

Propuesta Proyecto

Medicina Personalizada para las Distrofias Musculares Congénitas:
Desarrollo y validación de tratamientos avanzados para el déficit de
colágeno VI.

2025-2027

Resumen

El objetivo principal de este proyecto es i) avanzar en la validación in vitro e in vivo de las estrategias de edición génica (ASOs y editores de bases) desarrolladas en proyectos anteriores, ii) diseñar nuevas estrategias para otro tipo de mutaciones (mutaciones de “splicing”) y iii) investigar nuevas dianas terapéuticas en el modelo animal *col6a1* Ki G292R.

En el Anexo 1 detallamos los resultados de la propuesta anterior (2023-2025) y de otros resultados preliminares relacionados con esta propuesta.

Objetivos específicos:

1) Validación pre-clínica de estrategias terapéuticas para mutaciones puntuales (por cambio de aminoácido):

En los últimos años hemos demostrado como los oligonucleótidos antisentido (ASOs) y la edición genética (CRISPR/Cas9), (López-Márquez et al., 2022) pueden silenciar o corregir de forma específica y efectiva la mutación COL6A1 c. 877 G>A y restaurar la expresión de colágeno VI en modelos celulares. Estas mismas estrategias pueden aplicarse a otras mutaciones puntuales en genes de colágeno VI. En concreto este año hemos conseguido un hito importante que es la protección intelectual mediante PCT (EP2024/067949) del diseño y aplicación de los ASOs candidatos para el tratamiento de COL6-RD. Este hito representa no solamente una validación técnica de nuestros resultados, sino que es un paso necesario para el desarrollo clínico de una terapia y su futura aplicación en humanos.

Nuestro objetivo es continuar avanzando en la optimización y validación de estas estrategias in vitro e in vivo:

a. Validación Oligonucleótidos Antisentido (ASO) in vivo: habiendo completado los estudios de eficacia y citotoxicidad (Fig 1, Anexo) de diferentes ASOs en células, nuestro objetivo es validar su eficacia in vivo. Para ello llevaremos a cabo inyecciones intramusculares e intravenosas en el modelo de ratón *col6a1* Ki G292R que hemos generado con la mutación equivalente a la humana. Para evaluar la eficacia utilizaremos ASOs específicos de ratón. Inicialmente evaluaremos diferentes dosis de ASOs basados en estudios preliminares. Utilizando la dosis más baja y que demuestre eficacia, llevaremos a cabo inyecciones de una sola dosis y estudios de continuidad con inyecciones repetidas para evaluar el efecto acumulativo de los ASOs. Por una parte, cuantificaremos la llegada a distintos músculos y tejidos de los ASOs mediante “Splint” PCR y PCR digital y por otra parte mediremos el silenciamiento del alelo mutado también por PCR digital. El ratón *col6a1* Ki G292R tiene déficit de colágeno VI en distintos músculos (Anexo, Fig 3) por lo que podremos investigar el efecto de los ASOs en la expresión de colágeno VI mediante Western Blot e Inmunofluorescencia.

Las principales toxicidades asociadas con la administración de ASOs se evaluarán en ensayos in vitro e in vivo (inmunogenicidad, activación complemento, coagulación, toxicidad renal).

b. Optimización de edición génica con editores de bases para la mutación COL6A1 c.877 G>A (Gly293Arg)

Los editores de bases son unas herramientas de edición génica basadas en la tecnología CRISPR/Cas. A diferencia de la tecnología original, en este caso no es necesario inducir cortes en el ADN ni aportar un ADN molde, ya que la edición génica ocurre gracias a la actividad enzimática deaminasa que va acoplada a la Cas. Por ello esta nueva tecnología CRISPR es muy útil para editar mutaciones de un solo nucleótido como es el caso que nos ocupa. En nuestro laboratorio hemos venido desarrollando diferentes experimentos para optimizar esta tecnología, obteniendo resultados muy prometedores que se resumen a continuación.

Gracias a una colaboración con la Dra. Paula Río (CIEMAT, Madrid) y con el Dr. Jacob E. Corn (ETH Zurich, Zúrich), se nos cedió al laboratorio un plásmido con la secuencia del ADN del editor de bases de adenina usado en estos experimentos (ABE8e). En nuestro laboratorio, se optimizó el protocolo de la producción del mRNA del editor de bases con el cual se transfectarían las células de los pacientes en un cultivo primario. El plásmido con el ADN fue primero linearizado y después optimizamos la transcripción in vitro para poder obtener la mayor cantidad de mRNA con gran calidad. Esta optimización representa un paso crucial hacia la implementación de editores de bases en terapias genéticas personalizadas para enfermedades raras.

En primer lugar, llevamos a cabo estudios de secuenciación, tanto por Sanger como por NGS, de fibroblastos primarios de un paciente con la mutación COL6A1 c.877 G>A con y sin tratamiento con el editor de bases de adenina ABE8e (Anexo, Figura 2A). Los resultados que obtuvimos muestran como en las células No Tratadas (NT) hay una presencia del 50% de cada alelo (mutado, A/T; o sano, G/C) y en las células Tratadas (T) hay un incremento del 30% del alelo sano (G/C) a la vez que la disminución en el alelo mutado (A/T). Una edición del 30% también está presente en la adenina más próxima, que no tiene impacto en la secuencia de la proteína final, por ser una modificación silenciosa.

