

ANEXO 1

Closing the therapeutic gap for Congenital Muscular Dystrophies: Improving efficacy, delivery and safety of CRISPR/Cas9 and antisense oligonucleotides based therapies.

Enero 2023-Diciembre 2024

En previos trabajos (López-Márquez et al., 2022; Castroflorio et al., 2022) hemos demostrado que las herramientas CRISPR/Cas9 son altamente específicas y eficientes para editar mutaciones puntuales, reducir los niveles de expresión de alelos mutados y restaurar el fenotipo celular en fibroblastos de pacientes con déficit de colágeno VI. Sin embargo, hemos también identificado limitaciones que deben ser mejoradas antes de que la tecnología CRISPR/Cas9 pueda ser ampliamente aplicada in vivo. Específicamente, nuestros objetivos globales de este proyecto son: 1) Investigar cómo mejorar la eficiencia de edición genética para corregir diferentes tipos de mutaciones en los genes del colágeno VI. 2) Investigar sistemas de administración in vitro e in vivo. 3) Investigar los aspectos relacionados con la seguridad de dichas terapias en la población pediátrica española en colaboración con el Hospital Clínic de Barcelona.

Para llevar a cabo este proyecto y evaluar la eficacia, entrega y seguridad de dichas terapias in vivo hemos generado un nuevo modelo murino “knock-in” de la mutación humana c.877G<A, p.Gly293Arg.

Antes de emprender estos estudios es necesario caracterizar este nuevo modelo para investigar si es un buen modelo de la patología humana. Por otra parte utilizando este modelo animal (tanto animales heterocigotos como homocigotos para la mutación) así como ratones sanos investigaremos la administración y seguridad de las terapias de edición genética.

La colonia de este nuevo modelo animal (que denominamos KI col6a1G292R) esta establecida en el estabulario de la UB en el Hospital Sant Joan de Déu. Los estudios han sido aprobados por la Generalitat de Catalunya.

Objetivos específicos de esta propuesta son:

- i) Mantenimiento y gestión de la colonia de ratones KI col6a1G292R: Estabulación, procedimientos experimentales (20 jaulas por semana durante dos años, 104 semanas, + gastos de mantenimiento) y Genotipado (100 ratones): **11.282,24 €** (según tarifas de la Universidad de Barcelona).
- ii) Caracterización histopatológica y estudios de expresión de colágeno VI: Consumibles para análisis histológico y molecular de células y tejidos de ratones sin tratar y tras el tratamiento. Se solicitan consumibles para realizar análisis histológico y por inmunofluorescencia de varios grupos de músculo esquelético a diferentes edades, así como consumibles para biología molecular para realizar análisis de expresión génica en tejidos. **7.500 €**.

- iii) Estudios de biodistribución in vivo: los candidatos en forma de nanocomplejos de RNA se inyectarán marcados con fluorescencia en distintos grupos musculares en los ratones de distintos genotipos (incluidos los correspondientes controles en el musculo contralateral). La acumulación y la biodistribución en todo el cuerpo de los nanoconjugados se medirán mediante el sistema de imágenes ópticas IVIS® Spectrum in vivo y ex vivo a las 24, 48 y 72 horas después de la administración. La distribución específica de tejidos y células también se analizará mediante microscopía confocal y Light Sheet Microscopy a través del Joint Lab IRSJD_ICFO del que formamos parte. Se solicita presupuesto para la compra de reactivos incluyendo oligonucleótidos marcados con fluorescencia, anticuerpos primarios y secundarios y reactivos de histología. **5.000 €.**
- iv) Estudios funcionales de capacidad respiratoria: Uno de los músculos más afectados en COL6-RD es el diafragma y las complicaciones respiratorias son uno de los principales factores de riesgo de esta patología. Por este motivo queremos investigar en el modelo murino la función respiratoria antes y después del tratamiento con las nuevas opciones terapéuticas. Para ello llevaremos a cabo estudios de Pletismografía de cuerpo entero, rotarod y otras técnicas para medir el efecto funcional de las terapias a nivel respiratorio y motor en colaboración con el grupo de Albert Quintana de la UAB **3.500 €.**
- v) Gastos indirectos de gestión y realización del proyecto **4.092€**

Total: 31.374€