%.

Fig. 72 Sintesi del fosforoammidito dell'acido litocolico

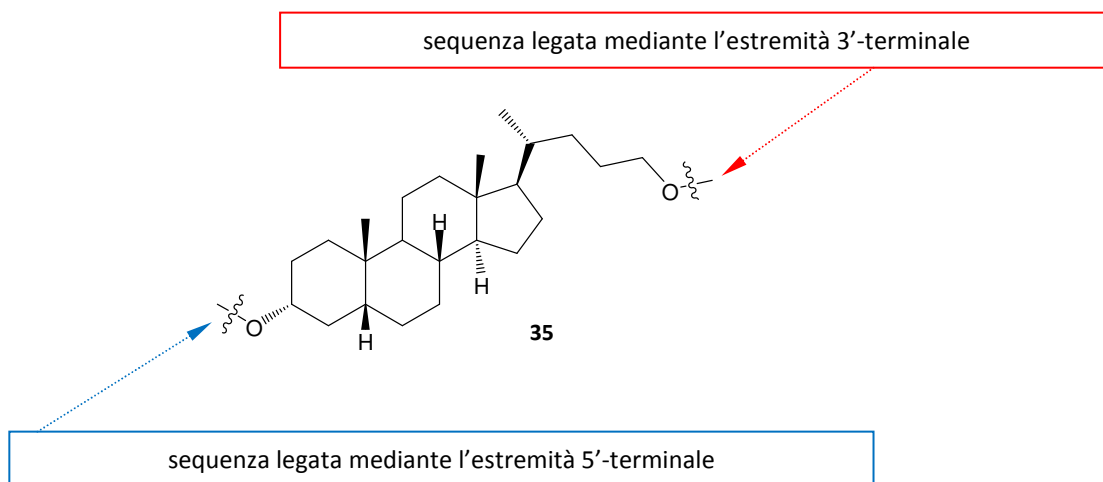


Fig.73 Acido litocolico inserito fra due tratti di sequenza oligonucleotidica

L'oligo così coniugato viene più facilmente assorbito all'interno delle cellule *target* rispetto ai corrispondenti oligo non coniugati, come dimostrano le prove di permeabilità eseguite su cellule "HeLa".

Strategie di sintesi ipotizzate

In Fig.74, sono riportati gli schemi di retrosintesi delle tre strategie da noi ipotizzate per la sintesi di nucleosidi 2'- funzionalizzati con derivati di acidi biliari.

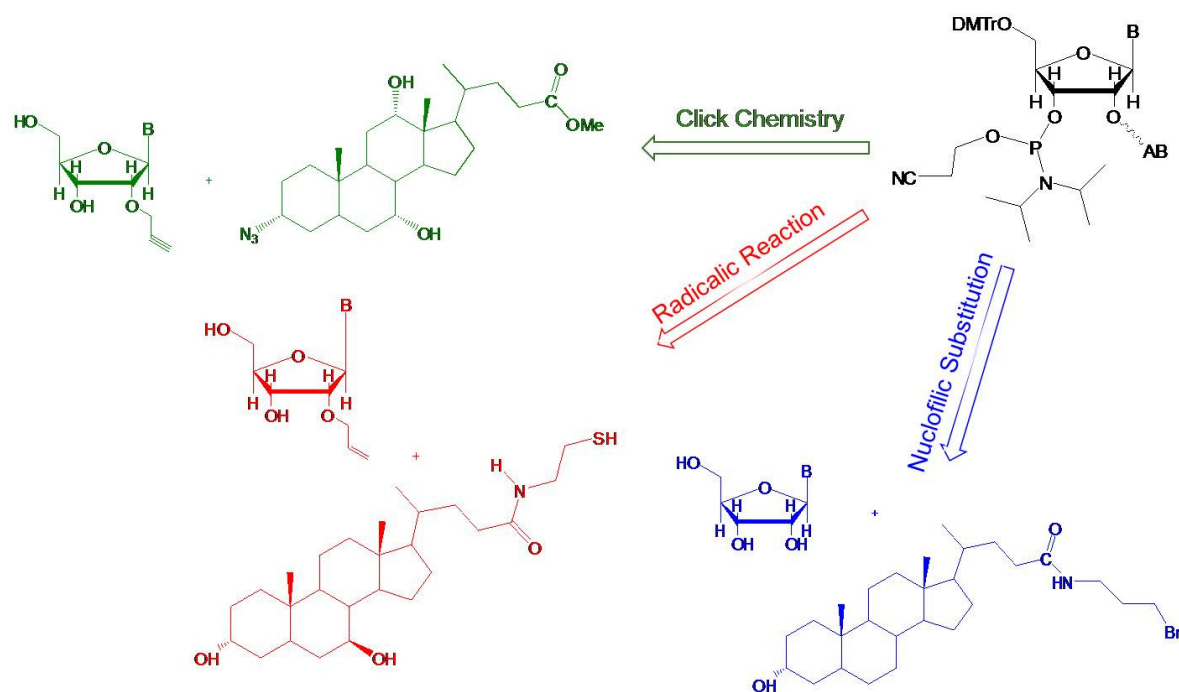


Fig.74 Strategie ipotizzate per la sintesi di nucleosidi 2'- funzionalizzati

2.2 Risultati e discussioni

Sintesi di coniugati adenosina-AB in posizione 2', mediante reazione di sostituzione nucleofila

L'acido biliare sul quale inizialmente abbiamo scelto di lavorare è stato l'acido litocolico (LA, Fig.75a), poichè rappresenta un modello di acido biliare semplificato, data la presenza di una sola funzione ossidrilica in posizione 3, mentre invece come nucleoside abbiamo scelto di utilizzare l'adenosina (Fig.75b) sulla base delle sue note caratteristiche chimico-fisiche^{134, 135}.

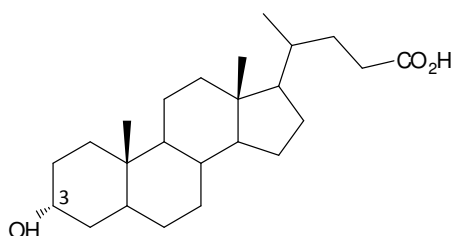


Fig. 75a Acido Litocolico (LA)

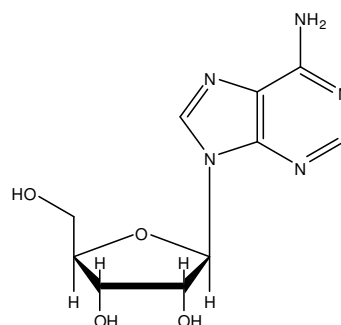


Fig. 75b Adenosina

Prakash, T.P. e Kawasaki A.M., descrivono in letteratura la sintesi del fosforoammidito dell'adenosina, modificato in posizione 2' come 2'-O-[2-[(*N,N*-dimetilammino)oxi]etil], abbreviato (2'-O-DMAOE)¹³⁵. Il primo passaggio di questa sintesi consiste nella reazione di alchilazione dell'adenosina in presenza di allilbromuro ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{Br}$) e di sodio idruro (NaH) e porta alla formazione di una miscela dei due allil isomeri in 2' **36** e in 3' **37** in rapporto 3:1, non separabili cromatograficamente, con resa pari al 66%¹³⁵ (Fig.76). La reazione viene realizzata senza proteggere né le funzioni ossidriliche presenti sullo zucchero, nè la funzione ammina esociclica presente sulla base azotata.

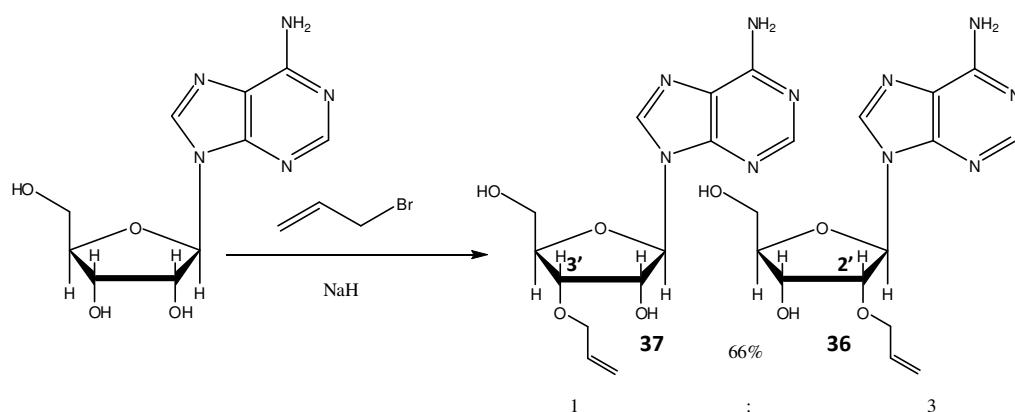


Fig. 76 Alchilazione adenosina non protetta

Un tale risultato trova spiegazione nelle caratteristiche di acidità dell'ossidrilica in posizione 2', il cui valore di pKa è pari a 12.14. Quindi la funzione ossidrilica in 2' sullo zucchero è particolarmente reattiva e per questo motivo non è richiesta la protezione degli altri gruppi funzionali presenti sull'adenosina.

Nello schema di reazione riportato in Fig.77 è rappresentata la nostra prima strategia di sintesi.

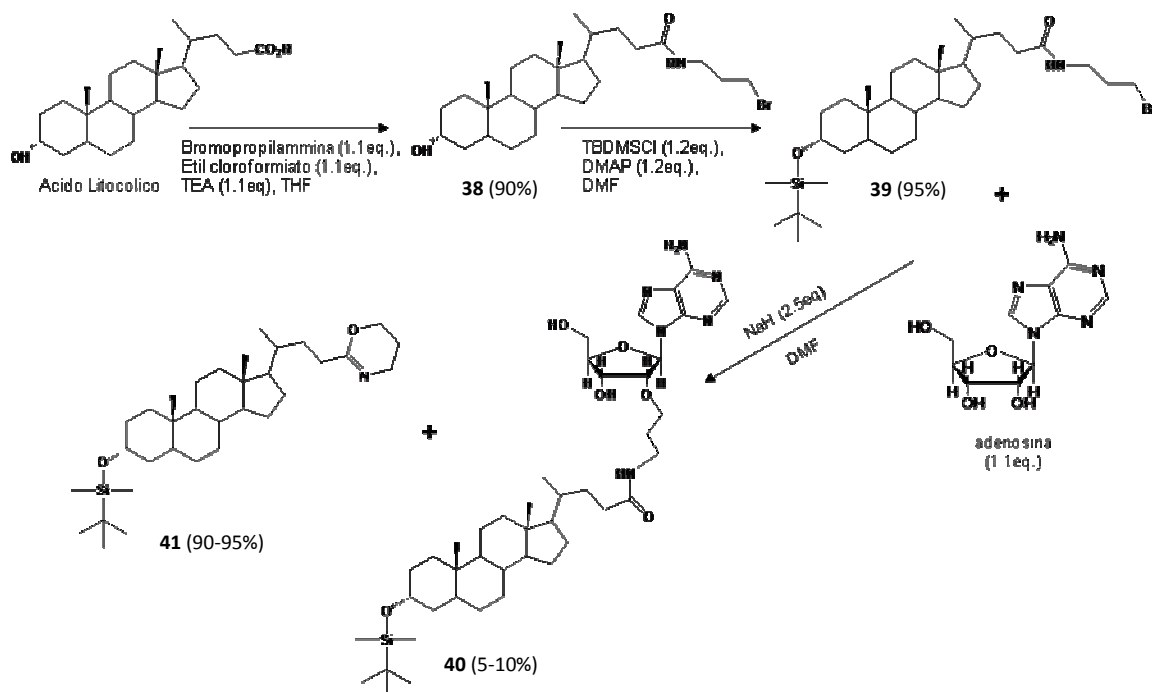


Fig. 77 Sintesi di coniugati adenosina-AB mediante sostituzione nucleofila

Il prodotto **40** è stato ottenuto facendo reagire l'adenosina in dimetilformamide (DMF) con idruro di sodio (NaH) e successivamente aggiungendo l'acido litocolico (LA), precedentemente funzionalizzato come bromopropil amide **38** e protetto come dimetiltertbutilsilil derivato **39**. La resa di questa reazione non è superiore al 5-10%.

Un'analisi più accurata dei grezzi di reazione ha messo in evidenza la presenza del sottoprodotto ossazinico **41** che si otteneva con resa quasi quantitativa. La formazione di **41** è dovuta alla reazione di ciclizzazione del composto **39**, che in ambiente basico si trasforma quasi completamente (90-95%) nel derivato ossazinico. Sulla base dei presenti risultati si è pensato di abbandonare momentaneamente tale strategia.

Sintesi di coniugati adenosina-AB in posizione 2', mediante reazione di "Click Chemistry"

Una strategia alternativa alla precedente, prevede l'uso della reazione di *click chemistry* per agganciare il residuo di acido biliare alla posizione 2' dell'adenosina. In letteratura¹³⁶, la reazione di *click chemistry* è stata utilizzata in tale ambito per la sintesi di coniugati oligonucleotidici di tipo **44** (Fig.78), ottenuti a partire da oligonucleotidi 3' e/o 5' alchino modificati di tipo **42**, che reagiscono mediante ciclo addizione [3+2] catalizzata con rame I (Cu^I), con il derivato bis-azido della perilenediammide (DPI) **43**.

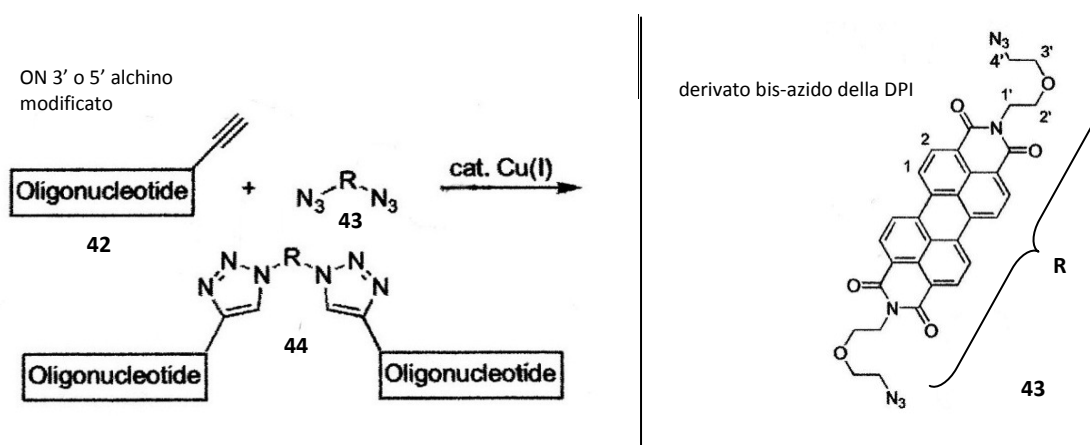


Fig. 78 Derivati triazolici di ON

Le cicloaddizioni 1,3-dipolari¹³⁷ sono processi concertati in cui due reagenti, il dipolo ed il dipolarofilo, si fondono per formare un'enorme varietà di eterocicli pentatomici.

La reazione tra un'azide ed un alchino terminale per formare triazoli¹³⁸ è un esempio di questa classe di reazioni. Oggigiorno, questa trasformazione sta godendo di grosse attenzioni e di larghe applicazioni in campo sintetico, grazie alla sua importante rivalutazione in versione catalitica¹³⁹. E' noto che le reazioni tra azidi (1,3-dipoli) e acetileni (dipolarofili), condotte ad alte temperature^{138,140}, formano miscele di triazoli regioisomeri 1,4 ed 1,5-disostituiti; è quindi indispensabile individuare condizioni di reazione tali da controllare la regioselettività.

La scoperta che quantità catalitiche¹³⁹ di Cu^I incrementano la velocità di reazione e controllano la regiochimica in maniera altamente specifica per i triazoli 1,4-disostituiti è stata compiuta da Sharpless e Meldal nel 2002.

Il meccanismo di reazione non è più di tipo concertato, ma procede secondo una sequenza a stadi successivi, coinvolgendo la formazione di complessi rame-alchino e rame-azide. Dunque, la versione migliorata della reazione di Huisgen si è trasformata in un meraviglioso esempio di efficienza chimica poiché, oltre ad essere operativamente semplice, permette la conversione dei reagenti verso un singolo prodotto, con alte rese e massimo livello di economicità atomica.

Per questi motivi la reazione si è guadagnata l'epiteto di "click"¹⁴¹, termine coniato dallo stesso Prof. Sharpless per indicare "una reazione chimica quasi perfetta per assemblare *building blocks* di speciale struttura". Lo stesso autore continua con il definirla "reazione componibile, di ampio raggio d'applicabilità, che dà alte rese e che genera sottoprodotti innocui separabili tramite tecniche non-cromatografiche, nonché stereospecifica; la reazione "click" richiede semplici condizioni operative; è insensibile all'acqua ed all'ossigeno; utilizza molecole facilmente ottenibili che possono dissolversi in solventi benigni e permette il rapido isolamento del composto finale".

L'alta affinità del gruppo azido verso il triplo legame (chemoselettività) e, di contrasto, l'inerzia di entrambi i gruppi funzionali nei confronti della maggior parte dei sostituenti connessi alla struttura base di tante biomolecole (bioortogonalità), come ancora la stabilità del triazolo verso la degradazione chimica ed enzimatica, sono peculiarità che concorrono a servirsi della reazione *click* per agganciare in maniera covalente entità molecolari bioattive, operazione in cui l'impiego di condizioni di reazione blande e

neutre sono prerequisiti essenziali. Il triazolo è una molecola che può partecipare alla formazione di legami ad idrogeno e dipolari che possono favorire, ad esempio, il riconoscimento di un substrato su un recettore oppure può incrementare la solubilità di un composto in un solvente¹⁴².

Il meccanismo proposto per la reazione di cicloaddizione tra azidi ed acetileni terminali, catalizzata da sali di Cu^I , è mostrato nello schema di Fig.79 e coinvolge l'iniziale formazione di un complesso π tra l'alchino terminale e Cu^I , determinando l'abbassamento del valore di pKa del derivato acetilenico.

