

Proyecto Investigación

Medicina Personalizada para las Distrofias Musculares Congénitas por déficit de colágeno VI: Desarrollo de terapias avanzadas, modelos fisiológicos y herramientas diagnósticas precisas.

Julio 2021- Julio 2023

1. Introducción:

Durante los últimos 11 años nuestro grupo de Investigación en el Hospital Sant Joan de Déu ha contribuido significativamente a la comprensión de las distrofias musculares relacionadas con el colágeno VI (COL6-RD), desde la perspectiva clínica y molecular. También hemos sido pioneros en mejoras diagnósticas, habiendo identificado nuevos biomarcadores e implementado, en el entorno clínico de rutina a nivel nacional e internacional, el análisis del colágeno VI en cultivos de fibroblastos. Hemos caracterizado clínica y genéticamente a una cohorte de pacientes españoles con COL6-RD que son seguidos regularmente en nuestra Unidad Neuromuscular y han recogido más de 30 pacientes de fibroblastos dérmicos que hemos analizado en detalle. Así, estamos en la posición correcta para liderar una transformación cualitativa en el campo hacia modelos más fisiológicos de la enfermedad, terapias avanzadas para mutaciones específicas y herramientas precisas e innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de la respuesta terapéutica para acercar nuevos tratamientos a pacientes con Distrofia Muscular Congénita.

Los COL6-RD se deben a mutaciones en los genes del colágeno VI (COL6A1, COL6A2 y COL6A3) que codifican tres cadenas. Estos se asocian a través de las repeticiones G-Xaa-Yaa (donde G es una Glicina) para formar un heterotrimer (la unidad básica o monómero). Los monómeros se ensamblan en dimers antiparalelos y luego tetrámeros que se secretan en la matriz extracelular (ECM) donde se ensamblan con otros tetrámeros para formar la red microfibrilar de colágeno VI. El colágeno VI es abundante en varios tejidos conectivos, incluidos los del músculo esquelético, la piel, los ligamentos y los tendones, donde se produce por fibroblastos específicos para cada tejido (por ejemplo, tenocitos). No hay tratamiento curativo disponible para COL6-RD y la atención del paciente se basa en el manejo de las complicaciones graves (insuficiencia respiratoria que invariablemente conduce a la necesidad de asistencia ventilatoria a partir de los 10 años, contracturas y escoliosis que requieren cirugía repetida) que limitan dramáticamente la calidad de vida de los pacientes particularmente los niños que se ven más gravemente afectados. Hasta la fecha, sólo ha habido un ensayo clínico con un fármaco anti apoptótico (Omigapil) y un estudio terapéutico utilizando una dieta baja en proteínas para activar la autofagia. Sin embargo, estos no han demostrado beneficios clínicos significativos.

Aunque inicialmente se describe como una enfermedad recesiva, las mutaciones dominantes representan entre el 50 y el 75% de las mutaciones en COL6-RD. Por todo lo anterior, una estrategia dirigida a la supresión específica del alelo mutado, para reducir su efecto negativo dominante, o para corregir la mutación puntual, sería beneficiosa para una gran proporción de pacientes COL6-RD que llevan estas mutaciones.

La tecnología de edición genética basada en el sistema CRISPR / Cas9 ofrece ambas posibilidades. El sistema CRISPR permite dirigir una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas) a una secuencia de ADN específica con alta precisión donde realizará un corte de doble cadena. La célula repara este daño usando dos mecanismos. En el primer caso, los extremos se unirán de forma no homóloga, dando como resultado mutaciones de inserción o delección de nucleótidos (INDEL) en el punto de corte (unión final no homóloga o NHEJ), una proporción de las cuales darán lugar a la inactivación de este alelo. En el segundo caso, el corte será reparado por

recombinación homóloga homóloga (HDR) si se añade una plantilla de ADN con la secuencia deseada al sistema.

Todas las estrategias mencionadas anteriormente son muy prometedoras para el tratamiento del COL6-RD, pero deben ser investigadas en modelos in vitro e in vivo apropiados.

Aunque nuestros estudios in vitro y los de otros grupos en pacientes nos han proporcionado información muy valiosa sobre la deficiencia de colágeno VI, no pueden replicar la compleja estructura tridimensional de los tejidos. Las plataformas de cultivo órgano típicas constituyen equivalentes de tejido in vitro que predicen el contexto humano in vivo. Se utilizan como modelos de enfermedades para el cribado terapéutico preclínico, entre otras aplicaciones.

