



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Developing tissue specific antisense oligonucleotide-delivery to refine treatment for Duchenne muscular dystrophy

Jirka, S.

Citation

Jirka, S. (2017, July 4). *Developing tissue specific antisense oligonucleotide-delivery to refine treatment for Duchenne muscular dystrophy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/51132>

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/1887/51132>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/51132> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Jirka, Silvana

Title: Developing tissue specific antisense oligonucleotide-delivery to refine treatment for Duchenne muscular dystrophy

Issue Date: 2017-07-04



Samenvatting

Een zeer belangrijk onderdeel in de ontwikkeling van nieuwe medicijnen is zorgen dat het medicijn op de plek komt waar het zijn werking moet uitvoeren. Een geneesmiddel kan een goede werkzaamheid hebben, maar wanneer het in het lichaam niet op de plek komt waar het nodig is heeft het geen baat voor mensen. Daarnaast moet een geneesmiddel veilig en verdraagzaam zijn. Geneesmiddelen die leiden tot toxiciteit of waar de bijwerkingen erger zijn dan de te behandelende aandoening, doen uiteindelijk meer kwaad dan goed. Een balans tussen een doeltreffende opname, veiligheid en verdraagzaamheid zal resulteren in een geneesmiddel met het gewenste effect dat geschikt is om mensen mee te behandelen.

Duchenne spierdystrofie (DMD) is een ernstige erfelijke spieraandoening waarbij de spieren worden aangetast en langzaam hun werking verliezen. Het komt voor bij 1:5000 pasgeboren jongens wereldwijd. DMD wordt veroorzaakt door een genetisch defect in het gen dat codeert voor het dystrofine eiwit, het *DMD* gen. Dit heeft het gevolg dat deze patiënten geen dystrofine eiwit kunnen maken.

In de kern van de cellen in ons lichaam is ons DNA opgeslagen. Dit DNA is onze genetische code, ons boek waar in staat beschreven wat en hoe er iets gemaakt moet worden in ons lichaam. De genetische code van ons DNA is opgebouwd uit genen, zoals hoofdstukken in een boek. Genen zijn verder onderverdeeld in intronen en exonen, zoals paragrafen in een boek. In de cel wordt een gen afgelezen en er een exacte kopie van gemaakt genaamd pre-messenger RNA (pre-mRNA). Dit wordt vervolgens gelezen en alle intronen (niet relevante informatie) worden er uitgehaald door middel van een proces wat "splicing" wordt genoemd. Wat overblijft noemen we messenger RNA (mRNA) en bestaat uit exonen (de relevante informatie). Als laatste stap wordt het RNA vertaald in eiwit. Elk gen heeft een begin en eind en net als bij een boek moet het helemaal afgelezen worden om het goed te begrijpen en te vertalen in het juiste eiwit. Als er in een boek een half hoofdstuk ontbreekt mis je een deel van het verhaal en begrijp je niet meer hoe het verhaal verder gaat. Dit is nu juist het geval bij patiënten met DMD, er missen relevante stukken van het gen waardoor de rest van het boek onleesbaar wordt en er uiteindelijk geen dystrofine eiwit kan worden gemaakt.

Het dystrofine eiwit is heel belangrijk voor spieren, het zorgt namelijk voor stevigheid en veerkracht bij beweging. Door het ontbreken van het dystrofine eiwit in de spieren raken deze gemakkelijk beschadigd, verzwakt en verliezen uiteindelijk hun functie. DMD is een aangeboren aandoening, de eerste symptomen zijn al zichtbaar rond het tweede levensjaar en de diagnose wordt meestal gesteld vóór het vijfde levensjaar. De eerste zichtbare symptomen zijn bijvoorbeeld een vertraging in het leren/gaan lopen, het gebruik van de handen om de benen te ondersteunen bij het gaan staan en zichtbaar moeite hebben met rennen en traplopen. Over

het algemeen worden DMD patiënten rolstoel afhankelijk rond het 12^{de} levensjaar, hebben mechanische ondersteuning nodig bij het ademen rond hun 20^{ste} levensjaar, eerst alleen in de nacht later ook overdag. Rond het 10^{de} levensjaar ontwikkelen zich de eerste hartproblemen en vrijwel alle patiënten hebben duidelijk hartfalen vanaf de leeftijd van 20 jaar. De levensverwachting van DMD patiënten in de westerse wereld is zo'n 30 jaar.

Naast DMD is er nog een gerelateerde spieraandoening, Becker spierdystrofie (BMD). BMD patiënten hebben ook een genetisch defect in het *DMD* gen, maar bij deze patiënten wordt er nog wel dystrofine eiwit gemaakt. Echter heeft dit dystrofine eiwit een mindere werking ten opzichte van het gezonde eiwit omdat het kleiner is. Er mist een hoofdstuk van een boek, waardoor je bijvoorbeeld niet weet dat de hoofdpersoon op vakantie is geweest, maar het verhaal is nog steeds duidelijk en leesbaar van begin tot eind. De symptomen voor BMD patiënten variëren van mild tot matig ernstig. BMD patiënten hebben een levensverwachting van 40-50 jaar voor de matig ernstige patiënten tot een normale levensverwachting voor de mildere variant.