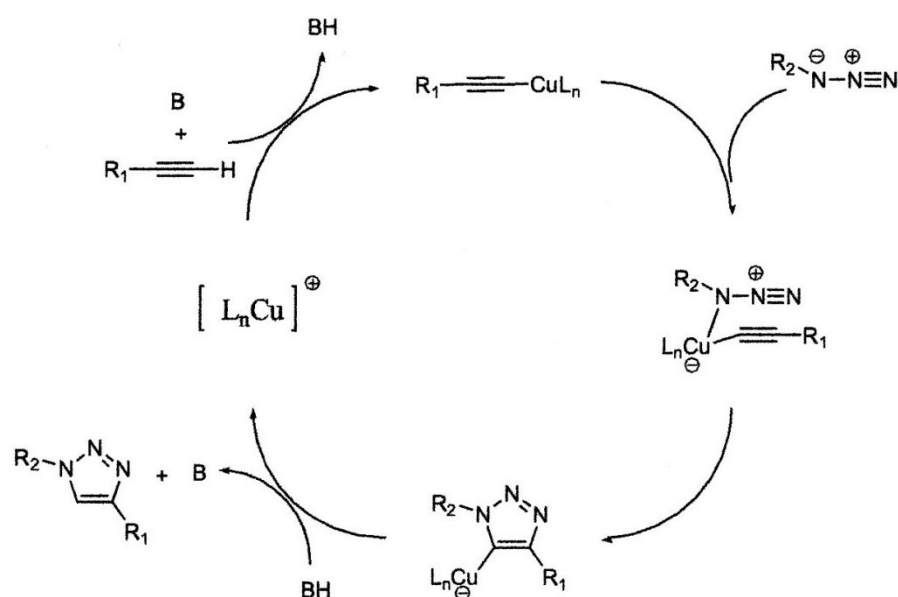


Fig. 79 ciclo catalitico per la sintesi di triazoli 1,4-disostituiti mediato da Cu^I

In questo complesso, il protone acetilenico risulta sufficientemente acido e può essere rimosso con una base. Il gruppo azido attacca l'addotto Cu(I) -acetilene formando un intermedio ciclico a cinque termini contenente ancora il rame. La protonazione finale rigenera il catalizzatore e libera il triazolo 1,4-disostituito; come si può notare, il meccanismo non è più di tipo concertato, come accade invece per le classiche reazioni di cicloaddizione 1,3-dipolari.

La nostra strategia di sintesi ha previsto la preparazione dell'alchino terminale sull' $-\text{OH}$ in posizione 2' dell'adenosina **45** (Fig.80), facendo reagire l'adenosina tal quale con propargil bromuro ($\text{CH}\equiv\text{C-CH}_2\text{-Br}$) e sodio idruro (NaH) in dimetilformammide (DMF) a

temperatura ambiente per una notte, secondo le modalità descritte su *J. Org. Chem.*¹³⁵, normalmente utilizzate per la reazione di alchilazione dell'adenosina in presenza di allil bromuro.

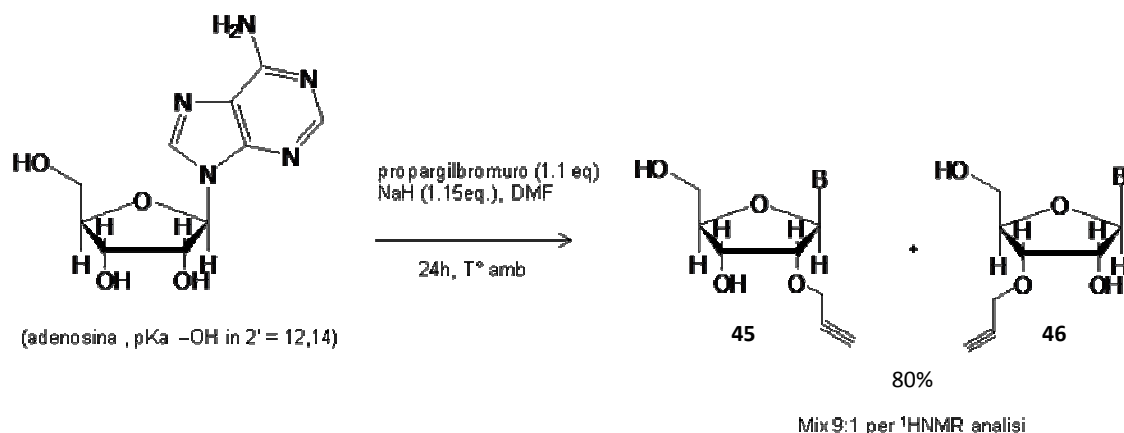
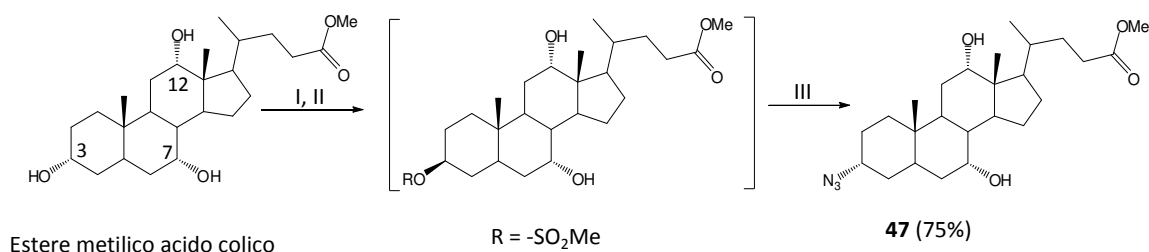


Fig. 80 Alchilazione -OH in 2' dell'adenosina in presenza di propargil bromuro

La reazione di alchilazione ha fornito i due propargil isomeri in 2' **45** e in 3' **46** in rapporto 9:1, stimato mediante analisi di Risonanza Magnetica Nucleare al Protone ($^1\text{H-NMR}$) con una resa complessiva dell' 80%. L'alchino terminale in 2' è stato isolato in miscela diastomerica tramite cromatografia in fase diretta su gel di silice.

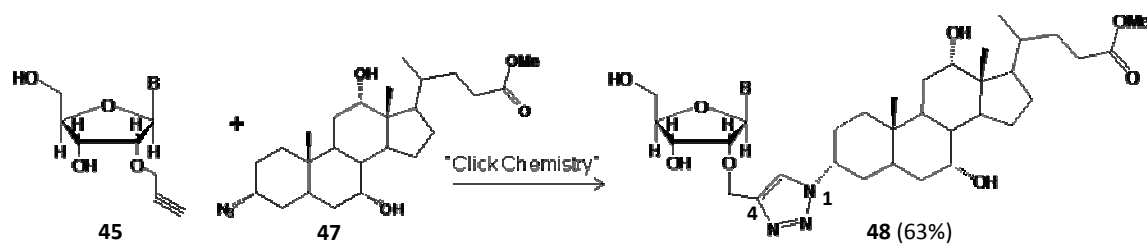
Successivamente è stata realizzata la preparazione dell'azide terminale sul carbonio C_3 dell'estere metilico dell'acido colico (CA), secondo le modalità riportate nello schema di reazione in Fig. 81. Con una prima reazione di Mitsunobu si ottiene l'estere solfonico con inversione di configurazione in posizione C_3 , che in situ viene convertito nel prodotto **47**, mediante una seconda sostituzione nucleofila con l'anione azido. L'intera sequenza consente la ritenzione della configurazione al C_3 .



I: trifenilfosfina (3.3mmol), trietilammina (TEA)(2mmol), acido metansolfonico (2.1mmol); THF anidro, 0°C;
II: dietilazodicarbossilato (DEAD) (3.1mmol); ta,2h;
III: sodio azide (NaN₃); 60-65°C, 24h.

Fig. 81 sintesi dell'azide terminale sul C_3 dell'acido colico (CA)

L'azide **47**, è stata isolata tramite cromatografia in fase diretta su gel di silice, con una resa complessiva dell' 75%. Una volta sintetizzate le molecole necessarie ossia l'alchino terminale **45** e l'azide terminale **47**, è stata effettuata la reazione di *click chemistry* secondo le modalità riportate nello schema di Fig.82. Il prodotto **48** è stato isolato tramite cromatografia in fase diretta su gel di silice con una resa del 63%.



"Click Chemistry": alchino **45** (1.1eq.), azide **47** (1.0eq.),
 toluene/DMF 10:1 (V/V),
 CuI (40 %mol.), DIPEA (8 eq.),
 36h, T° ambiente, al buio.

Fig. 82 Reazione di *click chemistry*

2.3 Conclusioni e prospettive

Possiamo concludere che l'applicazione della *click chemistry* su substrati altamente funzionalizzati come l'adenosina e il derivato azidico dell'acido biliare, ha fornito proficui risultati dimostrandosi particolarmente interessante. Tutto ciò ci fa credere che attraverso la reazione di *click chemistry*, sia possibile sintetizzare una varietà di altri derivati coniugati nucleoside-AB. Per il momento focalizzeremo la nostra attenzione sul derivato **48** al fine di trasformarlo nel corrispondente nucleotide fosfoammidito, da utilizzare come reagente per la sintesi in fase solida di nuovi oligonucleotidi contenenti uno o più residui di AB (Fig. 83).

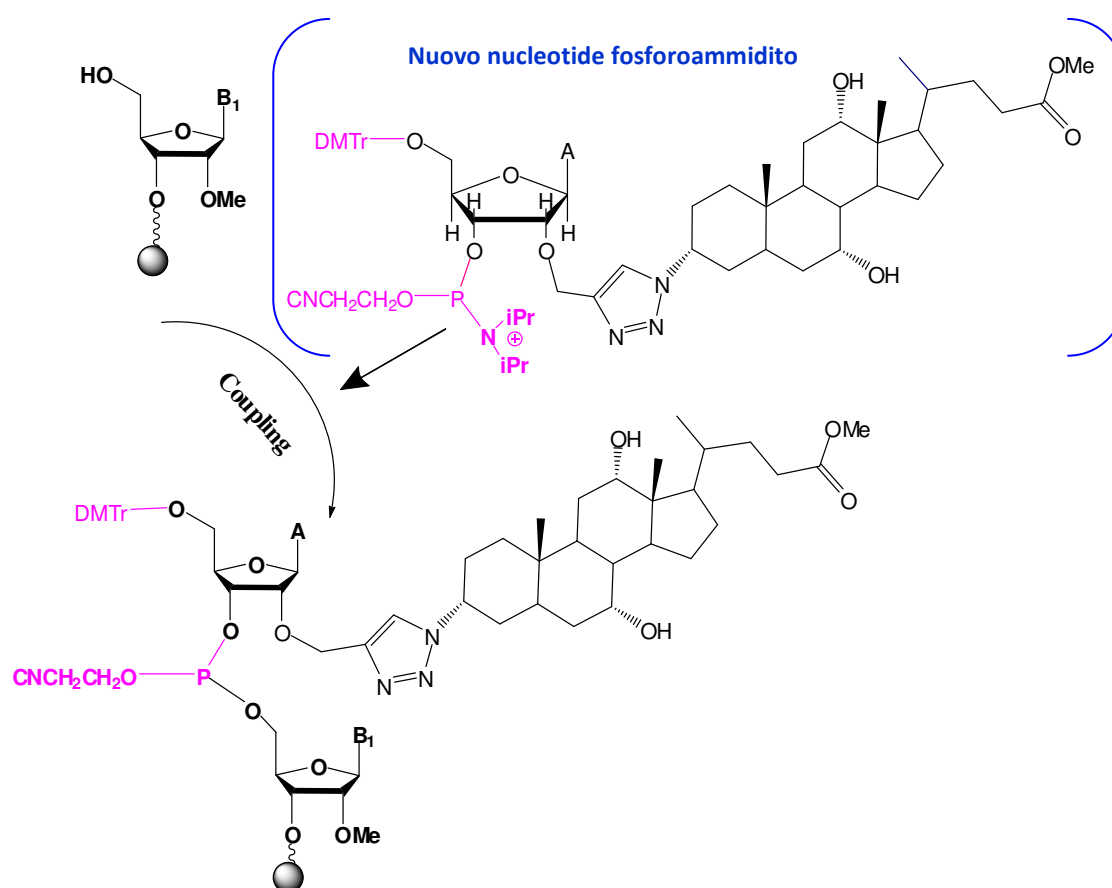


Fig.83 Ipotesica reazione di *coupling* del fosfoammidito adenosina-AB in un processo di sintesi automatica

Parte Sperimentale

3.1 Materiali per la sintesi e purificazione di oligo 2'-OMePS

Per la sintesi di oligonucleotidi 2'-OMePS *full length* 20/25 mer, è stato utilizzato il sintetizzatore automatico *AKTA oligopilot 10 PLUS* (P903) (flusso massimo 10ml/min, intervallo di pressione 0-250bar) della *General Electric (GE)*, gestito via computer mediante il *software UNIKORN* e in grado di sintetizzare oligo su scala variabile da 1 a 50 micromoli. Le sintesi su scala 2 e 7 μ molare, sono state effettuate utilizzando il supporto solido "*Primer Support 200TM*" (riboA; riboG; riboU; riboC) di *Amersham Biosciences*, con capacità di caricamento 80 e/o 200 μ mol/g.

L'analisi e purificazione dei grezzi di sintesi contenenti gli oligo DMT-on 2'-OMePS *full length* 20/25 mer, nonché l'analisi e purificazione dei corrispondenti prodotti purificati, sono state effettuate utilizzando il sistema HPLC *AKTA basic UPC 10* (P903) (flusso massimo 10ml/min e pressione massima 25 MPa), della *General Electric (GE)*, gestito via computer mediante il *software UNIKORN*. In tutti i casi le purificazioni sono state effettuate su colonna "*Resource RPC 3ml*" a fase inversa a base di polistirene/divinilbenzene, con porosità pari a 15 μ m ed intervallo di pH = 1-12, di *Amersham Biosciences*.

La qualità dei prodotti di sintesi è stata determinata mediante analisi RP-HPLC su sistema *Jasco*, utilizzando una colonna *Source 5RPC ST* (4.6x150 mm) (volume = 2.5ml) a base di polistirene/divinilbenzene, porosità 5 μ m di *Amersham Biosciences*; analisi di Risonanza Magnetica Nucleare al ³¹P (³¹P-NMR), effettuata su spettrometro *Varian-Gemini GE* e infine, analisi di spettrometria di massa *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF)*, utilizzando spettrometri *Bruker Daltonics flexAnalysis* e come metrici acido picolinico (PA) e 2',5'-diidrossiacetofenone (DHAP). Tutti gli oligonucleotidi sono stati quantificati mediante lettura spettrofotometrica UV-VIS a lunghezza d'onda λ = 260 nanometri (nm), utilizzando uno spettrofotometro *Jasco V630*.

3.2 Metodi per la sintesi e purificazione di M23D 2'-OMePS *full length*

L'oligonucleotide M23D 2'-OMePS *full length*, è stato sintetizzato sia su scala 2 μ molare che su scala 7 μ molare, caricando rispettivamente 25mg e 35mg. di "Primer Support 200TM" riboU nella colonna "small cassette" da 0.6 ml di volume massimo.

Il supporto solido è stato successivamente impaccato con solvente acetonitrile (CH₃CN) e la colonna è stata infine posizionata all'interno del reattore nel sistema di sintesi. Per la fase di detritilazione è stato utilizzato un volume pari a 5ml di soluzione al 3% (V/V) di acido dicloroacetico (Cl₂CHCOOH) in toluene, con un tempo di contatto pari a 0.5 min ed un flusso di 10ml/min, sia per sintesi su scala 2 μ molare che per sintesi su scala 7 μ molare. Per lo *step di coupling* sono state preparate soluzioni 0.05M (per scala 2 μ mol.) e 0.1M (per scala 7 μ mol.) in acetonitrile anidro (concentrazione di acqua \leq 30 ppm) dei seguenti fosforoammiditi: 2'-O-metil-rA(bz)fosforoammidito (bz=benzoile); 2'-O-metil-rG(ib)fosforoammidito (ib=isobutirile); 2'-O-metil-rC(tac) fosforoammidito (tac=tertbutilfenossiacetile); 2'-O-metil-rU fosforoammidito.

Il reattivo attivante utilizzato è stato "Activator 42", soluzione 0.25M in CH₃CN di 5-(Bis-3,5-trifluorometilfenil)-1H-tetrazolo, per sintesi su scala 2 μ molare (10 eq.; 60%; 12min.), per sintesi su scala 7 μ molare (6eq.; 60%; 8min.). I reagenti più sensibili all'acqua, come le soluzioni dei fosforoammiditi, il reagente attivante ed il solvente acetonitrile, vengono addizionati di opportune quantità di setacci molecolari a porosità 3Å, in grado di catturare le molecole di acqua, inoltre è necessario lavorare in atmosfera inerte (argon o azoto), mantenendo costantemente il sistema di sintesi ad una pressione di 30-35bar.

Durante la fase di tio-ossidazione è stata utilizzata una soluzione di fenilacetildisolfuro (PADS) in CH₃CN e piridina in rapporto 1:1 (V/V), il cui volume espresso in volumi colonna (CV) è pari a 2CV, il tempo di contatto è di 3 min. ed il flusso è di 0.4 ml/min. validi per entrambe le scale di sintesi.

La fase di *capping* è stata realizzata utilizzando le soluzioni di *capping A* a base di N-metilimidazolo, soluzione al 20% (V/V) in CH₃CN; *capping B1*, soluzione a base di anidride acetica al 40% (V/V) in CH₃CN e *capping B2*, soluzione a base di 2,6-lutidina al 60% (V/V) in CH₃CN. Per entrambe le scale di sintesi, il volume di reagente *cappingA* + *capping(B1+B2)* è stato pari a 2CV, con tempo di contatto 0.24 min. e flusso di reagente pari a 5ml/min.

Per quanto riguarda il trattamento finale con dietilammina (DEA), è stata utilizzata una soluzione al 20% (V/V) di DEA in CH₃CN e sia per sintesi su scala 2 µmolare che per sintesi su scala 7 µmolare, il volume di reagente utilizzato è stato pari a 10ml.; il tempo di reazione pari a 10 minuti ed il flusso pari a 1 ml/min.

Al termine della sintesi, il *primer support* con l'oligo M23D DMT-on 2'-OMePS *full length* attaccato, è stato estratto dalla colonna di reazione ed è stato messo a sbloccare in 2/3ml di soluzione di idrato d'ammonio (NH₄OH) al 33%, per 12 ore a temperatura di circa 60°C. Dopo lo sblocco e la deprotezione, l'oligo è stato separato dal supporto solido per filtrazione, ed il supporto è stato lavato con 2-3 porzioni da 1-2ml di una soluzione acqua/etanolo 1:1 (V/V), per favorire il totale recupero del prodotto di sintesi dal supporto stesso. Il prodotto è stato quindi concentrato per evaporazione sotto vuoto.

