

## Poster P.20.137

### IDENTIFICATION AND THERAPY OF COMBINED IMMUNODEFICIENCIES AND ADENOSINE DEAMINASE 2 DEFICIENCY

Brigida I.<sup>[1]</sup>, Zoccolillo M.<sup>[1]</sup>, Cicalese M.P.<sup>[2]</sup>, Hernandez R.J.<sup>[1]</sup>, Barzaghi F.<sup>[2]</sup>, Sartirana C.<sup>[1]</sup>, Sergi L.<sup>[1]</sup>, Scala S.<sup>[1]</sup>, Basso--Ricci L.<sup>[1]</sup>, Naldini L.<sup>[1]</sup>, Mortellaro A.\*<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Combined Immunodeficiencies (CID) are a heterogeneous group of genetic immune disorders, characterized by overlapping clinical signs and symptoms. Next-generation sequencing (NGS) has tremendously expanded the array of new defects in immune-related genes. To identify disease causative genes, we developed five target panels for Ion Torrent and Haloplex target system sequencing platforms. The complementary use of the two targeted sequencing approaches allowed the identification of causative variants in 28.6% of 105 patients<sup>1</sup>. In six unrelated patients, we identified new mutations in the ARPC1B gene encoding a protein required for the regulation of the actin cytoskeleton mediated by the ARP2/3 complex. Absence/low expression of ARPC1B in T cells resulted in impaired TCR-mediated proliferation and SDF-1 $\alpha$ -directed migration. ARPC1B correction by a lentiviral vector (LV)-mediated gene transfer approach restored ARPC1B expression and improved in vitro proliferation of patients' T cells<sup>2</sup>. Additional studies are ongoing for the characterization of a new CID caused by mutations in the CECR1 gene encoding the adenosine deaminase 2 (ADA2). Patients with ADA2 deficiency (DADA2) suffer from vasculitis, lacunar stroke, cerebral hemorrhages, systemic inflammation, cytopenia, and B-cell deficiency<sup>3,4</sup>. If undiagnosed or left untreated, DADA2 patients are at high risk of severe disability or death. Safe and targeted therapeutic options for DADA2 patients need to be rapidly developed. We generated a lentiviral vector (LV) encoding ADA2 to transduce CD34+ hematopoietic stem-progenitor cells (HSPCs) isolated from DADA2 patients and healthy donors (HD) and assess the efficacy and toxicity of ADA2 gene transfer. LV-mediated overexpression of ADA2 in HDs' HSPCs was not toxic, and cells maintained a normal clonogenic potential in vitro. Immunological reconstitution was efficiently achieved in humanized mice, and preliminary results showed a selective advantage of B and myeloid cells in mice receiving ADA2-transduced human CD34+ cells compared to those transplanted with GFP-transduced CD34+ cells. To study the correction of the DADA2-associated immune defects, we generated an ADA2-deficient (KO) U937 monomyelocytic cell line by CRISPR/Cas9 approach. ADA2 KO U937 cells well recapitulated the pro-inflammatory features observed in macrophages of DADA2 patients. Specifically, loss of ADA2 resulted in high expression of TNF and interferon stimulated-genes, and an imbalanced M1/M2 macrophage differentiation toward a pro-inflammatory M1 phenotype. Experiments assessing the LV-mediated correction of immune dysregulation in DADA2 macrophages are currently ongoing. In conclusion, NGS is a valuable diagnostic platform for the identification of new causative variants or genes that contribute to CID, and ADA2-encoding LV represents a powerful tool for the preclinical development of a gene therapy approach for DADA2.

Identificazione e terapia delle immunodeficienze combinate e del deficit di adenosina deaminasi 2

Le immunodeficienze combinate (CID) sono un gruppo eterogeneo di difetti immunologici caratterizzato da segni e sintomi clinici sovrapponibili. L'utilizzo di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha ampliato enormemente la gamma di nuovi difetti immuno-correlati.

Abbiamo sviluppato 5 pannelli per le piattaforme di sequenziamento Ion Torrent e Haloplex per l'identificazione dei geni che causano la malattia in pazienti CID. L'uso complementare dei due approcci ha permesso di identificare varianti causali nel 28,6% dei 105 pazienti analizzati<sup>1</sup>. Inoltre, abbiamo identificato in sei pazienti nuove mutazioni nel gene ARPC1B che codifica una proteina necessaria per la regolazione del citoscheletro. Per la prima volta abbiamo descritto difetti di proliferazione e migrazione delle cellule T, che sono state corrette mediante il trasferimento genico di ARPC1B con un vettore lentivirale (LV)<sup>2</sup>. Ci stiamo inoltre occupando di caratterizzare una nuova CID causata dal deficit di adenosina deaminasi 2 (ADA2). I pazienti presentano vasculite, difetti neurologici, infiammazione sistemica e difetto delle cellule B<sup>3,4</sup>. La varietà dei sintomi rende la malattia invalidante, potenzialmente letale e difficile da diagnosticare. La terapia genica potrebbe rappresentare una speranza di cura per questi pazienti. Abbiamo sviluppato un LV per il trasferimento genico di ADA2 in cellule ematopoietiche staminali CD34+ di pazienti DADA2 e donatori sani (HD). L'overespressione di ADA2 nelle cellule CD34+ di HD non è tossica, le cellule mantengono in vitro un potenziale clonogenico normale. Quando trapiantate in topi umanizzati, le cellule CD34+ ADA2 trasdotte attecchiscono, differenziano in cellule mature con una espansione preferenziale dei linfociti B e cellule mieloidi. Per studiare la correzione dei difetti immunologici associati a DADA2, abbiamo generato una linea cellulare monomelicita U937 mancante (KO) di ADA2. Le cellule U937 ADA2 KO ricapitolano bene le caratteristiche pro-infiammatorie osservate nei macrofagi dei pazienti DADA2. Sono in corso esperimenti per valutare se il trasferimento genico di ADA2 nelle U937 ADA2 KO e nei monociti di pazienti sia in grado di correggere il fenotipo pro-infiammatorio e il difetto di polarizzazione di macrofagi anti-infiammatori di tipo M2. In conclusione, NGS è una eccellente piattaforma diagnostica per l'identificazione di nuove varianti o nuovi geni causativi delle CID, e inoltre, abbiamo dimostrato che il LV codificante ADA2 rappresenta un potente strumento per lo sviluppo preclinico di un approccio di terapia genica per DADA2.

1. Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, et al. Targeted NGS platforms for genetic screening and gene discovery in primary immunodeficiencies. *Front Immunol.* 2019 Apr 11.
2. Brigida I, Zoccolillo M, Cicalese MP, et al. T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood.* 2018;132(22):2362-2374.
3. Navon Elkan P, Pierce SB, Segel R, et al. Mutant adenosine deaminase 2 in a polyarteritis nodosa vasculopathy. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(10):921-31.
4. Zhou Q, Yang D, Ombrello AK, et al. Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(10):911-20.

Immunodeficienze combinate e Immunodeficienza da deficit di adenosina deaminasi 2

Coordinator: Aiuti Alessandro

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

TGT16C06

**Disease Name:**

Combined immunodeficiencies Adenosine Deaminase 2

**Keywords:**

Combined immunodeficiencies, Adenosine deaminase 2 deficiency, Gene therapy