



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **Refinement of antisense oligonucleotide mediated exon skipping as therapy for Duchenne muscular dystrophy**

Heemskerk, J.A.

### **Citation**

Heemskerk, J. A. (2011, October 26). *Refinement of antisense oligonucleotide mediated exon skipping as therapy for Duchenne muscular dystrophy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17986>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17986>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Nederlandse samenvatting

Duchenne spierdystrofie is een ernstige spierziekte veroorzaakt door mutaties in het *DMD* gen, die het leesraam verschuiven. Door deze verschuiving ontstaat er een vroegtijdig stop codon en is het dystrofine eiwit dat uiteindelijk wordt geproduceerd niet functioneel. Normaliter stabiliseert dystrofine de spiervezels, door de actine in de spiervezel te verbinden met het celmembraan en de extracellulaire matrix. De uiteinden van het eiwit zorgen voor de binding en het middenstuk functioneert als een soort elastische schokdemper. Het is gebleken dat de uiteinden essentieel zijn voor het functioneren van het eiwit, maar dat van het tussenstuk delen gemist kunnen worden. Mensen met Becker spierdystrofie missen delen van het middenstuk en over het algemeen hebben zij minder symptomen. Echter bij de ziekte van Duchenne mist het laatste uiteinde van het eiwit en is er geen stabiliserende verbinding, hierdoor beschadigen de spiercellen als ze samentrekken. Bij bovengemiddeld gebruik van gezonde spieren treed ook schade op, echter omdat deze schade eenmalig is kunnen de reparatiemechanismen van de spier dit relatief efficiënt herstellen. Bij Duchenne patiënten is de spierschade chronisch en lukt het op den duur niet meer en sterven de spiercellen over de tijd af, waarna ze worden vervangen door fibrose en vetweefsel. Als gevolg hiervan treedt rond het vierde levensjaar de eerste spierzwakte op, een paar jaar later krijgen de patiënten moeite met lopen en in de vroege tienerjaren hebben de meeste patiënten een rolstoel nodig. Ernstige problemen met de ademhaling treden op rond het twintigste levensjaar en maken kunstmatige beademing noodzakelijk. Uiteindelijk overlijden de meeste patiënten met de huidige behandelingen in de derde of vierde decade van hun leven.

De mogelijkheden voor behandeling zijn op dit moment beperkt. De eerder genoemde kunstmatige beademing heeft voor een drastische verbetering van zowel de levensverwachting als van de kwaliteit van leven gezorgd. Verder is gebleken dat corticosteroiden ook een positief effect hebben op het beloop van de ziekte. Maar tot nu toe zijn dit de enige behandelingen die algemeen worden toegepast. Er is wel veel onderzoek gaande naar mogelijke nieuwe therapieën. Er wordt gekeken naar het induceren of remmen van factoren om de lichaamseigen reparatiemechanismen te ondersteunen of verbeteren. Verder wordt er gekeken naar het induceren of inbrengen van een functioneel dystrofine eiwit.

Antisense oligonucleotide (AON) gemedieerd exon skippen is één manier om een (deels) functioneel dystrofine eiwit in de spiercellen te induceren. Het idee van deze methode is het herstellen van het leesraam, door het verwijderen (skippen) van een extra exon tijdens het proces van pre-mRNA splicing. De AONs waarmee dit gebeurt binden aan het RNA en maskeren

splice factoren, hierdoor wordt het desbetreffende exon niet als zodanig herkend en wordt het samen met de flankerende intronen verwijderd. Dit skippen resulteert in een dystrofine eiwit dat beide uiteinden heeft en een deel van het tussenstuk mist, met andere woorden een 'Becker eiwit'. Het verschilt per mutatie welk exon of welke exonen er verwijderd moeten worden om het leesraam te herstellen. Verder is het leesraam niet altijd te herstellen met het skippen van één of meerdere exonen en als de mutatie in één van de essentiële uiteinden zit kan er ook geen (deels) functioneel eiwit geïnduceerd worden. Desalniettemin is de methode, in theorie, toepasbaar in een groot aantal patiënten. In de afgelopen jaren is bij cellen en in de muis aangetoond dat de methode potentie heeft en ook de eerste klinische testen hadden positief resultaat. Na injectie van de AON in de spier kon er exon skippen worden gedetecteerd en in de meeste spiervezels werd het verkorte dystrofine eiwit aangetoond, dit alles zonder noemenswaardige bijwerkingen. Nu is aangetoond dat de methode in principe werkt, is het belangrijk om te onderzoeken hoe deze kan worden geoptimaliseerd. Er zijn bijvoorbeeld verschillende chemische varianten voor de AONs beschikbaar. Hoewel de resultaten uit verschillende studies niet altijd één op één te vergelijken zijn (Hoofdstuk 5), lijkt de morfolino chemie de meest succesvolle in muis experimenten. Wij hebben echter aangetoond dat dit alleen geldt voor één specifieke muis sequentie en dat voor andere, humane, AON sequenties de morfolino en 2'O-methyl phosphorothioate chemie vergelijkbare resultaten geven (Hoofdstuk 2). Het zal dus per exon verschillen welke chemie de beste resultaten geeft. Dit is bevestigd door de resultaten van de laatste klinische studies, waarbij de 2'O-methyl phosphorothioate chemie betere resultaten lijkt te geven dan de morfolino chemie.

