

**SPLICE-SWITCHING THERAPY IN GENETIC DISEASES:  
DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY  
AND  $\beta$ -THALASSEMIA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2009**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**SPLICE-SWITCHING THERAPY IN GENETIC DISEASES: DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY AND  $\beta$ -THALASSEMIA**

NATEE JEARAWIRIYAPAISARN 4636655 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: SUTHAT FUCHAROEN, M.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., PRANEE FUCHAROEN, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D., SAOVAROS SVASTI, Ph.D.

**ABSTRACT**

Splice-switching oligonucleotides hold great promise for therapeutic applications in redirecting alternative splicing pathways; however, their delivery remains a major obstacle. Cell penetrating peptides (CPPs) containing arginine (R), 6-aminohexanoic acid (X) and/or  $\beta$ -alanine (B) greatly enhance the delivery of phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) in cell culture. In this study, the potency, functional biodistribution and toxicity of these conjugates were evaluated, *in vivo*, in EGFP-654 transgenic mice that ubiquitously express the aberrantly spliced EGFP-654 pre-mRNA reporter. Correct splicing and EGFP upregulation serve as a positive readout for peptide-PMO (PPMO) entry to cells and access to EGFP-654 pre-mRNA in the nucleus. Systemic delivery of a series of PPMOs, A-N, resulted in splicing correction in numerous tissues without detectable toxicity.

One of conjugates, PPMO-B, was very effective in the heart, diaphragm, and quadriceps, which are key muscles in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Therefore, PPMO M23D-B, designed to force skipping of stop-codon containing dystrophin exon 23, was investigated in *mdx* mouse model of the disease. Systemically delivered PPMO M23D-B yielded persistent exon 23 skipping, producing high and sustained dystrophin protein expression in body-wide muscles including cardiac muscle. The induced dystrophin was correctly localized at the sarcolemma of muscle fiber leading to a dramatic drop in serum creatine kinase, a hallmark of improvement in muscle integrity. Moreover, the induced dystrophin ameliorated the cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction identified in sham-treated age-matched *mdx* mice, in as little as 5-6 weeks after the initiation of treatment. All of these improvements were sustained for up to 7 months after the initiation of treatment. These results demonstrate for the first time that PPMO-mediated exon skipping therapy improved the cardiomyopathy in *mdx* mice with long-term impact.

Additionally, defective splicing of human  $\beta$ -globin pre-mRNA in a mouse model of IVS2-654  $\beta$ -thalassemia was repaired by a systemic delivery of PPMO-623-25-B or -H targeted to putative exonic splicing enhancers (ESEs) of aberrant exon. The repaired  $\beta$ -globin mRNA led to production of chimeric mouse-human hemoglobin and in consequence improvement of red blood cell pathology. To achieve long-term effect of repairing splicing defect, incorporation of splice-switching sequences into modified U7 snRNA or tRNA<sup>met</sup> vectors was investigated in HeLa cell models expressing either EGFP-654 or IVS2-654  $\beta$ -globin pre-mRNAs. The double-target U7.BP+623 snRNA, simultaneously blocking ESEs and cryptic branch point, was most effective in splicing correction. This approach provides a potential means to achieve permanent correction of the aberrant splicing.

Taken together, these works demonstrated promising proof-of-principle for splice-switching therapy in clinically relevant mouse models, which may lead to clinical trials.

**KEY WORDS: ALTERNATIVE PRE-mRNA SPLICING /  $\beta$ -THALASSEMIA / DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY / MORPHOLINO OLIGONUCLEOTIDE**

226 pages

การรักษาโรคกล้ามเนื้อลีบดูเซน และ เบต้าธาลัสซีเมียโดยการเปลี่ยนแปลงการตัดต่อของยีน  
 SPLICE-SWITCHING THERAPY IN GENETIC DISEASES: DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY  
 AND  $\beta$ -THALASSEMIA

นที เจียรวิริยะ ไพศาล 4636655 MBMG/D

ปร.ค. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สุทัศน์ ฟูเจริญ, พ.บ., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.,  
 ปราณี ฟูเจริญ, Ph.D., วรากรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D., เสาวรส สวัสดิ์วัฒน์, Ph.D.

