

## Poster P.20.134

### ADVANCED GENETIC ENGINEERING OF HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS

Ferrari S.<sup>[2]</sup>, Jacob A.<sup>[2]</sup>, Manzi M.<sup>[2]</sup>, Fiumara M.<sup>[2]</sup>, Mercuri E.<sup>[2]</sup>, Beretta S.<sup>[2]</sup>, Vavassori V.<sup>[2]</sup>, Albano L.<sup>[2]</sup>, Ranghetti A.<sup>[2]</sup>, Amabile A.<sup>[2]</sup>, Cittaro D.<sup>[1]</sup>, Lazarevic D.<sup>[1]</sup>, Merelli I.<sup>[3]</sup>, Lombardo A.<sup>[2]</sup>, Genovese P.<sup>[2]</sup>, **Naldini L.**<sup>\*[2]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>National Research Council, Institute for Biomedical Technologies ~ Milan ~ Italy

Targeted gene editing (GE) holds therapeutic promise for several inherited blood diseases. Its application in hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) has been limited by low efficiency of homology-directed repair (HDR) in long-term repopulating HSPC and decreased engraftment due to ex-vivo manipulation. Here, we aimed to establish a transferable-to-the-clinic GE protocol by enhancing the total yield of edited HSPC. To identify the biological responses constraining GE efficiency in repopulating HSPC, we analyzed the transcriptional landscape of treated cells early after GE. We found that the innate response to viral delivery of HDR-donor template and the nuclease-induced DNA double-strand breaks induced p53-dependent DNA damage response delaying cell proliferation and decreasing host repopulation. Yet, transient p53 inhibition released cell cycle block, increased the yield of engrafting edited HSPC and boosted 5-fold the clonal composition within the edited human graft compared to control. Since HDR is restricted to cells engaged in S/G2 cell cycle phases, we screened a panel of adenoviral proteins to force cell cycle progression upon transient expression during GE. Adeno5 E4orf6/7 increased HDR efficiency by 50% in primitive HSPC inducing self-limiting cell cycle activation, without impairing clonogenic output. Combination of E4orf6/7 expression and p53 inhibition allowed high and stable editing efficiencies (50%) in the human graft, even in secondary recipients, with polyclonal composition and unperturbed clonal dynamics. A further strategy to increase the proportion of corrected cells within the graft is based on enrichment, and eventually expansion, of a pure population of HDR-edited cells before in vivo administration. We developed a selection strategy combining state-of-the-art GE protocol and transient overexpression of a selector gene by engineered transient activators. We achieved proof-of-principle of robust and specific selector transactivation in HDR-edited HSPCs, even when using clinically compliant selector, reaching up to 90% purity. We are also exploring the possibility of improving edited cells engraftment by coupling the treatment to upregulation of protein involved in phagocytosis protection (CD47) and niche homing (CXCR4). By transiently overexpressing these proteins we enhanced human HSPC engraftment in NSG mice. Moreover, when these CD47/CXCR4 overexpressing cells were transplanted in previously established human hematochimeric mice undergoing HSPC mobilization in the peripheral blood, the infused cells efficiently outcompeted the mobilized ones and established higher and more stable chimerism than controls, suggesting the possibility to engraft a relevant proportion of ex vivo treated HSPC without any genotoxic conditioning. Altogether, these results significantly improve the overall outcome of targeted GE in HSPC and give confidence towards its future clinical translation.

Ingegneria Genetica Innovativa di Cellule Progenitrici/Staminali Ematopoietiche

La modificazione genetica mirata (GE) è un promettente trattamento per diverse patologie ematologiche ereditarie. La sua applicazione su cellule staminali/progenitrici ematopoietiche (CSPE) è ostacolata da bassa efficienza di ricombinazione omologa (RO) in CSPE ripopolanti a lungo termine e basso attecchimento dopo manipolazione ex-vivo. In questo lavoro, vogliamo stabilire un protocollo trasferibile alla clinica aumentando la quantità totale di CSPE modificate. Per identificare risposte biologiche limitanti l'efficienza di GE in HSPC, abbiamo analizzato il profilo trascrizionale di cellule

trattate per GE. Abbiamo osservato che la risposta innata allo stampo virale per RO e la rottura del DNA da nucleasi avviano una risposta p53-dipendente, rallentando la proliferazione e diminuendo la ripopolazione dell'ospite. L'inibizione transiente di p53 rilascia l'arresto proliferativo, aumenta la frazione di CSPE modificate attecchite e incrementa 5 volte il numero di cloni nella popolazione attecchita rispetto al controllo. Visto che la RO è limitata a cellule in fase S/G2, abbiamo valutato un set di proteine adenovirali che forzano transientemente la progressione del ciclo durante GE. Adeno5-E4orf6/7 incrementa l'efficienza di RO del 50% in CSPE primitive attivando il ciclo cellulare, senza peggiorare la clonogenicità. La combinazione di espressione di E4orf6/7 e inibizione di p53 consente alte efficienze di modificazione (50%) nei trapianti di cellule umane, anche in riceventi secondari, con policlonalità e dinamiche clonali imperturbate. Un'ulteriore strategia per incrementare la frazione di cellule corrette si basa su arricchimento e possibile espansione di una popolazione pura di cellule modificate con RO prima dell'amministrazione in vivo. Abbiamo sviluppato una strategia di selezione combinando il protocollo attuale di GE e sovraespressione transiente con attivatori trascrizionali di geni selettori. Abbiamo ottenuto la prova di principio di robusta e specifica transattivazione in CSPE modificate con RO, usando selettori clinicamente compatibili e raggiungendo 90% di purezza. Stiamo esplorando la possibilità di migliorare l'attecchimento delle cellule corrette accoppiando il trattamento con la sovraespressione di proteine coinvolte in protezione della fagocitosi (CD47) e homing nella nicchia (CXCR4). Sovraesprimendole transientemente abbiamo aumentato l'attecchimento delle HSPC umane in topi NSG. Quando cellule CD47/CXCR4-soveraesprimenti sono trapiantate in modelli murini ematochimerici umani sottoposti a mobilitazione, le cellule infuse rimpiazzano le mobilitate e stabiliscono più alto e stabile chimerismo dei controlli, suggerendo la possibilità di attecchimento di una porzione rilevante di CSPE trattate ex-vivo senza condizionamento genotossico. Nel complesso, questi risultati migliorano l'esito del GE e ne rinforzano il razionale per la traslazione clinica.

L. Naldini, Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526, 351-360 (2015).

G. Schirotti, S. Ferrari, A. Conway, A. Jacob, V. Capo, L. Albano, T. Plati, M. C. Castiello, F. Sanvito, A. R. Gennery, C. Bovolenta, R. Palchaudhuri, D. T. Scadden, M. C. Holmes, A. Villa, G. Sitia, A. Lombardo, P. Genovese, L. Naldini, Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1. *Science translational medicine* 9, (2017).

Schirotti, G, Conti, A, Ferrari, S, della Volpe, L, Jacob, A, Albano, L, et al. (2019). Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response. *Cell Stem Cell* doi:10.1016/j.stem.2019.02.019.

Sindrome HIGM

Coordinator: Luigi Naldini

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16E04

**Disease Name:**

HIGM Syndrome

**Keywords:**

HIGM Syndrome, Genome Editing, Hematopoietic Stem Cells