



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell'Innovazione in Sanità

Rendiconto di assegnazione risorse 5 per mille ANNO 2018 Contributo percepito € 748.955,61 in data 17/06/2020

Ente della Ricerca Sanitaria Denominazione

Ente: Fondazione Telethon

Codice fiscale: 04879781005

Sede legale: Via Varese 16b – 00185 Roma

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: [direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Dati del rappresentante legale delegato: Omero Toso – Vice presidente

Num. Prog.	Titolo del progetto	Fondi 5 per mille assegnati al progetto	Costo complessivo del progetto	Data di inizio progetto	Durata prevista
1	TTAKC0316TT - Mechanisms of enhanced HSC transduction and nucleic acid sensing	133.786,40	440.850,00	01/01/2019	36 mesi
2	TTAKD0316TT - The Aicardi-Goutières Syndrome – From nucleic acid sensing to disease modeling	29.195,50	297.335,00	01/01/2019	36 mesi
3	TTALF0516TT - Development of a liver-based epigenetic silencing strategy to treat familiar hypercholesterolemia	6.879,45	377.500,00	01/01/2019	36 mesi
4	TTEBE0616TT - Use of MSC to optimize transplantation outcome of gene edited-HSC	104.201,66	333.615,00	01/01/2019	36 mesi
5	TTEMG0316TT - Innovative strategies to promote Ag-specific tolerance	36.813,17	102.500,00	01/01/2019	36 mesi
6	TTGFA0416TT - Restoration of hematopoiesis following gene correction in beta-thal	39.528,35	199.860,00	01/01/2019	36 mesi
7	TTLNE0416TT - Advanced genetic engineering of hematopoiesis	131.761,03	484.440,00	01/01/2019	36 mesi
8	TTPGE0316TT - Gene correction of CD40LG gene in T cells and HSPC for the treatment of X-linked hyper-IgM immunodeficiency	21.391,59	313.110,00	01/01/2019	36 mesi

9	TTROF0416TT - Genomic mechanisms of human myelopoiesis: implications for bone marrow reconstitution after gene therapy	179.581,84	591.000,00	01/01/2019	36 mesi
10	TTSGG0216TT - In vivo induction of Ag-specific tolerance by hepatocyte-targeted gene transfer	65.816,65	233.120,00	01/01/2019	36 mesi

Data

Il Legale Rappresentante delegato

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Legale Rappresentante delegato

\*Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

<b>Codice:</b>	<b>Ente:</b>	<b>Anno fondi 5 per mille:</b>	<b>Titolo:</b>
5M-2018-23680375	Fondazione Telethon	2018	TTAKC0316TT - Mechanisms of enhanced HSC transduction and nucleic acid sensing
5M-2018-23680374	Fondazione Telethon	2018	TTAKD0316TT - The Aicardi-Goutières Syndrome $\zeta$ From nucleic acid sensing to disease modeling
5M-2018-23680373	Fondazione Telethon	2018	TTALF0516TT - Development of a liver-based epigenetic silencing strategy to treat familial hypercholesterolemia
5M-2018-23680372	Fondazione Telethon	2018	TTEBE0616TT - Use of MSC to optimize transplantation outcome of gene edited-HSC
5M-2018-23680371	Fondazione Telethon	2018	TTEMG0316TT - Innovative strategies to promote Ag-specific tolerance
5M-2018-23680351	Fondazione Telethon	2018	TTGFA0416TT - Restoration of hematopoiesis following gene correction in beta-thal
5M-2018-23680370	Fondazione Telethon	2018	TTLNE0416TT - Advanced genetic engineering of hematopoiesis
5M-2018-23680350	Fondazione Telethon	2018	TTPGE0316TT - Gene correction of CD40LG gene in T cells and HSPC for the treatment of X-linked hyper-IgM immunodeficiency
5M-2018-23680362	Fondazione Telethon	2018	TTROF0416TT - Genomic mechanisms of human myelopoiesis: implications for bone marrow reconstitution after gene therapy
5M-2018-23680369	Fondazione Telethon	2018	TTSGG0216TT - In vivo induction of Ag-specific tolerance by hepatocyte-targeted gene transfer

Dettagli progetto 5M-2018-23680375:

Codice Progetto:

5M-2018-23680375

Anno:

2018

Titolo:

