



Leids Universitair
Medisch Centrum

Gen therapie voor Duchenne

Annemieke Aartsma-Rus

Mei 2019



Outline

- Introductie
 - Genen en eiwitten
 - Waar gaat het mis bij Duchenne?
 - Gen therapie
 - Gen additie
 - Exon skippen
 - Genome editing
 - Stop codon readhtrough
- 
- Hoe?
Status?
Mitsen en maren

- Ons lichaam bestaat vooral uit eiwitten
- Genen bevatten blauwdruk voor eiwitten
- Fout in gen → Fout in eiwit
- Pathologie hangt af van functie eiwit en waar eiwit wordt geproduceerd
- Dystrofine: expressie in spier en brein
 - Problemen in spier (hart, glad en skelet) & brein

Spieren en zenuwen

- Ons lichaam bestaat voor >30% uit spieren
- >750 verschillende skelet spieren
- Spieren kunnen verlengen en verkoren worden na signaal vanuit het brein
- Iedere spiervezel heeft een eigen zenuw (motorneuron)
- Als spierweefsel verloren gaat: verlamming
- Als zenuwen verloren gaan: verlamming

Duchenne: geen dystrofine

Gezond



Duchenne



Becker



DMD: geen dystrofine

- Dystrofine stabiliseert spiervezels tijdens contractie
- Zonder dystrofine zijn spiervezels heel gevoelig voor schade
- Chronische ontsteking, littekenweefsel vorming en remming van spierherstel en uiteindelijk verlies van spiermassa en spierfunctie

Genetische therapieën

- DNA niveau
 - Gen toevoegen
 - Genome editing
- DNA transcripten aanpakken (RNA)
 - Splice modulatie (exon skippen)
 - Stop codon readthrough

Gen additie

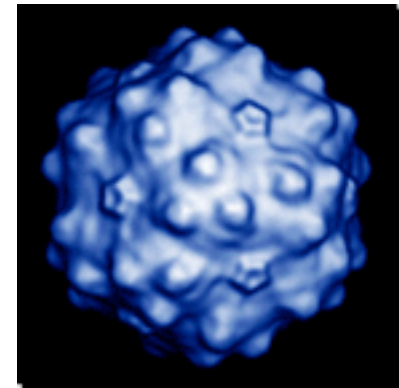
- Toevoegen functioneel gen aan spiervezels
- Dit gen wordt gebruikt voor dystrofine aanmaak
- Genen zitten in de celkern
- Miljarden celkernen per spier
- Niet genoeg om een celkern in een spier te raken
- Hoe kunnen we genen toedienen?

Virale vectoren

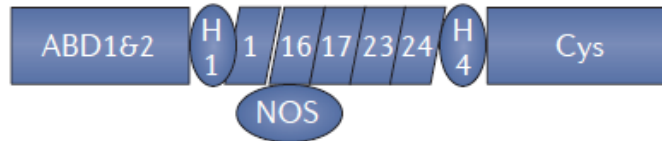
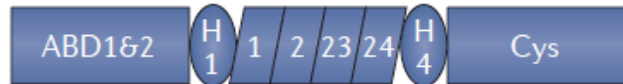
- Virussen kunnen genetisch materiaal naar weefsels brengen
- Virussen gebruiken om dystrofine gen toe te dienen aan spieren
- Welk virus?
- Adeno associated virus
 - Enige virus dat efficiënt spieren kan infecteren
 - Niet ziekteveroorzaken
 - Virale genen eruit – dystrofine gen erin (echter..)

Dystrofine gen is nogal groot

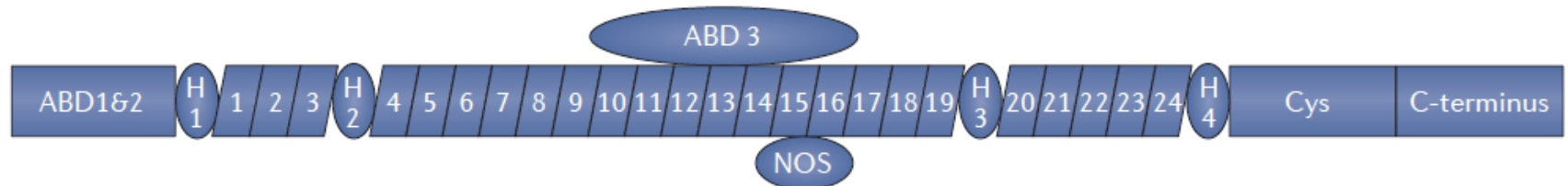
- AAV is heel klein (20 nm, 0.00002 mm)
- Capaciteit voor DNA is beperkt
- Dystrofine gen en code is te groot (500 en 3 keer)
 - Microdystrofine maken
 - Alleen cruciale domeinen
 - Is dit functioneel?



Microdystrofines in klinische studies



Nature Reviews | **Neurology**



Status quo gen therapie

- 3 trials met micro-dystrofine gaande
 - Pfizer (12 pat, lage en hoge dosis)
 - 6 patienten laagste 2 doses ontvangen; geen resultaten
 - Solid (16 pat, 4 doses)
 - Tijdelijk on hold
 - Laagste dosering: <5% microdystrofine in <10% vezels
 - Plannen voor behandeling hogere dosering
 - Sarepta/Ohio (12 pat, 1 dosis)
 - 4 patienten behandeld (dosis 4 keer hoger dan Solid);
Eerste resultaten gepresenteerd

Sarepta/Ohio microdystrofine

- 4 patienten behandeld (3-4 jaar oud)
- 200,000 miljard virus deeltjes/kg
- Voorbehandeling met hoge dosering steroiden
- Biopten genomen na 90 dagen
- Microdystrofine gezien
 - >70% vezels positief (patient 4: bijna 100%)
 - >40% dystrofine (patient 4: >100%)
- Follow up gaande en behandeling extra patienten
- Tijdelijk on hold – onzuiverheid in productieproces

