

## Poster P.20.140

### HSPC BIOLOGY: IN VIVO CLONAL TRACKING AND LINEAGE MODELING

**Scala S.\*<sup>[1]</sup>**, Basso--Ricci L.<sup>[1]</sup>, Quaranta P.<sup>[1]</sup>, Dionisio F.<sup>[1]</sup>, Omrani M.<sup>[1]</sup>, Naldini M.M.<sup>[1]</sup>, Barcella M.<sup>[1]</sup>, Calabria A.<sup>[1]</sup>, Salerio F.A.<sup>[1]</sup>, Monti I.<sup>[1]</sup>, Giannelli S.<sup>[1]</sup>, Darin S.<sup>[2]</sup>, Migliavacca M.<sup>[2]</sup>, Merelli I.<sup>[1]</sup>, Gattillo S.<sup>[3]</sup>, Ostuni R.<sup>[1]</sup>, Ciceri F.<sup>[3]</sup>, Gentner B.<sup>[1]</sup>, Bernardo M.E.<sup>[1]</sup>, Ferrua F.<sup>[1]</sup>, Cicalese M.P.<sup>[1]</sup>, Aiuti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-TIGET), San Raffaele Scientific Institute, ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Pediatric Immunohematology and Bone Marrow Transplantation Unit, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy, <sup>[3]</sup>Division of Immunology, Transplantation, and Infectious Diseases, Immunohematology and transfusion medicine, San Raffaele Scientific Institute ~ Milan ~ Italy

Gene therapy (GT) is based on infusion of gene-modified autologous Hematopoietic Stem/Progenitor cells (HSPC) isolated from BM or mobilized peripheral blood (MPB), to correct inherited disorders. HSPC mobilization for GT is usually obtained through administration of G-CSF (G) and Plerixafor (P). Some circulating HSPC (cHSPC) can also be found in peripheral blood (PB) of un-mobilized subjects. Combining phenotypic characterization, transcriptome profiling using single-cell RNA sequencing (scRNAseq), functional assays and integration site clonal tracking, we are studying the behavior and fate of resident, circulating and mobilized HSPC in physiological conditions and after GT. To monitor hematopoietic reconstitution post-GT, we exploited a novel flow-cytometry assay capable of quantifying 23 different blood cell types, including HSPC subsets, in BM, MPB or PB samples (Basso-Ricci et al, 2017).

We described the in vivo reconstitution dynamics of 7 HSPC subtypes including hematopoietic stem cells (HSC), multipotent progenitors (MPP) and lymphoid- or myeloid-committed precursors in 6 Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) patients up to 5 years after ex vivo GT. Steady-state hematopoiesis, with stable HSPC compartment, was reached around 1-2 years post-GT with a lentiviral vector. Additive Bayesian network modeling suggests that short-living MPP were more active in the early phases and were replenished around 1 year after GT by long-living HSC, which then remained in charge of the hematopoietic output. This implies that long-term HSC, that were activated in vitro, were capable of homing and resilience upon re-infusion (Scala et al. 2018).

The analysis of CD34+ cell composition before transduction revealed that primitive HSC were present in both BM and MPB-HSPC sources with higher amounts of primitive and myeloid-committed progenitors in MPB. This latter finding, may explain the rapid neutrophil engraftment and platelet transfusion independence in MPB-GT, in line with the observations in transplanted patients. Similar myeloid and lymphoid reconstitution was observed in BM and MPB-GT groups from 1-year post-GT implying that both HSPC sources have similar long-term repopulating properties.

We are also studying HSPC trafficking in physiological conditions and after mobilization. We found that cHSPC are enriched for multipotent lymphoid progenitors and preliminary scRNAseq results unveiled a higher lymphoid and erythroid signature in PB vs. BM HSPC. On the other hand, we observed enrichment of both primitive and myeloid progenitors after administration of G, followed by an increase of lymphoid progenitor contribution after administration of P. We also found that primitive HSPC amounts in PB after G+P administration correlated with their counts before mobilization in both PB and BM. Understanding the molecular players controlling HSPC trafficking will provide novel potential targets for innovative HSPC mobilization strategies.

