

## Poster P.20.133

### MECHANISMS OF ENHANCED HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSDUCTION AND NUCLEIC ACID SENSING

Petrillo C.<sup>[1]</sup>, Piras F.<sup>[1]</sup>, Unali G.<sup>[1]</sup>, Cittaro D.<sup>[2]</sup>, Calabria A.<sup>[1]</sup>, Castiglioni I.<sup>[1]</sup>, Cuccovillo I.<sup>[1]</sup>, Matafora V.<sup>[3]</sup>, Bachi A.<sup>[3]</sup>, Montini E.<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>, Gentner B.<sup>[1]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Kajaste--Rudnitski A.\*<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>SR-TIGET ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Center for Translational Genomics and Bioinformatics ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation (IFOM) ~ Milano ~ Italy

Current hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) gene therapy protocols require the use of multiple hits at high vector doses and prolonged ex vivo culture to reach clinically relevant transduction levels, imposing large-scale vector production and potentially compromising HSPC preservation in culture. Therefore, improving LV transduction efficiency in HSPC remains a high priority goal for the field. With this general objective in mind, this Research Project proposal builds on our previous observations that lentiviral transduction efficiency can be significantly increased in presence of compounds such as Cyclosporin A (CsA) or Rapamycin through distinct mechanisms (Petrillo et al., Mol Ther. 2015) as well as molecular insight we have gained regarding the signaling cascades activated upon transduction in human HSPC. These findings set the grounds for the characterization of the molecular mechanisms of LV restriction in HSPC and open the door for investigating the impact LV transduction and, more broadly, nucleic acid sensing have in different disease settings (Kajaste-Rudnitski and Naldini, Hum Gene Ther. 2015).

Up to date, our studies on vector-host interactions have uncovered substantial differences in how HSPC sense distinct viral vectors (Piras et al., EMBO Mol Med 2017) and identified the antiviral protein IFITM3 as a potent innate immune block to gene transfer constitutively active in HSPC, leading to the development of novel, highly efficient gene therapy approaches based on the use of cyclosporine H (Petrillo et al., Cell Stem Cell 2018). We have also recently shown that cyclosporine A may also preserve HSPC during ex vivo manipulation (Petrillo et al., Human Gene Ther 2019). We are currently investigating LV-mediated signaling and nucleic acid sensing in inflammatory disease backgrounds for more stealth gene transfer and work on identifying the molecular partners involved in IFITM3 restriction of lentiviral transduction in HSPC and the capacity of cyclosporines to overcome it. Overall, our efforts to understand the crosstalk between HSPC and viral vectors instructs us on which immune sensors and effectors to avoid and how, providing means to maximize gene engineering efficiencies and curb donor variability while preserving HSPC biological properties.

### MECCANISMI DI EFFICIENTE TRASDUZIONE E DI RICONOSCIMENTO DEGLI ACIDI NUCLEICI NELLE CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

Ad oggi, per essere efficace, il protocollo clinico di terapia genica su cellule staminali ematopoietiche (CSE) richiede l'uso in combinazione di esposizioni ripetute e alte dosi di vettore unite ad una potente stimolazione cellulare. Questi due fattori impattano negativamente sull'efficienza della procedura poiché, da una parte, impongono il bisogno di una grande quantità di vettore, mentre dall'altra la prolungata cultura ex vivo può interferire con le delicate funzioni biologiche delle CSE. Migliorare l'efficienza di trasduzione delle CSE da parte dei vettori lentivirali resta quindi un obiettivo primario nel campo della terapia genica, poiché questo consentirebbe di abbassare i costi della procedura, altrimenti insostenibili, e diminuire il possibile impatto della terapia sulla fisiologia della cellula. Per raggiungere questo obiettivo, ci baseremo sui nostri precedenti studi in cui abbiamo mostrato sia che

composti quali ciclosporina A (CsA) e Rapamicina sono in grado di aumentare notevolmente la trasduzione lentivirale (Petrillo et al, Mol Ther. 2015) sia quali sono le vie molecolari attivate dalla trasduzione virale in CSE umane. Il nostro lavoro ha permesso di gettare le fondamenta per la caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base della resistenza delle CSE alla trasduzione lentivirale, e ha dato inizio agli studi sull'impatto della trasduzione lentivirale e più in generale l'impatto che il riconoscimento degli acidi nucleici ha in diversi contesti patologici (Kajaste-Rudnitski and Naldini, Hum Gene Ther. 2015).

In questo contesto, abbiamo osservato che le CSE reagiscono in modo molto differente a diversi tipi di vettori di terapia genica (Piras et al., EMBO Mol Med 2017) e stiamo valutando l'impatto della trasduzione nel contesto di CSE da pazienti con patologie infiammatorie. Inoltre, siamo riusciti ad individuare la proteina antivirale IFITM3 come responsabile di un potente blocco all'ingresso dei vettori lentivirali nelle CSE e scoperto che questo blocco può essere superato in modo molto efficiente dalla ciclosporina H (Petrillo et al., Cell Stem Cell 2018). I nostri studi più recenti suggeriscono anche che, oltre ad aumentare l'efficienza del trasferimento genico, le ciclosporine possano avere un'azione benefica nel preservare le CSE durante la fase di manipolazione ex vivo (Petrillo et al., Human Gene Ther 2019). Sono in corso studi per identificare i partner molecolari coinvolti negli effetti di IFITM3 e delle ciclosporine nelle CSE. Nel complesso, i nostri studi sulle interazioni tra CSE e vettori di terapia genica ci permetteranno di sviluppare strategie di terapia genica più efficaci e sicuri per il trattamento di numerose malattie.

Petrillo C, Cesana D, Piras F, Bartolaccini S, Naldini L, Montini E, Kajaste-Rudnitski A. Cyclosporin A and Rapamycin relieve distinct lentiviral restriction blocks in hematopoietic stem and progenitor cells. Mol Ther., Feb. 23. 2015.

Kajaste-Rudnitski A. and Naldini L., Cellular innate immunity and restriction of viral infection - implications for lentiviral gene therapy in human hematopoietic cells. Hum Gene Ther. Apr;26(4):201-9. 2015.

Piras F, Riba M, Petrillo C, Lazarevic D, Cuccovillo I, Bartolaccini S, Stupka E, Gentner B, Cittaro D, Naldini L, Kajaste-Rudnitski A. Lentiviral Vectors Escape Innate Sensing but Trigger p53 In Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. EMBO Mol Med. Sep;9(9):1198-1211. 2017.

Petrillo C, Thorne LG, Unali G, Schioli G, Giordano AMS, Piras F, Cuccovillo I, Petit SJ, Ahsan F, Noursadeghi M, Clare BS, Genovese P, Gentner B, Cittaro D, Naldini L, Towers GJ, Kajaste-Rudnitski A\*. Cyclosporine H Overcomes Innate Immune Restrictions to Improve Lentiviral Transduction and Gene Editing In Human Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell. 2018 Dec 6;23(6):820-832.e9.

Petrillo C, Calabria A, Piras F, Capotondo A, Spinozzi G, Cuccovillo I, Benedicenti F, Naldini L, Montini E, Biffi A, Gentner B, Kajaste-Rudnitski A\*. Assessing the impact of Cyclosporine A on lentiviral transduction and preservation of human hematopoietic stem cells in clinically relevant ex-vivo gene therapy settings. Hum Gene Ther. 2019 Apr 30.

Malattie Genetiche

Coordinator: Anna Kajaste-Rudnitski

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16C03

**Disease Name:**

Genetic Disorders

**Keywords:**

HSC gene therapy, Innate Immunity, Vector-host interactions