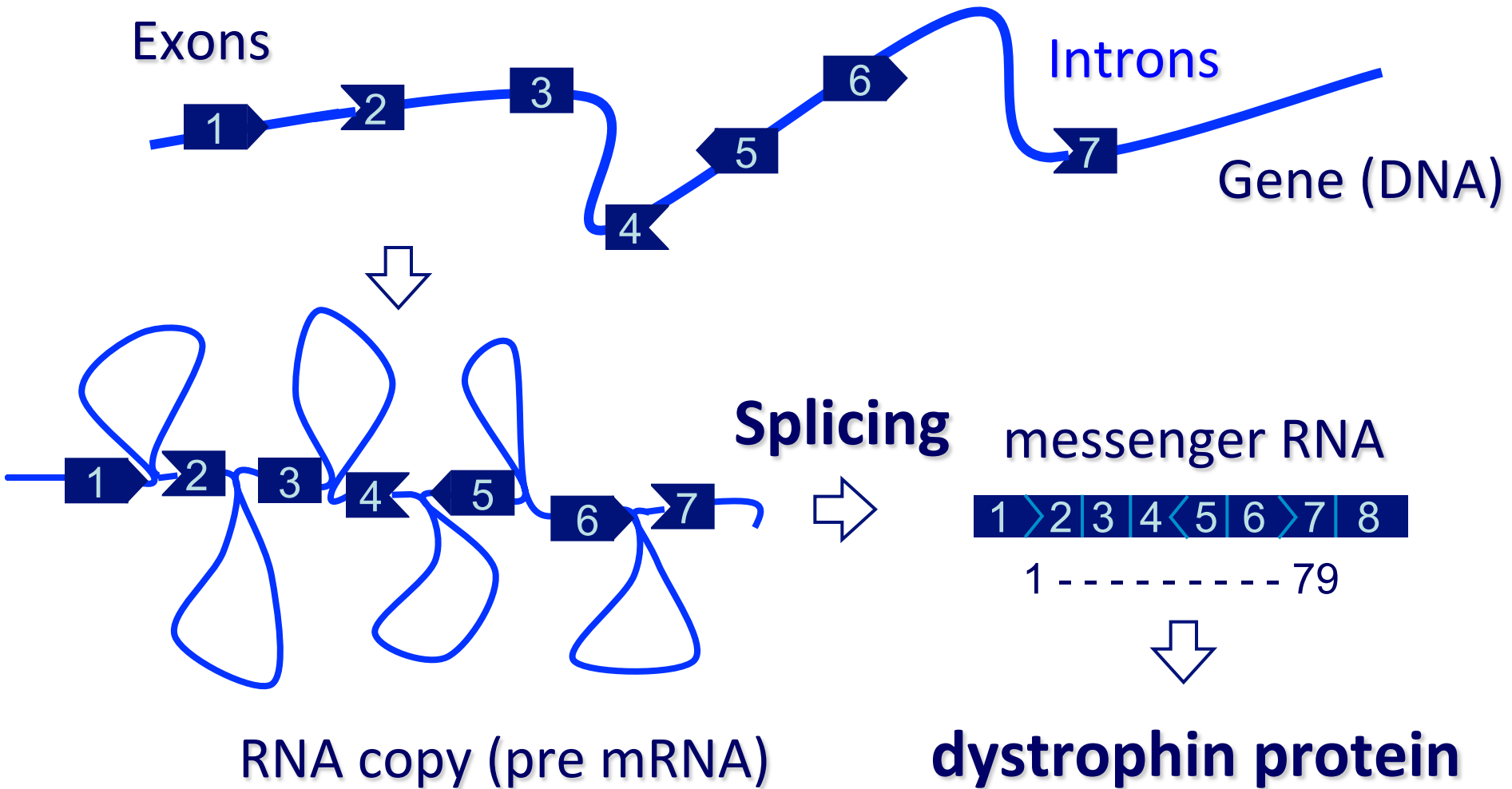
Wat moet er nog opgelost worden?

- Manufacturing (dosering is heel hoog)
- Immuun reactie tegen AAV
- Hoe lang blijft spier microdystrofie maken?
 - Immuun reactie: herhalen behandeling niet mogelijk
- Functionaliteit micro-dystrofie
- Veiligheid op korte en lange termijn
 - Behandeld met heel veel virussen
 - Lange termijn veiligheid is nog niet zeker

