

Development of novel therapy for osteogenesis imperfecta
Voortgangsrapportage Augustus 2018
Projectleiders Gerard Pals en Dimitra Micha

Overzicht

Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor Osteogenesis Imperfecta (OI). Het onderzoek bestaat uit twee verschillende projecten. Het eerste project focust zich op de stimulatie van collageenproductie. Dit is een zinvolle therapie voor patiënten met OI type I waarbij er minder collageen wordt geproduceerd in het bot. Het tweede project richt zich op de genetische manipulatie van het collageen gen met een mutatie, wat leidt tot structureel abnormaal collageen en bijgevolg een ernstige vorm van OI. De nieuwigheid van dit project is de combinatie van de twee benaderingen om zo een maximaal therapeutische voordeel te behalen. Aangezien elke OI familie een andere mutatie heeft, is het behandelen van elke aparte mutatie een gelimiteerde therapie. Met onze aanpak elimineren we de kopie van het collageen gen die de mutatie heeft. Dit zou tot een mildere ziekte leiden, gelijkend op OI type I. Deze patiënten zullen nog steeds een werkend collageen-producerend gen hebben zoals de patiënten met OI type I. We willen de collageenproductie van dit werkende gen stimuleren met FDA-goedgekeurde middelen die we geïdentificeerd hebben. Daarnaast wordt onderzocht of in de ernstige vormen van OI chemische chaperonnes effect kunnen hebben. Dit zal in vitro worden getest met gekweekte cellen van patiënten. Hieronder wordt meer informatie gegeven over de vooruitgang van elk project.

Het muismodel project

Het doel van dit onderzoek is om verschillende FDA- goedgekeurde middelen in muizen te valideren. We hebben ontdekt dat deze componenten collageenproductie stimuleren in gedifferentieerde botcellen van OI type I patiënten. We willen onze bevindingen in gekweekte cellen bevestigen in een OI type I muismodel en we zullen onderzoeken of deze therapie de botkwaliteit en botsterkte in muizen kan verbeteren. De toxiciteit en ongewenste effecten in andere weefsels of organen zullen ook grondig onderzocht worden om de veiligheid te evalueren.

Gebaseerd op de in vitro resultaten, hebben we 5 FDA-goedgekeurde middelen geselecteerd om *in vivo* te testen in het OI type I muismodel (MOV-13). Dit muismodel is fenotypisch sterk gelijkend op het fenotype van OI type I in de mens. Dit muismodel heeft minder collageen, zwakke beenderen en vertoont progressief gehoorverlies. In dit proefdieronderzoek zal specifiek onderzocht worden of toename in collageenproductie ook resulteert in een activatie van de osteoblasten, toename van de botmassa, verbetering van de botstructuur en verbetering van de botkwaliteit (sterkte). Een 20-tal muizen zullen aangekocht worden. Vervolgens zullen we met de muizen kweken tot we het benodigde aantal muizen hebben voor de pilotstudies en voor het eigenlijke onderzoek erna.

Promovenda Lauria is momenteel bezig met het opstellen van de aanvraag bij de Centrale Commissie Dierproeven (CCD) voor het verkrijgen van een vergunning voor de uitvoering van de nodige dierproeven. Deze vergunning zorgt ervoor dat de dierproeven volgens de Wet op de dierproeven en de Europese richtlijn voor dierproeven worden uitgevoerd. De CCD zal ook de wetenschappelijke kwaliteit van onze proeven controleren (bijvoorbeeld of het aangevraagde aantal muizen echt nodig is om het onderzoek uit te voeren). De vergunning van de CCD is vereist om te kunnen starten met de dierproeven. Op 19 september zal de CCD beslissen of onze aanvraag aanvaard wordt. Hierna kunnen we de muizen bestellen bij het Amerikaanse bedrijf The Jackson Laboratory. Aangezien de muizen gecryopreserveerd zijn, zal het minimaal 5 maanden duren voordat we deze ontvangen. De voorstudies (toxiciteit studies) zullen pas ten vroegste 3 maanden later kunnen starten, rekening houdend met het kweekprogramma. Deze zullen maximaal 4 à 5 maanden duren, maar zij zijn cruciaal voor het bepalen van de veilige/optimale dosering voor de komende experimenten. Wij verwachten dat wij in het najaar 2019 kunnen starten met de daadwerkelijke experimenten. Lauria heeft al de FELASA A, B en C certificaten (Federatie van Europese laboratoria voor diergeneeskundige verenigingen) behaald op de Vrije Universiteit Brussel in België en hoeft enkel nog een opfrissingscursus te volgen voordat ze met de muizen kan werken.