A continuación, se llevaron a cabo estudios para detectar cambios en los niveles de expresión del mRNA de los alelos mutados (MUT) y sanos (WT) (Anexo Fig. 2B). Se pudo observar un incremento significativo de los niveles de expresión relativos del alelo correcto o salvaje en aquellas células tratadas con las guías que estamos usando (G1 y G2). Este resultado indica que la edición que observábamos a nivel genómico se traduce también en cambios a nivel de mRNA y, por tanto, se puede traducir en un aumento de los niveles colágeno VI correctamente ensamblado.

Para confirmar este resultado, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para ver la corrección del patrón de ensamblaje de las fibras de colágeno VI en la matriz extracelular una vez tratadas las células (Anexo Fig. 2C). En primer lugar, se pudo apreciar diferencias significativas entre las células de un individuo sano (IS) con las del individuo que porta la mutación patogénica No Tratado (NT), lo cual confirmó la validez de esta técnica. Una vez tratadas las células (T) con las herramientas de edición de bases ABE8e, las fibras de colágeno aumentaron significativamente en presencia e intensidad, mejoraron su ensamblaje y direccionalidad, y disminuyó la presencia de agregados.

Todos estos resultados en su conjunto confirman el gran potencial que presentan los editores de base, en concreto los ABE8e, como posibles estrategias terapéuticas para abordar no solo la mutación a la que se hace referencia en este documento, sino otras variantes de un solo nucleótido.

En esta propuesta seguiremos avanzando en la optimización de estas herramientas. Para aumentar la tasa de corrección investigaremos diferentes condiciones de transfección de células (por ejemplo, concentración del mRNA y guías, nucleotransfección) y analizaremos los efectos no deseados a nivel genómico (genotoxicidad) utilizando distintas herramientas (Fiumara et al., 2024).

c. Investigar sistemas de administración in vitro e in vivo.

En los últimos años hemos investigado una clase de nanopartículas lipídicas (LNPs) desarrolladas por colaboradores en ICMAB llamadas Quasomas (QS). Los resultados hasta la fecha nos indican que los QS pueden conjugarse de forma eficaz a los ASOs y al mRNA de Cas9, que los nanoconjugados formados por QS son captados por la célula diana (fibroblastos) y que tras ser inyectados de forma intravenosa alcanzan distintos grupos musculares (Fig 4 Anexo 1). Teniendo en cuenta que no existe ninguna formulación estándar de LNPs para la entrega a músculo y que en el diseño de LNPs hay numerosas variables que considerar consideramos que tenemos que seguir investigando distintos sistemas de entrega en paralelo utilizando la experiencia adquirida con los QS. Estos sistemas incluirán otros tipos de LNPs comerciales y otros agentes como lípidos. Hemos puesto a punto en el laboratorio los métodos y sistemas para poder realizar y analizar tratamientos en ratones y detectar la distribución de ASOs y LNPs mediante IVIS, citometría de flujo, inmunofluorescencia y PCR digital para la detección de ASOs en tejido.

2. Desarrollo de estrategias terapéuticas para mutaciones de “splicing”. Existen variantes en genes de colágeno VI muy poco frecuentes (incluso únicas) cuyos efectos aún están por determinar y que también son susceptibles de modulación o corrección genética. Este es el caso de una mutación en el intrón 9 de *COL6A1* (c.859-10T>A) que fue identificada en un niño con COL6-RD y un fenotipo intermedio. Para descifrar el impacto de este cambio de nucleótido amplificamos la región entorno a la mutación y la analizamos por secuenciación Sanger y por PCR digital en fibroblastos de piel. Encontramos una secuencia adicional de 8 nucleótidos que se expresaba en una pequeña proporción de los transcritos y que probablemente no se traduciría al interrumpir el marco de lectura de la cadena alpha1. Por lo tanto, esta inserción de 8 nucleótidos no explicaría la aparición de la patología. Por este motivo, contactamos con el Hospital de Sant Pau para realizar secuenciación masiva del RNA que obtuvimos de la biopsia muscular del paciente. Este estudio demostró que la mutación conlleva la transcripción de varios RNAs mensajeros de *COL6A1* uno de los cuales contiene un pseudoexon de 159 nucleótidos que se traduciría interrumpiendo la triple hélice de la cadena alpha 1 (Fig 5 y 6 Anexo 1). Este mecanismo sería similar al descrito previamente para la mutación *COL6A1* c.930 +189 C>T (Bolduc et al., 2019). Esto probablemente ejerce un efecto negativo dominante sobre las cadenas alfa del colágeno VI normales y podría explicar la patología en este niño afecto de COL6-RD. Hasta donde sabemos, esta mutación no se ha descrito previamente. En esta propuesta, nuestro objetivo es caracterizar en detalle esta mutación a nivel de ARNm y proteína (estamos generando un anticuerpo que reconozca el pseudoexón) e investigar oligonucleótidos antisentido para eliminar el modificar el “splicing” y reducir o eliminar la expresión del pseudoexon así como editores de bases para corregir esa mutación intrónica.