L'analisi e la successiva purificazione del grezzo di sintesi contenente l'oligo M23D DMT-on, è stata realizzata su colonna "Resource RPC 3ml" a fase inversa a base di polistirene/divinilbenzene, lavorando in gradiente di acetonitrile (tampone B), in trietilammonioacetato (TEAA) 0.1M a pH = 8 e al 5% di CH₃CN (V/V) (tampone A). Il gradiente di eluizione utilizzato espresso in volumi colonna (CV) è stato il seguente: 0%B per 2 CV; gradiente 1 = 0-25%B in 6 CV; gradiente 2 = 25-45%B in 4 CV; step 3 = 100%B per 2 CV; step 4 = 0%B per 3 CV. Il prodotto M23D DMT-on purificato è stato quindi concentrato sotto vuoto e di nuovo sciolto in un'opportuna quantità di acqua (125-144 µl per sintesi su scala 2 µmolare; 509-581 µl per sintesi su scala 7 µmolare), che si ricava rispettando le seguenti proporzioni:

$$1000 \text{ OD}_{\text{oligo}} : 1 \text{ ml H}_2\text{O} = \text{OD}_{\text{tot}} \text{ oligo M23D DMT-on} : (x) \text{ ml H}_2\text{O}$$

Quindi è stato necessario determinare la densità ottica (OD) totale dell'oligo da detritilare, mediante misura spettrofotometrica UV-VIS a $\lambda = 260\text{nm}$, sapendo che:

$$\text{OD}_{\text{tot. oligo}} = \text{OD}_{\text{letti}} * \text{Fattore di diluizione} * \text{Volume}_{\text{tot. oligo}}$$

dove

OD_{tot.} = densità ottica totale

OD_{letti} = densità ottica letta

Fattore di diluizione = $\mu\text{l oligo} + \mu\text{l acqua in cella} / \mu\text{l acqua in cella}$

$\text{Volume}_{\text{tot.}} = \text{volume totale di oligo purificato e sciolto in acqua}$

Se per esempio si hanno a disposizione 5ml totali di oligo M23D DMT-on purificato e sciolto in acqua, se ne preleva una porzione (es.: 30 μl), la si aggiunge ad un volume noto di acqua contenuto nella cella al quarzo (es.: 3000 μl); quindi si effettua la lettura spettrofotometrica a lunghezza d'onda $\lambda=260\text{nm}$ che fornisce il valore di OD_{letto} .

Tale valore moltiplicato per il fattore di diluizione (in questo caso 3030/3000) e per il volume totale di oligo (in questo caso 5ml), permette di ricavare la densità ottica totale della soluzione di oligo DMT-on.

$$(x) \text{OD}_{\text{tot. oligo}} = \text{OD}_{\text{letti}} * 3030/3000 * 5\text{ml}$$

Dalla legge di Lambert e Beer è quindi possibile quantificare l'oligo sintetizzato.

$$\mathbf{A = \epsilon * b * c}$$

Dove

ϵ = coefficiente di estinzione molare in $\text{OD}/\mu\text{moli}$, variabile da oligo a oligo, calcolato secondo il metodo *Nearest-Neighbor*¹⁴³.

$b = 1$ = lunghezza del cammino ottico in cm

c = concentrazione della soluzione di oligo in μmoli

L'oligo sciolto nella giusta quantità di acqua, è stato quindi addizionato di un volume di acetato di sodio (NaOAc) a concentrazione 0.1M e a $\text{pH} = 3$, pari a 3,5 volte il volume di acqua utilizzato. La reazione di detritilazione, che avviene a temperatura ambiente nell'arco di circa un'ora, è stata seguita mediante RP-HPLC. Al termine della reazione, l'acidità della soluzione è stata tamponata aggiungendo un volume di acetato di sodio (NaOAc) a $\text{pH} = 8.5$ e concentrazione 2.5M, pari a 3 volte il volume di acetato di sodio (NaOAc) a $\text{pH} = 3$ utilizzato per la detritilazione stessa.

L'analisi e la purificazione dell'oligo M23D DMT-off ottenuto post-detritilazione, è stata realizzata su colonna "Resource RPC 3ml" a fase inversa a base di polistirene/divinilbenzene, lavorando in gradiente di aceto nitrile (CH_3CN) (tampone B),

in soluzione di trietilammonioacetato (TEAA) 0.1M a pH = 8, al 5% di CH₃CN (V/V) (tampone A) e il gradiente di eluizione utilizzato espresso in volumi colonna (CV) è stato il seguente: 0%B per 2 CV per equilibrare la colonna ; gradiente 1 = 0-15%B in 2 CV; gradiente 2 = 15-45%B in 4 CV; step 3 = 100%B per 2 CV; step 4 = 0%B per 1 CV.

L'oligo M23D purificato, è stato concentrato sotto vuoto e successivamente filtrato su resina "Dowex" 50 W X 8 (100-200 mesh) a scambio ionico (Na⁺) (0.35-0.41 g. di resina per sintesi su scala 2 µmolare; 1.27-1.46 g. di resina per sintesi su scala 7 µmolare). L'analisi RP-HPLC dell'oligo M23D purificato, è stata realizzata su colonna SOURCE 5RPC ST 4.6/150mm, lavorando in gradiente di acetonitrile (tampone B) in trietilammonioacetato (TEAA) 100mM TEAA a pH=7 (tampone A), secondo il gradiente 2-30% di B in 30 volumi colonna (CV) e ha fornito i seguenti valori attribuibili al picco di assorbimento corrispondente all'oligo M23D purificato: tempo di ritenzione (T_R)=28.95min.; inizio picco=28.36 min.; fine picco=33.77min.; area%picco=95,96%; area%impurezze~4%.

L'analisi di Risonanza Magnetica Nucleare al ³¹P (³¹P -NMR), è stata effettuata sciogliendo una porzione di prodotto purificato in solvente deuterato CDCl₃ ed ha fornito una % di prodotto PO non completamente fosforotioato, pari al 3-5%.

Infine, l'analisi di Spettroscopia di Massa MALDI-TOF effettuata sul prodotto M23D purificato, utilizzando come matrice acido picolinico (PA), ha fornito un valore di massa pari 8667.60 u.m.a.

(N.B.: un campione di oligo M23D sintetizzato in modalità DMT-off e successivamente cromatografato su colonna *Resource RPC* 3ml a fase inversa, mediante sistema RP-HPLC è stato sottoposto ad analisi di spettrometria di massa utilizzando la matrice 2',5'-diidrossiacetofenone (DHAP) ed ha fornito un valore di massa pari a 8687.58 u.m.a. attribuibile al prodotto di interesse, che però come volevasi dimostare, è risultato contaminato da alcune impurezze le cui masse cadono a 4840.96; 5177.44; 5514.54; 5850.825; 6187.69 u.m.a.)

3.3 Materiali per la sintesi e purificazione di nucleosidi 2'-funzionalizzati-AB

Le reazioni sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile, utilizzando TLC Silica gel 60 F₂₅₄ della Merck e per la visualizzazione delle macchie sono stati usati potassio permanganato (KMnO₄) soluzione all'1%; lampada UV a 254nm; soluzione fosfomolibdica (10g di acido fosfomolibdico, 200ml acido acetico glaciale, 5.5ml acido solforico concentrato). Le purificazioni sono state eseguite mediante cromatografia gravitazionale su colonna, utilizzando gel di silice "silica gel 60" (particle size 0.063-0.2mm; 70-230 mesh ASTM).

Gli spettri ¹H-NMR(400 MHz) e ¹³C-NMR (100MHz) sono stati registrati a temperatura ambiente in cloroformio deuterato (CDCl₃) o in dimetilsolfossido deuterato (DMSO) su spettrometri Bruker WM e Varian-Gemini GE; tutti i *chemical shift* sono riportati come δ ed espressi in ppm utilizzando come riferimento il segnale residuo del solvente; le costanti di accoppiamento (J) sono espresse in Hz. Gli spettri di massa MALDI-TOF sono stati effettuati utilizzando come matrice acido 2,6-diidrossibenzoico (DHBA).

3.4 Metodi per la sintesi e purificazione di nucleosidi 2'-funzionalizzati-AB: Sintesi di N-(3-bromopropil)-3α-idrossicolanoilammide (38)

1 g. ($2.65 \cdot 10^{-3}$ moli) di acido litocolico (LA) (PM = 376.57) è stato completamente sciolto in 10ml di THF anidro ed addizionato di 0.41 ml ($2.92 \cdot 10^{-3}$ moli) di trietilammina (TEA) a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi raffreddata in bagno di ghiaccio a 0°C e lentamente è stato addizionato etilcloroformiato 0.28ml ($2.92 \cdot 10^{-3}$ moli). Dopo circa un quarto d'ora dal termine dell'ultima aggiunta, la miscela di reazione è stata riportata a temperatura ambiente e sono stati addizionati 0.64g. ($2.92 \cdot 10^{-3}$ moli) di bromo propilammina. La miscela è stata fatta reagire a temperatura ambiente per 10 ore e la reazione è stata monitorata mediante cromatografia su strato sottile, utilizzando la miscela eluente diclorometano/metanolo (95/5). Al termine della reazione è stato effettuato un primo trattamento con HCl al 5%, ed un successivo trattamento con soluzione satura di sodio bicarbonato (NaHCO₃). Il grezzo di reazione è stato estratto in imbuto separatore con acetato di etile (AcOEt), anidrificato con sodio solfato anidro (Na₂SO₄), quindi evaporato sotto pressione ed infine purificato mediante cromatografia

gravitazionale su gel di silice, utilizzando una miscela eluente diclorometano/metanolo (95/5), ($R_f = 0.30$). Si sono ottenuti 1.18g. di prodotto purificato (PM = 496.5) sottoforma di solido bianco vetroso, corrispondenti ad una resa del 90%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) dati selezionati: $\delta = 0.62$ (s,3H), 0.92 (s,3H), 0.92-0.93 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H), 3.37-3.43 (m, 4H), 3.59-3.64 (m, 1H), 5.60-5.70 (m, 1H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz): $\delta = 13.5, 13.6, 18.7, 20.7, 24.4, 28.3, 28.9, 30.8, 30.9, 31.8, 32.0, 32.6, 34.3, 34.8, 35.5, 35.6, 35.7, 37.1, 38.7, 39.9, 40.2, 42.7, 54.3, 55.6, 56.6, 71.4, 172.6$; MALDI-TOF MS (496.56): 520.1 (M+Na), 534.98 (M+K).

Sintesi N-(3-bromopropil)-3 α -dimetiltertbutilsililossicolanoilammide (39)

1g. ($2.01 \cdot 10^{-3}$ moli) del composto **38** (PM = 496.5) è stato sciolto in 20ml di dimetilformammide (DMF) anidra in atmosfera inerte ed addizionato di 0.36 g. ($2.4 \cdot 10^{-3}$ moli) di dimetiltertbutilsililcloruro (DMTBSCI) e 0.29g. ($2.4 \cdot 10^{-3}$ moli) di dimetilamminopiridina (DMAP). La miscela di reazione è rimasta sotto agitazione per circa 3 ore a temperatura ambiente ed è stata seguita mediante cromatografia su strato sottile, utilizzando la miscela eluente diclorometano/metanolo (95/5).

Al termine della reazione è stato effettuato un trattamento con soluzione acquosa di cloruro d'ammonio (NH_4Cl) al 10%, quindi il prodotto estratto con acetato di etile (AcOEt) è stato successivamente anidrificato con sodio solfato anidro (Na_2SO_4) e dopo concentrazione sotto vuoto è stato purificato mediante cromatografia gravitazionale su gel di silice, utilizzando una miscela eluente diclorometano/metanolo (95/5), ($R_f = 0.40$). Si sono ottenuti 1.17g. di prodotto purificato (PM = 610.82), sottoforma di solido bianco vetroso, corrispondenti ad una resa del 95%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) dati selezionati: $\delta = 0.05$ (s,6H), 0.6 (s,3H), 0.90 (s,12H), 0.91-0.93 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 3H), 3.36-3.46 (m, 2H), 3.52-3.62(m, 3H), 5.62-5.78 (m, 1H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz): $\delta = 10.1, 10.2, 13.5, 13.6, 18.4, 18.7, 20.7, 24.2, 25.7, 25.8, 28.3, 28.9, 29.9, 30.2, 30.8, 31.8, 32.0, 32.6, 34.3, 34.8, 35.5, 35.6, 36.7, 37.7, 38.7, 39.9, 40.2, 42.7, 54.3, 55.6, 56.6, 72.8, 172.6$; MALDI-TOF MS (610.82): 633.30 (M+Na).

Sintesi di adenosil-2'-O-propil-3 α -dimetiltertbutilsililossicolanoilammide

(40)

0.48g ($1.80 \cdot 10^{-3}$ moli) di adenosina (PM = 267.24) sono stati sciolti in 10 ml di dimetil formammide (DMF) ed addizionati di 0.01g. ($4.1 \cdot 10^{-3}$ moli) di idruro di sodio (NaH), dopo circa mezz'ora è stato aggiunto 1g. ($1.64 \cdot 10^{-3}$ moli) di composto **39** (PM = 610.82), quindi la miscela di reazione è rimasta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte, ed è stata monitorata mediante cromatografia su strato sottile utilizzando la miscela eluente diclorometano/metanolo (90/10). Terminata la reazione sono stati effettuati più lavaggi con acqua e si è estratto con acetato di etile (AcOEt) in imbuto separatore. Dopo anidificazione con sodio solfato anidro, il grezzo di reazione è stato filtrato e concentrato sotto pressione, quindi purificato mediante cromatografia gravitazionale su gel di silice, utilizzando una miscela eluente diclorometano/metanolo (90/10), (Rf = 0.20). Si sono ottenuti 0.065-0.13g. di prodotto purificato (PM = 797.15), sottoforma di solido giallo vetroso, corrispondenti ad una resa del 5-10%; il rimanente 90-95% di prodotto corrisponde al derivato ossazinico **41** (PM = 529.91) solido giallo vetroso ottenuto in quantità 0.78-0.82g.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) dati selezionati prodotto **40**: δ = 0.02 (s, 6H), 0.6 (s, 3H), 0.8-0.95 (m, 15H), 2.92-3.04 (m, 1H), 3.29-3.40 (m, 1H), 3.42-3.51 (m, 1H), 3.52-3.60 (m, 2H), 3.72-3.83 (m, 2H), 3.90-4.00 (m, 1H), 4.32-4.40 (m, 1H), 4.50-4.53 (m, 1H), 4.60-4.71 (m, 1H), 5.70-5.80 (m, 1H), 5.84-5.87 (d, J=9.3Hz, 1H), 6.21-6.38 (m, 2H), 7.92 (s, 1H), 8.28, (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz): δ = 10.1, 10.2, 13.5, 13.6, 18.4, 18.7, 20.7, 24.2, 25.6, 25.7, 25.8, 28.8, 28.9, 30.1, 30.2, 31.8, 32.0, 34.2, 34.8, 35.5, 35.6, 35.8, 36.5, 38.0, 39.9, 40.2, 42.7, 54.3, 55.6, 56.6, 61.6, 67.5, 71.8, 72.8, 79.0, 87.5, 91.0, 119.4, 140.3, 149.8, 152.4, 156.1, 172.6. MALDI-TOF MS (797.15): 820.01 (M+Na), 835.80 (M+K).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) dati selezionati prodotto **41*HBr**: δ = 0.05 (s, 6H), 0.6 (s, 3H), 0.9 (s, 12H), 0.91-0.93 (d, J=9.3Hz, 3H), 2.60-2.11 (m, 2H), 3.38-3.44 (m, 4H), 3.53-3.70 (m, 1H), 5.70 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz): δ = 10.1, 10.2, 13.5, 13.6, 18.4, 19.1, 20.7, 21.9, 24.2, 25.6, 25.7, 25.8, 26.6, 28.3, 28.9, 30.2, 30.5, 32.0, 35.5, 35.6, 35.7, 35.9, 36.5, 39.9, 40.2, 41.9, 42.7, 54.3, 56.0, 56.6, 64.7, 72.8, 164.0.

MALDI-TOF MS (529.91): 553.11 (M+Na), 569.00 (M+K).

Sintesi di 2'-O-propargil adenosina (45)

0.5g ($1.87 \cdot 10^{-3}$ mol) di adenosina (PM = 267.24) sono stati sciolti in 10 ml di dimetil formammide (DMF) ed addizionati di 85mg ($2.15 \cdot 10^{-3}$ mol) di idruro di sodio (NaH) e di 0.22ml ($2.06 \cdot 10^{-3}$ mol) di propargil bromuro ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{Br}$). La miscela di reazione è rimasta sotto agitazione a temperatura ambiente per una notte, ed è stata monitorata mediante cromatografia su strato sottile utilizzando la miscela eluente diclorometano/metanolo (90/10). A fine reazione è stato effettuato un trattamento con metossido di sodio (MeONa), per eliminare eventuali residui di propargil bromuro non reagito, quindi si è affogato in acqua e successivamente estratto con acetato di etile. Dopo avere anidrificato con sodio solfato anidro, il grezzo di reazione è stato concentrato sotto pressione e purificato mediante cromatografia gravitazionale su gel di silice, utilizzando una miscela eluente diclorometano/metanolo (90/10), ($R_f = 0.25$). Si sono ottenuti 0.46g di prodotto purificato (solido amorfo, PM = 305.29), in miscela diastereomerica con l'isomero in posizione 3' in rapporto 9:1 (stimato mediante analisi di risonanza magnetica nucleare $^1\text{H-NMR}$) con resa complessiva dell' 80%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) dati selezionati: $\delta = 3.25-3.28$ (m, 1H), 3.52-3.67 (m, 2H), 3.98-4.03 (m, 1H), 4.16-4.32 (m, 2H), 4.34-4.40 (m, 1H), 4.63-4.67 (m, 1H), 5.32-5.38 (m, 1H), 5.47-5.52 (m, 1H), 6.00-6.03 (d, $J=7\text{Hz}$, 1H), 7.32-7.40 (m, 2H), 8.13 (s, 1H), 8.38 (s, 1H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz): $\delta = 56.5, 58.2, 62.0, 76.4, 77.3, 78.7, 79.5, 89.3$;

MALDI-TOF MS (305.29): 329.06 (M+Na).

Sintesi di 3 α -azido-7 α ,12 α -diidrossicolanato di metile (45)

0.42g dell'estere metilico dell'acido colico ($1 \cdot 10^{-3}$ mol, PM = 422.60) e 0.86g di trifetilfosfina ($3.3 \cdot 10^{-3}$ mol) sciolti in THF anidro e portati a temperatura di 0°C, sono stati addizionati di 0.3ml di trietilammina (TEA) ($2 \cdot 10^{-3}$ mol) e di 0.14 ml di acido metansolfonico ($2.1 \cdot 10^{-3}$ mol). La miscela di reazione è stata poi portata a temperatura ambiente e sotto agitazione sono stati addizionati 0.6ml di dietilazadicarbossilato (DEAD) ($3.1 \cdot 10^{-3}$ mol). Dopo 2 ore di reazione sono stati aggiunti 0.32g ($5 \cdot 10^{-3}$ mol) di sodio azide (NaN_3), la temperatura è stata portata a 60-65°C e la reazione è avvenuta sotto agitazione nell'arco di 24h.

Al termine della reazione seguita mediante cromatografia su strato sottile è stato effettuato un trattamento con acqua (30ml) a freddo, si è estratto con acetato di etile (AcOEt) (3*50ml) e dopo anidificazione con sodio solfato anidro (Na₂SO₄), il solvente è stato evaporato sotto pressione. Il grezzo di reazione è stato purificato mediante cromatografia gravitazionale su gel di silice, utilizzando una miscela eluente al 10% di AcOEt in cicloesano. Si sono ottenuti 0.33g di prodotto purificato (PM = 447.61), sotto forma di solido amorfo giallo, corrispondenti ad una resa del 75%.

