

Poster P.20.131

GENE THERAPY AND PATHOGENESIS OF CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE

Jofra Hernández R.*, Migliavacca M., Scala S., De Mattia F., Basso--Ricci L., Calabria A., Benedicenti F., Farinelli G., Ilaria Visigalli I., Carriglio N., De Simone M., Vezzoli M., Cecere F., Norata R., Mauro V., Sanvito F., Cristofori P., Albertini P., Mortellaro A., Montini E., Gentner B., Naldini L., Aiuti A.

San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget) ~ Milan ~ Italy

Chronic granulomatous disease (CGD) is a rare inherited phagocyte disorder characterized by the inability to produce reactive oxygen species due to the absence of NADPH oxidase activity^{1,2}. The objectives of this project is developing an effective gene therapy (GT) approach for CGD patients and better understanding disease pathogenesis. SR-Tiget developed the MSP.gp91_126T(2) lentiviral vector (LV) targeting the expression of gp91phox to granulocytes/monocytes by a combination of transcriptional and micro-RNA-mediated regulation^{3,4}. To assess the toxic and tumorigenic potential of transduced lineage-depleted (Lin-) hematopoietic stem-progenitor cells (HSPCs), we conducted a GLP study in Cybb-KO mice, a mouse model of XCGD. Cybb-KO Lin- cells were transduced or mock-transduced, and transplanted into lethally irradiated Cybb-KO mice. GT improved mice survival and blood leukocytes counts. Granulocytes and monocytes showed normal gp91phox expression and NADPH activity. After 12 months, pathological findings characterizing the XCGD model, such as granuloma, systemic inflammation, were reduced in GT mice. A diffuse lymphoblastic lymphoma caused the death of one out of 20 mice of the UT and GT groups. One GT mouse developed myeloid leukemia, while malignant sarcoma was observed in one mock mouse. These histopathological findings were considered within the background occurrence of mice exposed to irradiation. A genome-wide integration site (IS) analysis revealed that the IS number and population diversity of BM cells were on average similar to those observed in mouse preclinical studies. However, four GT mice showed a more oligoclonal IS distribution, so additional experiments, are ongoing to establish the safety of the GT approach.

We next investigated whether prolonged inflammation could alter the HSPC fitness by performing deep immunophenotyping of BM patients' CD34+HSPCs^{5,6}. The proportion of hematopoietic stem cells (HSC) and multipotent progenitors (MPP) was lower in the BM of pediatric XCGD patients compared to age-matched healthy donors, while the percentage of HSC and MPP of adult XCGD patients was comparable to healthy adult controls. Lymphoid early T-cell progenitors and Pre B/NK cells were present in the BM of pediatric XCGD patients and healthy donors, but not in adult XCGD patients. Moreover, we designed a new HSC mobilization strategy for XCGD patients combining G-CSF/Plerixafor with Ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug. The procedure was well-tolerated with no occurrence of adverse events. The peak number of CD34+ cells in PB of the two patients enrolled was 170 and 63 cells/ μ l, with a total yield of 1.19 and 0.51 $\times 10^9$, respectively. Collectively, we found that long-term exposure of patients' HSPCs to an inflammatory environment impacts negatively on their maintenance and differentiation, and thus, new mobilization strategies aimed at reducing inflammation are particularly valuable in patients with CGD.

Terapia genica e patogenesi della malattia granulomatosa cronica.

La malattia granulomatosa cronica (CGD) è un disturbo ereditario caratterizzato dall'incapacità dei fagociti di produrre specie reattive dell'ossigeno causata dall'assenza d'attività della NADPHossidasi^{1,2}. Gli obiettivi di questo progetto sono lo sviluppo di un approccio di terapia genica per i pazienti con CGD e migliorare la comprensione della patologia. SR-Tiget ha sviluppato il vettore lentivirale MSP.gp91_126T (2) (LV) che indirizza l'espressione di gp91phox nei granulociti e

