

Genetische therapie voor Usher syndroom: toekomstmuziek of...?

Erwin van Wijk
Usher symposium, Lent
28-09-2017



Usher syndroom: wat is het?

- Autosomaal recessief
- Prevalentie ~ 1: 20.000
- Klinisch:
 - a. Slechthorend/doof vanaf geboorte
 - b. Progressief verlies van zicht door RP
 - c. (Evenwichtsproblemen)
- 3 klinische typen
- 10 genen



(Charles Usher)



Type	Subtype	Chromosome	Gene
Usher I	USH1b	11	<i>MYO7A</i>
	USH1c	11	<i>USH1C</i>
	USH1d	10	<i>CDH23</i>
	USH1e	21	-
	USH1f	10	<i>PCDH15</i>
	USH1g	17	<i>SANS</i>
	USH1h	15	-
	USH1j	15	<i>CIB2</i>
	USH1k	10	-
Usher II	USH2a	1	<i>USH2A</i>
	USH2c	5	<i>GPR98/VLGR1</i>
	USH2d	9	<i>DFNB31</i>
Usher III	USH3a	3	<i>USH3</i>
	USH3b	20	-

myosin VIIa
USH1B

harmonin
USH1C

CDH23
USH1D

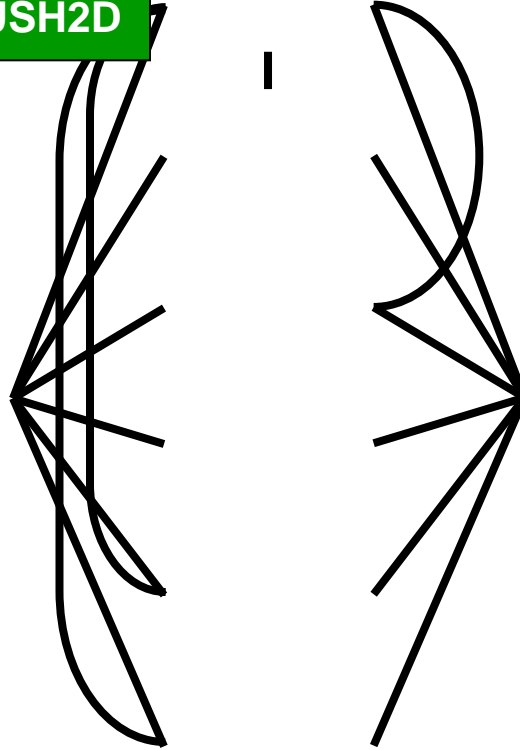
PCDH15
USH1F



SANS
USH1G

usherin
USH2A

GPR98
USH2C

whirlin
USH2D



 Usher type I
 Usher type II

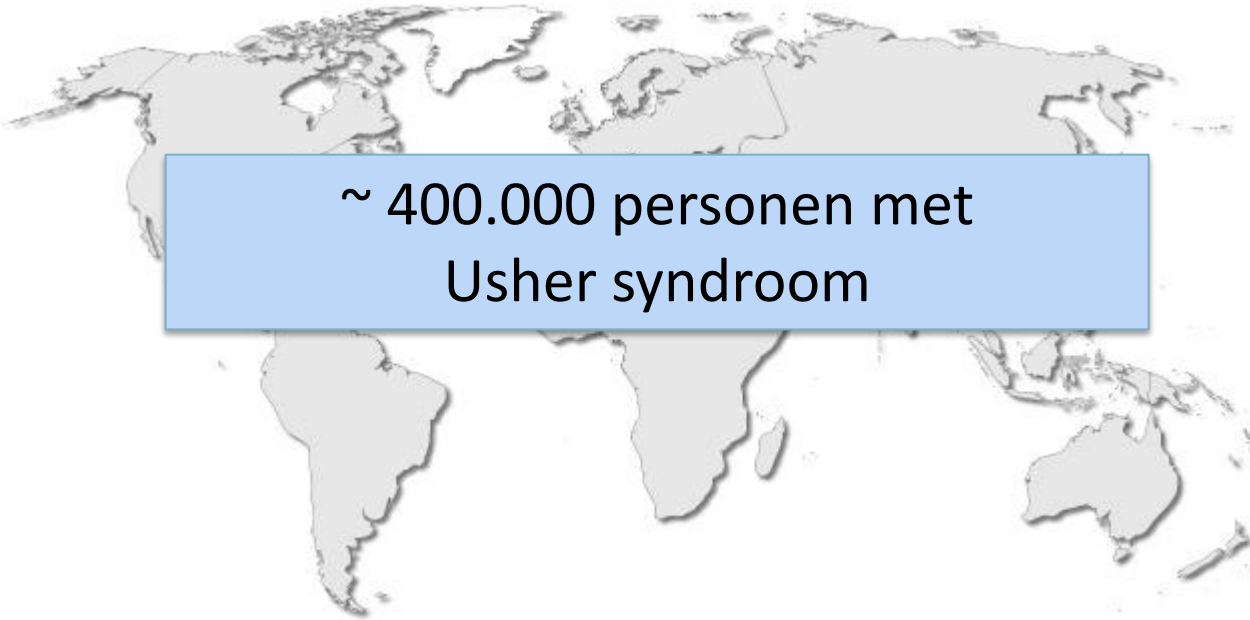
Netwerken



Als een netwerk niet meer functioneert...



Over hoeveel mensen praten we?



~ 400.000 personen met
Usher syndroom



Geen behandeling...



Usher syndroom: en dan?

A. Genetische testen:

Definitieve diagnose...

B. Genetische counseling:

Wat is het herhalingsrisico?

C. Hulpmiddelen:



Wat is nodig voor therapie ontwikkeling ?

1. Identificeren van de behoeften !

*** Contact met patienten is essentieel**

Wat gebeurt er op dit gebied?

Type	Subtype	Percentage %
Usher I	USH1b	14
	USH1c	2
	USH1d	7.5
	USH1f	4.5
	USH1g	2
	USH1j	0
Usher II	USH2a	52
	USH2c	10
	USH2d	3
Usher III	USH3a	3

Principe 1: Gen toevoeging

Type	Virus	Stand van zaken
USH1b	EIAV-Lenti (UshStat®)	<ul style="list-style-type: none">• Pre-klinische studies afgerond• Fase I/II klinische trial

Principe 2: Translational read-through

- “Doorlezen” van voortijdige STOP-mutaties tijdens vertaling in eiwit