TTAKC0316TT - Mechanisms of enhanced HSC transduction and nucleic acid sensing

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTAKC0316TT - Mechanisms of enhanced HSC transduction and nucleic acid sensing

Abstract Progetto:

Ad oggi, per essere efficace, il protocollo clinico di terapia genica su cellule staminali ematopoietiche (CSE) richiede l'uso combinato di esposizioni ripetute e alte dosi di vettore virale, unite a una potente stimolazione cellulare. Questi due fattori impattano negativamente sull'efficienza della procedura: da una parte impongono di disporre di una grande quantità di vettore, dall'altra la prolungata coltura 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 consentirebbe di abbassare i costi della procedura, altrimenti insostenibili, e diminuire il possibile impatto della terapia sulla fisiologia della cellula. Per raggiungere questo obiettivo, stiamo caratterizzando sia i meccanismi molecolari alla base della resistenza delle CSE alla trasduzione lentivirale, sia l'impatto della trasduzione lentivirale e più in generale l'impatto che il riconoscimento degli acidi nucleici ha in diversi contesti patologici. In questo contesto, abbiamo osservato che le CSE reagiscono in modo molto differente a diversi tipi di vettori di terapia genica e stiamo valutando l'impatto della trasduzione nel contesto di CSE da pazienti con patologie infiammatorie. Inoltre, siamo riusciti a individuare un potente blocco all'ingresso dei vettori lentivirali nelle CSE e scoperto che questo blocco può essere superato in modo molto efficiente farmacologicamente. Sono in corso studi per identificare i partner molecolari coinvolti nel blocco alla trasduzione lentivirale 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.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

133786.4

Costo Complessivo Progetto:

440850

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020

Dettagli progetto 5M-2018-23680374:

Codice Progetto:

5M-2018-23680374

Anno:

2018

Titolo:

TTAKD0316TT - The Aicardi-Goutières Syndrome  $\zeta$  From nucleic acid sensing to disease modeling

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTAKD0316TT - The Aicardi-Goutières Syndrome  $\zeta$  From nucleic acid sensing to disease modeling

Abstract Progetto:

Tra i fattori eziologici dei processi autoinfiammatori e delle patologie autoimmuni sta recentemente emergendo la deregolazione del sistema cellulare di riconoscimento degli acidi nucleici. In particolare, la maggiore espressione trascrizionale degli elementi retrovirali endogeni (ERE) o  $\zeta$  accumulo di danno al DNA con la conseguente crescita dei livelli di interferone di Tipo I sono stati proposti come cause originarie della patogenesi della sindrome di Aicardi-Goutières (SAG). SAG è un  $\zeta$  encefalopatia infiammatoria che può essere causata da mutazioni su sette geni codificanti per proteine coinvolte nel riconoscimento e nel metabolismo degli acidi nucleici. Ad oggi il meccanismo molecolare alla base della patologia rimane ancora incerto a causa della mancanza di modelli animali e cellulari che siano in grado di ricapitolare in vivo e in vitro  $\zeta$  aspetto neurologico di questa sindrome. Su queste premesse, stiamo studiando  $\zeta$  effetto molecolare delle mutazioni in alcuni dei geni causativi della SAG tramite approcci sperimentali che mimano i difetti genetici nel contesto di cellule staminali pluripotenti (iPSC). Queste iPSC possono successivamente essere differenziate in varie popolazioni cellulari del sistema nervoso centrale, come astrociti e neuroni, nelle quali sarà possibile studiare le cause e le conseguenze funzionali della patologia di SAG. Nel complesso, questo progetto esplorativo vuole investigare, in tipi cellulari fisiologicamente rilevanti, le cause molecolari alla base della sindrome di Aicardi-Goutières.  $\zeta$  identificazione di nuovi potenziali target e di parametri funzionali che possano essere monitorati nei pazienti getterà le basi per lo sviluppo di strategie terapeutiche.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

29195.5

Costo Complessivo Progetto:

297335

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020

Dettagli progetto 5M-2018-23680373:

Codice Progetto:

5M-2018-23680373

Anno:

2018

Titolo:

TTALF0516TT - Development of a liver-based epigenetic silencing strategy to treat familiar hypercholesterolemia

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTALF0516TT - Development of a liver-based epigenetic silencing strategy to treat familiar hypercholesterolemia

Abstract Progetto:

L'ipercolesterolemia familiare (IF) è una malattia genetica ereditaria causata da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo. Comunemente definito "colesterolo cattivo", il colesterolo associato alle lipoproteine a bassa densità (anche conosciuto come LDL-C) circola nel sangue sotto forma di grosse particelle. Se non opportunamente catturato e degradato dalle cellule del fegato, il colesterolo si accumula nella parete interna dei vasi sanguigni, determinando malattie cardiovascolari, tra cui l'aterosclerosi, una patologia strettamente correlata all'insorgenza di infarto o ictus. Tra i geni responsabili dell'IF, quello che codifica per la proteina PCSK9 ha recentemente attirato particolare attenzione. Infatti, PCSK9 regola l'assorbimento dell'LDL-C da parte delle cellule del fegato e mutazioni che ne aumentano la funzione determinano un accumulo di LDL-C nel sangue dei pazienti: questo accelera i processi di aterosclerosi e incrementa l'insorgenza di malattie cardiovascolari. Al contrario, soggetti che presentano mutazioni in PCSK9 che ne inattivano la funzione mostrano una diminuzione dei livelli circolanti di colesterolo e, di conseguenza, una riduzione nell'insorgenza di malattie cardiovascolari. In base a quest'ultima scoperta, sono stati sviluppati numerosi farmaci in grado di inattivare PCSK9, attualmente in sperimentazione clinica. Nonostante i dati promettenti, questi farmaci devono essere somministrati frequentemente ai pazienti e per tutta la loro vita, comportando una bassa aderenza al trattamento. Lo scopo del progetto è di sviluppare un approccio di terapia genica che consenta di inattivare PCSK9 dopo singolo trattamento farmacologico. A questo fine utilizzeremo dei Repressori Trascrizionali Artificiali (RTA), proteine ingegnerizzate in grado di riconoscere in modo specifico il gene di interesse e di inattivarne stabilmente la funzione attraverso l'epigenetica, il processo che fisiologicamente regola l'espressione dei geni. Il progetto verrà perseguito dapprima valutando l'efficacia e la specificità degli RTA contro PCSK9 in linee cellulari epatiche. Successivamente, verrà sviluppato un metodo per veicolare gli RTA al fegato, e sarà quindi valutata l'efficacia, la stabilità a lungo termine e la biosicurezza dell'inattivazione di PCSK9 in modelli animali, tra cui uno di IF.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

6879.45

Costo Complessivo Progetto:

377500

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020



Dettagli progetto 5M-2018-23680372:

Codice Progetto:

5M-2018-23680372

Anno:

2018

Titolo:

TTEBE0616TT - Use of MSC to optimize transplantation outcome of gene edited-HSC

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTEBE0616TT - Use of MSC to optimize transplantation outcome of gene edited-HSC

Abstract Progetto:

È stato riportato in letteratura che le cellule stromali mesenchimali (MSC) sono in grado, sia in modelli animali sia pazienti, di promuovere l'attecchimento delle cellule staminali ematopoietiche (HSC). Sulla base di queste proprietà le MSC potrebbero essere impiegate per facilitare l'attecchimento delle HSC geneticamente modificate ed, in particolare, di quelle sottoposte a gene editing. Allo scopo di raggiungere questo obiettivo finale, abbiamo effettuato 2 studi preparatori che ci hanno consentito di ottenere alcune evidenze sperimentali a supporto della nostra strategia. Nel primo studio abbiamo dimostrato che è possibile isolare ed espandere MSC dalla frazione negativa del midollo osseo (BM) umano, quale sorgente autologa di MSC in strategie di terapia genica. Le CD34- MSC sono state isolate con successo da 10 donatori sani (HD) di BM su Ficoll; successivamente le cellule CD34+ sono state purificate con deplezione immunomagnetica. La frazione CD34- è stata quindi utilizzata per l'espansione delle MSC. Le CD34- MSC così ottenute si sono dimostrate comparabili alle MSC standard in termini di morfologia, immunofenotipo, capacità proliferativa e clonogenica, abilità di inibire in vitro la proliferazione dei linfociti T e di differenziare in adipociti e osteoblasti. Questi dati dimostrano che le CD34- MSC possono essere impiegate in strategie di supporto dell'attecchimento nella terapia genica, in particolare nel gene editing in cui un basso numero di cellule è disponibile per il trapianto. Questa strategia consente, pertanto, di ottimizzare l'impiego dell'espianto di BM permettendo di ottenere sia MSC sia HSC dallo stesso campione di BM. In seguito, abbiamo caratterizzato in maniera estensiva le MSC ottenute da BM di pazienti affetti da immunodeficienza primaria (N. 7 CGD; N. 15 WAS; N. 11 SCID). Nonostante una tendenza ad una ridotta capacità clonogenica, le PID-MSC hanno mostrato una capacità proliferativa, morfologia, immunofenotipo, capacità di inibire risposta T e B in vitro confrontabile a quella delle HD-MSC. Mentre le HD- e le CGD-MSC hanno mostrato un'evidente capacità di inibire la maturazione dei monociti in cellule dendritiche, le SCID- e WAS-MSC hanno esibito una ridotta capacità. Dopo stimolazione di Toll-like Receptor, le PID-MSC hanno mostrato un profilo di espressione genica di fattori pro- ed anti-infiammatori alterato rispetto alle HD-MSC. Questi dati indicano che le PID-MSC sono caratterizzate da alcuni difetti funzionali e che la caratterizzazione delle MSC ottenute da pazienti è un prerequisito fondamentale per la loro eventuale applicazione clinica. Una volta ottenuti questi risultati preliminari, stiamo attualmente effettuando esperimenti di co-cultura di MSC e CD34+ da HD sia in