La experiencia de los ensayos clínicos para algunas enfermedades neuromusculares en los últimos años ha demostrado la importancia de contar con métodos cuantitativos, sensibles y reproducibles para medir pequeños cambios en las proteínas cuya expresión / función debe ser restaurada. Esta es una de las principales limitaciones para el éxito de los ensayos clínicos y para la aprobación de fármacos.

El diagnóstico de colágeno VI es complejo ya que predominan las mutaciones dominantes y estas resultan en alteraciones estructurales difíciles de medir por métodos convencionales. Proponemos aplicar sistemáticamente técnicas de microscopía y de análisis de imagen e inteligencia artificial para mejorar el diagnóstico de los pacientes con sospecha de déficit de colágeno VI y para monitorizar las respuestas al tratamiento.

Estas técnicas avanzadas de imagen aportarán una notable mejora al diagnóstico de COL6-RD. Potencialmente, estas metodologías podrían adaptarse para analizar otras proteínas afectadas en trastornos neuromusculares que afectan a un gran número de pacientes.

En resumen, los resultados y recursos derivados de este proyecto acercarán a los pacientes con deficiencia de colágeno VI y otras enfermedades relacionadas a tratamientos eficaces.

2. Objetivos

Los avances en terapia y edición génica están revolucionando el horizonte terapéutico de los pacientes con enfermedades raras. Sin embargo, el porcentaje de estudios pre-clínicos que desembocan en nuevas terapias efectivas y aprobadas por las agencias regulatorias es muy bajo. El objetivo general de esta propuesta es contribuir a cerrar esta brecha mediante la investigación sistemática de terapias avanzadas y el desarrollo de modelos fisiológicos in vitro e in vivo así como de herramientas de diagnóstico precisas. Nuestros objetivos específicos son:

1. Investigar la eficacia de las terapias avanzadas (edición genética mediante CRISPR/Cas9 y por medio de oligonucleótidos antisentido) para corregir mutaciones en genes de colágeno VI en fibroblastos de los pacientes.

2. Desarrollar modelos más fisiológicos in vitro e in vivo para COL6-RD para ser utilizados en las etapas pre-clínicas de futuros ensayos y para investigar el mecanismo de la enfermedad. Estos incluirán modelos organotípicos 2D y 3D y un nuevo modelo de ratón.

3. Diagnóstico y caracterización de pacientes con déficit de colágeno VI. Utilizando los protocolos y biomarcadores previamente establecidos continuaremos ofreciendo el diagnóstico

basado en el estudio de colágeno VI en fibroblastos a aquellos pacientes con sospecha de déficit de colágeno VI a nivel nacional e internacional. Más allá, aplicaremos el diagnóstico asistido por ordenador y el técnicas de imagen avanzadas (en colaboración con el Instituto de Ciencias Fotónicas, <https://jointlab-sjd.icfo.eu/>, y la Universidad Politécnica de Catalunya) para ofrecer un diagnóstico preciso a los pacientes con sospecha de COL6-RD, estudiar el efecto de las variantes genéticas en los genes COL6A de significado incierto y para monitorizar la restauración de Colágeno VI en células tratadas.

3. Equipo Investigador:

Jimenez Mallebrera, Cecilia: Coordinadora Grupo de Investigación.

Nascimento Osorio, Andres: Investigador Principal-coordinador Unidad Patología

Neuromuscular.

Daniel Natera-Benito: Investigador Principal

M. Carmen Badosa: Ayudante de Investigación.

El investigador licenciado para la realización del proyecto se contratará con los fondos

del proyecto en base a las necesidades técnicas y científicas del mismo.

4. Presupuesto:

Julio 2021-Julio 2023

Ayudante de Investigación

30,000 euros/año

Subtotal: 60,000 euros

Consumibles

Mantenimiento modelo animal G292R Ki: (mantenimiento de 20 jaulas pequeñas/semana durante 104 semanas, gestión de las colonias, obtención de tejidos): 5500 euros/año

Reactivos histología: 5,000 euros (histoquímica e inmunohistoquímica para la caracterización morfológica de distintos tejidos de ratón): 5,000 euros/año

Subtotal: 16,000 euros

Costes Indirectos

Subtotal 15,200 euros (7600 euros por año)

TOTAL, PROYECTO: 91,200 EUROS