¹H-NMR (DMSO) dati selezionati: δ = 0.58 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.84-0.86 (d, J=6.5Hz, 3H), 3.15-3.25 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.58-3.62 (m, 1H), 3.74-3.80 (m, 1H), 4.16-4.18 (m, 2H);

¹³C-NMR (75MHz): δ = 12.6, 13.5, 19.1, 24.8, 28.4, 28.6, 29.0, 29.5, 31.2, 31.4, 34.8, 35.5, 35.8, 36.4, 37.0, 37.1, 40.3, 44.2, 47.4, 47.5, 51.9, 52.0, 68.4, 73.3, 173.1;

MALDI-TOF MS (447.61): 470.98 (M+Na), 487.23 (M+K).

Sintesi di adenosil-2'-O-metilen-3 α -triazolil-7 α ,12 α -diidrossicolanato di metile (46)

Una volta sintetizzate le molecole necessarie ossia l'alchino terminale **43** e l'azide terminale **45**, si è eseguita la reazione di *click chemistry* facendo reagire 30mg ($6.70 \cdot 10^{-2}$ mmoli) di azide (PM = 447.61) con 22.51mg ($7.37 \cdot 10^{-2}$ mmoli) di alchino in toluene/DMF 10:1 (V/V), ai quali sono stati addizionati 1.91mg di CuI ($1.0 \cdot 10^{-2}$ mmoli) e 69.3mg di diisopropiletilammina DIPEA (0.54mmoli in due aliquote a distanza di 18h), la reazione è avvenuta sotto vigorosa agitazione magnetica, al buio, per 36h a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi concentrata sotto vuoto e successivamente cromatografata su gel di silice, all'interno di una piccola colonna, utilizzando la miscela eluente diclorometano/metanolo (90/10), (R_f = 0.25). Il prodotto **46** è stato quindi isolato sottoforma di solido amorfo giallo, con una resa del 63% pari a 31.7mg di prodotto (PM = 752.90).

¹H-NMR (DMSO) dati selezionati: δ = 0.60 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.91-0.93 (d, J=9.3Hz, 3H), 3.25-3.30 (m, 1H), 3.48-3.72 (m, 2H), 3.56-3.62 (m, 1H), 3.77-3.82 (m, 1H), 3.98-4.03 (m, 1H), 4.11-4.17 (m, 1H), 4.17-4.22 (m, 1H), 4.37-4.42 (m, 1H), 4.49-4.74 (m, 2H), 4.60-4.66 (m, 1H), 5.32-5.38 (m, 1H), 5.40-5.47 (m, 1H), 6.01 (d, J=9.3Hz, 1H), 7.3-7.5 (m, 2H), 7.8 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.35 (s, 1H);

^{13}C -NMR (75MHz): $\delta = 12.0, 13.5, 19.1, 24.3, 24.8, 28.6, 29.0, 29.5, 31.1, 31.2, 31.4,$
 $34.0, 35.5, 35.8, 36.8, 37.1, 40.3, 44.2, 47.4, 47.5, 51.9, 53.1, 61.1, 66.5, 68.4, 71.8, 73.3,$
 $79.0, 87.1, 91.0, 119.4, 122.9, 140.3, 142.3, 149.8, 152.4, 156.1, 173.1;$

MALDI-TOF MS (752.90): 776.37 (M+Na).

3.5 Bibliografia

- 1) Watson, J.D.; Krick, F.H. *Nature* **1953**, 171, 737.
- 2) (a) Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D., *Molecular Biology of the cell* **2002**, 4th ed. (New York: Garland). (b) Lewin, B.; *Genes VII* **2000**, (New York: Oxford University Press).
- 3) Marmur, J. et al., *Prog. Nuc. Acid. Res.* **1963**, 1, 231.
- 4) (a) Liebhaber, S.A.; Cash, F.E.; Shakin, S.H. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 15597-602; (b) Walder, R, Y.; Walder, J. A. *Proc. Natl. Acad.*, **1998**, 85, 5011-15; (c) Crooke, S.T. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 31, 1489; (d) Zamore, P.D.; Tuschl, T.; Sharp, P.A., Bartel, D.P. *Cell.*, **2000**, 101, 25.
- 5) (a) Zamecnik, P.C.; Stephenson M.L., *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1978** 75, 280; (b) Wagner, R.W. *Nature*, 1994, 372, 333; (c) (b) Cook, P.D.; Crooke ST, Lebleu B. (Eds), *Antisense Research and Application*, CRC, **1993**.
- 6) (a) Pestka, S.; Daugherty, B.; Jung, V.; Hotta, K.; Pestka, R.K.; *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1984**, 81, 7525-28; (b) Cazenave C.; Loreau, N.; Thong N.T.; Toulmè J.J.; Helene, C. *Nucleic Acids Research*, **1987**, 15, 4717-34.
- 7) (a) Moser, H.E.; Dervan, P.B. *Science*, **1987**, 238, 645-50; (b) Le Doan, T.; Perrouault, L.; Praseuth, D; Habhoub, N.; Decout, J.L.; Thong, N.T.; Lhomme, J.; Hélène, C. *Nucleic Acids Research*, **1987**, 15, 7749-60.
- 8) (a) Matteucci, M.D.; Bischofberger, N. *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1991**, 26, 287-96; (b) Hélène, C. *Anti-Cancer Drug Design* **1991**, 6, 569-84.
- 9) (a) Culliton, B.J. *Nature Medicine* **1995**, 1, 1; (b) Burkhard, J. and Uwe, Z.W. *Lancet Oncology*, **2002**, 3, 672-83.
- 10) (a) Crooke, S.T. *Curr. Mol. Med.*, **2004**, 4, 465-87; (b) Crooke, S.T. *Annu. Rev. Med.*, **2004**, 55, 61-95; (c) Crooke, S.T., *Drug Delivery System in Cancer Therapy*, **2004**, Brown, D.M. Ed.; Humana Press: Totowa, N.J.
- 11) (a) Nguyen, T.; Hélène, C. *Anghew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 666-90; (b) Napoli S. et al. *Nucleic Acids Research*, **2006**, 34, 734-44; (c) Arimondo, P.B. *Molecular and Cellular Biology*, **2006**, 26, 324-33.
- 12) (a) Pirrolo K.F. et al, *Pharmacology and Therapeutic*, **2003**, 99, 55-77; (b) Wilton, S.D. et al, *Neuromuscular Disorders*, **2005**, 15, 399-402; (c) Muntoni, F. et al, *Neuromuscular Disorders*, **2005**, 15, 450-457.
- 13) (a) Pendergast, P.S. et al, *Journal of Biomolecular Techniques*, **2005**, 16, 224-234; (b) Eugene, W.M. Ng et al, *Nature Reviews*, **2006**, 123-32.
- 14) Wang, D. et al, *Vaccine*, **2005**, 23, 2614-22.
- 15) Braasch, D.A.; Corey, D.R. *Biochemistry*, **2002**, 41, 4503.
- 16) Grillone, L.R.; Lanz, R. *Drugs Today*, **2001**, 37, 245-255.
- 17) Banerjee, D. *Curr. Opin. Invest. New Drugs*, **2001**, 2, 574-580.

- 18) (a) Watson, J. et al., *Molecular Biology of the gene* **1987**; (b) Lewin, B. *Genes V*, Oxford University Press **1994**.
- 19) (a) Lehmann, C.; Xu, Y. Z.; Christodoulou, C.; et al *J. Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 2379; (b) Avino, A.; Garcia, R.G. et al *Nucleosides Nucleotides*, **1996**, 15, 1871; (c) Grenner, G.; Schmidt, H.L. *Chem. Ber.*, **1977**, 110, 373; (d) Segal, A. et al *Chem. Biol. Interact.*, **1979**, 28, 333.
- 20) (a) Zon, G., *Pharmaceutical Res.* **1988**, 5, 539. (b) Shaw, J.P.; Kent, K.; Bird, J., *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 747.
- 21) (a) Suzuki, T.; Ohsumi, s.; Makino, K., *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4997-5003. (b) Hakala, H.; Oivanen, M.; Saloniemi, E. *J. Phys. Org. Chem.* **1992**, 5, 824-28.
- 22) Agrawal, K.L.; Buchi, H., Carruthers, M.H.; Khorana, H.G., *Nature* **1970**, 227, 27-34.
- 23) Khorana, H.G., *Bioorg. Chem.*, **1978**, 1, 35.
- 24) Shaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B. Khorana, H.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3821.
- 25) Smith, M.; Rammmler, D.H.; Khorana, H.G., *J.Am.Chem.Soc.*, **1961**, 84, 430-440.
- 26) Khorana, H.G.; Tener, G.M.; Moffat, J.P.; Pol, E.H., *Chem.& Ind. London*, **1956**, 1523.
- 27) Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149.
- 28) Letsinger, R.L.; Kornet M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85 (19), 3045-46.
- 29) Letsinger, R.L.; Mahadevan, V. J., *Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87 (15), 3526-27.
- 30) Caruthers, M.H.; Matteucci, M.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 3185-91.
- 31) Letsinger, R.L.; Ogilivie, K.K.; Miller, P.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91 (12), 3360-65.
- 32) Letsinger, R.L.; Ogilivie, K.K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91 (12), 3350-55.
- 33) Devine, K.G.; Reese C.B., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27 (45), 5529-32.
- 34) Gait, M.J.; Popov, S.G.; Singh, M.; Titmas, R.C. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **1980**, 7, 253-57.
- 35) Warner, B.D.; Warner, M.E.; Karns, G.A.; Brown-Shimer, S; Urdea, M.S. *DNA*, **1984**, 3, 401-11.
- 36) Letsinger, R.L.; et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 3278 - 79.
- 37) Letsinger, R.L.; Lunsford, W.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3655-61.
- 38) Caruthers, M.H.; Matteucci, M.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 3185-91.
- 39) (a) Caruthers, M.H.; McBride, L.J., *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 245-48; (b) Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 22, 1859.
- 40) Alberts, B. et al. *Biologia Molecolare della Cellula*, Ed. Zanichelli, Bologna, Italia, **1991**.
- 41) (a) Miller, P.S.; Mcparland, K.B.; Jayaram, K. *Biochem*, **1981**, 20, 1874; (b) Nolen, H.W.; Catz, P.; Friend, D.R. *Intl.J.Pharm.*, **1994**, 107,169.
- 42) Michelson, A.M.; Todd, A.R. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632.
- 43) (a) Cahn, R.S.; Ingold, C.; Prelog, V. *Anghew. Chem. Intl.*, **1966**, 5, 385; (b) Klyne, W.; Buckingham, J. *Absolute Configuration of Organic Moleculs*, **1974**, 229-30.
- 44) (a) Uhlman, E.; Peyman, A.; *Chem. Rev.* **1990**, 90, 543; (b) Miller, P.S.; Ts'O, P.O.P.; Hogrefe, R.I.; Reynolds, M.A.; Arnold, L.I. *Antisense Research and Application*, **1993**.

- 45) (a) Cohen, J.S.; Crooke, S.T.; Lebleu, B. (Eds), *Antisense Research and Application*, CRC, **1993**; (b) Crooke, R.M.; Crooke, S.T.; Lebleu, B. (Eds); *Antisense Research and Application*, CRC, **1993**, (c) Stein, C.A. Cheng, Y.C. *Science*, **1993**, 261, 1004.
- 46) (a) Campbell, J.M.; Bacon, T.A.; Wickstrom, E. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **1990**, 20, 259.
- 47) Stec, W.J.; Wilk, A. *Angew. Chem. Intl.*, **1994**, 33, 709.
- 48) (a) Loke, L.S.; Stein, C.A.; Zang, X.H.; Mori, K.; Nakanisci, M.; Subasinghe, C.; Cohen, J.S.; Nekers, L.M. *Procl. Natl. Acad. Sci USA*, **1989**, 86, 3474; (b) Crooke, R.M. *Anti-Cancer Drug Design*, **1991**, 6, 609; (c) Jarosewski, J.W.; Cohen, J.S. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **1991**, 6, 235. (d) Chin, D.J.; Green, G.A.; Zon, G.; Szoka, F.G.; Straubunger, R.M. *New Biologist*, **1990**, 2, 1091.
- 49) Matsukura, M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Mitsuya, H.; Reitz, M.; Cohen, J.S.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **1987**, 84, 7706.
- 50) Mori, K.; Boizeau, C.; Cazenave, C.; Matsukura, M.; Subasinghe, C.; Cohen, J.S.; Toulmè, J.J.; Stein, C. A. *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 8207.
- 51) (a) Morvan, F.; Rayner, B.; Leonetti, J.P.; Imbach, J.L.; *Nucleic Acids Res.*, **1988**, 16, 833; (b) Rayner, B.; Matsukura, M.; Morvan, F.; Cohen, J.S.; Imbach, J. L.; *CR Acad. Sci Paris*, **1990**, 310, 61; (c) Gmeiner, W.H.; Rao, K.E.; Rayner, B.; Vasseur, J.J.; Morvan, F., Imbach, J. L.; Lown, W. *Biochem*, **1990**, 29, 10329.
- 52) Marshall, W.S.; Caruthers, M.H.; *Science*, **1993**, 259, 1564.
- 53) (a) J. Burgers, P.M.; Eckstein, F. *Biochem.* **1978**, 18, 592; (b) Morvan, F. Rayner, R.B.; Imbach, J.L. *tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 7149.
- 54) Ghosh, M.K.; Ghosh, K.; Dahl, O.; Cohen, J.S. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 5761.
- 55) Sproat, B.S.; Lamond, A.I.; Crooke, S.T.; Lebleu B. (Eds), *Antisense Research and Application*, CRC, **1993**.
- 56) Prakash, T.P.; Balkrishen, B., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2007**, 7, 641-49.
- 57) Hinoue, H.; Hayase, Y.; Iwai, S.; Ohtsuka, E. **1987**, *FEBS Lett.*, 215, 327-330.
- 58) Morvan, F.; Porumb, H.; Degols, G.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Sproat, B.S.; Rayner, B.; Malvy, C.; Lebleu, B.; Imbach, J.L.; *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 280.
- 59) Monia B.P; Lesnik, E.A.; Gonzalez, C.; Lima, W.F.; McGee, D.; Guinosso, C.J.; Kawasaki, A.M.; Cook, P.D.; Freier, S.M. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 14514-14522.
- 60) Hinoue, H.; Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. **1987**, *Nucleic Acids Res.*, 15, 6131-48.
- 61) Sproat, B.S.; Lamond, A.B.; Beijer, B.; Neuner, P.; Ryder, U. *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 3373.
- 62) Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O.; Crooke ST, Lebleu B. (Eds), *Antisense Research and Application*, CRC, **1993**.
- 63) Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O. *Science*, **1991**, 254, 1497.
- 64) a) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christiansen, L.; Behrens, C.; Freier, S.M.; Driver, D.A.; Berg, R.H.; Kim, S.K.; Norden, B.; Nielsen, P.E. *Nature*, **1993**, 365, 566; (b) Brown, S.C.; Thomson, S.A.; Veal, J.M.;

- Davis, D.G. *Science*, **1994**, 265, 777; (c) Leijon, M.; Graslund, A.; Nielsen, P.E.; Buchardt, O.; Norden, B.; Kristensen, S.M.; Eriksson, M. *Biochemistry*, **1994**, 33, 9820.
- 65) Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1895.
- 66) Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O. *Proceeding of the Intl. Conference on Nucleic Acids Application*, Cancun, Jan., **1993**, 26-30.
- 67) Hanvey, J.C.; Peffer, N.J.; Bisi, J.E.; Thomson, S.A.; Cadilla, R.; Josey, J.A.; Ricca, D.J.; Hassman, C.F.; Bonham, M.A.; Au, K.G.; Carter, S.G.; Buckenstein, D.A.; Boyd, A.L.; Noble, S.A.; Bassis, L.E. *Science*, **1992**, 258, 1481.
- 68) Summerton, J. Weller, D. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.*, **1997**, 7, 187-95.
- 69) Summerton, J. *Innovation in Pharmaceutical Technology*, **2005**, 17.
- 70) (a) Summerton, J. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1999**, 1, 489, 141; (b) Summerton, J. *Letters in Peptide science*, **2004**, 10, 215.
- 71) (a) Sazani, P.; Kang, S.H.; Maier, M.A.; Wei, C.; Dillman, J.; Summerton, J.; Manoharan, M., Kole, R. *Nucl. Acids Res.*, **2001**, 29, 3965-74; (b) Suwanmanee, T., Sierokowska, H.; Lacerra, G.; Svasti, S.; Walsh, C.E.; Fucharoen, S.; Kole, R. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, 545-53.
- 72) Morcos, P.A. *Genesis* **2001**, 30, 94-102.
- 73) (a) Singh, S.K.; Nielsen, P.; Koshkin, A.A.; Wengel, J. *Chem. Commun.*, **1998**, 455; (b) Koshkin, A.A.; Singh, S.K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V.K.; Kumar, R.; ; Meldgaard, M.; Olsen, C.E.; Wengel, J. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 3607; (c) Toulmè, J.J. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19, 17-18.
- 74) Kerreck, J.; Wyszko, E.; Gillen, C.; Erdmann, V.A. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30 (9), 1911-18.
- 75) Wahlestedt, C.; Salmi, P.; Good, L.; Kela, J.; Johnsson, T.; Hokfelt, T.; Broberger, C.; Porreca, F.; Lai, J.; Ren, K.; Ossipov, M.; Koshkin, A.; Jakobsen, N.; Skouv, J.; Oerum, H.; Jacobson, M.H.; Wengel, J. *Procl. Nat. Acad. Sci, USA*, **2000**, 277, 7090-7107.
- 76) Kurreck, J., *Eur. J. Biochem.*, **2003**, 270, 1628-44.
- 77) Wilson, C.; Keefe, A.D.; *Cur. Opin. Mol. Ther.*, **2006**, 10, 607-14.
- 78) (a) Aartsma-Rus, A.; Janson, A.A.; Kaman, W.E.; Bremmer-Bout, M.; Den Dunnen, J.T.; Baas, F.; Van Ommen, G.J. et al. *Hum. Mol. Genet.*, **2003**, 12, 907-14; (b) Aartsma-Rus, A.; Janson, A.A.; Kaman, W.E.; Bremmer-Bout, M.; Den Dunnen, J.T.; Baas, F.; vVan Ommen; Van Deutekom, J.C., **2004**, *Am. J. Hum. Genet.*, 74, 83-92; (c) Friedman, K.J., Kole, J.; Cohn, J.A.; Knowles, M.R.; Silverman, L.R.; Kole, R., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 36193-199; (d) Lu, Q.L.; Mann, C.J.; Lou, F.; Bou-Gharios, G.; Morris, G.E.; Xue, S.A.; Fletcher, S.; et al, *Nat. Med.* **2003**, 6,6. (e) Van Deutekom, J.C.; Bremmer-Bout, M.; Janson, A.A.; Ginjaar, I.B.; Baas, F.; Den Dunnen, J.T.; Van Ommen G.J., **2001**, *Hum. Mol. Genet.*, 10, 01547-54; (f) Wilton, S.D.; Fletcher, S.; *Acta Myol.*, **2005**, 24, 222-29.
- 79) Adams, S.R.; Kauka, K.S.; Wikes, E.J.; Holder, S.B.; Galuppi, G.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 661.
- 80) (a) Tensamani, J.; Kubert, M.; Agrawal, S. *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 1841-44; (b) Fearon, K.L.; Stults, J.T.; Bergot, B.J.; Christensen, L.M.; Raible, A.M. *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 2754-61.
- 81) Krotz, A.H.; Carty, R.L.; Moore, M.N.; Scozzari, A.N.; Cole, D.L.; Ravikumar, V.T. *Green Chemistry*, **1999**, 277-281.