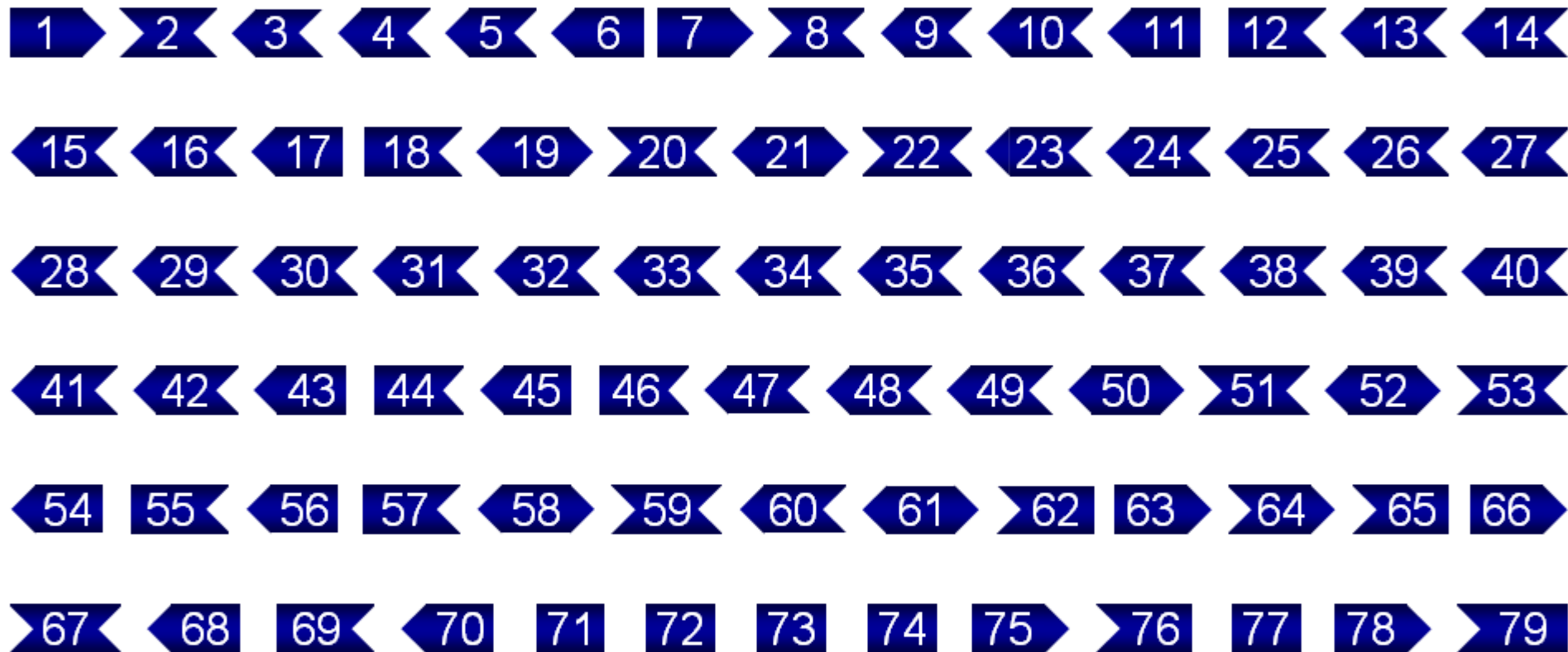
Genetische therapieën

- DNA niveau
 - Gen toevoegen
 - Genome editing
- DNA transcripten aanpakken (RNA)
 - **Splice modulatie (exon skippen)**
 - Stop codon readthrough

