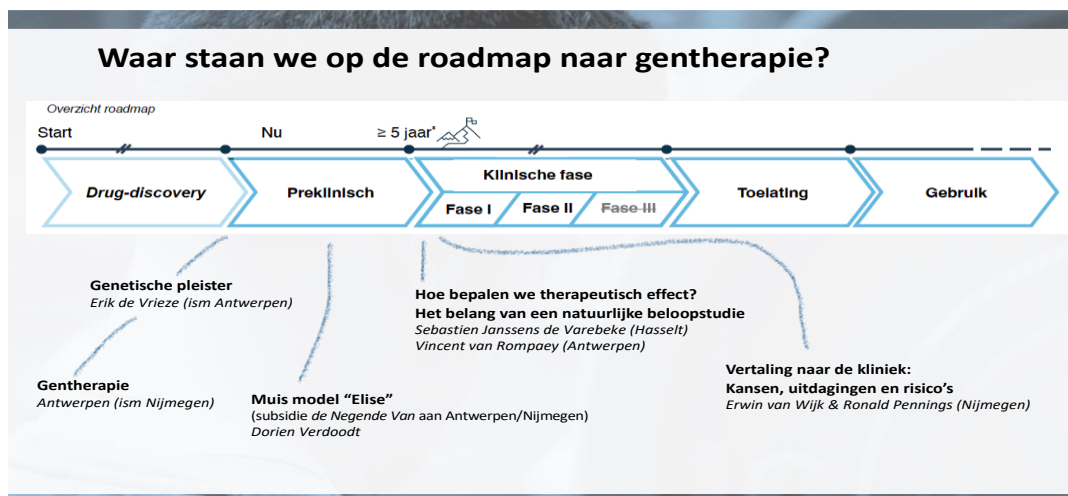


Presentatie Erik de Vrieze



Mooi om na 3 jaar in Antwerpen hier weer te staan en te vertellen waar we met het wetenschappelijk onderzoek nu staan. De stichting heeft een route kaart laten opstellen, met de beschikbaarheid van een therapie voor DFNA9 als einddoel.

Dit is de route kaart.



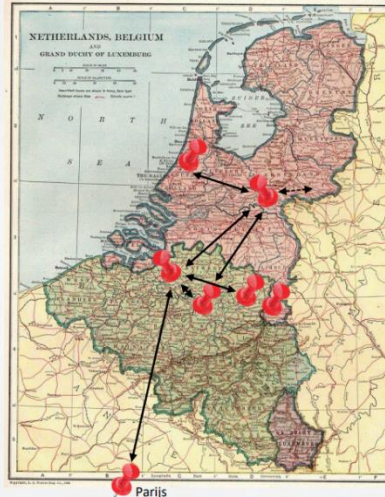
Waar staan we op de routekaart? Ik spreek niet alleen namens mij, maar namens alle wetenschappelijke onderzoekers die werken aan een therapie voor DFNA9.