- 82) (a) Patil, S.V.; Salunkhe, Mane and M.M. *Synth. Commun.* **1994**, 24, 2423; (b) Sekine, M *Nucleosides Nucleotides*, **1994**, 13, 1397; (c) Leonard, N.J.; Neelima, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7833; (d) Beaucage, S.L.; Iyer, R.P. *Tetrahedron*, **1992**, 48, 2223.
- 83) Sproat, B.S.; Bannwarth, W. *Tetrahedron. Lett.* **1983**, 24, 5771-74.
- 84) (a) Septak, M. *Nucleic Acids Research*, **1996**, 24, (15), 3053-58; (b) Suzuki, T. et al *Nucleic Acids Research*, **1994**, 22, 4997-5003; (c) Hakala, H. et al. *J. Phys. Org. Chem.*, **1992**, 5, 824-28.
- 85) (a) Wincott, F.; DiRenzo, A.; Shaffer, C.; Grimm, S.; Tracz, D.; Workman, C.; Sweedler, D.; Gonzales, C.; Scaringe, S.; Usman, N. *Nucleic Acids Research*, **1995**, 23, 2677-84; (b) Sproat, B.; Colonna, F.; Mullah, B.; Tsou, D.; Andrus, A.; Hampel, A.; Vinayak, R. *Nucleosides and Nucleotides*, **1995**, 255-273; (c) Tsou, D.; Hampel, A.; Andrus, A.; Vinayak, R. *Nucleotides*, **1995**, 14, 1481-92.
- 86) Krotz, A.H.; Klopkin, P.G.; Wilker, K.L.; Srivatsa, G.S.; Cole, D.L.; Ravikumar, V.T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3875-78.
- 87) Wang, Z. et al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2006**, 5049-60.
- 88) Vargeese, C.; Carter, J.; Yegge, J.; Krivjansky, S.; Settle, A.; Kropp, E.; Petersen, K.; Pieken, W. *Nucleic Acids Research*, **1998**, 1046-50.
- 89) Wu, X.; Pitsch, S. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 4315-23.
- 90) (a) Hobartner, C.; Kreutz, K.; Flecker, E. et al *Monatshfte für Chemie*, **2003**, 851-73; (b) Pitsch, S.; Weiss, P.A.; Jenny, L.; Stutz, A.; Wu, X.L.; *Helv. Chim. Acta*, **2001**, 84, 3773-95; (c) Welz, R.; Müller S.; *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 795-97.
- 91) Berner, S.; Muehlegger, L.; Seliger, H., *Nucleic Acids Research*, **1983**, 17(3), 853-64.
- 92) Chen, D.; Klopchin, P.; Parson, J.; Srivatsa, G.S. *J. Liq. Chrom. Technol*, **1997**, 20, 1185-95.
- 93) (a) Eckstein, F. *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, 54, 367; (b) Agrawal, S.; Tang, J. Y. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 7541; (c) Morvon, F.; Rayner, B.; Imbach, J.L. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 7149.
- 94) (a) Eckstein, F. *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, 54, 367; (b) Agrawal, S.; Tang, J. Y. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 7541; (c) Morvon, F.; Rayner, B.; Imbach, J.L. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 7149.
- 95) (a) Iyer, R.P.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1253; (b) Iyer, R.P.; Phillips, L.R.; Egan, W., Regan, J.B. Beaucage, S.L. *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 4693.
- 96) (a) Wang, Z.; Song, Q.; Sanghvi, Y.S. *Methods in Molecular Biology Oligonucleotide Synthesis Methods and Applications*; Herdewijn, p., Ed.; Humana: Totowa, NJ, **2005**, 288, 51; (b) Wang, Z.; Song, Q.; Sanghvi, Y.S. *Nucleoside Nucleotide Nucleic Acids*, **2003**, 22, 629.
- 97) Bergot, B.J.; Egan, W. *J. Chromatogr.*, **1992**, 599, 35-42.
- 98) Capaldi, D.C.; Gaus, H.J.; Carty, R.L. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4683-90.
- 99) Stec, W.J. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3908-13.
- 100) (a) Xu, Q. et al. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 3643; (b) Ma, M. Y. X. et al. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25, 3590.
- 101) (a) V.T. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 2513-17; (b) Krotz, A.H.; Gorman, D.; Mataruse, P.; Foster, C. et al. *Org. Proc. Res. And Develop.*, **2004**, 8, 852-58.
- 102) Capaldi, D.C.; Scozzari, A.N.; Cole, D.L.; Ravikumar, V.T. *Org. Process Res. Dev.* **1999**, 3,

- 485.
- 103) Robert, J.; Anouti, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1997**, 473-78.
- 104) Cheruvallath, Z.S.; Carty, R.L.; Moore, M.N.; Capaldi, D.C.; *Org. Process Res. Dev.* **2000**, 4, 199-204.
- 105) Capaldi, D.C. et al. *Org. Proc. Res. and Devel.*, **2003**, 7, 832-38.
- 106) Bergman, E.D.; Ginsberg, D.; Pappo, R., *Org. React.*, **1959**, 10, 179.
- 107) Boal, J.H. et al. *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 3115-17.
- 108) Reddy, M.P. et al *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 8929-32.
- 109) (a) Holmberg, L. Large scale oligonucleotides synthesis, *IBC meeting*, **1997** october 28-29, San Diego, California; (b) Holmberg, L. *IBC Conference*, **1998** february 2-3, Coronado, California.
- 110) Warren, W.J.; Vella, G. *Protocols for Oligonucleotides Conjugates*, **1994**, 233-64.
- 111) Hill, T.L.; Mayhev, J.W. *J. Chromatogr.*, **1991**, 512, 415.
- 112) (a) Kato, Y.; et al *J. Chromatogr.*, **1989**, 478, 264; (b) Ausserer, W.A.; Biros, M.L. *BioTechniques*, **1995**, 19, 136; (c) Jilge, G. et al *J. Chromatogr.*, **1989**, 476, 37.
- 113) Srivatsa, G.S.; Klopchin, P.; Batt, M.; Carlson, R.H.; Cole, D.L *J. Pharm. Biomed Analys.*, **1997**, 16, 619-30.
- 114) (a) Warren, W.J.; Vella, G.; *Mol. Biotechnol*, **1995**, 4, 179; (b) Huber, G.C. *J. Chromatogr. A.*, **1998**, 806, 3; (c) Uesugi, T.; Sano, K.; Uesawa, Y. et al *J. Chromatogr. B.*, **1997**, 703, 63.
- 115) Gilar, M.; Bouvier, E.S.P. *J. Of Chromat. A.*, **2000**, 890, 167-77.
- 116) (a) Huber, G.C.; Oefner, P.J.; Bonn, G.K. *J. Chromatogr.*, **1992**, 599, 113; (b) Huber, G.C.; Oefner, P.J. et al. *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 1061; (c) Huber, G.C.; Oefner, P.J.; Bonn, G.K. *Anal. Biochem.*, **1993**, 212, 351.
- 117) (a) Oligopure: Instruction for Use, Document No. 69157 (rev.A), Hamilton, Reno, NV, USA, **1994**; (b) Oligonucleotide Purification cartridge: Oligonucleotide Purification protocol, Perkin-Elmer, Applied Biosystem Division, USA, **1999**.
- 118) Krotz, A.H. et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1863-67.
- 119) Krotz, A.H. et al. *Org, Proc. Res. & Devel.*, **2003**, 7, 47-52.
- 120) (a) Rothemberg, M. et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1989**, 20, 1523; (b) Guinosso, C.J. et al. *Nucleosides Nucleotides*, **1991**, 10, 259.
- 121) Chakraborty, R. et al., *Biochem. J.* **1999**, 393-96.
- 122) Will, D.W.; Brown, T. *Thetrahedron Lett.*, **1991**, 33, 2729.
- 123) (a) Farooqui, F. et al. *Bioconjugate Chem.*, **1991**, 2, 422.(b) Gmeiner, W.H. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1991**, 1, 487.
- 124) (a) Xu, Y.Z. et al. *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 3839; (b) Schulhof, J.C. et al. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 51.
- 125) Jäschke, A. V., Fürste J. P., Nordhoff, E., Hillenkamp, F., Cech, D., Erdmann, V.A., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 4810-17;

- 126) (a) Stetsenko, D.A., Gait, M.J., *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 4900-08; (b) Tung, C. H., Stein, S., *Bioconj. Chem.*, **2000**, *11*, 605-18.
- 127) Takaharu Maruyama et al. *Biochem. And Biophys. Res.*, **2002**, *329*, 386-90.
- 128) Hofmann, A.F. *Ital. J. Gastroenterol.* **1995**, *27*, 106-13; *International Journal of Urology*, **2002**, *9*, 42-46
- 129) Rodrigues, C.M.P. et al., *The American Society for Clinical Investigation, Inc.* **1998**, Vol. 101, *12*, 2790-99.
- 130) DeLong, R.K., et al. *Bioorg. Nucl.Acids Res.*, **1999**, Vol. 27, *16*, 3334-41.
- 131) Lehman, T.J.; Engels, J.W. *Bioorg. And Med. Chem.*, **2001**, *9*, 1827-35.
- 132) Starke, D. et al. *Bioorg. And Med. Chem.*, **2001**, *11*, 945-49.
- 133) Kim, S.J. et al., *Chem. Bio. Chem.*, **2004**, *5*, 1517-22.
- 134) Velikyan, I. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2893-94.
- 135) Prakash, T.P.; Kawasaki. A.M., et al. *J. Org. Chem.*, **2002**, 357-69.
- 136) Ustinov, A.V. et al. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 1467-1473.
- 137) (a) R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565; (b) R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 741; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 633. (c) R. Huisgen in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, pp. 1 - 176; (d) A. Padwa in *Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4* (Ed.: B. M. Trost), Pergamon, Oxford, **1991**, pp. 1069 – 1109.
- 138) (a) R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613; (b) R. Huisgen, G. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494; (c) W. Lwowski in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, Vol. 1* (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, cap. 5.
- 139) (a) Rostovtsev, V. V.; Green. L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2599; (b) Tornoe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057.
- 140) (a) W. Lwowski in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, Vol. 1* (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, pp. 559 –645; (b) H. Wamhoff in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry, Vol. 5* (Eds.: A. R. Katritzky, C. W. Rees), Pergamon Press, Oxford, **1984**, pp. 669 –732.
- 141) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- 142) (a) W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366; (b) K. Bezouska, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 269.
- 143) (a) Breslauer, K.J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 3736-50; (b) Borer et al. *J.Mol.Biol.* **1983**, *86*, 843-53.

**Cationic PMMA nanoparticles bind and deliver antisense oligoribonucleotides
allowing restoration of dystrophin expression in the *mdx* mouse**

Paola Rimessi¹, Patrizia Sabatelli^{1,2}, Marina Fabris¹, Paola Braghetta³, Elena Bassi¹, Pietro Spitali¹, Gaetano Vattemi⁴, Giuliano Tomelleri⁴, Lara Mari⁵, Daniela Perrone⁶, Alessandro Medici⁶, Marcella Neri¹, Matteo Bovolenta¹, Elena Martoni¹, Nadir Maraldi⁷, Francesca Gualandi¹, Luciano Merlini¹, Marco Ballestri⁸, Luisa Tondelli⁸, Katia Sparnacci⁹, Paolo Bonaldo³, Antonella Caputo³, Michele Laus⁹, Alessandra Ferlini¹

¹Department of Experimental and Diagnostic Medicine, Section of Medical Genetics, University of Ferrara, Ferrara, Italy

²IGM-CNR, Unit of Bologna c/o IOR, Bologna, Italy

³Department of Histology, Microbiology, and Medical Biotechnology; University of Padova, Padova, Italy

⁴Department of Neurological Sciences and Vision, Section of Clinical Neurology, University of Verona, 37134 Verona, Italy.

⁵Department of Chemistry, University of Ferrara, Ferrara, Italy

⁶ Department of Biology and Evolution, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

⁷Department of Human Anatomical Sciences, University of Bologna and Laboratory of Cell Biology, IOR, Bologna, Italy

⁸ISOF, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna, Italy

⁹Department of Environmental and Life Sciences INSTM, University of Piemonte Orientale, Alessandria, Italy.

Correspondence should be addressed to:

Alessandra Ferlini, MD, PhD

Department of Experimental and Diagnostic Medicine, Section of Medical Genetics,
University of Ferrara, Italy

Tel +39 0532 974439; fax +39 0532 974406; email fla@unife.it

ABSTRACT

For subsets of Duchenne muscular dystrophy mutations, antisense oligoribonucleotide-mediated exon skipping has proven to be efficacious in restoring the expression of dystrophin protein. In the *mdx* murine model systemic delivery of antisense oligoribonucleotide, recognising the splice donor of dystrophin exon 23, has shown proof of concept. Here we show that using cationic polymethylmethacrylate (PMMA) nanoparticles (marked as T1) loaded with a low dose of 2'-O-methyl-phosphorothioate antisense oligoribonucleotide delivered by weekly intraperitoneal injection (0.9 mg/kg/week), could restore dystrophin expression in body-wide striated muscles. Delivery of an identical dose of naked antisense oligoribonucleotide did not result in detectable dystrophin expression. Transcription, western and immunohistochemical analysis showed increased levels of dystrophin transcript, protein and correct localisation at the sarcolemma. This study shows that T1 nanoparticles have the capacity to bind and convoy antisense oligoribonucleotides in body-wide muscle tissues and to reduce the dose required for dystrophin rescue. By immunofluorescence and electron microscopy studies we highlighted the diffusion pathways of this compound. This non-viral approach may valuably improve the therapeutic usage of antisense oligoribonucleotides in Duchenne muscular dystrophy as well as the delivery of RNA molecules with many implications in both basic research and medicine.

**Cationic PMMA nanoparticles bind and deliver antisense oligoribonucleotides
allowing restoration of dystrophin expression in the *mdx* mouse**

Paola Rimessi¹, Patrizia Sabatelli^{1,2}, Marina Fabris¹, Paola Braghetta³, Elena Bassi¹, Pietro Spitali¹, Gaetano Vattemi⁴, Giuliano Tomelleri⁴, Lara Mari⁵, Daniela Perrone⁶, Alessandro Medici⁶, Marcella Neri¹, Matteo Bovolenta¹, Elena Martoni¹, Nadir Maraldi⁷, Francesca Gualandi¹, Luciano Merlini¹, Marco Ballestri⁸, Luisa Tondelli⁸, Katia Sparnacci⁹, Paolo Bonaldo³, Antonella Caputo³, Michele Laus⁹, Alessandra Ferlini¹

¹Department of Experimental and Diagnostic Medicine, Section of Medical Genetics, University of Ferrara, Ferrara, Italy

²IGM-CNR, Unit of Bologna c/o IOR, Bologna, Italy

³Department of Histology, Microbiology, and Medical Biotechnology; University of Padova, Padova, Italy

⁴Department of Neurological Sciences and Vision, Section of Clinical Neurology, University of Verona, 37134 Verona, Italy.

⁵Department of Chemistry, University of Ferrara, Ferrara, Italy

⁶ Department of Biology and Evolution, University of Ferrara, Ferrara, Italy.

⁷Department of Human Anatomical Sciences, University of Bologna and Laboratory of Cell Biology, IOR, Bologna, Italy

⁸ISOF, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna, Italy

⁹Department of Environmental and Life Sciences INSTM, University of Piemonte Orientale, Alessandria, Italy.

Correspondence should be addressed to:

Alessandra Ferlini, MD, PhD

Department of Experimental and Diagnostic Medicine, Section of Medical Genetics,
University of Ferrara, Italy

Tel +39 0532 974439; fax +39 0532 974406; email fla@unife.it

ABSTRACT

For subsets of Duchenne muscular dystrophy mutations, antisense oligoribonucleotide-mediated exon skipping has proven to be efficacious in restoring the expression of dystrophin protein. In the *mdx* murine model systemic delivery of antisense oligoribonucleotide, recognising the splice donor of dystrophin exon 23, has shown proof of concept. Here we show that using cationic polymethylmethacrylate (PMMA) nanoparticles (marked as T1) loaded with a low dose of 2'-O-methyl-phosphorothioate antisense oligoribonucleotide delivered by weekly intraperitoneal injection (0.9 mg/kg/week), could restore dystrophin expression in body-wide striated muscles. Delivery of an identical dose of naked antisense oligoribonucleotide did not result in detectable dystrophin expression. Transcription, western and immunohistochemical analysis showed increased levels of dystrophin transcript, protein and correct localisation at the sarcolemma. This study shows that T1 nanoparticles have the capacity to bind and convoy antisense oligoribonucleotides in body-wide muscle tissues and to reduce the dose required for dystrophin rescue. By immunofluorescence and electron microscopy studies we highlighted the diffusion pathways of this compound. This non-viral approach may valuably improve the therapeutic usage of antisense oligoribonucleotides in Duchenne muscular dystrophy as well as the delivery of RNA molecules with many implications in both basic research and medicine.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked inherited muscle degenerative disorder mainly caused by frame-disrupting mutations due to large rearrangements in the dystrophin gene [1]. DMD boys are affected by both severe skeletal muscle wasting and dilated cardiomyopathy. The milder allelic form of the disease, Becker muscular dystrophy, is due to in frame mutations which preserve a shortened but functional protein. This observation has suggested that converting a DMD phenotype to a less severe condition may represent a possible therapeutic approach for DMD. In this context, restoration of dystrophin synthesis by exon skipping during pre-mRNA splicing by means of antisense oligoribonucleotide (AON) could potentially be applicable for up to 90% of DMD patients [2]. Indeed, this approach has been successfully applied to the *mdx* mouse model, both *in vitro* and *in vivo*, to normal and DMD patients' myogenic cells, to the transgenic hDMD mouse, and to the canine model of DMD. These results have therefore generated optimism about the feasibility of developing effective therapy approaches for DMD [3-5]. Indeed, it was recently shown that intramuscular injection of 2'OMePS AONs in four DMD patients was associated with relevant local rescue of dystrophin synthesis [6]. Notwithstanding these encouraging results, the systemic administration of AONs is limited by their cellular uptake and non-toxic effective doses. The main challenge in this field is therefore to improve the delivery of AONs to all tissues affected by the disease, including skeletal and cardiac muscles, and to reduce the effective therapeutic dose in view of life-long treatment [6-8]. In particular, to obtain exon skipping in the heart is of importance, since cardiomyopathy is currently the leading cause of death in DMD patients. Very recently two independent studies described a high yield of dystrophin protein in the heart by systemic delivery of morpholino oligomers conjugated with cell-penetrating peptide containing arginine [9, 10]. However, the non degradable nature of PMO still raises concerns over their safety after extended systemic applications [11]. Experimental evidence in the *mdx* model indicates that engineered AONs can efficiently reach the cardiac muscle also when cloned into recombinant

adeno-associated virus (rAAV) vectors [12]. However, the intrinsic immunogenicity of virus-associated proteins may impair the efficacy of viral-mediated gene inoculations preventing prolonged transgene expression. Indeed, whereas mice may be more tolerant to initial exposure to AAV, recent data demonstrated immune-mediated loss of rAAV persistence in the DMD dog model and in patients participating to a phase 1/2 clinical trial of β -haemophilia [13, 14].