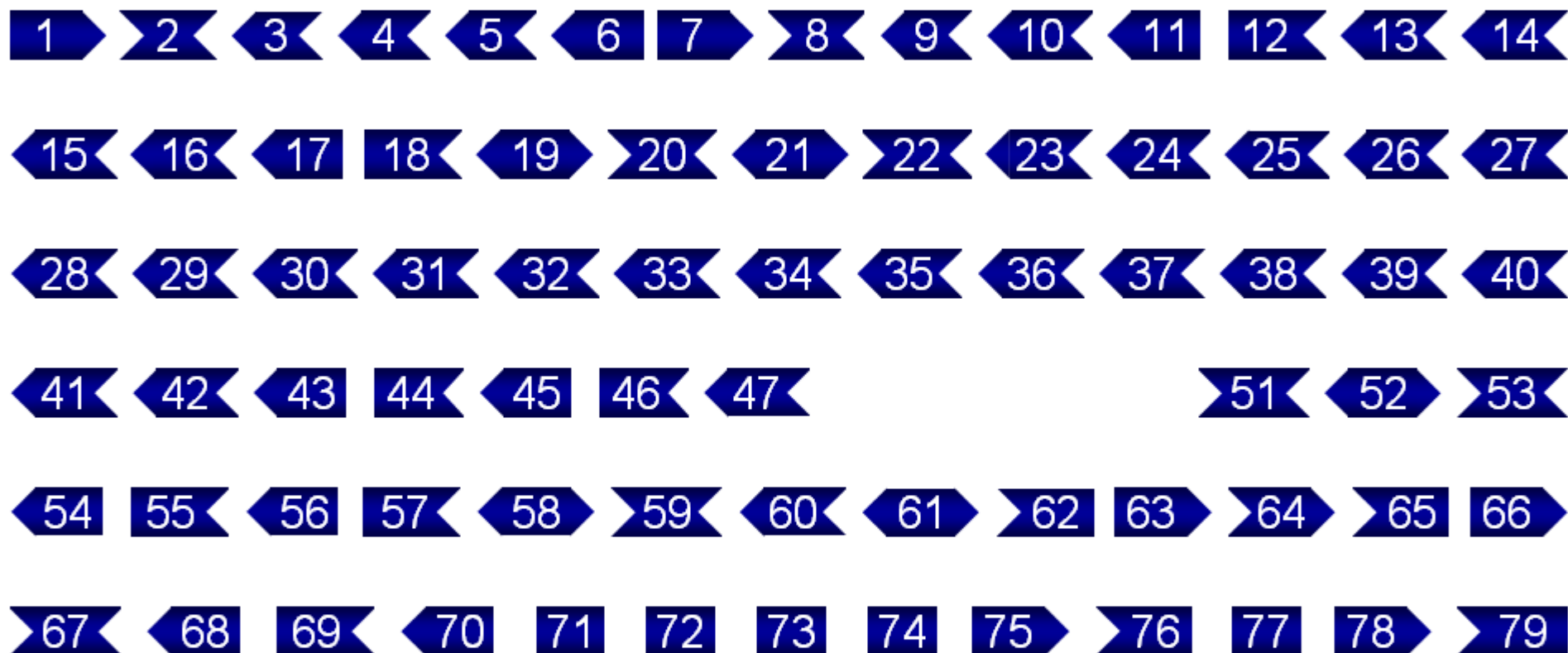
Splicing



Dystrofine exonen



Duchenne: code verstoord



Exon 48-50 deletie



Code verstoord → onleesbaar

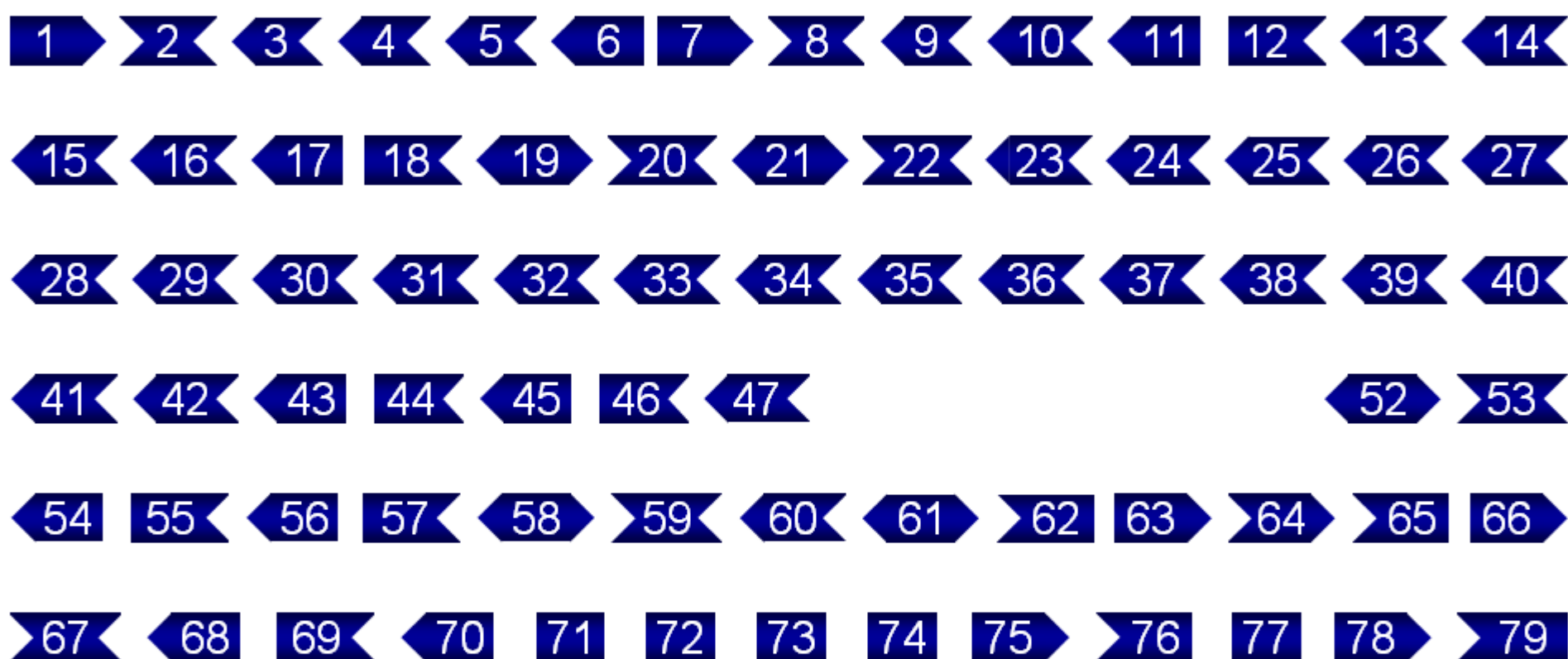


Eiwit vertaling stopt vroegtijdig



Dystrofine niet functioneel

Becker: code behouden



Becker: code behouden



Code niet verstoord: blijft leesbaar



Eiwit vertaling gaat door



Dystrofine deels functioneel

Exon skippen



Genetische code hersteld



Deels functioneel dystrofine kan gemaakt worden

Mutatie specifieke aanpak

Exon	All mutaties	Deleties
51	14%	21%
45	9.0%	13%
53	8.1%	12%
44	7.6%	11%
50	3.8%	5.6%
43	3.1%	4.5%
8	2.0%	2.9%

Bladen et al, Hum Mut 2015

Status quo

- Exon 51 skip AONs ontwikkeling verst ontwikkeld
- Drisapersen en eteplirsen
- Drisapersen getest in >300 DMD patienten
 - Mogelijk trager ziektebeloop
 - Veiligheidsproblemen
 - Niet goed gekeurd
 - Ontwikkeling gestopt (Prosensa/GSK/BioMarin)

Eteplirsen is goedgekeurd in de VS

FDA News Release

FDA grants accelerated approval to first drug for Duchenne muscular dystrophy

[f SHARE](#) [t TWEET](#) [in LINKEDIN](#) [p PIN IT](#) [✉ EMAIL](#) [🖨 PRINT](#)

For Immediate
Release

September 19, 2016

- Gebaseerd op minimale toename dystrofine (<1%)
- Nog geen functionele effecten aangetoond
- Sarepta moet voor 2021 functioneel effect aantonen
- Niet goedgekeurd in Europa

Status Quo

- Eteplirsen studies (Sarepta)
- Betere exon 51 AONs
 - Wave (veilig → nu testen voor functioneel effect)
 - Sarepta (testen voor functioneel effect)
- Gen therapie: exon 2 skip AON-gen (Audentes)
- Exon 53 en exon 45 AON studies
 - Sarepta (53: 1% en 45: <1% dystrofine)
 - NS-Pharma (53: 4-5% dystrofine)
 - Daiichi Sankyo (45: <<1 % dystrofine)
- Preclinisch: exon 44, 50, 52 en 55 skippen