- Specifiek geschikt voor STOP mutaties
- **Efficientie is laag...**

Type	Methode	Stand van zaken
USH1c	TRIDs (NB30, PTC124, NB54)	<ul style="list-style-type: none">• <i>In vitro</i> in cellijnen met de p.R31X mutatie• Organotypische retina kweken (Goldmann <i>et al.</i>, 2012)
USH1g	TRIDs	<ul style="list-style-type: none">• <i>In vitro</i> in cellijnen met de p.S243X mutatie (Sorusch <i>et al.</i>, 2017)
USH2a	TRIDs	<ul style="list-style-type: none">• <i>In vitro</i> in cellijnen met de p.W3955X mutatie (Neuhaus <i>et al.</i>, 2017)

Principe 3: Gen correctie

- Repareren van specifieke mutaties
- Mutatie-specifieke methode; geschikt voor zeer frequente mutaties
- **Efficientie is zeer laag; kans op off-target effecten**

Type	Methode	Stand van zaken
USH1c	ZNF nuclease	<ul style="list-style-type: none">• <i>In vitro</i> in cellijnen met de p.R31X mutatie• Efficientie erg laag... (Overlack <i>et al.</i>, 2012)
USH2a	CRISPR/Cas9	<ul style="list-style-type: none">• <i>In vitro</i> in cellijnen met de c.2299delG mutatie• Efficientie erg laag... (Fuster Garcia <i>et al.</i>, 2017)

Principe 4: Splice modulatie

- Corrigeren van **effect** van specifieke mutaties, of...
- Overslaan van gemuteerde exonen
- Exon-specifieke methode; geschikt voor frequent gemuteerde exonen
- **Efficient; expressie-niveau optimaal; kans op off-target effecten**

Type	Methode	Stand van zaken
USH1c	Splice correctie	<ul style="list-style-type: none">• Knock-in muis model met de c.216G>A mutatie• Herstel evenwicht en gehoor (Lentz <i>et al.</i>, 2012)
USH2a	Splice correctie	<ul style="list-style-type: none">• <i>In vitro</i> in cellijnen met de c.7595-2144A>G mutatie (Slijkerman <i>et al.</i>, 2016)
	Exon skipping	<ul style="list-style-type: none">• Zebraavis mutant met exon13 mutatie (Dona & Slijkerman <i>et al.</i>, in prep)

Overwegingen vooraf...