The use of synthetic non-viral vectors based on polymeric systems is a versatile and safe approach for the *in vivo* delivery of bioactive molecules, including plasmid DNA, oligonucleotides and peptides. They increase their stability and shelf-life in biological fluids, improving their efficacy. Over the past decade, several polymeric delivery systems, such as liposomes, copolymers, nano- and micro-spheres, have been developed [15]. The compounds are encapsulated inside the polymeric matrix and released *in vivo* by a combination of diffusion and polymer degradation. However, following encapsulation and release, labile drugs, such as DNA and proteins, may undergo significant degradation accompanied by a reduction in drug activity [16]. Moreover intracellular drug release from the polymeric matrix may be too slow to be effective. In fact, particles could be removed from the intracellular environment before much of the payload has been released [17].

To achieve an effective binding, cationic micro and nanospheres consisting of biodegradable polymers (PLGA) were therefore obtained in which cationic surfactants are able to adsorb drug onto particles surface [i.e. cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)] or cationic polymers [i.e. polyethyleneimine (PEI)] [18, 19]. However, this approach suffers from an inherent surface instability due to the occurrence of cationic surfactant desorption, thus ultimately leading to reproducibility problems and even toxic side effects. To overcome these problems, we designed and prepared a novel type of cationic core-shell nanospheres (T1), made up of a core of poly(methyl methacrylate) or PMMA, surrounded by a shell bearing cationic groups. PMMA T1 nanoparticles have cationic groups, ideal for AONs binding, covalently bound to the particles thus avoiding

desorption and instability problems. PMMA-based nanoparticles were already described as in vivo drug delivery systems for both DNA oligonucleotides and peptides delivery [20, 21].

Anionic and cationic PMMA-based nanoparticles similar to the T1 sample used in this study, were already shown to be very promising delivery systems for protein and DNA vaccines or for modified peptide nucleic acids (PNAs) as the particle/bioactive molecules are readily taken up by the cells where they efficiently release the delivered drug, are safe in mice and non-human primates, even after multiple administration of high doses, and slowly biodegradable [22-24]. This knowledge prompted us to evaluate T1 nanoparticles as alternative vehicles to deliver charged RNA-like AONs and to induce dystrophin rescue with improved efficiency and/or with more durable effect in *mdx* mice. We indeed demonstrate that T1 nanoparticles bind 2'OMePS oligoribonucleotides and have a body wide distribution following intraperitoneal administration. This was accompanied with dystrophin restoration both in skeletal muscles and in the heart. This rescue persisted up to 6 weeks after the last injection. Using T1 nanoparticles the effective dose of AON was highly reduced (2.7 mg/kg) when compared to those used in previous studies on naked AONs delivery (120-240 mg /kg) [25, 26]. Our results encourage further studies on T1 or other novel nanoparticles to evaluate applicable therapeutic employment for AON delivery in DMD.

RESULTS

T1 nanoparticles and AON loading experiments

T1 nanoparticles (diameter by SEM 417 nm, Z-potential + 46.5 mV, surface charge density 155 $\mu\text{mol/g}$) were obtained by emulsion polymerization (Fig. 1 a). They were made of a core of poly(methyl methacrylate), surrounded by a shell bearing cationic groups. Loading experiments to test loading capacity, depending on the physico-chemical properties of the T1 nanoparticles, such as surface charge density (155 $\mu\text{mol/g}$) and surface area, showed that T1 nanoparticles (1 mg/ml) adsorbed onto their surface 2'OMePS M23D oligoribonucleotide in the concentration range of 10-

100 µg/ml. The hydrophobic nature of the 2'OMePS oligoribonucleotide is responsible for its strong lipophilic interaction with the surface quaternary ammonium groups and with the matrix of the nanoparticles (Fig. 1 b). M23D adsorption on T1 nanospheres was a highly reproducible process with a loading efficiency, representing the percentage of bound versus unbound oligonucleotides, ranging from 20 to 100%. In particular, the adsorption efficiency was high at low AON concentration and it slightly decreased at high AON concentration, leading to the assembling of AON/nanoparticles complexes with 18 µg/mg of loading value (data not shown).

Nanoparticles body-distribution

In order to monitor body distribution, 3 *mdx* mice (group 3 in Table I) were treated via intraperitoneal injections with fluorescent AON-free T1 nanoparticles and analysed 1 week and 6 weeks after last injection, obtaining similar results. Fluorescence analysis was performed on spleen, liver, heart, gastrocnemius, diaphragm and quadriceps. In diaphragm, nanoparticles were detected close to the mesothelium (Fig. 1c, A). Single particles were found intracellular in several myofibers of gastrocnemius and in the heart (Fig. 1c, B and C). The number of particles/mm² was higher in diaphragm when compared to gastrocnemius and quadriceps (about 10 and 2 particles/mm², respectively). Transmission electron microscope examination confirmed the presence of nanoparticles in all tissues examined (Fig 1 d). T1 nanoparticles appeared as electron-translucent round structures with an expected size of 500 nm. Nanoparticles were found both in the cytoplasm of circulating macrophages in lymphatic vessels and inside endothelial cells of blood vessels (Fig 1 d, B and C).

Immunohistochemical analysis of dystrophin

In all skeletal muscles from mice treated with the T1/M23D complexes, dystrophin expression was restored in a significant number of fibers. The immunolabelling pattern was characterised by clusters of dystrophin-expressing fibers (Fig 2). Restored dystrophin localized correctly at the sarcolemma, and the intensity of labelling was comparable to the WT muscle fibers (Fig. 3a). However, in some groups of fibers the labelling appeared heterogeneous. We found an average of

40, 40.27 and 45% of dystrophin-expressing fibers with a labelling covering 90-100% of the perimeter, in diaphragm, gastrocnemius and quadriceps, respectively; the percentage of myofibers with a labelling ranging from 50 to 90%, was 44,2%, in diaphragm, 55,3%, in gastrocnemius and, 45,5%, in quadriceps. Moreover, 10%, in diaphragm, 3%, in gastrocnemius and 4%, in quadriceps of myofibers showed a discontinuous pattern or a labelling that covered less than 50% of the perimeter. Immunohistochemical analysis of dystrophin in cardiac muscle of all T1/M23D treated *mdx* mice examined 1 week after last injection revealed the presence of groups of dystrophin-expressing cardiomyocytes in different areas of the heart (Fig 3b). Dystrophin was absent in the heart of T1/M23D treated mice sacrificed 6 weeks after last injection (data not shown) and in control *mdx* mice (Fig. 3b).

Quantitative analysis of dystrophin-positive fibers was performed in skeletal muscle of *mdx* mice treated with T1/M23D complexes, while cardiac muscle was not evaluated; the count of dystrophin-positive fibers in skeletal muscle excluded myofibers with a labelling that covered less than 50% of the perimeter or with a discontinuous pattern. The average of positive-muscle fibers varied between different skeletal muscles (Fig.4a). The number of dystrophin-positive fibers found in *mdx* mice treated with T1/M23D complexes was significantly increased when compared to *mdx* mice treated with the same dose of naked M23D or to control *mdx* mice, untreated or treated with T1-Fluo AON-free nanoparticles. *Mdx* mice examined 1 week after last injection showed the highest number of dystrophin-positive fibers in diaphragm and quadriceps and the lowest in gastrocnemius. In *mdx* mice examined 6 weeks after the last injection, the highest number of dystrophin-positive fibers was detected in gastrocnemius and the lowest in diaphragm and quadriceps.

Western blot

By western blot analysis the expression of dystrophin was clearly detected in gastrocnemius, quadriceps and diaphragm from all *mdx* mice groups treated with T1/M23D complexes, examined both 1 week and 6 weeks after last injection, but undetectable in the heart as well as in *mdx* mice treated with naked M23D or untreated (Fig. 4 b). Two different antibodies against dystrophin

produced similar results. The size of the protein was indistinguishable from the full-length dystrophin of the normal muscle, as expected for a protein translated by a single exon 23 skipped transcript. No other lower molecular weight products were seen.

Transcription studies

-Quantitative evaluation of T1/M23D treatment on general dystrophin transcriptional level

In order to quantify differences in the amount of dystrophin transcript both in skeletal and cardiac muscle from untreated, T1/M23D and naked M23D treated animals, we performed a quantitative analysis using exon specific RealTime assays (ESRAs). This demonstrated that untreated *mdx* mice showed a generally lower transcription level in respect to the amount of the transcript (considered as 100%) detected in the wild type mice, therefore used as control. In addition, the transcription level in *mdx* follows a muscle-specific pattern, being the higher level of messenger in diaphragm (34 % of the wild type) and heart (14 %), whereas lower levels were seen in gastrocnemius (10%) and quadriceps (6%) (Fig. 5 a). The *mdx* mice group 1 (Table I), treated with T1/M23D compound and sacrificed 1 week after last injection, showed a significant increase of dystrophin transcription levels in the heart (80% more transcript), gastrocnemius and quadriceps (70% and 50% more, respectively), although at different extent among treated mice (Fig. 5 a). No effect was observed in the diaphragm, where transcription level remained comparable in treated and untreated animals. The *mdx* mice group 2, treated with naked M23D, did not show significant difference in the dystrophin transcription level in comparison with untreated *mdx* mice (Fig. 5 a).

-Exon 23 skipped transcript quantification

The percentage of exon 23 skipped transcript, calibrated to exon 7 and taking as endogenous control mouse β -actin gene, appeared to be clearly assessable in the cardiac muscle (16%) as well as in the skeletal muscles (6%) of T1/M23D treated *mdx* mice analysed 1 week after last injection (Fig. 5 b). In addition, the correct exon 22-exon 24 junction was assessed by sequencing the nested PCR product (data not shown). Quantitative analyses were also performed on the treated *mdx* mice

sacrificed 6 weeks after last injection, however the transcription levels were comparable to those of untreated *mdx* mice, and the exon 23 skipped transcript was undetectable.

DISCUSSION

In this work we describe the first application of cationic core-shell nanoparticles as effective non-viral vehicles for the delivery of charged antisense oligoribonucleotides *in vivo*. We demonstrated that the T1 nanoparticles can efficiently bind 2'OMePS RNA-like oligonucleotides. We also demonstrated that T1 nanoparticles are widely distributed in various tissues/organs including heart and skeletal muscle. We also showed that intraperitoneal administration of the M23D AON adsorbed onto T1 nanoparticles induced the restoration of dystrophin protein expression in skeletal muscles and, although at lower levels, in the heart of *mdx* mice. The dystrophin rescue is associated with increased dystrophin transcript and expression of high molecular weight dystrophin protein, as shown by western blot analysis. The novel dystrophin correctly localised at the sarcolemma, as detected by immunohistochemical analysis. These results demonstrate the effectiveness of this approach both in terms of body-wide distribution and protein synthesis restoration.

Moreover, dystrophin rescue was obtained using a very low dose of AON, corresponding to 1/50th - 1/80th of the routine dosage described in the literature for systemic treatments of *mdx* mice [25, 26]. Dystrophin synthesis is clearly induced by the T1/M23D complexes since the injection of the same dose of naked M23D did not produce any effect. The combination of slow release and depot effects, together with the protection from degradation/sequestration, afforded by this delivery system could be responsible of the very low amount of AON required for producing a functional effect. The above suggestion is supported by the well-known hydrophobic nature of phosphorothioates [27], which is responsible for the strong lipophilic interactions of oligonucleotides with quaternary ammonium groups and matrix of the nanoparticles.

Since a moderate toxicity is documented for PS-AONs, even in view of chronic treatment, the possibility of obtaining sustainable effects by using a very low dose is certainly realistic.

The second interesting result is the dystrophin rescue obtained in the heart, as shown in treated *mdx* mice sacrificed 1 week after the last injection. Although we are aware that the amount of dystrophin rescue in the heart is low, we should consider that it has been obtained by 1/80th of the dose previously administered for systemic delivery of 2'OMePS [25]. It is also known that other AON molecules as PMO-AONs do not reach the heart spontaneously but only when conjugated with cell-penetrating peptides [26, 9, 10]. Therefore, despite of the low amount of rescue as well as the lack of its persistence after 6 weeks, the T1/M23D complex represents the first conjugate able to improve the 2OMePS oligomer uptake by systemic administration.

Although delivery of 2'OMePS was demonstrated to be improved by using synthetic cationic copolymers of poly(ethylene imine) (PEI) and poly(ethylene glycol) (PEG), this delivery was performed only locally since systemic administration of these copolymers may present toxic effects [28-30, 3].

We have also set up a novel quantitative analysis (ESRA) of dystrophin transcripts that provided the identification of a muscle-specific pattern of transcription in untreated *mdx* mice in comparison with wild type mice. We used both β -actin and adjacent dystrophin exons as reference transcribed regions. The ESRA analysis allowed us both to identify a wide increase of transcription levels after treatment in the different muscles, including heart, and to quantify the dystrophin exon 23 skipped transcript in the heart (16%) and in skeletal muscles (6%). The increased amount of dystrophin transcript in T1/M23D treated *mdx* mice could be due to an enhanced stability of skipped transcript and/or to the inhibition of non sense mediated decay. The difference between heart and skeletal muscle exon 23 skipped transcript amounts is remarkable. Furthermore, it is also evident that there is a discrepancy between transcript and protein rescue, being inversely proportional in heart versus skeletal muscle. Although explaining this peculiar but relevant finding requires further studies, there are data showing that both the transcription and translation behaviour varies between heart and

skeletal muscle. This may be due to cis/trans acting tissue specific factors able to destabilize or stabilize the transcripts or more generally to the different transcription and translation efficiency in both tissues [30, 31].

Histological analysis showed no apparent tissue damage in any of the organs examined, such as liver, kidney and spleen.

A possible disadvantage in using PMMA nanoparticles is related to their slow biodegradability, possibly causing adverse effects due to accumulation in chronic treatments. Furthermore, T1 nanoparticles might be not appropriate for intravenous usage, since the possibility to form small aggregates, expected by using more than 2.5 mg of nanoparticles [24]. For these reasons and in order to improve the potential for such a novel approach, we are currently testing different nanoparticles, varying in size, RNA binding affinity and bioerosion propensities.

In summary, our results show that intraperitoneal administration of a low dose of specific AON-nanoparticle complexes can effectively restore dystrophin synthesis in both skeletal and cardiac muscle. Nanoparticles are therefore eligible as candidate delivery systems for RNA molecules supporting further investigations in particular for DMD AONs-mediated therapeutics.

MATERIALS AND METHODS

AON synthesis

M23D(+07-18) (5'-GGCCAAACCUCGGCUUACCUGAAAU-3') AON against the boundary sequences of the exon and intron 23 of mouse dystrophin gene, contains 2'-*O*-methyl modified RNA and full-length phosphorothioate (PS) backbone [33]. Oligonucleotide synthesis was carried out on an ÄKTATM oligopilot plus 10 DNA/RNA synthesizer (GE Healthcare) using its trityl-on mode. The sequence was synthesized on a 2 µmol scale using Primer Support 200 loaded at 80 µmol/g (Amersham Biosciences). Commercial 2'-*O*-methyl phosphoroamidites (Proligo) were dissolved to a nominal concentration of 50 mM in anhydrous acetonitrile (CH₃CN) and activated with a 0.25 M solution of 5-(bis-3,5-trifluoromethylphenyl)-1*H*-tetrazole (Proligo) in CH₃CN. The

final detritylation was achieved using a 0.1 M aqueous solution of NaOAc (pH 3.0). Crude dimethyltryptamine (DMT) protected and detritylated oligonucleotide were purified by an ÄKTAbasic UPC liquid chromatography system using an Amersham Biosciences Resource RPC 3ml column eluted under a gradient of CH₃CN in 0.1 M TEAA (pH 8).

The final oligonucleotide was dissolved in water and filtered through a short column of Dowex 50WX8 (Na⁺ form, 100-200 mesh) to obtain after lyophilization 0.8 μmol (40%) of target compound. The purity of the full-length desired product was evaluated by MALDI-TOF MS, ³¹P-NMR and RP-HPLC analyses.

T1 nanoparticles loading experiments

For phosphorothioate modified RNA-like oligonucleotide (2OMePS-AON) adsorption experiments, 1.0 mg of freeze-dried nanospheres were suspended in 1.0 ml of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and sonicated for 15 minutes. The appropriate amount of a concentrated aqueous solution of 2OMePS-AON was then added to reach the final concentration (10÷100 μg/ml). The experiments were run in triplicate (SD ≤ 10%). The suspensions were continuously stirred at 25°C for 2 hours. After microfuge centrifugation at about 18000 rpm for 15 min, quantitative sedimentation of the AON-nanoparticle complexes was obtained and aliquots (10÷50 μl) of the supernatant were withdrawn, filtered on a Millex GV₄ filter unit and diluted with sodium phosphate buffer. Finally, UV absorbance at λ = 260 nm was measured. Adsorption efficiency (%) is calculated as 100 x (administered AON)-(unbound AON)/(administered AON).