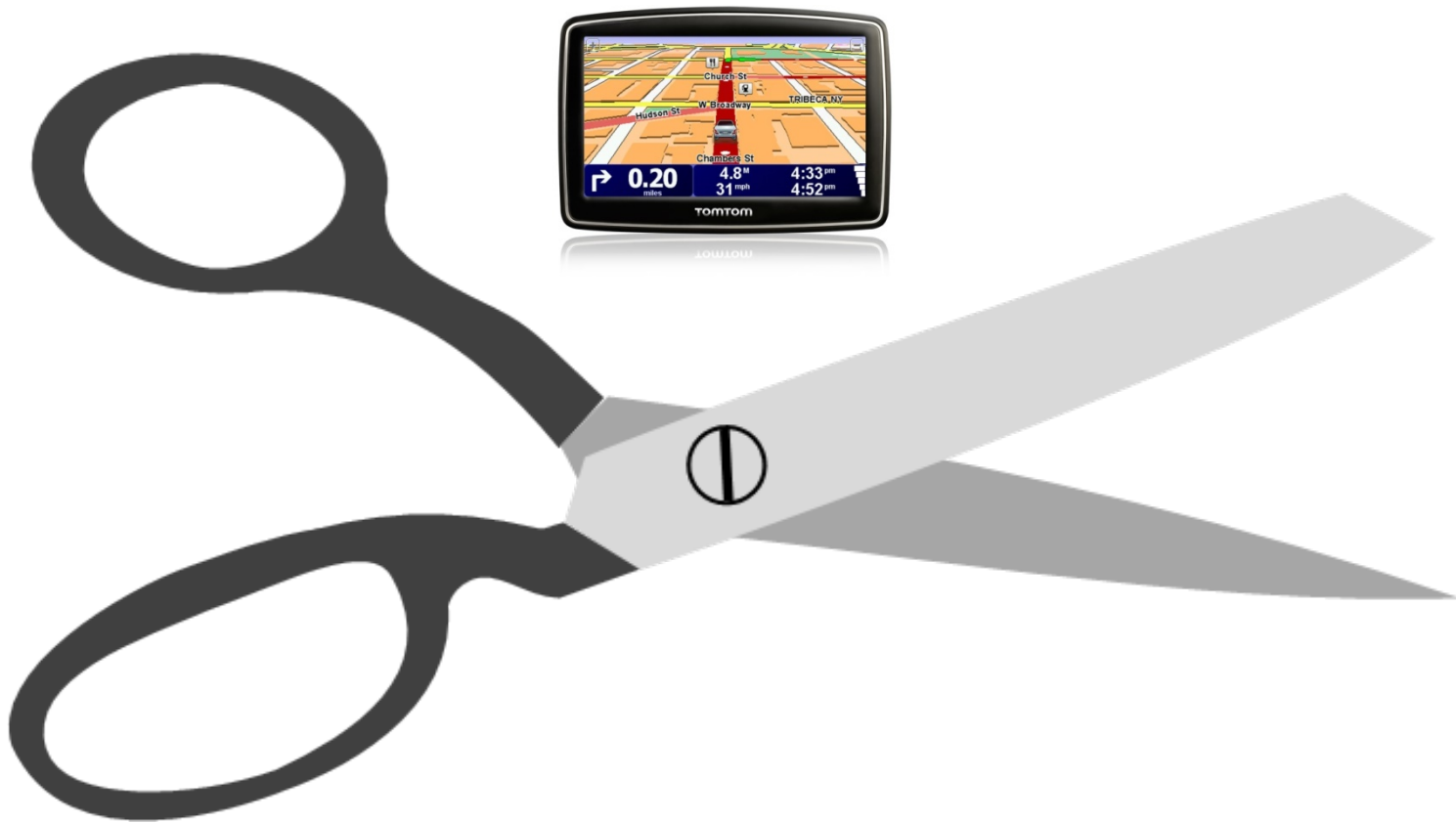
Exon skippen hordes

- Mutatie specifieke aanpak (kleine subgroepen)
- Wekelijksse behandeling nodig
- Niet goedgekeurd in Europa
- Heel duur in de VS
- Controversiele goedkeuring in VS

Genetische therapieën

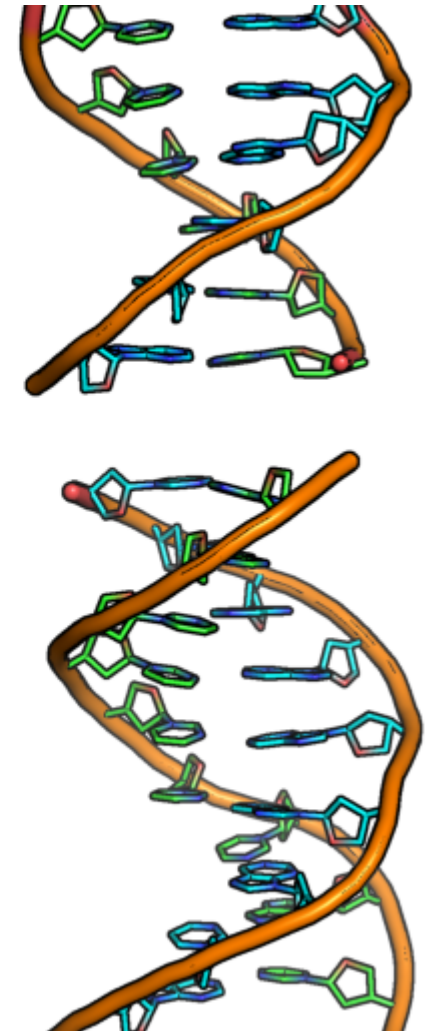
- DNA niveau
 - Gen toevoegen
 - **Genome editing**
- DNA transcripten aanpakken (RNA)
 - Splice modulatie (exon skippen)
 - Stop codon readthrough

Genome editing en CRISPR/Cas9



Waarom zou je DNA knippen?

- DNA bevat eiwit blauwdrukken
- DNA schade is niet goed
- Lopen continue DNA schade op
- Wordt zo snel mogelijk gerepareerd



DNA schade herstel systemen

Herstel

Uitwisseling (delende cellen)

Foutloos herstel



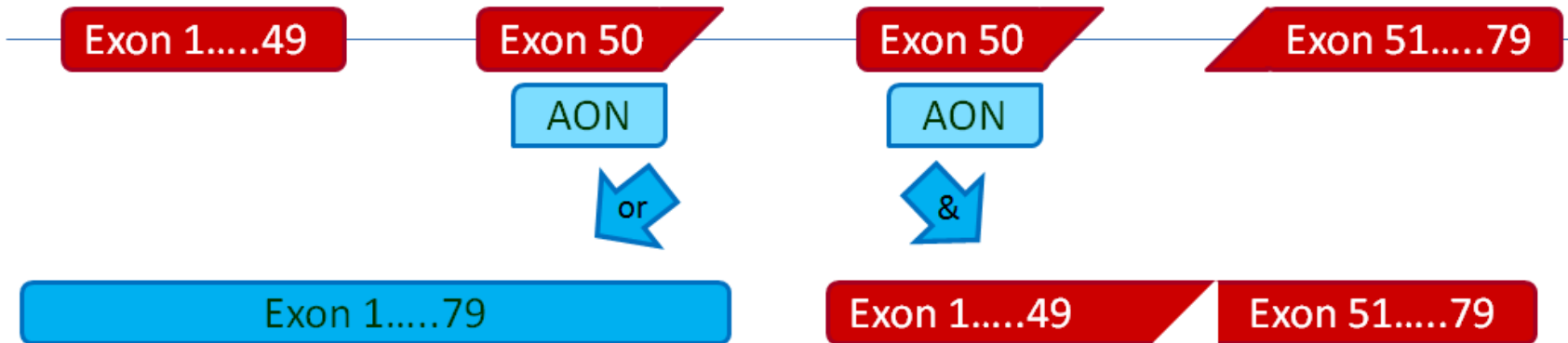
Lijm (niet delende cellen)