1. Functioneel model



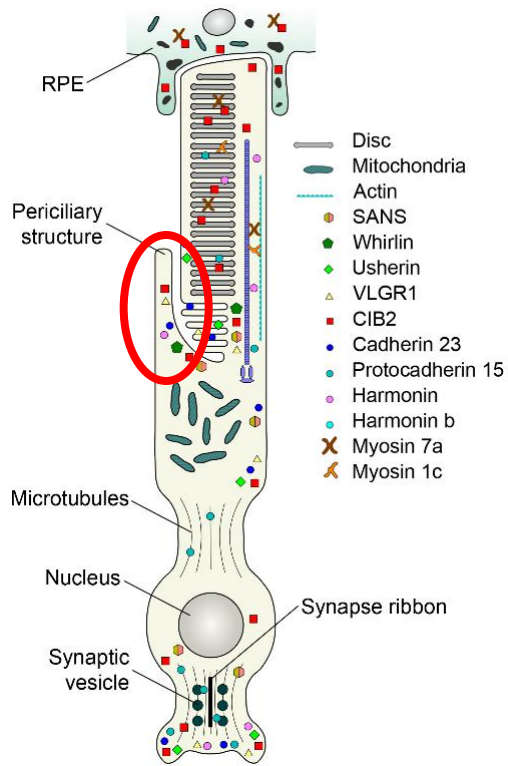
Muis~~X~~model ?

2. Strategie



?