Animals

All experiments were performed on male *mdx* mice (C57BL/10ScSn–Dmd*mdx*/J) or age-matched wild type male mice (C57BL/10SnJ). All procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee. Mice were housed in temperature controlled rooms (22°C) with a humidity of 50% and a 12:12 hr light-dark cycle. Mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

Intraperitoneal injections of T1-AON complexes, T1Fluo-AON free and naked AON

T1 nanoparticles toxicity tests were performed both in mice and in murine/human cells using up to 5 mg/injection (intraperitoneal, IP) in animals and 10 mg/ml in cells. No toxicity was observed both in *in vivo* and in *in vitro* systems (A.Caputo, personal communication).

mdx mice (8-10 weeks of age) were IP injected with 250 µl of T1/M23D complex, containing 45 µg of M23D AON and 2.5 mg of T1 nanoparticles (thought to represent a well tolerated dose both for multiple IP and for IV administration) dissolved in sterile unpreserved saline solution (0.9% sodium chloride), or 250 µl containing 45 µg of M23D dissolved in unpreserved saline solution, and monitored according to approved NIH and University guidelines. The complex suspension (250 µl) was slowly injected through the abdominal skin into the peritoneal cavity using an insulin syringe fitted with a 28-gauge needle. One group of *mdx* mice (n=6) (group1) received 3 identical injections of T1/M23D complex at days 0, 7 and 14. One group of *mdx* mice (n=2)(group2) received 3 identical injections of M23D naked AON at the same times. Controls were age-matched *mdx* mice injected at days 0, 7 and 14 with fluorescent T1 AON-free nanoparticles (n=3) (group 3) and untreated *mdx* mice (n=6) (group 4) as negative controls. The total amount of the administered M23D AON was 135 µg/animal. Table I summarises treatments and sacrifices of mice analysed in the present work.

Harvest of tissues

At 1 week after the third injection, 4 *mdx* mice of group 1, 2 *mdx* mice of group 2, 1 *mdx* mouse of group 3 and 2 *mdx* mice of group 4, were sacrificed and diaphragm, gastrocnemius, quadriceps and cardiac muscles were isolated, blotted dry, trimmed of external tendon, pinned to Parafilm-covered cork, snap frozen in liquid N₂-cooled isopentane, and stored at -80°C until further processing. Muscles from the 2 remaining *mdx* mice of group 1 together with the control *mdx* mice, 2 from group 3 and 3 from group 4, were harvested 6 weeks after the last injection (16–18 weeks of age). Liver, kidney and spleen were also harvested.

Fluorescent microscope analysis of nanoparticles distribution

Seven- μ m thick frozen sections of liver, spleen, heart, diaphragm, quadriceps and gastrocnemius skeletal muscles from *mdx* mice of group 3 (Table I) were labelled with a rabbit anti-nidogen antibody (Calbiochem), selected as marker of basal lamina, incubated with an anti-rabbit TRITC-conjugated secondary antibody (DAKO), washed several times with phosphate-buffered saline (PBS) and observed with a Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope. Serial sections, obtained from three different levels of each organ at 100 μ m intervals were observed at 100X and images recorded with a Nikon digital camera.

Transmission electron microscope study of nanoparticles distribution

Liver, spleen, kidney, diaphragm, gastrocnemius and quadriceps skeletal muscles and heart were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 3 h and with 1% osmium tetroxide in Veronal buffer for 2 hrs, dehydrated with ethanol and embedded in Epon E812.

Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and observed in a Philips EM 400 transmission electron microscope, operated at 100KV.

Immunohistochemical analysis of dystrophin

Seven- μ m thick frozen sections of heart, diaphragm, quadriceps and gastrocnemius skeletal muscle fragments from *mdx* treated with M23D AON T1-conjugated complex (group 1), M23D naked AON (group 2), T1Fluo AON-free (group 3) and untreated *mdx* mice (group 4), were labelled with a polyclonal anti-dystrophin antibody (Santa Cruz) diluted 1:100, incubated with an anti-rabbit TRITC-conjugated secondary antibody (DAKO), washed several times and observed with a Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope.

Evaluation and quantification of dystrophin-positive fibers

Dystrophin immunolabelled transverse sections from WT, treated and untreated *mdx* mice were analyzed with a Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope at 20x and images were taken with a fixed exposure time (0,5 seconds) using an high-resolution CCD camera (Nikon). Images were analysed by NIS-Element BR2.20 (Nikon) imaging program and the threshold intensity for each tissue was determined on sections of WT mice. Since in T1/MD23 treated *mdx* mice groups of

fibers showed a heterogeneous pattern, the percentage of the perimeter truly labelled by the antibody was determined for each fiber by using the AnalySIS program (Soft Imaging System, Muenster, Germany). The count of dystrophin-positive fibers excluded myofibers with a labelling that covered less than 50% of the perimeter or with a discontinuous pattern. The number of dystrophin-positive fibers was evaluated on three different levels, 300 μm apart from each other, in the diaphragm, gastrocnemius, quadriceps and on eight serial sections, at 100 μm intervals, of the heart. At least 3,000 muscle fibers from the diaphragm and gastrocnemius and 5,000 from the quadriceps muscles, respectively, obtained from three different levels of tissue blocks for each sample, were studied for statistical evaluation; data were analysed according to Mann-Whitney test, and the criterion for statistical significance was $p < 0.05$.

The counts were performed blind to sample identity and the relative patterns were confirmed by an independent observer in order to un-bias the observation.

SDS-PAGE electrophoresis and immunoblotting analysis

Twenty- μm thick frozen muscle sections were homogenized with a lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 1% amidosulfobetaine-14 (ASB-14) and 0.3 % DTE, and then centrifuged at 1500 g for 10 min. Protein concentration was determined in the supernatants with the Bradford method. Aliquots of proteins from normal *C57BL/10* mice (10 μg) and from muscles of treated or untreated *mdx* mice (300 μg) were loaded onto a 6% T SDS-polyacrylamide gel and separated by electrophoresis. Samples were transferred to a nitrocellulose membrane overnight at 75 V. The membrane was blocked with non-fat dried milk for 60 min at room temperature and incubated overnight at 4°C with the specific antibody DYS2 (a mouse monoclonal antibody to the carboxy terminal region of dystrophin, 1:100, NovoCastra, Newcastle, U.K.) or H-300 (a rabbit polyclonal antibody to the internal region of dystrophin, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). After intervening washes, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG diluted 1:40000 or 1:30000, respectively. After intervening washes, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated

goat anti-mouse IgG diluted 1:40,000. Immunocomplexes were visualized with the ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

RNA studies

Total RNA was purified from muscle biopsies of wild type (n=2), untreated (n=6) and treated *mdx* mice (n=8), by using RNeasy kit (Qiagen) and reverse transcribed into cDNA using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). Six novel exon-specific realtime assays (ESRA) detecting *mdx* exons 7, 8, 22, 23, 25 and 56, were specifically developed for this study. These exons were chosen because they do not undergo to spontaneous alternative splicing. ESRA on exons 7, 22, 23 and 25 were used to quantify the percentage of exon 23 skipping in treated mice. Dystrophin transcript quantification was performed by comparison with the beta-actin gene on each isolated muscle from both treated and control *mdx* mice. All these ESRA are based on TaqMan technology and have been designed by PrimerExpress Applied Biosystems software. Primers and probes sequences are available upon request. The amount of target sequences in respect to appropriate endogenous control (beta-actin gene) was evaluated by the comparative CT method with respect to the endogenous beta-actin control ($\Delta\Delta C_t$ Method) (Applied Biosystems User Bulletin #2). Nested RT-PCR was performed as described [25], skipped transcript was analysed by sequencing (ABI PRISM 3130 Automated Sequencer).

ACKNOWLEDGMENTS

The Telethon Italy grants GGP05115 and GUP07011 (both to A.F.) are acknowledged: Thanks are also due to the Industria Chimica Emiliana (ICE Reggio Emilia) Grant (to AF), to FAR2007 (University of Ferrara, to A.F.), to TREAT-NMD Network of Excellence of EU FP7 n. 036825 (to LM and Telethon-Italy). We are also grateful to the ISS National AIDS Programme grants to A.C., L.T. and M.L. supporting the nanoparticle technology platform. We wish to thank Dr. Judith van Deutekom (Prosensa-LUMC University, Leiden, NL) for the helpful suggestions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Aartsma-Rus, A, Van Deutekom, JC, Fokkema, IF, Van Ommen, GJ, Den Dunnen, JT (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* **34**: 135-144. Review.
2. Aartsma-Rus, A, Janson, AA, Kaman, WE, Bremmer-Bout, M, van Ommen, GJ, den Dunnen, JT, and van Deutekom, JC (2004). Antisense-induced multiexon skipping for duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* **74**: 83–92.
3. Bremmer-Bout, M, Aartsma-Rus, A, de Meijer, EJ, Kaman, WE, Janson, AA, Vossen, RH, *et al.* (2004). Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: A model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol Ther* **10**: 232-240.
4. McClorey, G, Moulton, HM, Iversen, PL, Fletcher, S and Wilton, SD (2006). Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther* **13**: 1373-1381.
5. Aartsma-Rus, A, van Ommen, GJ (2007). Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* **13**: 1609-1624. Review.
6. van Deutekom, JC, Janson, AA, Ginjaar, IB, Frankhuizen, WS, Aartsma-Rus, A, Bremmer-Bout, M, *et al.* (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* **357**: 2677-2686.
7. 't Hoen, PA, van der Wees, CG, Aartsma-Rus, A, Turk, R, Goyenvalle, A, Danos, O, *et al.* (2006). Gene expression profiling to monitor therapeutic and adverse effects of antisense therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacogenomics*, **7**, 281-297.
8. Hoffman, EP (2007). Skipping toward personalized molecular medicine. *N Engl J Med* **357**: 2719-2722.

9. Jearawiriyapaisarn, N, Moulton, HM, Buckley, B, Roberts, J, Sazani, P, Fucharoen, S, *et al.* (2008). Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of *mdx* Mice. *Mol Ther* **16**: 1624-1629.
10. Yin, H, Moulton, HM, Seow, Y, Boyd, C, Boutilier, J, Iverson, P, Wood, MJ (2008). Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. *Hum Mol Genet* Sep 10. [Epub ahead of print].
11. Williams, JH, Schray, RC, Sirsi, SR, Lutz, GJ (2008). Nanopolymers improve delivery of exon skipping oligonucleotides and concomitant dystrophin expression in skeletal muscle of *mdx* mice. *BMC Biotechnol.* **2**: 8:35.
12. Denti, MA, Rosa, A, D'Antona, G, Sthandier, O, De Angelis, FG, Nicoletti, C, *et al.* (2006). Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the *mdx* mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 3758-3763.
13. Wang, Z, Allen, JM, Riddell, SR, Gregorevic, P, Storb, R, Tapscott, SJ, *et al.* (2007). Immunity to adeno-associated virus-mediated gene transfer in a random-bred canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **18**: 18-26.
14. Manno, CS, Pierce, GF, Arruda, VR, Glader, B, Ragni, M, Rasko, JJ, *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**: 342-347.
15. Li, SD, Huang, L (2006). Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther* **13**: 1313-1319.
16. Tamber, H, Johansen, P, Merkle, HP, and Gander, B (2005). Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**: 357-376.
17. Little, R and Kohane, DS (2008). Polymers for intracellular delivery of nucleic acids. *J Mater Chem* **18**: 832-841.

18. O'Hagan, D, Singh, M, Ugozzoli, M, Wild, C, Barnett, S, Chen, MC, *et al.* (2001). Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines. *J Virol* **75**: 9037-9043.
19. Oster, CG, Kim, N, Grode, L, Barbu-Tudoran, L, Schaper, AK, Kaufmann, SHE, Kissel, T (2005). Cationic microparticles consisting of poly(lactide-co-glycolide) and polyethylenimine as carriers systems for parental DNA vaccination. *J Control Rel* **104**: 359-377.
20. Kreuter, J (1983). Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting, and use. *Pharm Acta Helv* **58**: 196-209.
21. Kreuter, J, Speiser, PP (1976). New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infect Immun* **13**: 204-210.
22. Stieneker, F, Kreuter, J, Löwer, J (1991). High antibody titres in mice with polymethylmethacrylate nanoparticles as adjuvant for HIV vaccines. *AIDS* **5**: 431-435.
23. Caputo, A, Brocca-Cofano, E, Castaldello, A, De Michele, R, Altavilla, G, Marchisio, M, *et al.* (2004). Novel biocompatible anionic polymeric microspheres for the delivery of the HIV-1 Tat protein for vaccine application. *Vaccine* **22**: 2910-2924.
24. Castaldello, A, Brocca-Cofano, E, Voltan, R, Triulzi, C, Altavilla, G, Laus, M, *et al.* (2006). DNA prime and protein boost immunization with innovative polymeric cationic core-shell nanoparticles elicits broad immune responses and strongly enhance cellular responses of HIV-1 tat DNA vaccination. *Vaccine* **24**: 5655-5669.
25. Lu, QL, Rabinowitz, A, Chen, YC, Yokota, T, Yin, H, Alter, J, *et al.* (2005). Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 198-203.
26. Alter, J, Lou, F, Rabinowitz, A, Yin, H, Rosenfeld, J, Wilton, SD, *et al.* (2006). Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* **12**: 175-177.

27. Metelev, V, Agrawal, S (1992). Ion-exchange high-performance liquid chromatography analysis of oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates. *Anal Biochem* **200**: 342-346.
28. Sirsi, SR, Schray, RC, Guan, X, Lykens, NM, Williams, JH, Erney, ML, Lutz, GJ (2008). Functionalized PEG-PEI copolymers complexed to exon-skipping oligonucleotides improve dystrophin expression in *mdx* mice. *Hum Gene Ther* **19**: 795-806.
29. Nguyen, HK, Lemieux, P, Vinogradov, SV, Gebhart, CL, Guerin, N, Paradis, G, *et al.* (2000). Evaluation of polyetherpolyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents. *Gene Ther* **7**: 126–138.
30. Grosse, S, Aron, Y, Honoré, I, Thévenot, G, Danel, C, Roche, AC, *et al.* (2004) Lactosylated polyethylenimine for gene transfer into airway epithelial cells: role of the sugar moiety in cell delivery and intracellular trafficking of the complexes. *J Gene Med* **6**: 345–356.
31. Misquitta, CM, Iyer, VR, Werstiuk, ES, Grover, AK (2001). The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Mol Cell Biochem* **224**: 53-67.
32. Park, SK, Prolla, TA (2005). Gene expression profiling studies of aging in cardiac and skeletal muscles. *Cardiovasc Res* **66**: 205-12. Review.
33. Gebiski, BL, Mann, CJ, Fletcher, S, Wilton, SD (2003). Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in *mdx* mouse muscle. *Hum Mol Genet* **12**: 1801-1811.

Table I

Group (n° of animals)	Formulations Dose/Injections	I° Injection (day)	II° Injection (day)	III° Injection (day)	I° Sacrifice (day)	II° Sacrifice (day)
1 (n=6)	T1-M23D 2.5 mg/45 µg	0	7	14	21 (n=4)	60 (n=2)
2 (n=2)	M23D 45 µg	0	7	14	21 (n=2)	
3 (n=3)	T1 2.5 mg	0	7	14	21 (n=1)	60 (n=2)
4 (n=6)	NT	NT	NT	NT	21 (n=3)	60 (n=3)

NT. not treated

FIGURE LEGENDS

Figure 1 T1 nanoparticles characteristics and biodistribution

1 a: T1 nanoparticle scanning electron microscope (SEM) image showing the nanoparticles size (diameter 417 nm).

1 b: Schematic representation of the lipophilic interaction between oligoribonucleotide molecules (AON) and the surface quaternary ammonium groups onto nanoparticles.

1-Panel c: Biodistribution of T1-Fluo nanoparticles by fluorescence microscope analysis in group 3 *mdx* mice. **A:** diaphragm; **B:** skeletal muscle (gastrocnemius); **C:** heart. Tissue sections were labeled with anti-nidogen antibody (red staining). Isolated nanoparticles are detected inside the cytoplasm or close to the basement membrane of the muscle fibers (arrows). Bar, 20 μ m.

1-Panel d: Biodistribution of T1 nanoparticles by electron microscope analysis. The diaphragm shows the presence of several nanoparticles between two mesothelial cells of the peritoneal side (**A**) and inside the cytoplasm of endothelial cells of blood (**B**) and lymphatic vessels (**C**) (arrows).

Figure 2 Immunohistochemical findings in *mdx* skeletal muscles

Dystrophin immunolabelling in muscle fibers. Representative fields of cross sections from C57BL6 wild type, untreated *mdx*, naked M23D treated *mdx* and T1/M23D complexes treated *mdx* mice, diaphragm, gastrocnemius and quadriceps skeletal muscle labelled with a polyclonal anti-dystrophin antibody, demonstrating absence of dystrophin in *mdx* mice untreated and treated with M23D naked AON and restoration of immunolabelling in several groups of muscle fibers after treatment with T1/M23D complexes analysed one and 6 weeks after the last injection. The total injected amount of AON per animal, both naked or nanoparticles-combined, was 135 μ g. Bar, 40 μ m.

Figure 3 Immunohistochemical findings in *mdx* skeletal muscles and heart

3 a: Dystrophin appears correctly expressed at the membrane of muscle fibers of T1/M23D treated *mdx* mice both one and 6 weeks after last treatment. The intensity of labelling in rescued dystrophin-positive muscle fibers is reminiscent of normal muscle. No dystrophin labelling is detected at the sarcolemma of untreated *mdx* myofibers. Bar, 20 μ m.

3 b: Immunohistochemical analysis of dystrophin in heart from C57BL6, untreated *mdx* and T1/M23D treated *mdx* mice. Restoration of dystrophin immunolabelling is detected in focal areas of cardiac muscle of mice treated with T1/M23D complexes, 1 week after last injection. When compared with normal cardiac muscle, the dystrophin immunolabelling appears discontinuous at the membrane of treated cardiomyocytes. Bar, 50 μ m.

Figure 4 Positive fibers counting and western blotting

4 a: The statistical analysis shows a significant increase of dystrophin-positive fibers in diaphragm, quadriceps and gastrocnemius of *mdx* mice treated with T1/M23D complexes (group 1) if compared to *mdx* mice treated with M23D naked AON (group 2) or with T1 nanoparticles (group 3; see Table I). The average of dystrophin-positive myofibers varies among different skeletal muscles and the mice examined one and 6 weeks after the last injection. Data represent mean \pm SD. §, $P < 0.05$. *, $P > 0.05$.

4 b: Dystrophin immunoblot using DYS2 antibody shows restored expression of the protein in diaphragm, gastrocnemius and quadriceps muscle from T1/M23D complexes treated *mdx* (lanes 3 and 4: one week after last injection, lane 5: six weeks after last injection, group 1 in Table I), while no protein is detected in *mdx* untreated control (lane 2). Dystrophin protein is undetectable in heart from both untreated and treated *mdx* mice. Diaphragm, gastrocnemius, quadriceps and heart from normal mice are used as positive controls, 1/30th of protein loaded in the other lanes (lane 1).

Figure 5 Transcript and exon skipping quantification

5 a: Quantification of dystrophin transcript in skeletal and cardiac muscles from *mdx* treated and untreated animals in respect to wild type mice (considered as 100%). Dystrophin transcript expression was evaluated by relative-quantitative Real Time PCR using β -actin as endogenous control. Histograms represent dystrophin transcript level calculated by the mean of exons 7, 22 and 25, $2^{-\Delta\Delta CT}$ values (expressed as percentage) in different skeletal muscles (diaphragm, quadriceps and gastrocnemius) and heart. A total of 26 experiments has been performed (column represents the mean values). The analysis was performed on *mdx* mice from 3 different groups sacrificed one week after the last injection: group 1 (n=4; grey column), group 2 (n=2; white column), and group 4 (n=6; black column).