Uiteindes aan elkaar geplakt
Informatie gaat verloren

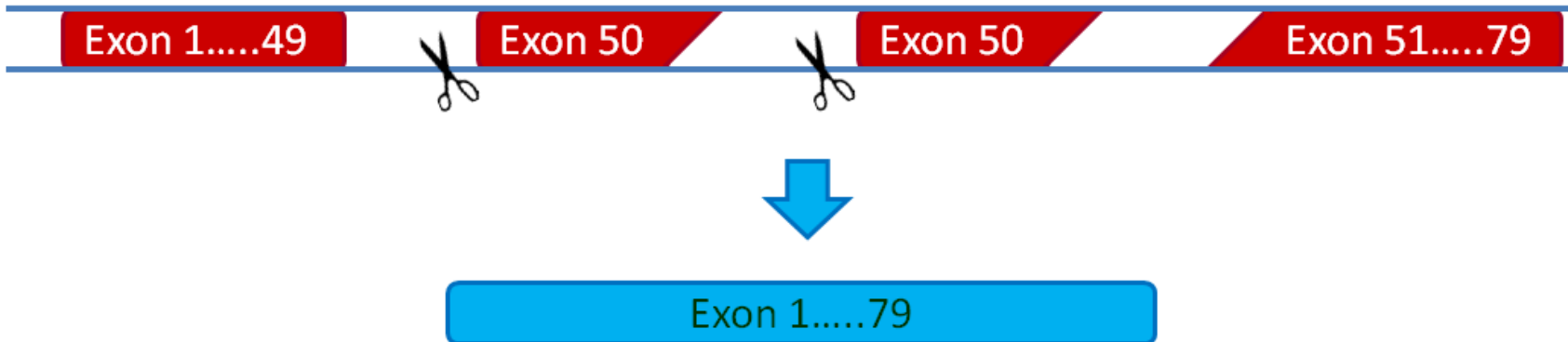


Exon skippen vs genome editing

Exon skippen



Genome editing



CRISPR/Cas 9 voor DMD

- Exon skippen is tijdelijk effect
- Herhaaldelijk toedienen
- Code herstellen op DNA → permanent effect
- Kan met genome editing
- Voordelen tov exon skippen:
 - Eenmalige behandeling
 - Kunt meerdere exonen verwijderen
 - Werkt ook voor duplicaties

En het werkt! In muizen...

Science AAAS

REPORT

In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy

Christopher E. Nelson^{1,2}, Chady H. Hakim³, David G. Ousterout^{1,2}, Pratiksha I. Thakore^{1,2}, Eirik A. Moreb^{1,2}, Ruth M. Castellanos Rivera⁴, Sarina Madhavan^{1,2}, Xiufang Pan³, F. Ann Ran^{5,6}, Winston X. Yan^{5,7,8}, Aravind Asokan⁴, Feng Zhang^{5,9,10,11}, Dongsheng Duan^{3,12}, Charles A. Gersbach^{1,2,13,*}

REPORT

In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells

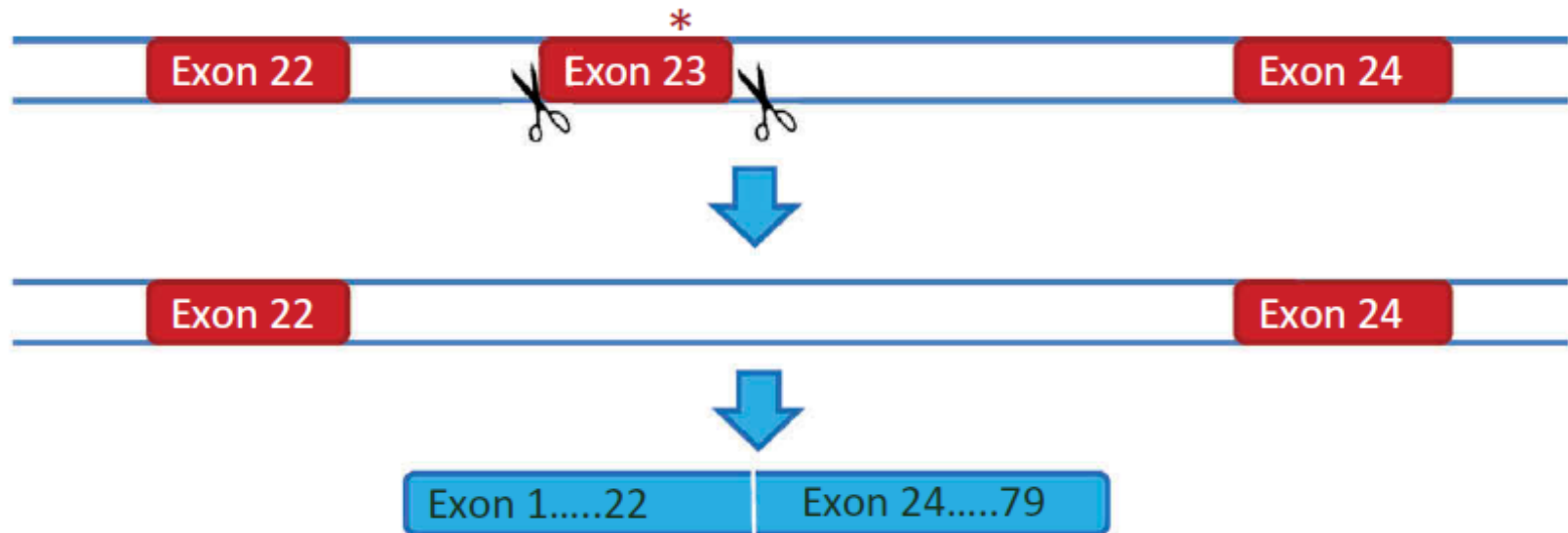
Mohammadsharif Tabebordbar^{1,2,*}, Kexian Zhu^{1,3,*}, Jason K. W. Cheng¹, Wei Leong Chew^{2,4}, Jeffrey J. Widrick⁵, Winston X. Yan^{6,7}, Claire Maesner¹, Elizabeth Y. Wu^{1,†}, Ru Xiao⁸, F. Ann Ran^{6,7}, Le Cong^{6,7}, Feng Zhang^{6,7}, Luk H. Vandenberghe⁸, George M. Church⁴, Amy J. Wagers^{1,‡}

