

Poster P.18.128

GENE CORRECTION OF CD40LG GENE IN T CELLS AND HSPC FOR THE TREATMENT OF X-LINKED HYPER-IGM IMMUNODEFICIENCY

Vavassori V.^[1], Mercuri E.^[1], Schirotti G.^[1], Marcovecchio G.^[1], Castiello M.C.^[1], Annoni A.^[1], Albano L.^[1], Capo V.^[1], Margulies C.^[2], Buquicchio F.^[2], Cotta--Ramusino C.^[2], Villa A.*^[1], Naldini L.^[1], Genovese P.^[1]

^[1]San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, ^[2]Editas Medicine ~ Boston ~ United States of America

X-linked hyper-IgM syndrome (HIGM1) is caused by mutations of CD40LG, whose absence in CD4 T-cells impairs their helper signaling for B-cell activation/immunoglobulin class-switching. Since its unregulated expression caused lymphoproliferation/lymphomas, we aimed to correct CD40LG while preserving its physiologic regulation. Corrected autologous T-cells could provide immediate therapeutic benefit to patients by resolving pre-existing infections and bridge them towards a definitive cure by Hematopoietic-Stem/Progenitor-Cell (HSPC) transplant. To validate this strategy, we infused wild-type T-cells into HIGM1 mice pre-conditioned or not with different lymphodepleting regimens, reaching long-term, stable T-cell engraftment and partial rescue of antigen-specific IgG response upon vaccination. Thus, we optimized a CRISPR/Cas9-based protocol to insert a corrective cDNA into the first intron of CD40LG in human T-cells and correct most disease-causing mutations with the same highly-specific reagents. This strategy allows ~40% T-cell correction while preserving the long-term-repopulating T-stem-memory cells. CD40L expression and physiologic regulation was restored on edited CD4+ T-cells from both healthy donors and HIGM1 patients, reaching up-to 60% of wild-type expression level. Corrected T-cells provided normal contact-dependent helper function to B-cell as assessed by in-vitro proliferation, class-switching and IgG secretion assays. To increase the yield of edited T-cell before transplant, we coupled the corrective cDNA with a clinical-compatible selector gene and confirmed that enriched T-cells preserved their engraftment capacity in NSG mice. Since surface expression of the reporter gene was observed also in resting cells, we exploited an optimized, truncated version of the EGFR selector gene for allowing in vivo tracking of the edited cells and, in case of adverse events, their depletion by a pharmaceutical-grade monoclonal antibody. Our work establishes the rationale and guiding principles for clinical translation of T cells gene correction for treating HIGM1 patients.

La sindrome da iper-IgM legata all'X (HIGM1) è causata da mutazioni di CD40LG, la cui assenza nelle cellule T CD4 compromette la loro capacità di attivazione delle cellule B e induzione del cambio di classe delle immunoglobuline. Poiché la sua espressione non regolata ha causato linfoproliferazione/linfomi in un modello murino, abbiamo mirato a correggere il CD40LG preservandone la regolazione fisiologica. Le cellule T autologhe corrette potrebbero fornire un beneficio terapeutico immediato ai pazienti risolvendo infezioni preesistenti e collegandole a una cura definitiva mediante trapianto di cellule staminali ematopoietiche / cellule progenitrici (HSPC). Per validare questa strategia, abbiamo infuso cellule T wild-type in topi HIGM1 preconditionati o meno con diversi regimi linfodepletanti, raggiungendo l'attecchimento stabile a lungo termine delle cellule T e il recupero parziale della risposta IgG specifica dell'antigene dopo la vaccinazione. Pertanto, abbiamo ottimizzato un protocollo basato su CRISPR/Cas9 per inserire un cDNA correttivo nel primo introne di CD40LG nelle cellule T umane e correggere la maggior parte delle mutazioni che causano malattie con un unico set di reagenti altamente specifici. Questa strategia consente di correggere circa il 40% delle cellule T preservando le cellule di staminali della memoria T, capaci di ripopolamento a lungo termine. L'espressione di CD40L e la sua regolazione fisiologica sono state ripristinate su

cellule T CD4 + editate da donatori sani e pazienti HIGM1, raggiungendo fino al 60% del livello di espressione fisiologico. Le cellule T corrette hanno fornito la normale funzione di supporto dipendente dal contatto alle cellule B, valutata mediante test di proliferazione in vitro, cambio di classe e secrezione di IgG. Per aumentare la resa delle cellule T modificate prima del trapianto, abbiamo accoppiato il cDNA correttivo con un gene selettore clinicamente compatibile e confermato che le cellule T arricchite conservavano la loro capacità di attecchimento nei topi NSG. Poiché l'espressione superficiale del gene reporter è stata osservata anche nelle cellule a riposo, abbiamo sfruttato una versione troncata ottimizzata del gene selettore EGFR per consentire il tracciamento in vivo delle cellule modificate e, in caso di eventi avversi, la loro deplezione da parte di un anticorpo monoclonale di livello farmaceutico. Il nostro lavoro stabilisce le motivazioni e i principi guida per la traduzione clinica della correzione genica delle cellule T per il trattamento di pazienti con HIGM1.

Genovese et al., Nature 2014

Schioli et al., Science Translational Medicine 2017

Schioli et al., Cell Stem Cell 2019

Sindrome da iper-IgM legata al cromosoma X

Coordinator: Pietro Genovese

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

TGT16E3

Disease Name:

X-linked Hyper IgM Syndrome

Keywords:

Gene Editing, CD40L, Immunodeficiency