Tracking clonale delle cellule staminali e dei progenitori ematopoietici in vivo in esseri umani.

La terapia genica (GT) si basa sull'infusione di cellule staminali/progenitrici ematopoietiche (HSPC)

autologhe, isolate dal midollo osseo (BM) o da sangue periferico mobilizzato (MPB), modificate geneticamente per correggere malattie ereditarie. La mobilizzazione delle HSPC per GT si esegue somministrando G-CSF (G) e Plerixafor (P). Alcune HSPC circolanti (cHSPC) si possono trovare anche nel sangue periferico (PB) di soggetti non mobilizzati. Combinando analisi di caratterizzazione fenotipica e trascrizionale a singola cellula (scRNA), saggi funzionali e tracking clonale dei siti di integrazione, il nostro progetto ha lo scopo di studiare la biologia e le dinamiche delle cellule HSPC residenti nel BM, di quelle circolanti nel PB e di quelle mobilizzate sia in contesti fisiologici che dopo GT. Per monitorare la ricostituzione ematopoietica nei pazienti dopo GT, abbiamo sviluppato un nuovo saggio di citometria capace di quantificare 23 tipi cellulari diversi, HSPC incluse, nel BM, nel PB e nel MPB, (Basso-Ricci et al, 2017).

Studiando le dinamiche di ricostituzione di 7 sottopopolazioni di HSPC, tra cui le cellule staminali ematopoietiche (HSC) e i progenitori multi-potenti (MPP), in 6 soggetti con Sindrome di Wiskott-Aldrich trattati con GT, abbiamo osservato che i pazienti raggiungono un'ematopoiesi e un compartimento HSPC stabile a partire da 1-2 anni dalla GT. Modelli statistici indicano che le MPP sono più attive nella fase iniziale post-GT e sono sostituite a 1 anno dalle HSC a lungo termine, che sono poi responsabili del mantenimento dell'ematopoiesi. Ciò implica che HSC attivate in vitro, sono capaci di fare homing e rimanere inattive dopo infusione (Scala et al 2018).

Abbiamo inoltre osservato che cellule HSC sono presenti sia nel BM che nel MPB e che progenitori mieloidi sono in maggiore frequenza nel MPB. Ciò potrebbe spiegare il rapido attecchimento di neutrofili e la veloce indipendenza da trasfusioni di piastrine nei pazienti MPB-GT, come descritto nei pazienti trapiantati. Ad 1 anno dalla GT, pazienti BM-GT e MPB-GT mostrano simile ricostituzione ematopoietica, indicando che HSPC da BM e MPB hanno analoghe capacità a lungo termine.

Stiamo studiando inoltre la circolazione delle HSPC in situazioni fisiologiche e durante la mobilizzazione. Secondo i nostri dati, le cHSPC hanno un'alta frequenza di progenitori linfoidi e analisi di scRNA confermano un'attività trascrizionale tipica delle cellule linfoidi ed eritroidi. Inoltre abbiamo osservato che dopo G, le HSPC sono composte da progenitori primitivi e mieloidi, mentre aumenta la componente linfoide dopo P. Inoltre, la quantità di cellule primitive mobilizzate dopo G+P correla con il loro numero pre-mobilizzazione sia nel BM che nel PB. L'identificazione dei meccanismi alla base della circolazione delle HSPC aiuterà ad individuare nuove strategie per la mobilizzazione delle HSPC.

Basso-Ricci L, Scala S, Milani R, et al. Multiparametric Whole Blood Dissection: A One-Shot Comprehensive Picture of the Human Hematopoietic System. *Cytom. Part A.* 2017;91A(10):952–965.

Scala S, Basso-Ricci L, Dionisio F, et al. Dynamics of genetically engineered hematopoietic stem and progenitor cells after autologous transplantation in humans. *Nat. Med.* 2018;24:1683–1690.

Sindrome di Wiskott Aldrich

Coordinator: Alessandro Aiuti

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16B02

**Disease Name:**

Wiskott Aldrich Syndrome

**Keywords:**

Hematopoietic Stem/Progenitor Cells, Gene Therapy, Clonal Tracking