Routekaart naar behandeling voor DFNA9

1998: "ontdekking" COCH gen
1999: "ontdekking" P51S mutatie

2017: eerste kennisdag de Negende Van

Verbindende rol "De Negende Van" in wetenschappelijk onderzoek

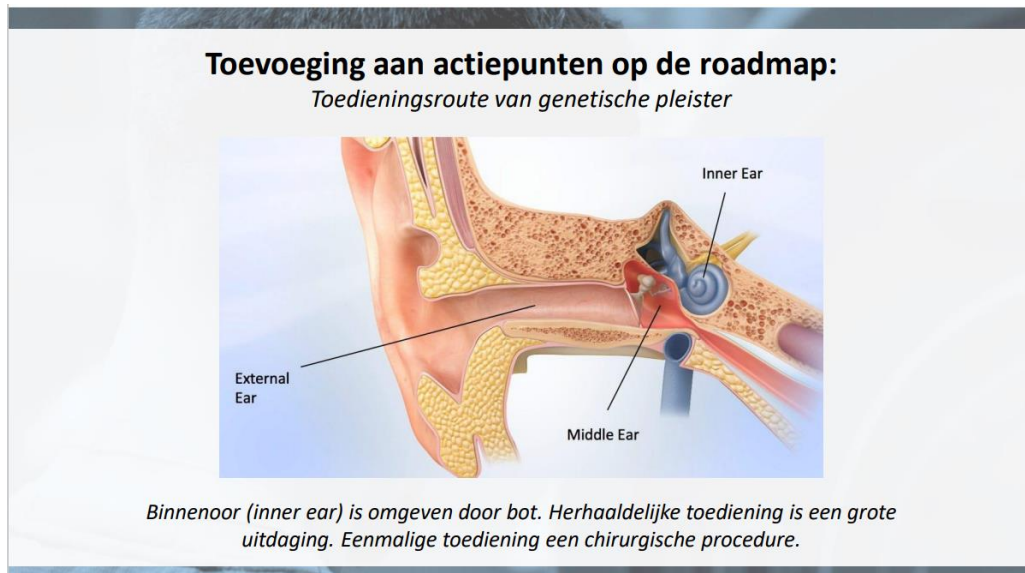


Het project begon in 1998 met ontdekking van de P51S mutatie. Onderzoek in die periode was vooral gericht op: wat is de ziekte? Hoe is het klinisch beeld? De gen mutatie was inmiddels bekend, maar technieken voor de ontwikkeling van een gentherapie bestonden toen nog niet.

In 2017 was de eerste Kennisdag, en rond die tijd concentreerde het onderzoek naar DFNA9 zich op deze 2 plekken (Antwerpen en Nijmegen). Maar inmiddels ziet de kaart er zo uit, we zijn van 2 wetenschappelijke centra wel aardig gegroeid, we (Nijmegen) hebben een samenwerking met Leiden, vanuit Antwerpen lopen lijntjes naar Parijs en Leuven. En ook in Maastricht en Hasselt gebeurt inmiddels onderzoek naar DFNA9. En wat ook heel bijzonder is, we werken samen en zijn niet elkaars concurrenten. Dit is een belangrijke verdienste van de stichting. Met name Arthur en Jan en Tim zijn constant bezig ons op de juiste spoor te houden, zodat we samen werken. En zodat we samen voor jullie werken, en zo de nodige stappen zetten om zo snel mogelijk het einde van de routekaart bereiken. Ik zal in mijn presentatie wat vertellen over de genetische pleister, een van de mogelijkheden in de toekomst om DFNA9 te behandelen. Maar de genetische pleister is niet de enige therapie waar aan gewerkt wordt. We werken samen met Antwerpen, en zij nemen het voortouw in de ontwikkeling van een gentherapie. Dorien Verdoodt zal daar meer over vertellen.

De gentherapie is nog in een eerdere fase dan de genetische pleister. Daarom vertellen we vandaag in detail hoe de genetische pleister werkt, en wat er moet gebeuren voordat we deze in patiënten kunnen gaan testen. Om dat te bereiken, is niet alleen therapie van belang, we moeten ook een geschikt model hebben om de werkzaamheid van de therapie te testen. Hiervoor gebruiken we proefdieren. Daar zal Dorien Verdoodt wat meer over vertellen. Goed om te weten dat we, naast de ontwikkeling van een therapie, ook gestart zijn met de ontwikkeling van een muismodel. Op deze manier kunnen we het proces versnellen. En als we dan eindelijk zo ver zijn dat we studies in mensen mogen gaan doen, hoe tonen we aan dat het werkt? Dat is ook een belangrijk deel van de route naar een behandeling. Daar wordt op ingesprongen door onderzoekers in Hasselt en Antwerpen, door Vincent van Rompaey en Sebastien Janssens de Vaerebeke.

Dus naast de ontwikkeling van de therapie zelf, wordt ook hard gewerkt om de andere gaten in onze kennis in te vullen, en obstakels te overwinnen. Op deze manier kunnen we zo snel mogelijk door naar het eind van de routekaart. Maar... het is niet allemaal rozegeur en maneschijn, het is een lange en moeilijke weg met veel obstakels. In Nijmegen hebben we deze route al eerder (deels) afgelegd voor Usher Syndroom. Erwin van Wijk en Ronald Pennings zullen aan het einde van de middag hun ervaringen met dit proces delen, en een eerlijk en kritisch beeld schetsen over de mogelijke obstakels op de weg naar een behandeling voor DFNA9 je kunt verwachten in de route.