REPORT

Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy

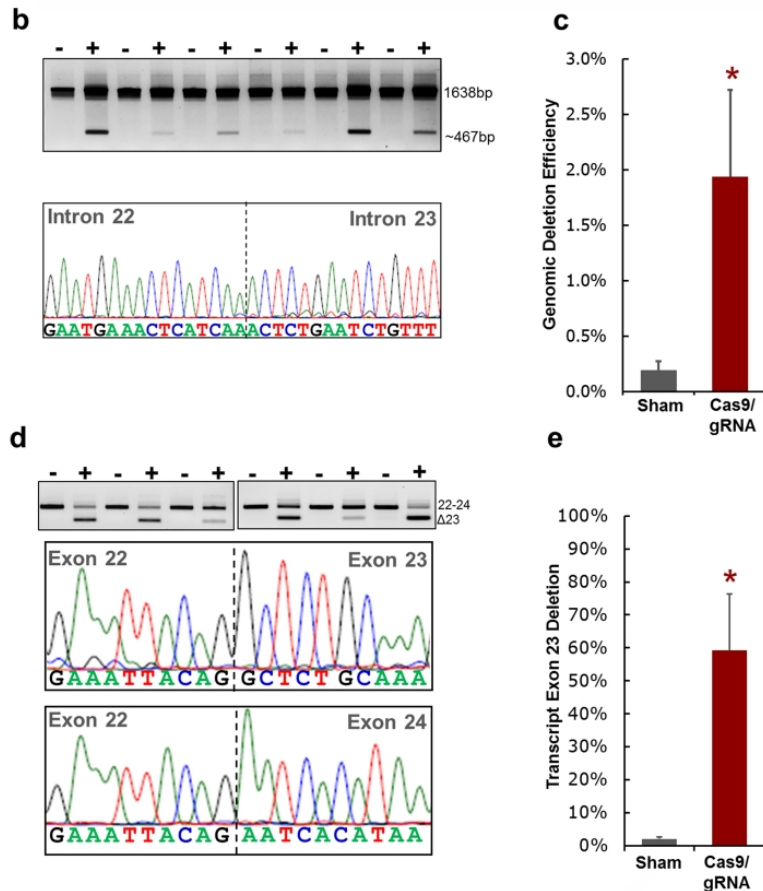
Chengzu Long^{1,2,3,*}, Leonela Amoasii^{1,2,3,*}, Alex A. Mireault^{1,2,3}, John R. McAnally^{1,2,3}, Hui Li^{1,2,3}, Efrain Sanchez-Ortiz^{1,2,3}, Samadrita Bhattacharyya^{1,2,3}, John M. Shelton⁴, Rhonda Bassel-Duby^{1,2,3}, Eric N. Olson^{1,2,3,†}

Wat is er gedaan in muizen?

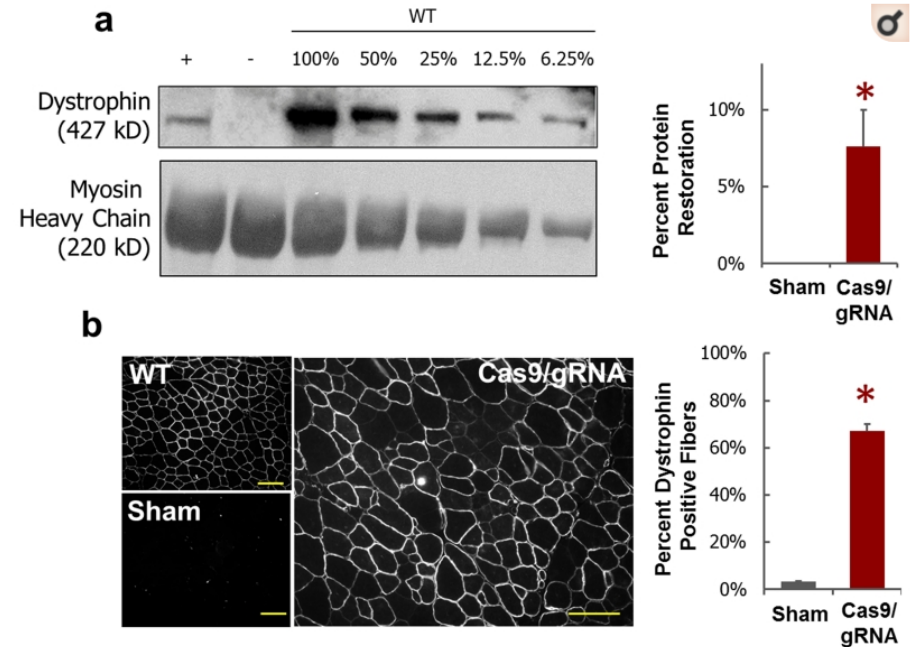


Resultaten in muizen

Locale toediening DNA en RNA analyse



Locale toediening Eiwit analyse



Nelson et al., Science 2016; 351: 403-7

Wat is er in muizen bereikt?

