



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

SLOVAK SUMMARY / ZHRNUTIE V SLOVENČINE

Huntingtonova choroba (Huntington's disease, HD) patrí k doposiaľ nevyliciteľným neurodegeneratívnym ochoreniam vykazujúcim autozómovo dominantnú dedičnosť. Samotnou príčinou ochorenia je nadpočetné opakovanie C-A-G kodónu, v počte 40 a viac, v géne kódujúcom proteín huntingtín (*HTT*). Expanziou C-A-G trípлетu dochádza k vzniku mutantnej formy huntingtínu a celkovej zmene jeho funkcie v organizme. Zmutovaný *HTT* proteín sa ukázal byť prevládajúcou toxickou entitou, ktorá podmieňuje vznik HD patogenézy v mozgu. Veľký význam sa preto prikladá vývoju terapeutických stratégií, ktorých cieľom je znížiť hladinu zmutovaného *HTT* proteínu. Mikro (mi)RNA patria do triedy malých bunkových RNA, ktoré sa na základe komplementarity báz viažu na príslušné mRNA a tým potláčajú ich transláciu do proteínu. miRNA môžu potenciálne slúžiť ako terapeutický nástroj na zníženie expresie mutantného *HTT* génu. V klinických aplikáciách je expresná kazeta kódujúca danú terapeutickú miRNA doručená do mozgu za pomoci adeno-asociovaných vírusov (AAV), kde zaručí dlhodobú expresiou miRNA prekursorov a to v priebehu niekoľkých rokov. Tieto prekursory sú ďalej spracované mechanizmom bunkovej RNA interferencie (RNAi) za vzniku maturovanej miRNA molekuly, ktorá rozpoznáva špecifickú sekvenciu v *HTT* mRNA a zabezpečí zníženie produkcie toxického *HTT* proteínu.

V prvej kapitole opisujeme súčasné poznatky o Huntingtonovej patogenéze, terapeutických stratégiách, ktoré znižujú hladinu zmutovaného *HTT*, a bunkové a živočíšne modely umožňujúce predklinický výskum tohto ochorenia. Zaradili sme génovú terapiu využívajúcu miRNA doručovaných pomocou AAV vírusov medzi, v súčasnosti študované, terapeutické metódy znižovania hladiny zmutovaného *HTT*. Popisujeme experimentálne poznatky získané z predklinických štúdií na bunkových a zvieracích modeloch Huntingtonovej choroby, ktoré sú dôkazom potenciálnej účinnosti génovej terapie na liečenie Huntingtonovej choroby, a potrebným predpokladom pred začiatkom klinickej štúdie.

V druhej kapitole opisujeme pilotnú štúdiu využívajúcu génovú terapiu na základe miRNA. Navrhli a testovali sme účinnosť rôznych terapeutických miRNA zacielených na rôzne sekvencie v *HTT* exónoch 1, 50 a 67 *in vitro* a *in vivo*. Na základe získaných výsledkov sme pre ďalší predklinický výskum vybrali miHTT konštrukt zacielený na sekvenciu umiestnenú jeden nukleotid *upstream* od začiatku CAG opakovania v exóne 1. miHTT konštrukt vykazoval najsilnejšiu účinnosť *in vitro* a v humanizovanom myšacom modeli (hu128/21). Okrem toho sme ako prví v oblasti výskumu Huntingtonovej choroby testovali niekoľko pre-miRNA prekursorov s cieľom zvýšiť bezpečnosť lieku. Identifikovali sme pre-miR-451 ako jediný prekursor, ktorý neprodukuje opozitný reťazec *in vitro* a *in vivo*, a preto zlepšuje profil bezpečnosti lieku.