Anatomie van fotoreceptoren



humaan

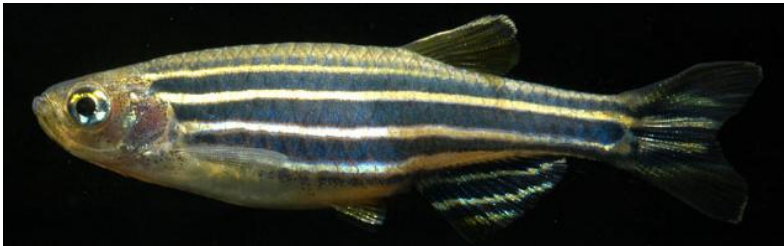


muis

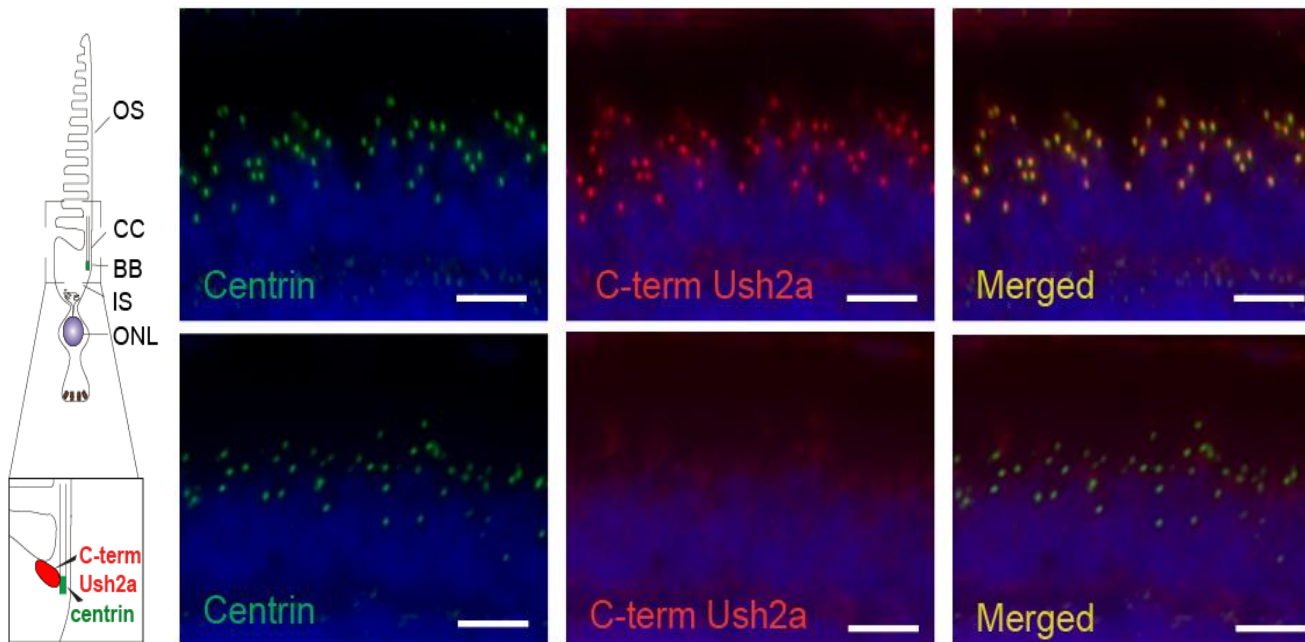


zebravis

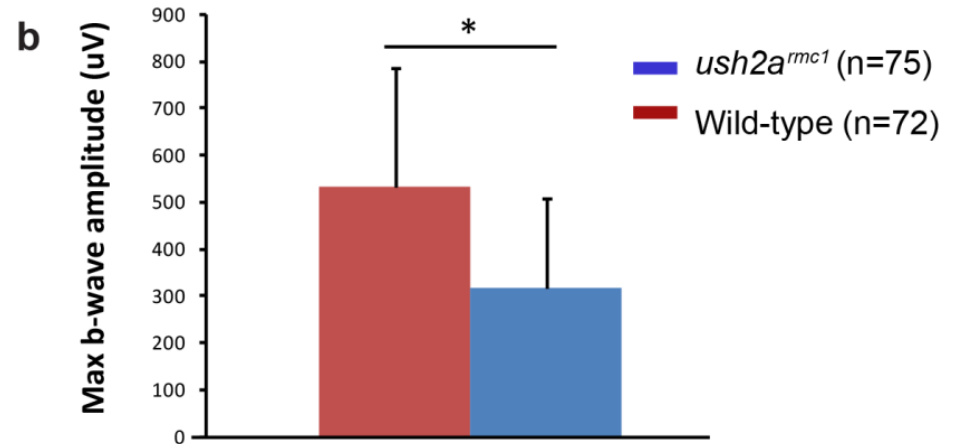
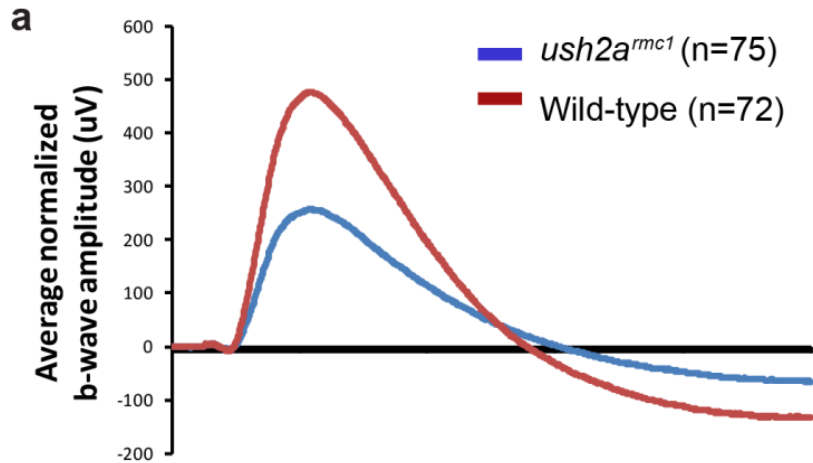
Ons model: zebravis



- *ush2a* aanwezig in zebravis genoom
- Humaan vs. zebravis USH2A:
gen- en eiwitstructuur zeer geconserveerd



Functioneel model: *ush2a^{rmc1}*



Welke therapeutische opties hebben we ?

Toevoegen ~~e~~ **X** van een kopie *USH2A* gen

Maar,

*Gen grootte (15,606 bp cDNA)...

2 founder mutaties in exon 13...



Gen ~~reparatie~~ **X**

Maar,

*Off-target effecten?

*Mutatie specifiek

*Efficientie?

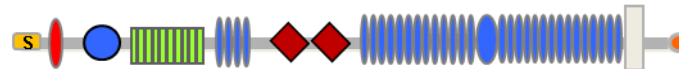
*Niet klaar voor gebruik in de mens

Strategie: exon-skipping !

mRNA

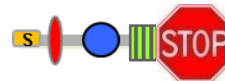
Eiwit

Functie ?