Voordat ik met mijn het stuk over de genetische pleister, wil ik graag één ding toevoegen aan de route kaart. We hebben het over gentherapie voor het binnenoor. En u weet: het binnenoor zit goed verpakt in het bot van onze schedel. U zit dat op het plaatje. Wat voor behandeling we ook zullen ontwikkelen voor DFNA9, of voor gehoorverlies in algemeen, iedere therapie zal wel in het binnenoor afgeleverd moeten worden. En dat is op dit moment de grote uitdaging, voor DFNA9, maar ook voor gehoorverlies onderzoek in algemeen.

Voor zover de algemene introductie over het wetenschappelijk onderzoek dat we met zijn allen aan het doen zijn.

Waar staan we op de roadmap naar gentherapie?

Genetische pleister voor DFNA9


Erik de Vrieze

Afdeling KNO

Radboudumc, Nijmegen



Nu de genetische pleister. Toen ik een paar jaar geleden in Antwerpen voor dezelfde groep stond kon ik er nog niet veel over zeggen. We stonden toen op het punt stonden om een patent in te dienen. Tot die tijd moest alles nog geheim blijven. Kort na de kennisdag in Antwerpen konden we ons onderzoek publiceren in een wetenschappelijk tijdschrift en vertellen aan de wereld. Dit is een screenshot van het de publicatie.



Genetische pleister

Voorjaar 2021: eerste wetenschappelijke publicatie ontwikkeling
"genetische pleister"

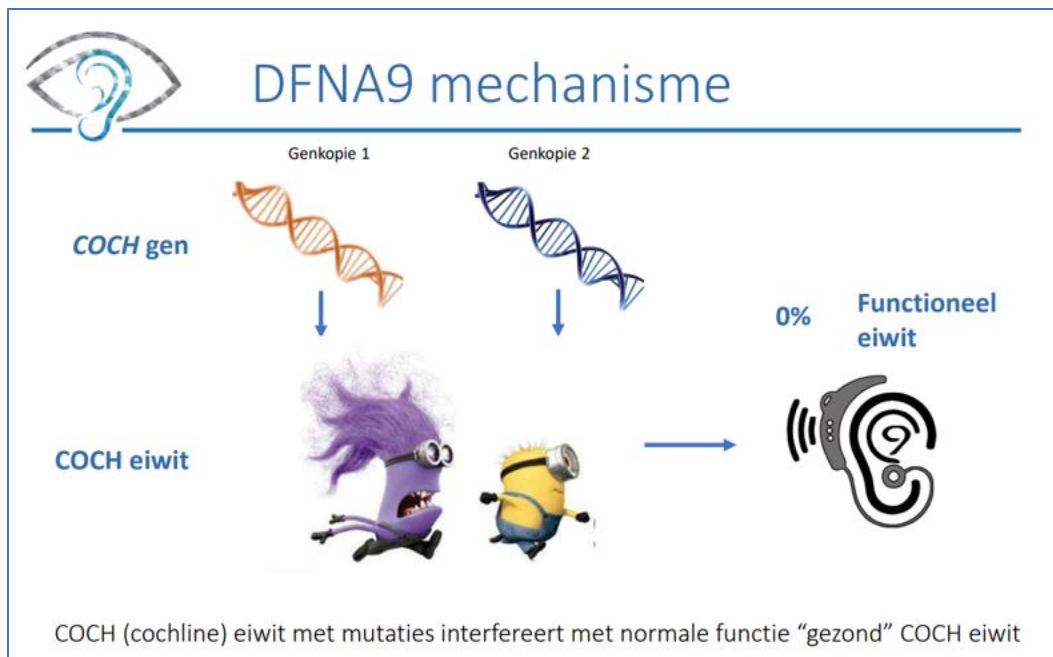
AON-based degradation of c.151C>T mutant
COCH transcripts associated with dominantly
inherited hearing impairment DFNA9

Erik de Vrieze,^{1,2} Jorge Cañas Martín,¹ Jolien Peijnenborg,¹ Aniek Martens,¹ Jaap Oostrik,^{1,2} Simone van den Heuvel,³
Kornelia Neveling,^{3,4} Ronald Pennings,^{1,2} Hannie Kremer,^{1,2,3} and Erwin van Wijk^{1,2}