V nadväznosti na predchádzajúcu štúdiu sme sa rozhodli otestovať účinnosť génovej terapie využívajúcej miHTT-451 konštrukt na potlačenie agregácie *HTT* proteínu a neurodegenerácie. **V tretej kapitole** sme injektovali AAV5 vektory nesúce miHTT-451

konštrukt bilaterálne do prúžkovaného telesa (striatum) potkanov, ktoré reprezentujú lentivírusový model Huntingtonovej choroby a následne sme merali terapeutickú odpoveď. Ukázali sme výrazné zníženie počtu HTT agregátov, čo viedlo k potlačeniu neuronálnej dysfunkcie dva mesiace po injektovaní. Táto štúdia preukázala funkčnú účinnosť AAV5-miHTT-451 konštrukt na potlačenie patologických príhod spôsobených zmutovaným HTT proteínom. Naše výsledky podporili pokračovanie predklinických štúdií na ďalších zvieracích modeloch, ktoré sú mimo rozsahu tejto práce. V súčasnej dobe je miHTT-451 konštrukt sľubným kandidátom (AMT-130) v uniQure pre liečenie Huntingtonovej choroby. V októbri 2017 bola AMT-130 génová terapia označená organizáciou FDA (Food and Drug Administration) v USA ako „Orphan Drug“ a v januári 2018 organizáciou EMA (European Medicines Agency) ako „Orphan Medicinal Product Designation“ (OMPD), vďaka čomu sa stala prvou študovanou AAV génovou terapiou, ktorá prijala toto označenie na poli Huntingtonovej choroby. Očakáva sa, že AMT-130 vstúpi do klinického vývoja v roku 2019.

Úloha miRNA v cytoplazme je pomerne dobre popísaná, ale ich funkcia v jadre bunky začala byť objasňovaná iba nedávno. Zaujímavé je znižovanie HTT mRNA v jadre, pretože v jadre bola hlásená určitá úroveň toxicity spôsobená HTT mRNA. Okrem toho rozšírenie terapeutického účinku miRNA do jadra bunky by mohlo v budúcnosti ponúknuť nové možnosti v aplikáciách aj pre iné ochorenia. **V štvrtej kapitole** sme navrhli miRNA, ktoré sú špecificky zamerané na nedávno identifikovanú polymorfnú sekvenciu s deléciou štyroch nukleotidov, Δ ACTT, ktorá sa nachádza v intróne 22 zmutovaného HTT mRNA. Tento heterozygotný polymorfizmus je vo veľkej miere charakteristický pre pacientov Huntingtonovej choroby haploskupiny A1 a preto je možné súčasne zabezpečiť alelovú špecificitu a zníženie hladiny jadrového HTT pre liečbu Huntingtonovej choroby. V tejto kapitole sme ukázali 90% zníženie zmutovaného HTT proteínu v ľudských neuronálnych bunkových kultúrach Huntingtonovej choroby heterozygotných pre Δ ACTT, a takmer 0% zníženie v Δ ACTT-negatívnych kultúrach, čo ukazuje najsilnejšiu selektívnu účinnosť génovej terapie do súčasnosti vôbec. Zaujímavé je, že tieto údaje spochybňujú tradičný koncept zmaturovaných miRNA, ktoré pôsobia predovšetkým v cytoplazme. Preto sme navrhli všeobecnú koncepciu znižovania expresie génov v jadre bunky, ktoré spôsobujú iné ochorenia, za pomoci terapeutických miRNA a odporúčame ďalšie predklinické validačné štúdie.

Klinické štúdie predstavujú pokročilú fázu vývoja nového lieku. Aby bolo možné zavedenie výsledkov génovej terapie z preklinických štúdií k pacientom s Huntingtonovou chorobou, dôležitou zložkou výskumu je identifikácia farmakokinetických/farmakodynamických markerov. Ideálne sú tieto markery merané na ľahko získateľných biologických tekutinách ako je krv alebo cerebrospinálna tekutina a ukazujú koreláciu medzi expresiou účinných AAV-miRNA vektorov a dlhodobou účinnosťou u pacientov s Huntingtonovou chorobou liečených génovou terapiou. **V piatej kapitole** sme ukázali prvé náznaky, že terapeutické miRNA môžu byť vylučované vo vezikulách obohatených o exozómy z ľudských neuronálnych bunkových kultúr pacientov s Huntingtonovou chorobou. Tieto zistenia sú významné