

## Poster P.04.29

### CELL PENETRATING PEPTIDE-CONJUGATED MORPHOLINO FOR TREATMENT OF SMA SYMPTOMATIC CASES

Pagliari E.<sup>[1]</sup>, Rizzuti M.<sup>[2]</sup>, Bersani M.<sup>[1]</sup>, Ramirez A.<sup>[1]</sup>, Bordoni A.<sup>[2]</sup>, Taiana M.<sup>[1]</sup>, Bresolin N.<sup>[1]</sup>, Comi G.P.<sup>[1]</sup>, Corti S.<sup>[1]</sup>, Nizzardo M.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Dino Ferrari Centre, Neuroscience Section, Department of Pathophysiology and Transplantation (DEPT), University of Milan, Neurology Unit, IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico ~ Milan ~ Italy

Background: Nusinersen, like other treatments tested for SMA, has a very narrow therapeutic window (Chiriboga, 2017, Corey, 2017); results are strikingly efficient only in the pre- or early symptomatic phases, likely because ASOs have difficulty crossing the blood-brain barrier (BBB), and cellular uptake is inefficient. The conjugation of ASO with cell-penetrating peptides (CPPs) can be a strategy to address this issue; indeed, it has already been proved to enhance ASO cellular and tissue uptake and pharmacological profiles (Amantana et al., 2007). In our previous study we demonstrated, in presymptomatic affected mice, the therapeutic efficacy of a Morpholino (MO) sequence, an ASO variant (Nizzardo et al., 2014). Here, we tested the therapeutic efficacy of four different CPPs conjugated to our validated MO sequence in presymptomatic and symptomatic SMA mice.

Results: We linked four different CPPs (Tat, R6, r6 and (RXRRBR)2XB) to our already validated MO sequence (Nizzardo et al., 2014). Our first aim was to identify the best peptides able to deliver the MO to the central nervous system (CNS) through a local or systemic injection performed both in presymptomatic and symptomatic mice in comparison to unconjugated-MO. The therapeutic potential of conjugates was determined by the ability to rescue the SMN protein levels. Data from western blot analysis on brain and spinal cord samples showed that all the CPP-MO conjugates increase SMN protein levels more efficiently than unconjugated MO in all conditions. Interestingly, systemic injection is the most successful treatment underlying the ability of the conjugates to cross the BBB, allowing MO non-invasive systemic delivery. The most promising candidates seemed to be r6-MO and RXR-MO, which were selected for further investigations to assess the therapeutic efficacy in a larger cohort of SMA mice. The two conjugates were administered in symptomatic SMA $\Delta$ 7 mice intraperitoneally at postnatal day 5. Spinal cord and intercostal muscles of SMA treated mice showed a significant increase in the number of motor neurons and in the innervated neuromuscular junctions. These data were supported by a striking increase in survival and motor functions. All the results confirmed the superiority of the conjugates, in particular r6-MO, on unconjugated MO.

Conclusion: The conjugation of MO with CPP is able to improve MO biodistribution and increase SMN protein levels representing a viable tool for SMA therapy. In particular, we identified two CPPs, r6 and RXR, that could efficaciously deliver MO into the CNS after an intraperitoneal, symptomatic injection in affected mice. CPP-MOs had significant, beneficial effects on the symptomatic pathological phenotype never observed with other compounds. Overall, this strategy offers the chance to treat the disease in a symptomatic phase, expanding the therapeutic window and can be further optimized and developed for SMA clinical trials.

Titolo in italiano: Morfolino coniugato a peptide per il trattamento dei casi sintomatici affetti da SMA  
Abstract per il pubblico laico (italiano)

La terapia mediante oligonucleotidi antisenso (ASO), oltre alla terapia genica, è l'unico trattamento, approvato per l'atrofia muscolare spinale (SMA). La SMA è causata da mutazioni nel gene SMN,

associate ad un deficit dell'omonima proteina. Nel nostro laboratorio abbiamo già dimostrato che il Morfolino (MO), una variante di ASO, è in grado di aumentare la produzione di SMN e di migliorare il fenotipo patologico del modello murino di SMA. Tuttavia, l'efficacia terapeutica è fortemente limitata dall'inadeguata biodistribuzione e dalla scarsa efficacia nei casi sintomatici. Ad oggi, il recupero completo del fenotipo patologico in vivo è stato ottenuto solo in fase presintomatica, che raramente corrisponde al momento in cui viene fatta la diagnosi nei pazienti. Una possibile strategia consiste nel coniugare il MO con peptidi in grado veicolarlo nel sistema nervoso centrale (SNC), oltrepassando la barriera emato-encefalica (BEE) e migliorandone la biodistribuzione. Inoltre, questo approccio offre la possibilità di trattare la malattia in fase sintomatica, quando la BEE ha ormai raggiunto la maturazione completa, ampliando la finestra terapeutica. **RISULTATI:** Abbiamo studiato l'efficacia di 4 diversi peptidi nel veicolare il MO nel SNC. Abbiamo coniugato i peptidi al MO e li abbiamo somministrati per via sistemica, valutando il loro potenziale terapeutico in termini di capacità di incrementare i livelli di SMN. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'efficacia di tutti i peptidi ed in particolare la superiorità di due coniugati, che sono stati testati in topi SMA sintomatici. I dati funzionali e di sopravvivenza hanno confermato l'efficacia del trattamento. **PROSPETTIVE:** I nostri dati hanno rivelato che il MO coniugato a dei peptidi è in grado di raggiungere il SNC dopo somministrazione sistemica e di curare il fenotipo patologico. Questa strategia offre la possibilità di trattare la SMA in fase sintomatica e potrebbe essere ulteriormente ottimizzata per future sperimentazioni cliniche.

-Amantana A, Moulton HM, Cate ML, Reddy MT, Whitehead T, Hassinger JN, Youngblood DS, Iversen PL. Pharmacokinetics, biodistribution, stability and toxicity of a cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugate. *Bioconjug Chem.* 2007 Jul-Aug;18(4):1325-31.

-Chiriboga CA. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2017. 17(10): 955-962.

-Corey DR. Nusinersen, an antisense oligonucleotide drug for spinal muscular atrophy. *Nature Neuroscience.* 2017; 20: 497-499.

-Nizzardo M, et al. Effect of combined systemic and local morpholino treatment on the spinal muscular atrophy  $\Delta 7$  mouse model phenotype. *Clinical Therapeutics.* 2014 Mar 1;36(3):340-56.e5.

Atrofia Muscolare Spinale

Coordinator: Monica Nizzardo

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14025

**Disease Name:**

Spinal Muscular Atrophy

**Keywords:**

Spinal Muscular Atrophy, Morpholino antisense oligonucleotides, peptides