

## Poster P.13.100

### EXPANDED CIRCULATING HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS AS A NOVEL CELL SOURCE FOR THE TREATMENT OF AUTOSOMAL RECESSIVE OSTEOPETROSIS

**Penna S.\*<sup>[1]</sup>**, Capo V.<sup>[1]</sup>, Merelli I.<sup>[2]</sup>, Barcella M.<sup>[1]</sup>, Scala S.<sup>[1]</sup>, Basso--Ricci L.<sup>[1]</sup>, Draghici E.<sup>[1]</sup>, Sergi Sergi L.<sup>[1]</sup>, Palagano E.<sup>[3]</sup>, Zonari E.<sup>[1]</sup>, Desantis G.<sup>[1]</sup>, Uva P.<sup>[4]</sup>, Cusano R.<sup>[4]</sup>, Fontana E.<sup>[3]</sup>, Crisafulli L.<sup>[3]</sup>, Mantero S.<sup>[3]</sup>, Schinke T.<sup>[5]</sup>, Scanziani E.<sup>[6]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>, Ficara F.<sup>[3]</sup>, Sobacchi C.<sup>[3]</sup>, Gentner B.<sup>[1]</sup>, Villa A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Institute for Biomedical Technologies, National Research Council ~ Segrate ~ Italy, <sup>[3]</sup>CNR-IRGB, Milan Unit ~ Milan ~ Italy, <sup>[4]</sup>CRSA, Science and Technology Park Polaris ~ Pula ~ Italy, <sup>[5]</sup>Institut für Osteologie und Biomechanik ~ Hamburg ~ Germany, <sup>[6]</sup>Department of Veterinary Medicine ~ Milan ~ Italy

Autosomal recessive osteopetrosis (ARO) is a rare genetic disease, affecting osteoclast differentiation or function. The majority of ARO patients (55%) presents mutations in TCIRG1 gene, encoding the  $\alpha 3$  subunit of V-ATPase proton pump, necessary for bone resorption. Osteoclast dysfunction results in limited bone marrow cavity and increased number of circulating CD34+ cells in patients. Symptoms include dense and brittle bones, anaemia and progressive nerve compression, leading to death in the first decade of life<sup>1,2</sup>. To date, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the treatment of choice, but its applicability is limited by availability of HLA-matched donor, toxicity of conditioning regimens and significant transplant-related morbidity<sup>3–6</sup>. Gene therapy (GT) may represent an alternative therapeutic option for these patients. We generated two lentiviral vectors (LVs), driving TCIRG1 expression under the control of the phosphoglycerate kinase promoter, with or without the dNGFR marker gene. We tested our GT protocol on the oc/oc murine model<sup>7</sup>, recapitulating the human disease. We transduced Tc1rg1-mutated Lin<sup>-</sup> cells, that showed the rescue of osteoclasts resorptive function upon in vitro differentiation. Transduced Lin<sup>-</sup> cells were also injected intra-liver into irradiated oc/oc newborn mice. The untreated oc/oc mice have a life expectancy of two weeks, conversely GT mice were sacrificed four months after GT, showing absence of circling behaviour, amelioration of bone architecture and reduced parathyroid hormone level in the serum. Furthermore, we observed the reorganization of white and red pulp of the spleen by histological analysis. In parallel, we exploited circulating CD34+ cells as a novel cell source for autologous transplantation of gene corrected cells. We observed that CD34+ cells, circulating at high frequency in the peripheral blood of TCIRG1-deficient patients, have a cellular composition that resembles bone marrow. To overcome the unfeasibility of bone marrow harvest/ HSPC mobilization and limit serial blood drawings, we applied UM171-based ex-vivo expansion of HSPCs<sup>8</sup> coupled with lentiviral gene transfer. Circulating CD34+ cells from TCIRG1-defective patients were transduced with LVs and expanded ex vivo. Expanded cells maintained long-term engraftment capacity and multi-lineage repopulating potential when transplanted in vivo both in primary and secondary NSG recipients. Moreover, when CD34+ cells were differentiated in vitro, we observed the formation of TRAP-positive multinucleated osteoclasts from both transduced and untransduced CD34+ cells, as expected. Bone resorption capacity was restored only in cells transduced with corrective LVs. Overall, we provide evidence that expansion of circulating HSPCs coupled to gene therapy could represent a feasible, readily available treatment for ARO patient, thus opening the way to future gene-based treatment of skeletal diseases caused by bone marrow fibrosis.

