



Universiteit
Leiden
The Netherlands

MicroRNA-based gene therapy for Huntington's disease : Silencing the villain

Miniarikova, J.

Citation

Miniarikova, J. (2019, January 24). *MicroRNA-based gene therapy for Huntington's disease : Silencing the villain*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/68333>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/68333>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/68333> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Miniarikova, J.

Title: MicroRNA-based gene therapy for Huntington's disease : Silencing the villain

Issue Date: 2019-01-24

DUTCH SUMMARY / NEDERLANDSE SAMENVATTING

De ziekte van Huntington (ZvH) is een ernstige hersenaandoening die veroorzaakt wordt door een CAG-verlenging in het huntingtine (HTT) gen. Het is bewezen dat het schadelijke mutante HTT-eiwit de voornaamste oorzaak is van ZvH en therapeutische strategieën die gericht zijn op het verlagen van het schadelijke HTT eiwit zijn veelbelovend. Micro (mi) RNA's zijn korte cellulaire RNAs die aan een complementair stukje boodschappermolecuul, messenger RNA (mRNA) genaamd, kunnen binden om zo de translatie tot eiwit te stoppen. Door gebruik te maken van deze eigenschap kunnen miRNAs worden ontworpen welke in een expressieplasmide gekloneerd zijn om de expressie van ziekte genen zoals HTT te verlagen.

De miRNA-coderende plasmide wordt vervolgens verpakt in niet delende, niet in het humane genoom integrerende virussen, genaamd AAVs. Het verpakken van therapeutische genen in een AAV wordt genterapie genoemd. Deze onschadelijke AAVs worden afgeleverd aan de desbetreffende weefsels, opgenomen door de cellen, gaan naar de celkern resulterend in lange termijn (in jaren) expressie van precursor miRNA (pre-miRNA). Deze pre-miRNAs worden verder verwerkt door het cellulaire RNA-interferentie (RNAi) mechanisme tot een "gematureerd" miRNA molecuul. Het "gematureerde" miRNA molecuul kan aan een complementaire stukje HTT mRNA binden met vervolgens een reductie in het schadelijke HTT-eiwit als gevolg: HTT gen-uitschakeling.

In **hoofdstuk 1** wordt de huidige kennis en ontwikkelingen beschreven over de pathogenese van de ZvH, behandelstrategieën om het schadelijke HTT uit te schakelen en het gebruik van cellulaire en diermodellen in preklinische studies. Daarnaast wordt de strategie van AAV genterapie tegen de ZvH beschreven in dit proefschrift vergeleken met andere strategieën die gebruikt worden om HTT te verlagen. Ook wordt er een beschrijving gegeven van de voorafgaande preklinische studies in cellulaire en diermodellen die noodzakelijk zijn als "proof-of-concept" en "proof-of-principle" om met een klinische studie te kunnen beginnen.

In **hoofdstuk 2** wordt een proof-of-concept studie beschreven van genterapie door middel van miRNAs resulterend in HTT gen-uitschakeling. Verschillende miRNA's werden ontworpen tegen HTT-exon 1, 50 en 67 en getest *in vitro* en *in vivo*. Op basis hiervan hebben we het miHTT-construct geselecteerd voor verdere preklinische ontwikkeling. Het geselecteerde miHTT-construct bindt één nucleotide vóór de CAG-expansie in exon 1 en gaf het sterkste effect *in vitro* en *in vivo* in een gehumaniseerd ZvH muismodel, Hu128/21. Daarnaast hebben we als eerste in het ZvH-veld verschillende primaire-miRNA moleculen zowel *in vitro* als *in vivo* getest om zo het productieproces van miHTT in cellen te optimaliseren en het veiligheidsprofiel te verbeteren. We hebben vastgesteld dat de humane miR-451 precursor als enige primaire-miRNA molecuul geen extra tweede tegenovergesteld molecuul, genaamd passagiersstreng produceert. Door deze miRNA precursor te gebruiken

kunnen dus de ongewenste effecten die geassocieerd worden met de passagiersstreng worden uitgesloten. Het werk beschreven in hoofdstuk 2 heeft geresulteerd in de selectie van één therapeutische kandidaat, genaamd AAV5-miHTT-451.