Voor de meeste DMD patiënten is er geen geneesmiddel beschikbaar. Behandeling bestaat voornamelijk uit symptoombestrijding zoals het gebruik van corticosteroiden en ondersteuning van de ademhaling en hartfunctie. Hiernaast is een heel team van getraide mensen betrokken (fysiotherapeut, orthopedisch therapeut, longarts, cardioloog, revalidatieartsen e.d.) om het leven zo aangenaam mogelijk te maken. Op dit moment zijn er verschillende potentiële geneesmiddelen voor DMD in ontwikkeling. Over het algemeen kunnen deze in twee hoofdgroepen worden verdeeld. Een groep richt zich op het genetisch defect, het herstellen van de aanmaak van het dystrofine eiwit. De andere groep richt zich op het verbeteren van de bijkomende symptomen zoals het verminderen van de ontsteking of het sterker maken van de spieren. De grootste vooruitgang op het moment is gericht op het herstel van de dystrofine productie: exon skippen. Het geneesmiddel wat hierbij gebruikt wordt heet een antisense oligonucleotide (AON). Deze AON bindt in de celkern van een spiercel aan een speciaal gekozen plek op het pre-mRNA van het *DMD* gen. Daarbij plakt de AON een stuk van een niet functionerend exon op dit pre-mRNA af, het halve hoofdstuk in een boek. Wanneer er vervolgens van pre-mRNA door het proces wat splicing heet mRNA wordt gemaakt, wordt dit afgeplakte stuk pre-mRNA er ook uit gehaald (exon skippen). Nu wordt er een groter stuk weg gehaald, maar wordt het RNA weer leesbaar en kan er een dystrofine eiwit worden gemaakt zoals we zien bij BMD patiënten. Het rare halve hoofdstuk in het boek wordt er uitgehaald (overgeslagen of wel geskipt), en al weet je nu niet dat de hoofdpersoon op vakantie is geweest, het is een mooi leesbaar boek met een duidelijk begin en eind.

Dit proefschrift richt zich op het verbeteren van het gebruik van AON als geneesmiddel voor DMD patiënten. Omdat 30-40% van het menselijk lichaam uit spieren bestaat is het onmogelijk om iedere spier apart te behandelen. Systemische toediening (door het hele lichaam) is nodig. Uit pre-klinisch onderzoek is gebleken dat systemisch toegediende AON in de spieren terecht komen. Het grootste gedeelte komt echter in de lever en nieren terecht en verlaten het lichaam zonder ook maar iets gedaan te hebben. Er zijn verschillende manieren om deze aanpak te verbeteren. Je kan chemisch de AON zelf aanpassen waardoor het stabiel wordt (minder snel afgebroken door het lichaam) of beter aan het mRNA bindt. In hoofdstuk 6 is zo'n chemische aanpassing beschreven. In gekweekte spiercellen in een laboratorium leverde dit een verhoogde activiteit van de AON op. Maar wanneer deze aanpassing in dieren werd getest bleek het helemaal niet te werken en ook nog eens toxisch te zijn.

Een andere mogelijke oplossing is om er voor te zorgen dat meer AON in de spieren terecht komt. Hier zijn verschillende mogelijkheden voor. Binnen dit proefschrift is gekozen voor de ontwikkeling van spier specifieke peptiden (piepkleine eiwitten) die wanneer vast gemaakt aan de AON, deze naar de spieren zou moeten geleiden. Voor de ontwikkeling/identificatie van spier specifieke peptiden is gebruik gemaakt van de techniek faag display. Deze techniek maakt gebruik van een fagenbank (in dit geval peptiden fagen bank) die bestaat uit wel meer dan een miljard fagen (virussen die bacteriën infecteren en zich daar kunnen vermenigvuldigen) die ieder aan hun buitenkant een uniek peptide tot expressie brengen. In een laboratorium is zo'n fagenbank blootgesteld aan spiercellen. Afhankelijk van het peptide dat ze aan de buitenkant hebben zitten, zullen deze fagen wel of niet aan een spiercel binden. De fagen die binden zijn geïdentificeerd en het bijbehorende peptide gekarakteriseerd. Deze peptiden werden vervolgens synthetisch gemaakt. In het laboratorium is onderzocht of ze inderdaad aan spiercellen kunnen binden en bij voorkeur ook de spiercellen in gaan en in de kern van de cel terecht komen (want daar moet uiteindelijk de AON ook heen om zijn werking te kunnen verrichten). Wanneer een peptide gevonden is die aan de juiste voorwaarden voldeed werd deze gekoppeld aan een AON. In diermodellen is er onderzocht of er bijvoorbeeld meer peptiden geconjugeerd AON in de spieren terecht kwam ten opzichte van de AON alleen. Daarnaast is er ook gekeken naar het percentage exon skippen en of er na toediening meer dystrofine eiwit aanwezig is in de spieren. In hoofdstuk 3 is een eerste peptide beschreven (P4) die weliswaar een kleine maar toch significante toename in het percentage exon skippen bewerkstelligt in hart en diafragma (ademhalingspomp). Omdat het wenselijk is om nog betere peptiden te vinden is met behulp van de techniek "next generation sequencing" de analyse van faag display selecties verbeterd, dit staat beschreven in hoofdstuk 4. Nieuwe verbeterde faag display selecties hebben uiteindelijk geresulteerd in de identificatie van peptiden CyPep10, beschreven in hoofdstuk 5. Het CyPep10-AON conjugaat

resulteerde, na systemische toediening, in een significante verdubbeling van de opname van het conjugaat evenals het percentage exon skippen in alle geanalyseerde skeletspieren en hart. Na een eiwitbepaling is er op het oog ook een mogelijk kleine verhoging van het dystrofine eiwit gevonden maar dit is nog niet bewezen.

In conclusie, spier specifieke peptiden hebben de potentie om de opnamen van AON, of andere potentiële geneesmiddelen voor spieren, te verbeteren. Zo gezegd zij hebben de potentie de balans tussen een doeltreffende opname, veiligheid en verdraagzaamheid te verbeteren resulterend in een geneesmiddel met de gewenste werkzaamheid voor de behandeling van DMD patiënten.