Een andere vraag is wat de beste toedieningsmethode is voor de AONs. Ze kunnen in de spier, intraveneus, intraperitoneaal en onderhuids worden geïnjecteerd of door middel van een pil worden ingenomen. Injecteren in de spier werkt heel goed, alleen is het niet goed haalbaar om herhaaldelijk alle spieren in het lichaam te injecteren. Voor het hart en het diafragma is dit zelfs onmogelijk. AONs zijn relatief grote moleculen en daardoor komt er maar een kleine hoeveelheid vanuit het lumen van de darmen in de rest van het lichaam terecht. Orale toediening is daarom momenteel geen optie. Ook na intraveneuze, intraperitoneale en onderhuidse injectie komen er in principe weinig AONs uit de bloedvaten en door de celmembraan. Echter, omdat de bloedvaten en het celmembraan in spiervezels bij de ziekte van Duchenne beschadigd zijn en niet goed functioneren, komt er toch een grote hoeveelheid AONs in de spieren terecht (Hoofdstuk 4). Omdat bij intraveneuze injectie de AONs direct in de bloedbaan worden geïnjecteerd, is er met deze toedieningsmethode op korte termijn de meeste skip. Maar op de lange termijn komt er met subcutane toediening een vergelijkbare hoeveel

AONs in de spiercellen terecht en zal een vergelijkbare hoeveelheid nieuw eiwit worden gemaakt (Hoofdstuk 4). Hoewel wij hebben aangetoond dat relatief hoge doses met intraveneuze injectie in de muis geen toxische gevolgen heeft (Hoofdstuk 3), kan de hoge piek dosis in theorie toch voor problemen zorgen en is onderhuidse toediening een veiligere optie. Verder is onderhuidse toediening een stuk minder ingrijpend voor de patiënt.

Om de effectiviteit van exon skippen verder te verbeteren kan het met andere therapieën gecombineerd worden. Hiervoor is een groot aantal kandidaten, maar omdat corticosteroiden al in patiënten worden gebruikt, zijn dat de meest voor de hand liggende kandidaten. In preliminaire experimenten hebben wij gezien dat er mogelijk een additief effect is bij de combinatie van exon skippen en corticosteroiden. Verder is in muisexperimenten gebleken, dat exon skippen in het hart minder efficiënt is dan in skelet spieren (Hoofdstuk 2). Een combinatie van exon skippen met een therapie die de hartfunctie verbeterd is dus mogelijk zelfs noodzakelijk.

Hoewel er door de beschadiging van de spiercellen bij de ziekte van Duchenne veel AON op de goede plek terechtkomt, eindigt een groot deel nog steeds niet in de spieren, maar in de lever, nieren en andere weefsels. Specifieke opname door de spiercellen, bijvoorbeeld met behulp van peptiden die specifiek binden aan de spiercellen (Hoofdstuk 6), zou de methode efficiënter maken. Wij hebben een peptide gevonden dat de opname van AONs door spieren lijkt te vergroten (Hoofdstuk 6). Meer onderzoek is echter nodig om de potentie van dit peptide duidelijk te maken.

De laatste klinische studies bewijzen dat exon skippen bij de ziekte van Duchenne met de huidige chemiën en toedieningmethoden zeer succesvol is. Behandeling in combinatie met andere therapieën en specifieke targeting naar de spiercellen kunnen dit succes in de toekomst mogelijk nog vergroten. Enige mate van optimisme lijkt dus gerechtvaardigd.