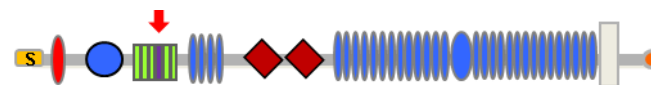
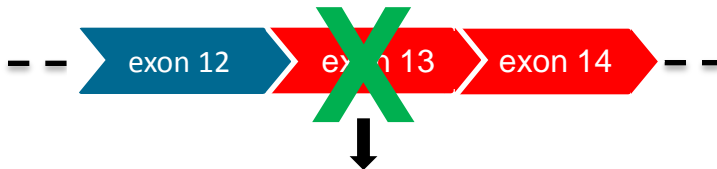


++

Mutatie



-



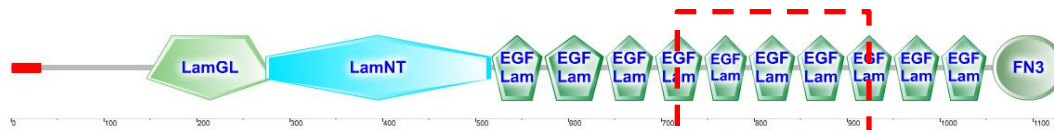
+ ?

In frame skipping

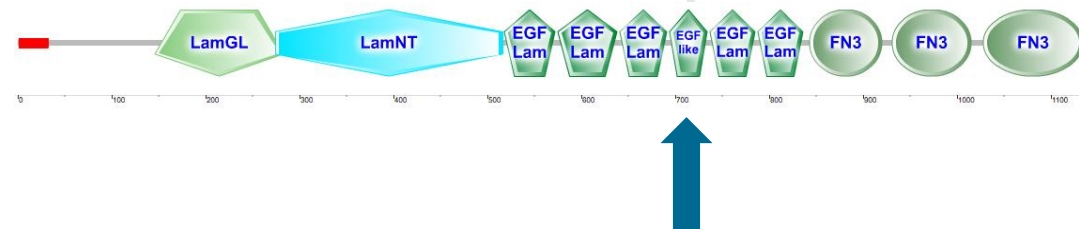


Computer voorspellingen...

Normaal Ush2a



Ush2a Δ exon13



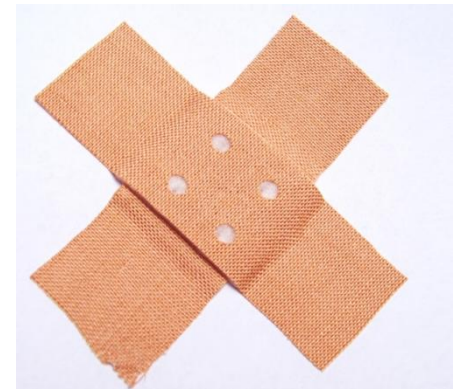
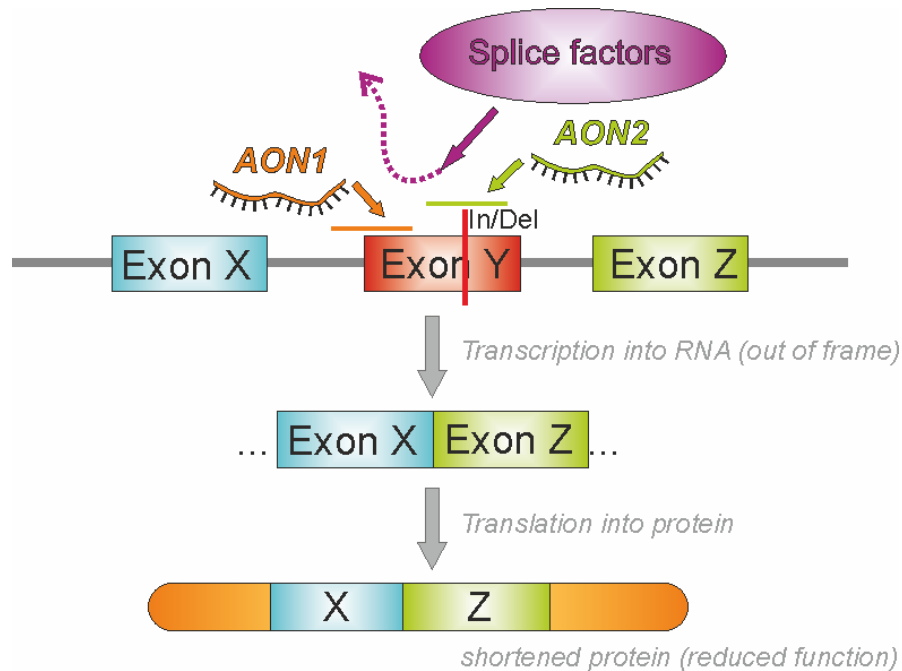
- EGF Lam domeinen 5, 6 and 7 verdwijnen
- Fusie van EGF Lam domeinen 4 and 8 tot een EGF-like domein

Hoe bepalen we het effect van *ush2a* Δ ex13 op visuele functie → zebavis model !