Voor een verder mechanistisch bewijs hebben we gekeken naar de effecten van het miHTT-451-construct om formatie van HTT-aggregatie en neurodegeneratie te onderdrukken. In **hoofdstuk 3** werd AAV5-miHTT-451 bilateraal geïntjecteerd in het striatum van een lentivirale ZvH rat model en detherapeutische effecten werden bestudeerd. Een sterke vermindering in aggregatie van het schadelijke HTT eiwit werd aangetoond, wat vervolgens leidde tot onderdrukking van neuronale dysfunctioneren van het ZvH rat model. Deze studie bevestigt een functioneel therapeutische effect van AAV5-miHTT-451 op de ZvH pathologie dat veroorzaakt wordt door het mutante HTT-eiwit. Deze resultaten ondersteunen verdere ontwikkelingen van preklinische studies in grotere dieren, die buiten het kader van dit proefschrift vallen. Momenteel is het miHTT-451-construct de definitieve productkandidaat AMT-130 in de ontwikkelingspijplijn van uniQure, N.V. In oktober 2017 ontving AMT-130 de “orphan drug designation” onderscheiding in ZvH door de “Amerikaanse Food and Drug Administration”. In januari 2018 ontving AMT-130 een “Orphan Medicinal Product Designation” (OMPD) onderscheiding in ZvH van “European Medicines Agency”, als eerste AAV-getherapie voor ZvH. Er wordt verwacht dat AMT-130 in 2019 de klinische ontwikkeling zal ingaan.

De rol van miRNAs in het cytoplasma is uitvoerig onderzocht, maar hun mogelijke functies in de celkern zijn pas recent beschreven. Verlaging van HTT-transcripten in de celkern is interessant omdat hier ook een kleine hoeveelheid van het schadelijke HTT-RNA actief is. Bovendien zou therapeutische effecten van miRNAs in de kern nieuwe kansen kunnen bieden in de toekomst voor andere ziektes. In **hoofdstuk 4** wordt beschreven hoe miRNAs ontworpen zijn om specifiek tegen een recent geïdentificeerde polymorfisme sequentie dat gekoppeld is aan het mutante allel. Deze polymorfisme bevindt zich in HTT-intron 22 en bestaat uit een deletie van vier nucleotiden; ACTT en is grotendeels uniek voor de A1-haplogroep van ZvH-patiënten en biedt daarom een mogelijkheid voor een allel-specifieke en nucleaire strategie om HTT te onderdrukken. Gebruik makend van miRNAs is een zeer sterke reductie van 90% aangetoond van de mutante HTT eiwit in ZvH-neuronale cellijnen die heterozygoot zijn voor Δ ACTT. In Δ ACTT-negatieve neuronale cellijnen geen verlaging was aangetoond, wat tot nu toe de sterkste allel-specifieke reductie is beschreven in de literatuur. Deze bevindingen dienen als bewijs dat miRNA's ook in de celkern actief kunnen zijn en gebruikt kunnen worden in preklinische validatiestudies tegen andere schadelijke mRNA moleculen welke tot hersenaandoeningen leiden en die specifiek in de celkern tot expressie komen.

Om verder ontwikkelingen in een ZvH-getherapie in patiënten te ondersteunen, is het belangrijk om wat het lichaam doet met het medicijn en wat het medicijn doet met het lichaam (PK/PD)-metingen te verrichten in lichaamsvloeistoffen die gemakkelijk te verkrijgen

zijn, zoals hersenvocht of bloed. Hiermee kan een verband gelegd worden van de aanwezige hoeveelheid miRNA moleculen in de hersenen met de klinische langetermijn effecten in ZvH-patienten. In **hoofdstuk 5** worden de bevindingen beschreven dat therapeutische miRNA's in neuronale cellijnen van ZvH-patiënten uitgescheiden kunnen worden in vesikels verrijkt met exosomen. Deze bevindingen zijn van groot belang voor de ZvH veld en andere ziekte indicaties. Het hebben van een specifieke PK/PD-metingen, die van toepassing kunnen zijn op andere CNS-indicaties, zal een aanzienlijke invloed hebben op de preklinische en klinische ontwikkeling van genterapieën op basis van gen-uitschakeling die momenteel met deze uitdagingen worden geconfronteerd. Verdere studies worden gedaan buiten het kader van dit proefschrift om een beter inzicht te krijgen van het mechanisme en mogelijkheid van de 'exosomale verspreiding' van HTT gen-uitschakeling *in vivo*.

Tot slot, in **hoofdstuk 6**, wordt de huidige kennis over reductie van HTT-mRNA en eiwit strategieën samengevat. Verder wordt er een overzicht gegeven van de preklinische veiligheidsmaatregelen voor genterapie op basis van miRNA en de mogelijkheden voor de toekomst.