3. Estudio de dianas terapéuticas farmacológicas y mecanismos fisiopatológicos en COL6-RD.

La regeneración muscular y la fibrosis son dos mecanismos interconectados e interdependientes fundamentales para mantener la homeostasis y correcta función muscular. Existen datos que apuntan a que la capacidad regenerativa del músculo de pacientes con déficit de colágeno VI está comprometida debido a alteraciones intrínsecas en las células satélite (Urciuolo et al., 2013). Asimismo, la fibrosis es uno de los hallazgos más tempranos y comunes en músculo de los pacientes con COL6-RD y en el de los modelos animales descritos hasta la fecha (Mohassel et al., 2023). De acuerdo con esta evidencia, en el modelo murino que hemos generado (*col6a1* Ki G292R) hemos evidenciado un aumento significativo de fibrosis a partir de los 2 meses de edad en el diafragma y otros músculos (Anexo 1 Fig 7). Uno de los reguladores principales de la fibrosis es el TGF β que actúa transmitiendo señales desde la matriz extracelular hasta el núcleo promoviendo la transcripción de genes relacionados con la fibrosis. El aumento de fibrosis y de la actividad de la vía del TGF β es común a otras distrofias musculares y es modulable mediante fármacos anti-fibróticos a distintos niveles. En este objetivo analizaremos la capacidad regenerativa del músculo de los ratones transgénicos *col6a1* Ki G292R (tras inyección intramuscular con cardiotoxina), la expresión a nivel de RNA y proteína de distintos elementos de la vía de la fibrosis (TGF β activo, Smad3 y Smad3-fosforilado, fibronectina, periostina, biglican) así como la activación de dicha vía en nivel basal y durante la regeneración seguida de daño muscular.

Estos estudios nos permitirán determinar si los hallazgos en la alteración de la vía del TGF β y en la capacidad regenerativa del músculo son comunes con otros modelos y un hallazgo universal en COL6-RD y por lo tanto representan un mecanismo diana en la patología. Si esto fuera el caso, los distintos modelos animales podrían usarse en paralelo y en colaboración para evaluar el uso de fármacos que actuaran revirtiendo estas alteraciones. Estos compuestos podrían usarse como complemento de terapias de tipo génica.

Referencias

López-Márquez A, Morín M, Fernández-Peñalver S, Badosa C, Hernández-Delgado A, Natera-de Benito D, Ortiz C, Nascimento A, Grinberg D, Balcells S, Roldán M, Moreno-Pelayo MÁ, Jiménez-Mallebrera C. CRISPR/Cas9-Mediated Allele-Specific Disruption of a Dominant COL6A1 Pathogenic Variant Improves Collagen VI Network in Patient Fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 16;23(8):4410. doi: 10.3390/ijms23084410. PMID: 35457228; PMCID: PMC9025481.

PCT Application No. PCT/EP2024/067949

Title: OLIGONUCLEOTIDES FOR TREATING NEUROMUSCULAR DISEASES

Applicant: HOSPITAL SANT JOAN DE DEU; UCL BUSINESS LTD

Fiumara M, Ferrari S, Omer-Javed A, Beretta S, Albano L, Canarutto D, Varesi A, Gaddoni C, Brombin C, Cugnata F, Zonari E, Naldini MM, Barcella M, Gentner B, Merelli I, Naldini L. Genotoxic

effects of base and prime editing in human hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol. 2024 Jun;42(6):877-891. doi: 10.1038/s41587-023-01915-4. Epub 2023 Sep 7. Erratum in: Nat Biotechnol. 2024 Jun;42(6):986. doi: 10.1038/s41587-024-02142-1. PMID: 37679541; PMCID: PMC11180610.

Urciuolo, A., Quarta, M., Morbidoni, V. et al. Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. Nat Commun 4, 1964 (2013). <https://doi.org/10.1038/ncomms2964>

Mohassel P, Rooney J, Zou Y, Johnson K, Norato G, Hearn H, Nalls MA, Yun P, Ogata T, Silverstein S, Sleboda DA, Roberts TJ, Rifkin DB, Bönnemann CG. Collagen type VI regulates TGF β bioavailability in skeletal muscle. bioRxiv [Preprint]. 2023 Jun 24:2023.06.22.545964. doi: 10.1101/2023.06.22.545964. PMID: 38586035; PMCID: PMC10996771.

Presupuesto

Personal

Ayudante de investigación: con dedicación exclusiva al proyecto de investigación.

39.563 €/año (incluido coste empresa) = **79.126 €**

Sub-total: 79.126 €

Gastos indirectos (10%) 7.912,60 €

Total: 87.038,60 €