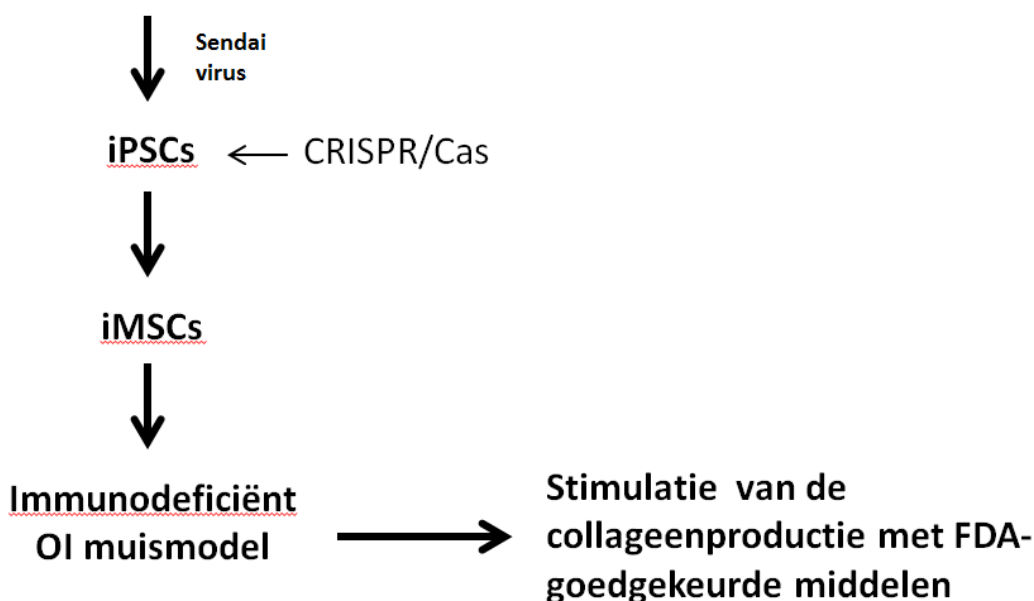
Gentherapie

Bij OI zijn er twee verschillende soorten mutaties mogelijk in de collageen genen. De eerste mutatie zal leiden tot structureel fout collageen en dit zorgt voor een ernstigere vorm van OI. De tweede mutatie (ook wel een heterozygote nul mutatie genoemd), zal ervoor zorgen dat er maar de helft van de normale hoeveelheid collageen wordt geproduceerd. Dit is de mildere vorm van OI. Wij willen het eerste type mutatie met gentherapie behandelen, op een manier die leidt tot dezelfde uitkomst als het tweede type mutatie. Het uitschakelen van een gen kopie van het mutante gen is veel veiliger en bovendien toepasbaar voor alle patiënten.

Mensen zijn diploïd, dit betekent dat ze twee kopieën hebben van bijna al hun genen. In de ernstige vormen van OI heeft één van deze twee kopieën van het collageen gen een mutatie. Gedurende 30 jaar ervaring met diagnostische genetische analyse hebben we ongeveer 500 mutaties in het collageen gen gevonden. Dit betekent dat het corrigeren van een mutatie van één individu een lage impact heeft op de hele OI patiënten groep. Om dit op te lossen zullen we de kopie van het gen, dat het defecte collageen produceert, verwijderen. Hierdoor zal enkel normaal collageen worden geproduceerd door het gezonde gen, wat 50% is van wat een gezond persoon produceert. Het verwijderen van het foutieve gen wordt uitgevoerd via gentherapie of meer specifiek met het CRISPR/Cas systeem. CRISPR/Cas is een methode waarmee DNA in de cel gemodificeerd kan worden. Een belangrijk aandachtspunt in dit project is het gebruik van niet-integratieve genetische manipulatiemethoden om de kans op onverwachte en ongewilde genomische wijzigingen te verkleinen, aangezien deze een risico op lange termijn kunnen worden met regeneratieve geneeskunde (bijvoorbeeld cel herprogrammering met virussen die integreren in het humane genoom). Een bijkomend aandachtspunt is het type cel dat verkregen moet worden om te kunnen gebruiken voor de botregeneratie. Hieronder wordt een schema gegeven van wat we stapsgewijs gaan doen, met daaronder een toelichting.

Schematische weergave van aanpak:

Fibroblasten van OI patiënten



Toelichting aanpak

We zullen beginnen met de fibroblasten (cellen die deel uitmaken van het bindweefsel in de huid) van patiënten te herprogrammeren tot geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs) met behulp van het Sendai virus. Het Sendai virus integreert niet in het celgenoom. De methode voor differentiatie naar iPSCs wordt aangeboden in het stamcel laboratorium van [dr. Vivi Heine](#) op de Vrije Universiteit. De manipulatie van het gen met CRISPR/Cas zal ook in dit laboratorium worden uitgevoerd. De herprogrammering naar iPSCs is onder andere nodig omdat CRISPR/Cas gemakkelijker uit te voeren is in deze cellen. Deze cellen zijn vrijwel identiek aan embryonale stamcellen. Ze kunnen delen zonder hun stamcel eigenschappen te verliezen en kunnen differentiëren tot elk celtype. Bovendien willen we hierna de iPSCs herprogrammeren tot geïnduceerde mesenchymale stamcellen (iMSCs). De differentiatie van iPSCs naar iMSCs is een heel noodzakelijke stap.

Mesenchymale stamcellen (MSCs) zijn multipotente stamcellen, dit betekent dat ze kunnen differentiëren naar verschillende soorten cellen van verwante weefsels. MSCs kunnen onder andere botvormende cellen, kraakbeencellen en vetcellen worden. We differentiëren de iPSCs naar iMSCs zodat deze kunnen gebruikt worden om het bot te regenereren. iMSCs blijven, in tegenstelling tot MSCs, goed delen na de gentherapie. De iMSCs zullen dan geïnjecteerd worden in het bot van immunodeficiënte muizen om het effect te zien *in vivo*. We gebruiken immunodeficiënte muizen omdat we werken met humane cellen en we geen interferentie willen met het immuunsysteem tegen de humane cellen. Op dit moment bestaan er nog geen immunodeficiënte Ol muismodellen, dus zullen we een muismodel moeten gebruiken dat ietwat gelijkend is. Ten slotte zullen we ook het effect van zowel de component en de gentherapie samen bekijken *in vivo*.

Training in het stamcel laboratorium met iPSC differentiatie van fibroblasten, de differentiatie van iPSCs naar iMSCs, de karakterisering en het omgaan met de Sendai virus begint in september 2018. Dit is een heel belangrijke stap aangezien iPSCs gevoelige cellen zijn en ervaring heel belangrijk is.