

## Poster P.20.139

### NOVEL STRATEGIES TO GENERATE TOLEROGENTIC DENDRITIC CELLS FOR ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY

Passerini L.\*, Santoni De Sio F., Annoni A., Amodio G., Avancini D., Andolfi G., Passeri L., Fresolone L., Fortunato M., Gregori S.

*San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), IRCCS San Raffaele Scientific Institute, ~ MILAN ~ Italy*

Dendritic cells (DC) dictate immune responses by instructing T cells to respond to dangerous stimuli or to promote tolerance. DC-10 are IL-10-producing DC characterized by HLA-G and ILT4 expression that play a pivotal role in promoting tolerance via T regulatory cells (Tregs). We identified CD141 and CD163 that in combination with CD14 and CD16 enables the ex vivo identification of DC-10 (1). Using these markers we showed a lower frequency of DC-10 and higher proportion of pro-inflammatory cells is present pre-symptomatic and in symptomatic type 1 diabetic subject, indicating that circulating DC-10 may represent a biomarker of tolerance.

To improve the knowledge on DC-10, we analyzed the chromatin status and the transcriptome of DC-10. ATAC-seq led to the identification of DC-10 specific open chromatin regions and regulator elements (RE), putatively controlling target genes. Gene set enrichment analysis confirmed that identified target genes as over-expressed core, in which the DC-10 marker CD163, members of the LIR family and other Inhibitory receptors, and chemokine receptors and ligands putatively associated to tolerogenic functions were found. Transcription factors (TF) binding motif analysis revealed an enrichment for a well-known tolerogenic TF in T cells, binding sites. TF inhibition during DC-10 differentiation affects their phenotype, while TF activation during DC differentiation allows the up-regulation of DC-10 associated markers. Once validated, our findings will provide a comprehensive network of players that regulate tolerogenic pathways and will help identifying new molecular tools to induce or restore tolerance.

We generated stable tolerogenic DC suitable for cell-based approaches, using lentiviral vectors (LV) encoding for IL-10 in combination with i) a marker gene, or ii) a given antigen(Ag)-derived peptide fused the invariant chain, leading to stable presentation of the encoded Ag to both CD4+ and CD8+ T cells. In the first case engineered DC present alloAg to prevent graft rejection, while in the second case engineered DC stably present the encoded Ag to modulate autoimmunity. In both cases the presence of sustained levels of IL-10 will dampen pathogenic immune responses and promote/restore tolerance via Ag-specific Treg induction. DC transduced with LV co-encoding for IL-10 and marker gene or with LV co-encoding for IL-10 and invariant chain + peptide Ag secrete sustained levels of IL-10 in steady state and upon activation, but not IL-12; are phenotypically and functionally stable upon activation; modulate CD4+ and CD8+ T cell responses in vivo and in vitro; differentiate CD4+ T cells into Ag-specific Tregs in vitro. The combination of state-of-the-art LV-based strategy and the use of Ag-derived peptides makes our approach attractive to generate stable and effective human engineered DC for therapeutic applications in the context of organ transplantation and autoimmune diseases.

Le cellule dendritiche (DC) modulano le risposte immunitarie istruendo le cellule T a rispondere ai patogeni o a promuovere la tolleranza. Le DC-10 sono DC che producono IL-10, esprimono HLA-G e ILT4 e svolgono un ruolo fondamentale nel promuovere la tolleranza attraverso l'induzione delle cellule T regolatorie (Tregs). Abbiamo identificato il CD141 e CD163 che in combinazione con CD14 e CD16 consentono l'identificazione delle DC-10 in vivo (1). Usando tali marcatori abbiamo evidenziato una frequenza più bassa di DC-10 nei soggetti diabetici, dati a sostegno del potenziale uso delle DC-

10 come marcatori di tolleranza

Per caratterizzare le DC-10, abbiamo analizzato lo stato della cromatina e il trascrittoma. L'analisi ha portato all'identificazione di elementi regolatori (RE) specifici delle DC-10 che controllando l'espressione di diversi dei geni. L'analisi "Gene set enrichment" ha confermato che tra i target genetici delle RE sono presenti geni over-espressi nelle DC-10: il CD163, marcatore delle DC-10, membri della famiglia LIR, altri recettori inibitori e recettori e ligandi di chemochine che possono essere associati a funzioni tollerogeniche. L'analisi del motivo di legame dei fattori di trascrizione (TF) ha permesso di identificare un noto TF tollerogenico nelle cellule T. L'inibizione di tale TF durante la differenziazione delle DC-10 influenza il loro fenotipo, mentre la sua attivazione durante il differenziamento delle DC consente l'up-regolazione di marcatori associati alle DC-10. Una volta validati, i nostri risultati potranno fornire informazioni sui pathways che regolano la tolleranza e aiuteranno ad identificare nuovi target molecolari utili per indurre o ripristinare la tolleranza.

Abbiamo generato cellule DC tollerogeniche mediante uso di vettori lentivirali (LV) che esprimono IL-10 in combinazione con i) un gene marcatore, o ii) un peptide antigenico (Ag) fuso con la catena invariante, che permette la presentazione dell'Ag codificato alle cellule T CD4+ e CD8+. Nel primo caso le cellule DC ingegnerizzate presentano alloAg e sono utilizzabili per prevenire il rigetto di trapianti, nel secondo caso le cellule DC ingegnerizzate presentano autoAg e sono utilizzabili per modulare l'autoimmunità. In entrambi i casi la presenza di IL-10 inibisce le risposte immunitarie patologiche e promuove/ripristina la tolleranza attraverso l'induzione di cellule Tregs. DC trasdotte con vettori che esprimono IL-10 e un gene marker e DC trasdotte con vettori che esprimono IL-10 e peptide secernono livelli sostenuti di IL-10, ma non di IL-12; sono fenotipicamente e funzionalmente stabili; modulano le risposte delle cellule T CD4+ e CD8+; e promuovono il differenziamento di cellule Tregs. La combinazione di vettori lentivirali e l'uso di peptidi derivati da Ag rende il nostro approccio attraente per la generazione di cellule DC per applicazioni terapeutiche nel contesto del trapianto di organi e delle malattie autoimmuni.

1. Comi M., Avancini D., Santoni de Sio F., Villa M., Uyeda M.J., Floris M., Tomasoni D., Bulfone A., Roncarolo M.G., Gregori S. Co-expression of CD163 and CD141 identifies human circulating IL-10-producing dendritic cells (DC-10). *Cell Mol Immunol.* 2019 Mar 6. doi: 10.1038/s41423-019-0218-0.

Diabete Tipo 1, Mucopolisaccaridosi Tipo 1

Coordinator: Silvia Gregori

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16G01

**Disease Name:**

T Cell Mediated Diseases

**Keywords:**

TOLERANCE, LENTIVIRAL VECTORS, IMMUNOTHERAPY