¹Department of Otorhinolaryngology, Radboud University Medical Center, 6525 GA Nijmegen, the Netherlands; ²Donders Institute for Brain, Cognition, and Behaviour, Radboud University Medical Center, 6525 GA Nijmegen, the Netherlands; ³Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, 6525 GA Nijmegen, the Netherlands; ⁴Radboud Institute for Health Sciences, Radboud University Medical Center, 6525 GA Nijmegen, the Netherlands

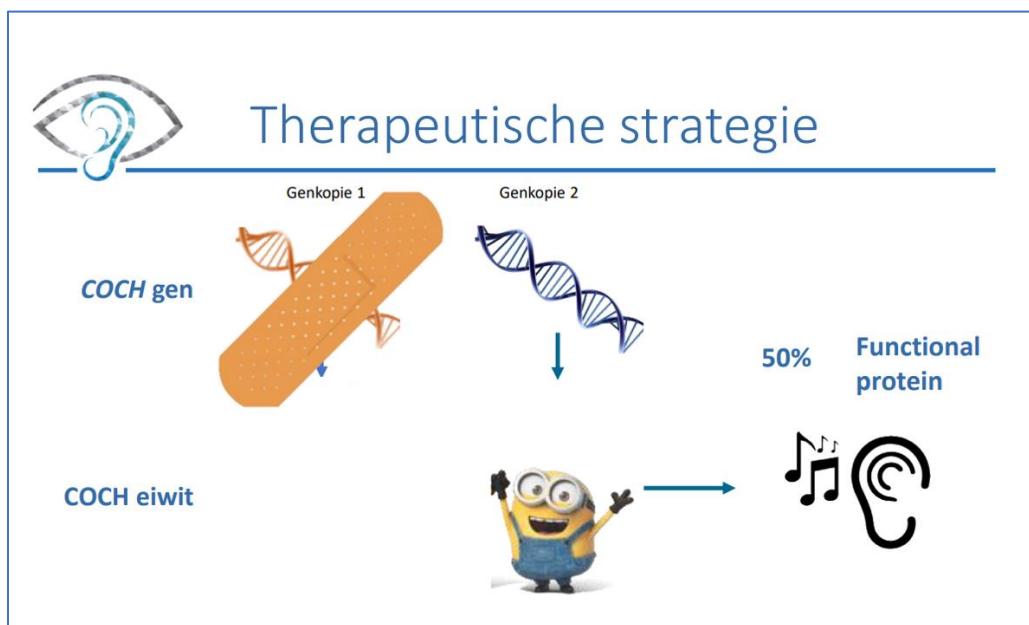
Frequente P51S mutatie

Ik heb die in de presentatie opgenomen om te benadrukken dat de genetische pleister die we ontwikkelen specifiek bedoeld is voor deze mutatie: c.151C>T, ook wel P51S genoemd. Dit is de mutatie die het grootste deel van de mensen met DFNA9 heeft, maar er zijn ook mensen met een andere mutatie. Als we succes hebben voor deze mutatie is vertaalslag naar de andere varianten natuurlijk ook de maken. Die andere mutaties zijn veel zeldzamer, wat de keuze voor P51S natuurlijk wel de logische route maakt.



Hoe werkt het dan zo'n genetische pleister?

Als u in 2019 of 2018 of 2017 hier was, heeft u deze slide al gezien. Ik zal het mechanisme achter DFNA9 nog even kort aanstippen om de werking van de genetische pleister uit te kunnen leggen. Bij DFNA9 hebben mensen één gen-kopie met een mutatie, weergegeven in oranje. Deze mutatie zorgt voor de vorming van eiwit met storend functie in het binnenoor. Het tweede genkopie is gezond, maar kan door de verstoring zijn functie niet uitvoeren. En daardoor ontstaat DFNA9.



De oplossing klinkt simpel: we plakken het verkeerde gen af en daarmee kan het gezonde eiwit zijn werking doen. En dat is precies wat de genetische pleister (zoals we dat noemen), moet gaan doen.