5 b: Percentage of exon 23 skipping determined by Real Time PCR in cardiac and skeletal muscles from *mdx* treated animals in comparison with untreated mice. The analysis was performed on group 1 mice (n=4) in respect to group 4 mice (n=3), all sacrificed one week after the last injection. The percentage of exon 23 skipped transcript ($2^{-\Delta\Delta CT}$ values) calibrated on exon 7, was evaluated in 3 different experiments and appeared to be clearly assessable in the cardiac muscle (16%; grey column) as well as in the skeletal muscles, represented by gastrocnemius and quadriceps (6%; white column).

Figure 1

[Click here to download Figure: Fig. 1.eps](#)

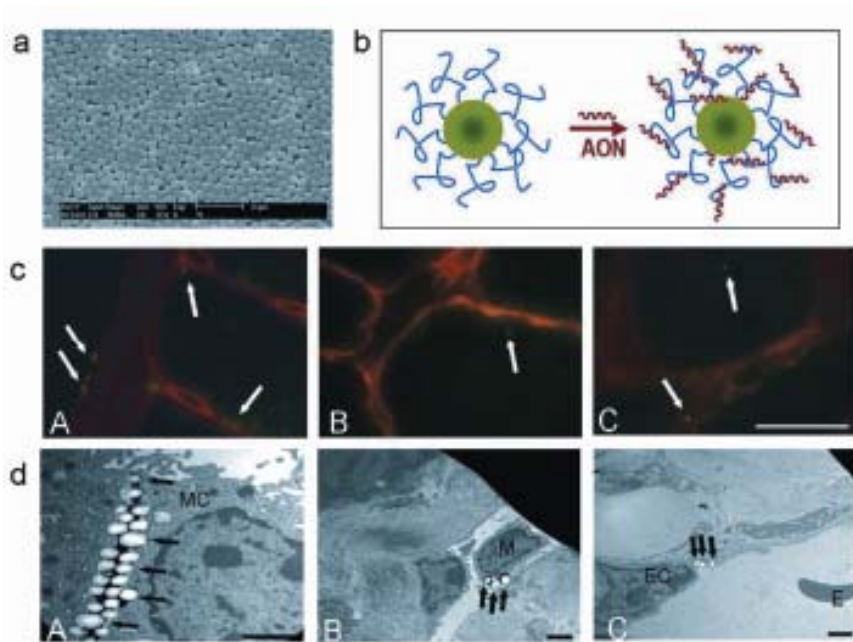


Figure 2

[Click here to download Figure: Fig. 2.eps](#)



Figure 3

[Click here to download Figure: Fig. 3.eps](#)

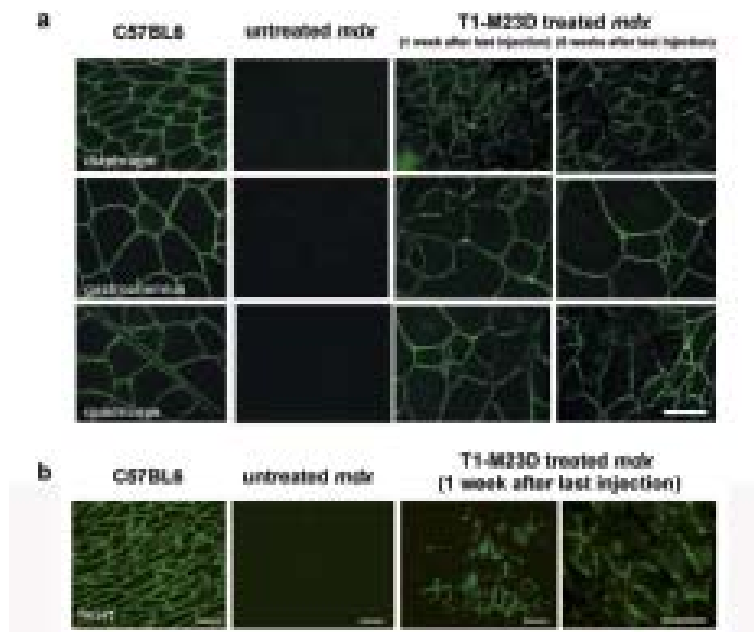


Figure 4

[Click here to download Figure: Fig. 4.eps](#)

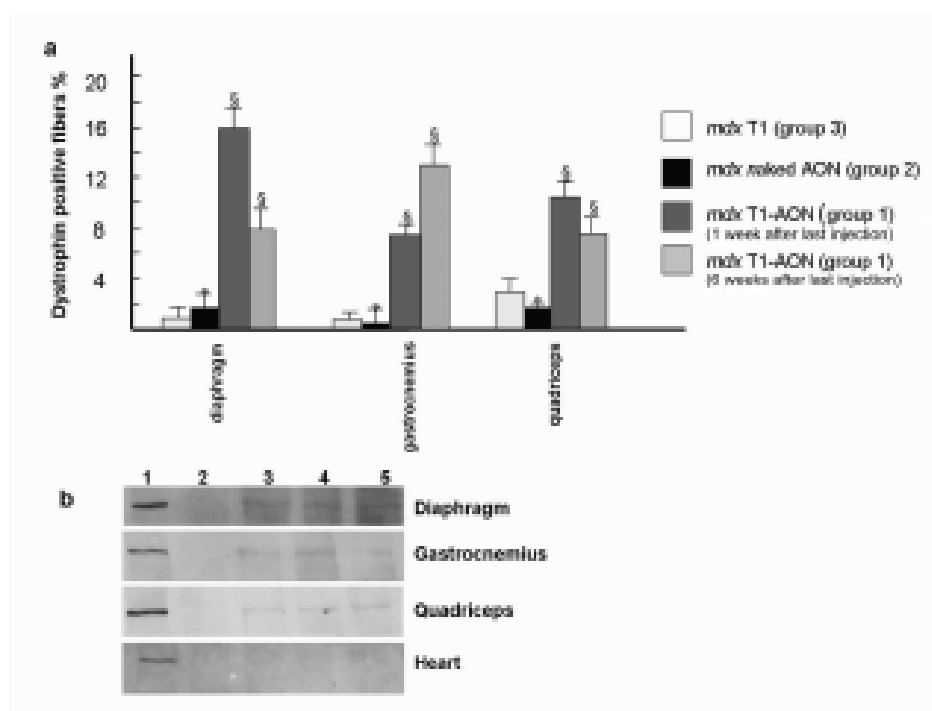
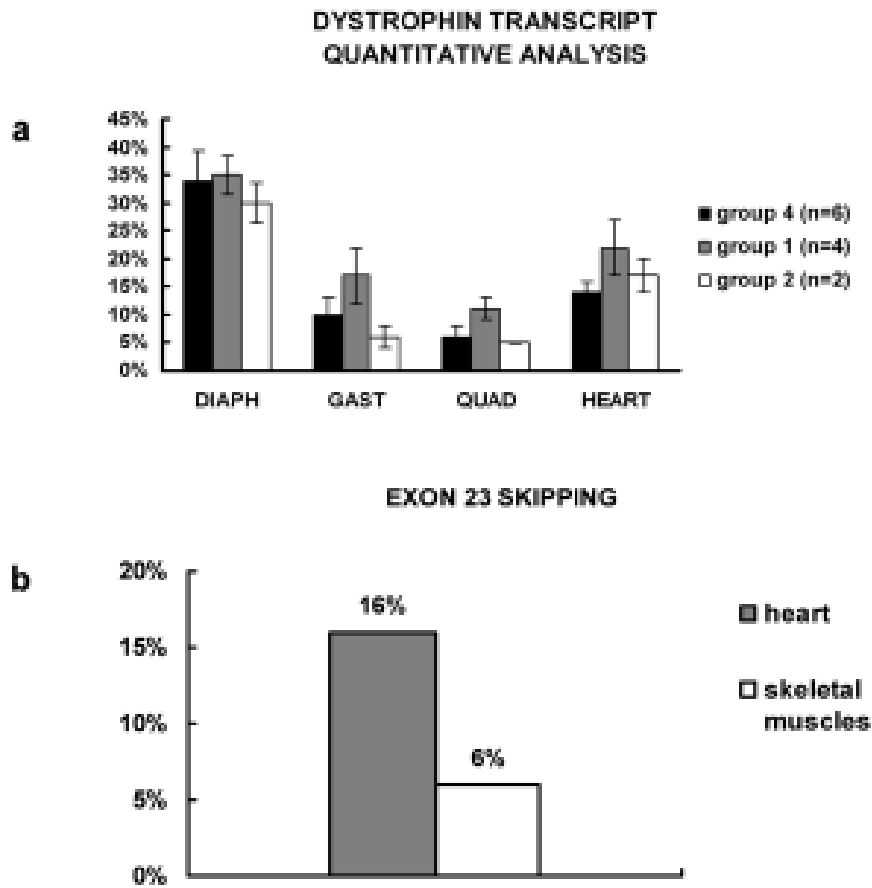


Figure 5

[Click here to download Figure: Fig. 5.eps](#)



SUPPLEMENTARY MATERIAL

MATERIAL AND METHODS

*Nanoparticles synthesis**Materials*

2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA), 1-bromooctane, poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate ($M_n=2080$) (PEGMA), 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AIBA), fluorescein and allyl chloride were purchased from Aldrich. Potassium persulfate (KPS) was purchased from Carlo Erba. All these products were used without further purification. Methyl methacrylate (MMA) was purchased from Aldrich and distilled under vacuum just before use.

Synthesis of ionic comonomer

The ionic comonomer 2-(dimethyloctyl)ammonium ethyl methacrylate was obtained by direct reaction of DMAEMA with 1-bromooctane. DMAEMA (0.166 mol) was mixed with 1-bromooctane (0.083 mol) without any additional solvent. After the addition of a small portion of hydroquinone to inhibit eventual radical polymerization reactions, the mixture was stirred at 50°C for 24 hours. The solid product so obtained was washed with dry diethyl ether to remove the excess DMAEMA. Finally, it was dried under vacuum at room temperature. The purity of the product was tested by ^1H NMR spectra. Reaction yields were in the 55-65% range.

Synthesis of fluorescent comonomer

2.0 g of fluorescein (6.0 mmol), 2.0 g of calcium carbonate and hydroquinone (trace) were dissolved in 100 ml of dimethylformamide (DMF), and the solution was heated at 60°C. Allyl chloride was added slowly dropwise and the reaction was allowed to proceed for 30 h in the dark. After vacuum evaporation of the solvent the product was purified by flash column chromatography (silica gel; diethyl ether-ethyl acetate 80:20 as eluent). Yield 53%, (m.p.=123-125°C); MS, m/z (%): 412 (M^+ , 100), 371 (10), 287 (20), 259 (15), 202 (7); ^1H -NMR (CD_3OD): δ 4.44 (dd, $J=5.9$ and 1 Hz, 2 H, O- CH_2 -CH=), 4.75 (dd, $J=5.9$ and 1 Hz, 2 H, O- CH_2 -CH=), 5.08 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}$),

5.40 (m, 2H, CH₂=CH), 5.58 (m, 1H, CH₂=CH), 6.10 (m, 1H, CH₂=CH), 6.60 (m, 2H, Ar), 6.98 (m, 3H, Ar), 7.25 (d, J=1 Hz, 1H, Ar), 7.45 (dd, J=7.5 and 1 Hz, 1H, Ar), 7.85 (m, 2H, Ar), 8.30 (dd, J=7.5 and 1Hz, 1H, Ar).

T1 nanoparticles preparation

Nanoparticle sample T1 (Patent No. PCT/EP2004/012420) was obtained as following described: 500 ml of deionized water containing 5.6 g (16 mmol) of the ionic comonomer were introduced in a 1 litre five-neck reactor equipped with a condenser, a mechanical stirrer, a thermometer and inlets for nitrogen at room temperature with a stirring rate of 300 rpm. The mixture was purged with nitrogen and nitrogen was fluxed during the entire polymerization procedure. The mixture was then heated to 80°C and methylmethacrylate (56.2 g, 0.562 mol) was added. After additional 15 minutes equilibration time, 75.7 mg (0.28 mmol) of KPS dissolved in 3 ml of deionized water were added and the mixture was reacted for 4 hours. At the end of the reaction, the product was purified by dialysis to remove the residual monomers. Fluorescent sample T1fluo was obtained in the same way by dissolving in the methylmethacrylate 10 mg (24.3 μmol) of the fluorescent comonomer (Patent No. PCT/EP2004/012420).

The nanoparticle size was measured by a JEOL JSM-35CF SEM with an accelerating voltage of 20 kV. The samples were sputter coated under vacuum with a thin layer (10-30 Å) of gold. The SEM photographs were digitalized, and elaborated by the NIH Image (version 1.55, public domain) image processing program. From 150 to 200 individual nanoparticle diameters were measured for each optical micrograph. The quaternary ammonium group amount per gram of nanoparticle was determined by potentiometric titration of the bromine ions obtained after complete ionic exchange. The ionic exchange was accomplished by dispersing in a beaker 0.5 g of the nanoparticle sample in 25 ml of 1M KNO₃ at room temperature for 48 hours. In these conditions, a quantitative ionic exchange was achieved. The mixture was then adjusted to pH = 2 with dilute H₂SO₄ and the bromide ions in solution were titrated with a 0.01 M solution of AgNO₃.

Hystological analysis

In order to define tissue morphology, one- μ m thick semithin sections were obtained from several blocks of liver kidney and spleen, stained with basic toluidine blue and observed at 100x with a Nikon Eclipse 80i microscope. Images were recorded with a Nikon digital camera.

RESULTS

Hystological analysis

Histological analysis showed no apparent tissue damage, absence of morphology alterations, no modifications of the cell architecture, and absence of inflammatory infiltrates in any of the organs examined, such as liver, kidney and spleen (see Supplementary Figure 1)

FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: Morphological analysis of liver, kidney and spleen from mdx mice treated with T1/M23D complex, analysed 1 week after last injection. Semithin sections stained with toluidine blue do not reveal any chronic inflammatory reaction in all tissues studied. Original magnification, 100x

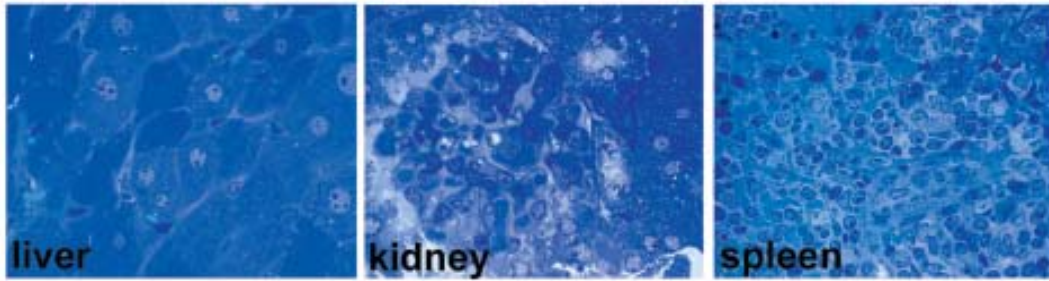
Supplementary Figure 2: Nested RT- PCR analysis of dystrophin mRNA in muscle tissues of wild type, untreated and T1/M23D treated mdx mice.

Primary PCR was performed by using 20F-26R primers spanning exons 20–26 of the mouse dystrophin gene, while nested amplification was carried out across exon 20-25 with a forward primer mapping downstream in respect to 20F (expected product: full-length 874bp, skipped 661bp). The muscles analysed were diaphragm, quadriceps, gastrocnemius and heart in wild type (lanes 1,4,7,10), untreated mdx (lanes 2,5,8,11) and T1/M23D treated mdx mice (lanes 3,6,9,12). Full-length dystrophin transcript was detected in all cDNA samples, and a shorter transcript originated from AON-induced exon 23 skipping was observed in quadriceps (lane 6),

gastrocnemius (lane 9) and heart (lane 12) of T1/M23D treated mdx mice, analysed 1 week after last injection. Arrows indicate the fragment size of the DNA Molecular Weight Marker IX (Roche).

Supplemental Figure 1

[Click here to download Supplemental Figure: Supplementary Fig. 1.eps](#)



Supplemental Figure 2

[Click here to download Supplemental Figure: Supplementary Fig. 2.eps](#)



Ringraziamenti

Un profondo e sentito ringraziamento,

- alla Prof. Simonetta Benetti, che mi ha offerto la possibilità di vivere questa meravigliosa esperienza di lavoro;
- al Prof. Alessandro Medici, che mi ha dato fiducia e mi ha accolta nel suo gruppo di ricerca;
- alla Prof. Daniela Perrone, amica e prima maestra, persona unica nel suo genere che ha dato vita a questo progetto di ricerca, investendo la sua inesauribile energia e forza di volontà, dando prova delle sue capacità intellettuali;
- ai carissimi professori Giancarlo Fantin e Marco Fogagnolo amici e per me secondi padri, i cui consigli ed insegnamenti riempiono ed animano le giornate di lavoro: "grazie Profs siete veramente eccezionali";
- ai Dottori Enzo e Maurizio Bartoli dell'azienda Industria Chimica Emiliana (ICE) di Reggio Emilia, nostra principale fonte di finanziamenti;
- al Dr. Massimo Capobianco del CNR di Bologna, per i consigli e la collaborazione;
- alla Prof. Alessandra Ferlini e a tutti gli amici e colleghi del Dip. di Genetica Medica di Ferrara;
- al Prof. Pedro Merino, al Dr. Jesus Orduña dell'Università di Saragoza (Spagna) e al Prof. Piero Traldi e collaboratori del CNR di Padova, per le analisi di spettrometria di massa.
- a Paolo Formaglio per la simpatia e la disponibilità con le analisi spettroscopiche;
- a Marco Carmosino e Marcello Fratta, persone che stimo per la serietà, la puntualità e la disponibilità;
- a tutti i Dottori ed amici del Dip.di Chimica: Francesco Ferroni, Nikla Baricordi, Martino Ambrosini, "Franceschino", Alessandra Vecchi, Andrea Nuzzi, Michele Fiore, Lisa Moni, Mauro Lo Conte, Mohammed Aldhoun, Eva Busatto, Luca Samiolo, Letizia Bregola, Martina Donatoni, Pier Paolo Giovannini, Silvia Maietti, Matteo Mantovani, Alessandro Grandini, Tatiana, Elena, Delia, per la simpatia, le risate ed i piacevoli momenti di allegria;
- a Mamma, Papà, Roberto e Luca, la mia meravigliosa famiglia, le mie stelle comete.

Grazie a tutti, grazie di cuore!