ESPANSIONE DELLE CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE PER UN INNOVATIVO TRATTAMENTO DELL'OSTEOPETROSI AUTOSOMICA RECESSIVA

L'osteopetrosi autosomica recessiva (ARO) è causata da difetti del differenziamento o della

funzionalità degli osteoclasti e conduce alla morte nei primi anni di vita. Circa il 55% dei pazienti presentano mutazioni nel gene TCIRG1, necessario per il riassorbimento osseo. Il difetto osteoclastico causa la riduzione delle cavità midollari e un aumento delle cellule CD34+ circolanti in periferia. I sintomi della malattia includono ossa dense e fragili, anemia e compressione dei nervi cranici. Ad oggi il trattamento standard è il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSPC), il cui successo è limitato dalla presenza di donatori compatibili, dalla tossicità del condizionamento e dalla mortalità correlata alla procedura. La terapia genica, quindi, rappresenta una valida alternativa per questi pazienti. Abbiamo sviluppato due vettori lentivirali che esprimono il gene TCIRG1. Abbiamo testato il protocollo di terapia genica nel modello murino oc/oc, che ricapitola la malattia. In seguito alla correzione genica abbiamo osservato il recupero della funzionalità degli osteoclasti in vitro. In vivo le cellule trasdotte hanno consentito la sopravvivenza dei topi oc/oc, irradiati e trattati con iniezione intraepatica, fino a 4 mesi post-terapia. A differenza dei topi non trattati che hanno un'aspettativa di vita di 2 settimane, i topi trattati con terapia genica mostrano miglioramento dell'architettura scheletrica, ridotti livelli di ormone paratiroideo nel siero e riorganizzazione della polpa rossa e bianca della milza. In parallelo, abbiamo studiato le cellule CD34+ circolanti come nuova fonte di HSPC per la terapia genica, in quanto i pazienti ARO sono caratterizzati da un elevato numero di cellule CD34+ nel sangue periferico. L'analisi approfondita delle popolazioni ematopoietiche evidenzia una forte somiglianza con la composizione del midollo osseo. Poiché il prelievo di midollo osseo o la mobilizzazione di HSPC non possono essere effettuati nei pazienti con osteopetrosi, abbiamo trasdotto le cellule CD34+ con i vettori lentivirali e poi applicato un protocollo di espansione delle HSPC ex vivo. Le cellule manipolate hanno mantenuto la capacità di attecchire a lungo termine e di ricostituire le sottopopolazioni ematopoietiche nei topi immunodeficienti. Inoltre, le cellule CD34+ hanno mostrato la capacità di differenziare in osteoclasti in grado di riassorbire dischetti di osso in vitro. In conclusione, abbiamo dimostrato che la terapia genica e l'espansione delle HSPC rappresentano un protocollo utilizzabile per la cura dell'osteopetrosi. Tale terapia rappresenta una nuova opportunità terapeutica per il trattamento mediante terapia genica di patologie scheletriche caratterizzate da fibrosi del midollo osseo.

1. Villa A, Guerrini MM, Cassani B, Pangrazio A, Sobacchi C. Infantile malignant, autosomal recessive osteopetrosis: the rich and the poor. *Calcif. Tissue Int.* 2009;84(1):1–12.
2. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013;9(9):522–536.
3. Stepsky P, Grisariu S, Avni B, et al. Stem cell transplantation for osteopetrosis in patients beyond the age of 5 years. *Blood Adv.* 2019;3(6):862–868.
4. Steward CG. Hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis. *Pediatr. Clin. North Am.* 2010;57(1):171–80.
5. Orchard PJ, Fath AL, Le Rademacher J, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for infantile osteopetrosis. *Blood.* 2015;126(2):270–276.
6. Schulz AS, Moshous D, Steward CG, Villa A, Sobacchi C. Osteopetrosis. Consensus guidelines for diagnosis, therapy and follow-up. *ESID - EBMT WP Inborn Errors.* 2015;1–35.
7. Scimeca JC, Quincey D, Parrinello H, et al. Novel mutations in the TCIRG1 gene encoding the  $\alpha 3$  subunit of the vacuolar proton pump in patients affected by infantile malignant osteopetrosis. *Hum. Mutat.* 2003;21(2):151–157.
8. Zonari E, Desantis G, Petrillo C, et al. Efficient Ex Vivo Engineering and Expansion of Highly Purified Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations for Gene Therapy. *Stem Cell Reports.* 2017;8(4):977–990.

Osteopetrosi Autosomica Recessiva

Coordinator: Anna Villa  
Duration (N. Years): 5  
Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16C05

**Disease Name:**

Autosomal Recessive Osteopetrosis

**Keywords:**

Gene therapy, Osteopetrosis, Lentiviral vectors