Genetische pleister (AON)

Stoppen van de vertaling van het gemuteerde COCH gen

Geen echte pleister

Officiële naam:

Antisense oligonucleotide (AON of ASO)

- Synthetisch, kort DNA/RNA molecuul
- Ontwikkeld om specifiek het mutant COCH gen af te schermen
- Tijdelijke werkzaamheid – itt gentherapie waar werkzaamheid blijvend is

De genetische pleister is niet letterlijk een pleister. De officiële naam is antisense oligonucleotide. Een term die je meteen mag vergeten. We korten het vaak af als AON of ASO in het Engels. Het is een heel klein stukje erfelijke informatie die we specifiek ontwikkeld hebben om het gemuteerde COCH gen af te schermen. Deze therapie is tijdelijk van werkzaamheid en daardoor kunnen we vrij veilig werken. Als het rare bijwerkingen heeft, raakt het uitgewerkt en kun je stoppen met de behandeling. In Antwerpen werken ze aan een gentherapie waarbij het werkzaamheid blijvend zou moeten zijn en dat de werking blijvend is.

We hebben in Nijmegen gekozen voor de genetische pleister. Deze technologie achter de genetische pleister heeft zich meermaals bewezen. Er zijn verschillende andere therapieën die op dezelfde techniek berusten die inmiddels door de EMA goedgekeurd zijn. Ook voor mensen met Usher syndroom hebben we met deze techniek een behandeling ontwikkeld die inmiddels in de kliniek getest wordt. Zodoende was het voor ons logisch om van deze technologie gebruik te maken.



Genetische pleister

De technologie van de genetische pleister / antisense oligonucleotide heeft zich al veelvuldig bewezen in klinisch onderzoek

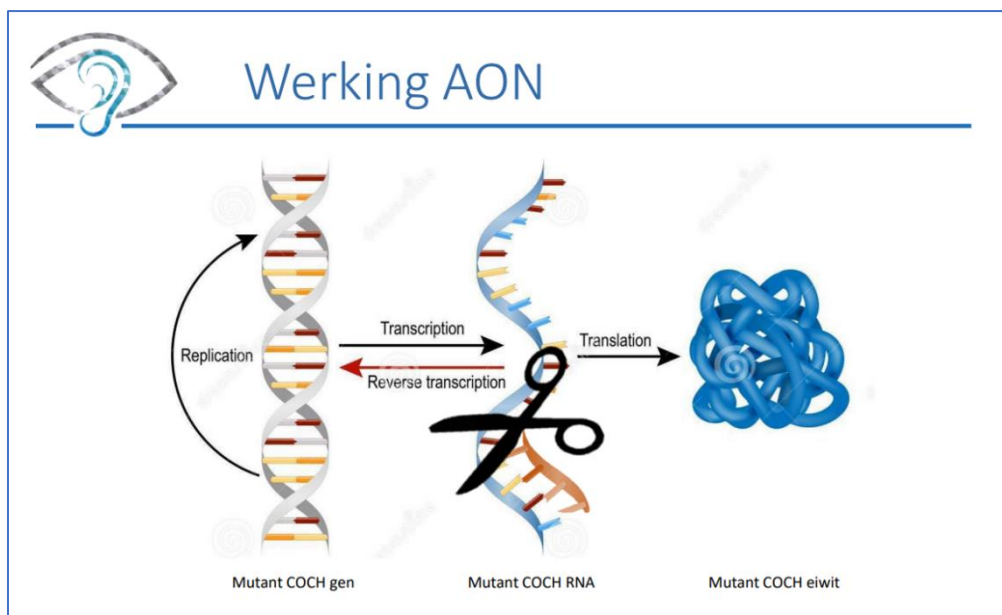
The screenshot shows a news article from 'Waylivra' with the following content:

- Waylivra (Share, RSS) AUTHORISED
- Tegsedi (Share, RSS) AUTHORISED
- Spinraza (Share, RSS) AUTHORISED
- STELLAR logo
- ProQR heeft positieve resultaten gepubliceerd van hun Fase 1/2 Stellar klinische studie naar QR-421a, een onderzoekstherapie voor de behandeling van Ushersyndroom en retinitis pigmentosa (RP) als gevolg van mutaties in exon 13 van het *USH2A* gen.
- Small text: 'This medicine is authorised for use in the European Union.'