Vraagstellingen

- **1) Kunnen we specifiek *ush2a* exon13 skippen?**
 - Ontwerpen en testen van AONs tegen *ush2a* exon13
- **2) Is het resulterende eiwit (gedeeltelijk) functioneel?**
 - Terugkeer van Ush2a expressie op de juiste plek ?
 - Verbetering van visus (ERG metingen) ?

Antisense oligonucleotides (AON)



- Complementair aan pre-mRNA
- Voorkomt binding van splice factoren → overslaan van exon tijdens splicing!

Samenvatting

- Het Ush2a eiwit is afwezig in het netvlies van het *ush2a^{rmc1}* model
- Het *ush2a^{rmc1}* model heeft al zeer vroeg problemen met zijn visus
- Skipping van exon13 resulteert in:
 - a. (Gedeeltelijke) terugkeer van Ush2a expressie op de juiste plaats in fotoreceptoren
 - b. Een hersteld ERG patroon !

Exon13-skipping is veelbelovend als methode voor de ontwikkeling van een toekomstige behandeling voor *USH2A*-gerelateerde netvlies degeneratie.

Farmaceutische industrie stapt in !

Nijmegen, 02 mei 2016



Samenwerking Radboudumc en ProQR bij ontwikkeling nieuwe therapie voor Usher syndroom

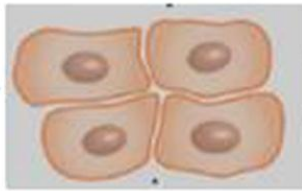
RNA-therapie voor netvliesdegeneratie door USH2A-mutatie

Het Radboudumc en ProQR Therapeutics uit Leiden hebben een samenwerkingsovereenkomst getekend. Via deze samenwerking willen ze een RNA-therapie voor patiënten met Usher syndroom sneller gaan ontwikkelen.

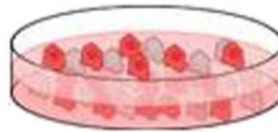
Vertaalslag naar juiste context...



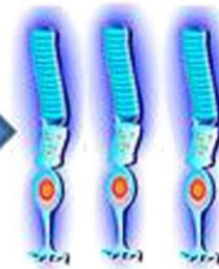
**USH2A
patient**



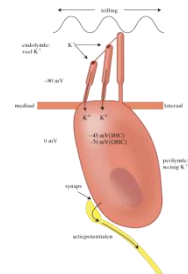
**Fibroblasten
uit huid biopt**



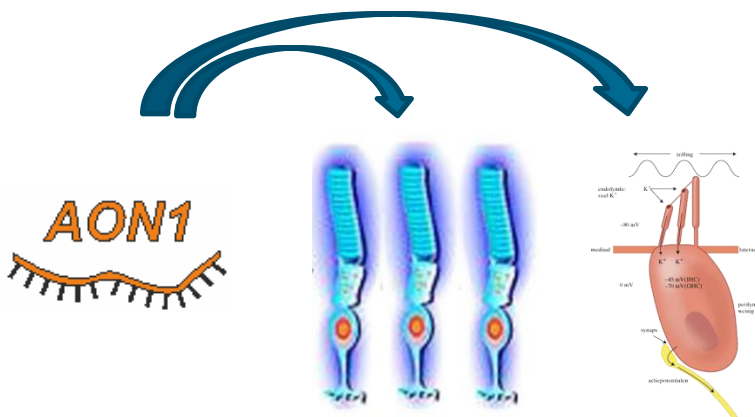
**Stam cellen
[iPSC]**



**Fotoreceptor- en
haarcel-like
cellen
(met mutatie!)**



Follow-up



**Fotoreceptor- en haarcel-like
cellen
(met mutatie!)**

- 1) Functioneel ?**
(splice correctie/vis)
- 2) Specifiek ?**
(off target effecten)
- 3) Veilig ?**
(toxiciteit)

Fase I/II klinische trials !



Radboudumc

Rob Collin
Ronald Pennings
Bas Hartel



ProQR Therapeutics

Hester van Diepen
Peter Adamson

University of Oregon

Jennifer Phillips
Monte Westerfield

University of Zürich

Stephan Neuhaus

NIN, Amsterdam

Maarten Kamermans



**Foundation
Fighting BlindnessSM**

Driving research to save and restore sight



**STICHTING WETENSCHAPPELIJK
ONDERZOEK DOOFBLINDHEID**