บทคัดย่อ

การใช้ oligonucleotide ในการเปลี่ยนแปลงการตัดต่อของยีนมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำไปใช้ในการรักษาโรคทางพันธุกรรมที่มีความผิดปกติของการตัดต่อของยีน อุปสรรคที่สำคัญของวิธีการนี้คือการขนส่งและการลำเลียง oligonucleotide ไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต้องการ ซึ่งมีการพบว่าสายเปปไทด์นำพาที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนและกรดอะมิโนสังเคราะห์ (6-aminohexanoic acid และ เบต้าอะลานีน) สามารถเร่งการขนส่ง phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO) ได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการทดสอบประสิทธิภาพและความเป็นพิษของสายเปปไทด์นำพาเหล่านี้ในการลำเลียงขนส่ง PMO ไปยังอวัยวะต่างๆ ในหนูทดลองที่มีการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงสีเขียวที่มีความผิดปกติของการตัดต่อของยีน โปรตีนนี้จะเรืองแสงเมื่อ PMO ที่ติดกับสายเปปไทด์นำพา (PPMO) สามารถเข้าสู่เซลล์แล้วเปลี่ยนแปลงการตัดต่อของยีนให้กลับมาเป็นปกติได้ ผลการทดลองพบว่า PPMO ทั้งหมดที่ทำการทดสอบให้ประสิทธิภาพในการแก้ไขการตัดต่อของยีนได้ดีในอวัยวะหลายชนิดต่างๆ กัน และยังไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทดลอง

ผู้วิจัยได้นำ PPMO-B ซึ่งมีประสิทธิภาพดีในกล้ามเนื้อหัวใจ, กระบังลม, และต้นขา ไปใช้ในการรักษาโรคกล้ามเนื้อลีบดูเซนในหนูทดลอง ซึ่งยีนที่สังเคราะห์โปรตีนดิสโทรฟินมีมิวเตชันที่ทำให้เกิดรหัสหยุดของการสังเคราะห์โปรตีนก่อนกำหนดในเนื้อเยื่ออื่นที่ 23 ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนชนิดนี้ในกล้ามเนื้อและส่งผลกระทบต่อกล้ามเนื้ออ่อนแรง หลังการฉีด PPMO ที่ไปจับตรงตำแหน่งจุดตัดของเนื้อเยื่ออื่นที่ 23 เข้าไปทางหลอดเลือดที่หางของหนู พบว่ามีการสร้างสาย mRNA ที่เนื้อเยื่ออื่นที่ 23 ขาดหายไป และสร้างโปรตีนดิสโทรฟินที่สั้นลงในกล้ามเนื้อทุกชนิดในหนูทดลองรวมทั้งกล้ามเนื้อหัวใจ โปรตีนดิสโทรฟินที่ถูกสร้างขึ้นนี้พบว่าอยู่ที่ผนังเซลล์กล้ามเนื้อเหมือนโปรตีนดิสโทรฟินปกติและพบว่าเอ็นไซม์ creatine kinase ลดลงซึ่งแสดงว่าการทำงานของกล้ามเนื้อดีขึ้น นอกจากนั้นพบว่า 5-6 สัปดาห์หลังจากเริ่มฉีดการฉีด PPMO ความผิดปกติทางหัวใจของหนูดีขึ้น และผลนี้ยังคงอยู่ถึง 7 เดือนหลังการฉีด ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า PPMO สามารถรักษาอาการผิดปกติทางหัวใจในหนูโรคกล้ามเนื้อลีบดูเซนซึ่งมีผลเป็นระยะเวลายาวนาน

นอกจากนี้ยังได้นำ PPMO ไปใช้ในการรักษาโรคเบต้าธาลัสซีเมียในหนูทดลองซึ่งมียีนเบต้าธาลัสซีเมียของคนที่เกิดจากมิวเตชันใน intron 2 ชนิด 654 ที่ทำให้การตัดต่อของยีนผิดปกติและไม่สามารถสร้างโปรตีนเบต้าโกลบินได้ พบว่าการใช้ PPMO ไปจับตรงตำแหน่ง exonic splicing enhancers (ESEs) ของการตัดต่อยีนที่ผิดปกติช่วยทำให้การตัดต่อของยีนกลับมาเป็นปกติและมีการสร้างฮีโมโกลบินลูกผสมระหว่างแอลฟาโกลบินของหนูและเบต้าโกลบินของคนซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงพยาธิสภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ด้อย ผู้วิจัยยังทำการศึกษากการใช้ U7 snRNA และ tRNA<sup>met</sup> เป็นพาหะในการนำลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อไปจับยังตำแหน่งเป้าหมาย เพื่อซ่อมแซมการตัดต่อของยีนเบต้าโกลบินที่ผิดปกติซึ่งจะนำไปสู่การรักษาที่ได้ผลเป็นระยะเวลายาวนาน ผู้วิจัยพบว่า U7.BP+623 snRNA ที่ไปจับตรงตำแหน่งของทั้ง ESEs และ cryptic branch point มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการแก้ไขการตัดต่อของยีนเบต้าโกลบินในเซลล์ HeLa

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของการรักษาโรคทางพันธุกรรมด้วยการเปลี่ยนแปลงการตัดต่อของยีนในหนูทดลองซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาในคนต่อไป