We hebben in ons lichaam DNA, wat de informatie bevat voor alles wat in ons lichaam gebeurt. Maar DNA, het bouwplan, is uniek in iedere cel. Er zijn geen kopieën van deze informatie aanwezig, dus moet je er zuinig op zijn. Als je een huis gaat bouwen neem je ook niet je enige tekening mee. Als het kapot gaat weet je niet meer waar je je muurtje moet zetten. Een kopie, het RNA, dat is wat ons lichaam gebruikt als kopietje van het DNA, en als basis van de productie van eiwitten (de functionele bouwstenen van het lichaam).



Werking AON



Een klassieke gentherapie zal aangrijpen op het DNA. Met de genetische pleister grijpen we aan op het RNA. Hier schematisch weergegeven. De genetische pleisters bindt het gemuteerde COCH RNA, en dan knipt hij het RNA kapot. Daardoor kan logischerwijs het storende eiwit niet gevormd worden, want de bouwtekening is niet compleet. Dus dat is wat we proberen te doen en dit is dus een elegant proces waarbij we niet op het DNA hoeven in te grijpen.



Vroege ontwikkelingsfase

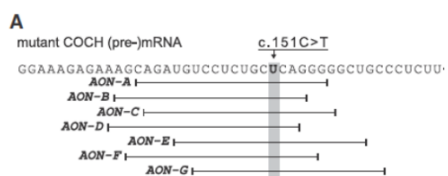


De totstandkoming van de therapie of het molecuul dat we ontwikkeld hebben, zal ik in een paar stappen laten zien. We hebben veel tests in gekweekte cellen gedaan. In de flesjes zit vloeistof waar de cellen graag leven en als we zo'n flesje onder de microscoop leggen, zien we op de foto cellen afkomstig van een DNFA9 patiënt.

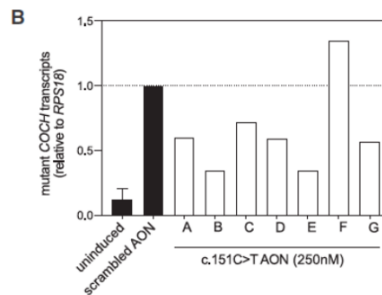


Eerste tests werkzaamheid

Ontwerp genetische pleisters (AONs)



Test of afbraak mutant COCH

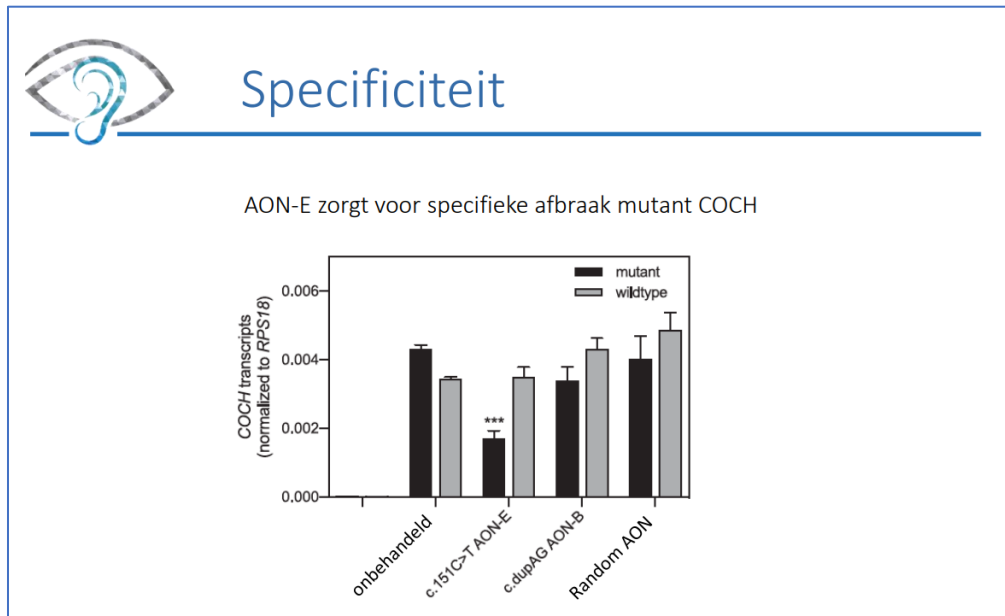


Ter vergelijking:

gezond COCH: AGCAGATGTCCTCTGC CAGGGGGCTGCCCTCTT
mutant COCH: AGCAGATGTCCTCTGC TAGGGGGCTGCCCTCTT

En in die cellen hebben we aangetoond dat het molecuul doet wat hij moet doen, mutant COCH RNA kapot knippen. De pleister teken je niet zomaar. We hebben er een aantal ontwikkeld waarvan we voorspelden dat ze goed in staat zouden moeten zijn om specifiek het RNA van P51S mutant COCH te herkennen. En die mutatie is een zeer subtiel verschil. Je ziet een stukje COCH gen. In groen is zoals het is in de gezonde situatie. Die mutatie, de T (in rood) is het probleem. Je ziet meteen dat de flankerende informatie identiek is. Het is niet eenvoudig om iets te ontwikkelen wat specifiek deze wijziging, die T herkent, maar niet de C.

En we willen immers voorkomen dat het gezonde COCH eiwit niet langer gevormd wordt, want complete afwezigheid van COCH leidt ook tot gehoorverlies.



We hebben het getest, de resultaten zie je op de slide. We zien dat, in vergelijking met de controle (onbehandelde cellen) dat wanneer we genetische pleister type B of E toedienen, we het mutant COCH RNA goed kunnen afbreken.

Vervolgens is ook van belang wat ik zojuist noemde: we moeten het gezonde COCH RNA niet afbreken. We hebben studies gedaan of de genetische pleister dus in staat is om specifiek mutant COCH RNA af te breken. Je ziet in de zwarte balken van de grafiek het mutant RNA en in grijs het gezonde. En als we de AON toevoegen aan deze cellen, is er 60% reductie van het mutant COCH RNA. De hoeveelheid gezond RNA neemt niet af. Een van de andere AONs was een stuk minder potent. Een AON met random informatie deed helemaal niets. En dat toont aan dat het effect wat we zien echt specifiek aan de genetische pleister is toe te schrijven.

Kanttekeningen

- Studies in gekweekte “laboratorium” cellen – niet “patiënt-eigen”
- Gewenst effect, maar studies van korte duur. Wat is het effect na weken/maanden?
- Effecten op gehoorverlies nog niet onderzocht
- Genetische pleister voor mensen met de c.151C>T (P51S) mutatie

Dit zijn hele mooie en veelbelovende ontwikkelingen maar ik wil ook voor jullie daar een paar kanttekeningen blij plaatsen: het is een studie in gekweekte laboratorium cellen. En de

studies die we uitvoeren in het lab zijn van korte duur. U heeft er niks aan dat u na een dag na het toedienen de werkzaamheid is verloren. Dus het is goed om te kijken naar het effect van het toedienen na vele weken en maanden. Daarnaast hebben ook het effect op gehoorverlies nog niet kunnen onderzoeken. Daar hebben we de het muismodel voor nodig (daarover later meer). En de genetische pleister is nu gericht tegen de P51S mutatie. Later kunnen we ze hopelijk ook gaan ontwikkelen voor andere mutaties.



Dan nu terug naar de roadmap: waar staan we nu? Wat gaan we in Nijmegen specifiek doen? En wat gebeurt er in de samenwerkingen? De eerste stap is het verbeteren van de AON voor een nog sterkere afbraak van het mutant COCH RNA. Je zag in het figuur een halvering. We kunnen al het mutant COCH RNA laten afbreken, maar dat gaat ten koste van het gezonde RNA. Dat willen we niet. Met chemische aanpassingen van de pleister kunnen we de specificiteit verder verbeteren.

Daarnaast zijn we recent een samenwerking gestart met de Universiteit van Leiden. We hebben een onderzoeksbeurs gekregen om mini oortjes te kweken van patiënt cellen. En om op deze mini oortjes in een kweekschalpje de genetische pleister te gaan testen. En ik hoop dat we snel kunnen starten met onderzoek naar de werking van de genetische pleister in diermodellen. Zodat we, in samenwerking met de Universiteit van Antwerpen, ook echt kunnen aantonen dat we gehoorverlies kunnen voorkomen met deze behandeling. En dat is denk ik wel het perfect bruggetje naar de muismodellen van Dorien.. Dank u wel!