monociti^{3,4}. Per valutare la tossicità e tumorigenicità delle cellule staminali progenitrici ematopoietiche (HSPCs) trasdotte, abbiamo condotto uno studio GLP nel modello murino CGD. Le cellule del midollo osseo (BM) dei topi CGD sono state trasdotte/non trasdotte (mock) e trapiantate in topi CGD condizionati. La GT ha migliorato la sopravvivenza e normalizzato il numero dei leucociti nel sangue (PB). Granulociti e monociti hanno mostrato una normale espressione di gp91phox e attività di NADPH. Dopo 12 mesi, le caratteristiche patologiche del modello CGD (granuloma, infiammazione sistemica) sono marcatamente ridotti nei topi GT. Nei 20 topi/gruppo, 1 linfoma linfoblastico nei UT e GT, 1 leucemia mieloide nei GT e 1 sarcoma maligno nei mock è stata la causa di morte; dati compatibili con quanto riportato in topi irradiati letalmente. Un'analisi d'integrazione genomica (IS) del LV ha rivelato che il numero di IS e la diversità di popolazione delle cellule BM erano in media simili a quelli osservati negli studi preclinici nel topo. Tuttavia, quattro topi GT hanno mostrato una distribuzione IS più oligoclonale, e quindi sono in corso ulteriori esperimenti per stabilire la sicurezza dell'approccio GT.

Abbiamo poi esaminato se l'infiammazione prolungata possa alterare le HSPCs eseguendo un'immunofenotipo completo delle cellule CD34+ HSPCs dei pazienti^{5,6}. La proporzione di cellule staminali ematopoietiche (HSC) e progenitori multipotenti (MPP) era inferiore nel BM dei pazienti XCGD pediatrici rispetto ai donatori sani, mentre la percentuale di HSC e MPP dei pazienti adulti e controlli sani era paragonabile. I progenitori linfoidei precoci delle cellule T e le cellule Pre-B/NK erano presenti nel BM di pazienti pediatrici e donatori sani, ma non in pazienti adulti. Inoltre, abbiamo elaborato una nuova strategia di mobilitazione delle cellule HSC combinando G-CSF/Plerixafor con Ibuprofen, un farmaco antinfiammatorio non steroideo. La procedura è ben tollerata senza eventi avversi. Il numero massimo di cellule CD34+ nel PB dei due pazienti era di 170 e 63 cellule/ μ l, con una resa totale rispettivamente di 1,19 e 0,51 $\times 10^9$. Riassumendo, abbiamo identificato che l'esposizione degli HSPC dei pazienti a un ambiente infiammatorio ha un impatto negativo sul loro mantenimento e differenziamento, quindi, nuove strategie di mobilitazione volte a ridurre l'infiammazione sono particolarmente preziose nei pazienti con CGD.

1. Rider NL, Jameson MB, Creech CB. Chronic Granulomatous Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Genetic Basis of Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018. 7(suppl_1): p.S2-S5.
2. Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther.* 2017 Dec;34(12):2543-2557.
3. Chiriaco M, Farinelli G, Capo V, Zonari E, Scaramuzza S, Di Matteo G, Sergi LS, Migliavacca M, Hernandez RJ, Bombelli F, Giorda E, Kajaste-Rudnitski A, Trono D, Grez M, Rossi P, Finocchi A, Naldini L, Gentner B, Aiuti A. Dual-regulated lentiviral vector for gene therapy of X-linked chronic granulomatosis. *Mol Ther.* 2014. 22(8): p. 1472-1483.
4. Farinelli G, Jofra Hernandez R, Rossi A, Ranucci S, Sanvito F, Migliavacca M, Brombin C, Pramov A, Di Serio C, Bovolenta C, Gentner B, Bragonzi A, Aiuti A. Lentiviral Vector Gene Therapy Protects XCGD Mice From Acute Staphylococcus aureus Pneumonia and Inflammatory Response. *Mol Ther.* 2016 Oct;24(10):1873-1880.
5. Ludin A, Gur-Cohen S, Golan K, Kaufmann KB, Itkin T, Medaglia C, Lu XJ, Ledergor G, Kollet O, Lapidot T. Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Oct 10;21(11):1605-19.
6. Weisser M, Demel UM, Stein S, Chen-Wichmann L, Touzot F, Santilli G, Sujer S, Brendel C, Siler U, Cavazzana M, Thrasher AJ, Reichenbach J, Essers MAG, Schwäble J, Grez M. Hyperinflammation in patients with chronic granulomatous disease leads to impairment of hematopoietic stem cell functions. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jul;138(1):219-228.e9.
7. Yannaki E, Karponi G, Zervou F, Constantinou V, Bouinta A, Tachynopoulou V, Kotta K, Jonlin E,

Papayannopoulou T, Anagnostopoulos A, Stamatoyannopoulos G. Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with β -thalassemia major. Hum Gene Ther. 2013 Oct;24(10):852-60.

Malattia Granulomatosa cronica

Coordinator: Alessandro Aiuti

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

Telethon Project (nr):

SR-TIGET PROJECT GENE THERAPY

Disease Name:

Chronic Granulomatous Disease

Keywords:

Chronic granulomatous disease, gene therapy, hematopoietic stem cell mobilization