- Target deletie gemaakt
- Dystrofine hersteld
- Maar
 - Efficiëntie nog beperkt
 - Systemische toediening lastig: AAV nodig

Waarom zijn mensen zo enthousiast?

- Potentieel van de techniek
- Gericht ingrijpen op DNA
- Mogelijkheden die er eerst niet waren
 - Model systemen maken (cellen en diermodellen)
 - Therapie?
- Makkelijk (in cellen)
- Veel voorbeelden dat het werkt in DMD modellen
- Media hype
 - Voorbeeld: recente paper in Science
 - Locale behandeling (4 honden) en systemisch (2 honden)

Media hype

NEWS | IN DEPTH

BIOMEDICINE

In dogs, CRISPR fixes a muscular dystrophy

'Treatment repairs gene in beagles by further mutating it, but human trials are far off'

By Jon Cohen

Fighting fire with fire, researchers working with dogs have fixed a genetic glitch that causes Duchenne muscular dystrophy (DMD) by further damaging the DNA. The unusual approach, using the genome editor CRISPR, allowed a mutated gene to again make a key muscle protein. The feat—achieved for the first time in a large animal—raises hopes that such genetic surgery could one day prevent or treat this crippling and deadly disease in people. An estimated 300,000 boys around the world are currently affected by DMD.

The study monitored just four dogs for less than 2 months: more animal experi-

year to develop the potential treatment.

Olson says his team worked quickly not because of corporate ambitions, but rather to prove the concept before expanding to longer, more thorough dog experiments that ultimately are needed to launch human trials. The few animals initially studied, he adds, reflects sensitivities about experimenting with dogs. "We're very mindful of ethical concerns and have done our best to keep our use of dogs to an absolute minimum."

The *dystrophin* gene, the largest in the human body, contains 79 separate coding regions, or exons, that work together to create a protein that has 3600 amino acids. That much DNA offers a lot of opportunities for mutations that can cause DMD. But only one

would accidentally introduce errors to exon 51, leading its proteinmaking machinery to skip the exon altogether and produce a shortened but still functional dystrophin. (A newly approved drug for DMD, eteplirsen, promotes such exon-skipping as well, but its efficacy remains hotly debated.)

Another challenge was to alter billions of muscle cells throughout a living animal. So the team enlisted a helper: a harmless adeno-associated virus that preferentially infects skeletal muscle and heart tissue. Two 1-month-old dogs received intramuscular injections of the virus, engineered to carry CRISPR's molecular components. Six weeks later, these muscles were making dystrophin again. Those results led the researchers to

Downloaded from



Home > Health > CRISPR halts Duchenne muscular dystrophy progression in dogs

CRISPR Halts Duchenne Muscular Dystrophy Progression In Dogs

August 31, 2018

Vind ik leuk 23

MEGAN MOLTENI | SCIENCE 08.30.18 02:00 PM

More >

CRISPR HALTED MUSCULAR DYSTROPHY IN DOGS. ARE HUMANS NEXT?

CRISPR gene editing successfully stopped Duchenne muscular dystrophy in dogs and human trials are next

brian wang | August 31, 2018

Potentieel

- Exon skippen is tijdelijk effect
- Herhaaldelijk toedienen
- Code herstellen op DNA → permanent effect (?)
- Kan met genome editing
- Voordelen tov exon skippen:
 - Eenmalige behandeling (is dat echt zo?)
 - Kunt meerdere exonen verwijderen (inefficient)
 - Werkt ook voor duplicaties

Wat moet nog worden gedaan/uitgezocht?

- Toediening
 - Moet Cas9 en guideRNA toedienen aan alle spieren
 - AAV vectoren nodig
 - Zal minder efficient zijn dan gen additie
 - Twee componenten systeem en twee stappen nodig
 - Productie
- Efficiëntie
 - Momenteel vrij laag
- Veiligheid
 - Hoe specifiek zijn de Cas9 enzymen?
 - AAV vectoren integreren in DNA

“CRISPR Cure”

- Genetische code is hersteld
 - Becker achtig eiwit – deels functioneel
 - Dus geen genezing/cure
 - Stops spierdystrofie niet
- Tijd van behandeling
 - Verlies van spierweefsel en functie is niet reversibel
 - Code herstellen in vet/bindweefsel leidt niet tot dystrofine productie
 - Vroeg behandelen

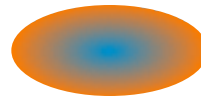
Genome editing bij embryo's

- Moet weten dat moeder draagster is
- Als je dit weet, kun je ook embryo selectie doen
- Minder risico en minder invasief

Genetische therapieën

- DNA niveau
 - Gen toevoegen
 - Genome editing
- DNA transcripten aanpakken (RNA)
 - Splice modulatie (exon skippen)
 - Stop codon readthrough

Stop codon read through



Translarna: goedgekeurd voor DMD



PTC THERAPEUTICS RECEIVES POSITIVE OPINION FROM CHMP FOR TRANSLARNA™ (ATALUREN)

- The first treatment for the underlying cause of Duchenne muscular dystrophy -

SOUTH PLAINFIELD, NJ – May 23, 2014 – PTC Therapeutics, Inc. (NASDAQ: PTCT) today announced that following its request for re-examination, the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) of the European Medicines Agency (EMA) has adopted a positive opinion regarding the company's application for a conditional

Stand van zaken in NL voor translarna

- Goedgekeurd in Europa voor ambulante patienten van 2 jaar en ouder
- Orale toediening
- Alleen voor stop mutaties (13% van patienten)
- Beschikbaarheid varieert per land (\$\$\$)
- In Nederland niet goedgekeurd door ZIN
 - Aangevraagd door PTC → afgekeurd
 - Opnieuw aangevraagd (met nieuwe gegevens) → ?

Samenvatting

- Goed gekeurde genetische therapieën
 - Eteplirsen (VS) en Translarna (Europa)
 - Beide niet op de markt in Nederland
- Genetische therapieën in klinische studies
 - Gen additie, exon skippen, translarna
- Genetische therapieën in pre-klinische fase
 - Genome editing