sistema 2D sia 3D (impiegando un bioreattore a perfusione continua). Questi esperimenti ci stanno consentendo di settare le condizioni di coltura ideali per l'espansione ex-vivo ed il mantenimento delle HSC edite in presenza di MSC.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

104201.66

Costo Complessivo Progetto:

333615

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020

Dettagli progetto 5M-2018-23680371:

Codice Progetto:

5M-2018-23680371

Anno:

2018

Titolo:

TTEMG0316TT - Innovative strategies to promote Ag-specific tolerance

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTEMG0316TT - Innovative strategies to promote Ag-specific tolerance

Abstract Progetto:

"Nell'ultima decade l'applicazione terapeutica delle cellule T regolatorie (Treg) finalizzata al controllo delle risposte immunitarie indesiderate e per promuovere tolleranza immunologica in malattie autoimmuni o dopo trapianto allogenico è stata estensivamente studiata. Studi clinici piloti hanno dimostrato la sicurezza e la fattibilità del trasferimento in vivo di cellule Treg, sia cellule regolatorie di tipo 1 (Tr1) che cellule Treg esprimenti il fattore di trascrizione FOXP3. Attualmente, sono in corso diversi studi clinici finalizzati a valutare l'efficacia delle cellule Treg terapeutica dopo trapianto allogenico di cellule ematopoietiche o d'organo (fegato e rene), nelle malattie autoimmuni come diabete di tipo 1, uveite e nel morbo di Chron. I risultati di questi studi clinici daranno una risposta certa ai quesiti riguardo l'efficacia delle terapie adottive con cellule Treg. Nonostante questi successi, rimangono ancora da definire protocolli efficienti di espansione ex vivo delle cellule Treg, di generazione di cellule Treg Ag-specifiche, e di identificare nuovi metodi che permettano di controllare e/o manipolare la plasticità delle cellule Treg. Ad oggi si sono sviluppati protocolli di espansione in vitro di popolazioni policlonali di cellule Treg FOXP3+. Solo recentemente la ricerca si è focalizzata nello sviluppo di metodi efficaci per espandere e/o generare cellule Treg FOXP3+ antigene(Ag)-specifiche. Sfruttando l'utilizzo di tecnologie di trasferimento genico mediato da vettori lentivirali, la modificazione epigenetica sito-specifica e la riprogrammazione di cellule T ci proponiamo di generare in vitro popolazioni omogenee di cellule Treg Ag-specifiche. I seguenti approcci verranno esplorati: i) il trasferimento genico di fattori trascrizionali finalizzati a sostenere l'espansione in vitro e la sopravvivenza in vivo delle cellule Treg; ii) la manipolazione epigenetica sito-specifica di geni chiave delle cellule Treg in modo tale da generare cellule Treg epigeneticamente indotte (eiTreg); e iii) la riprogrammazione di cloni di cellule T effettrici Ag-specifiche in cellule staminali pluripotenti indotte (T-iPSC) per generare cellule Treg Ag-specifiche. In caso di successo, i risultati di questi studi permetteranno di mettere a punto nuovi metodi per generare in vitro cellule Treg Ag-specifiche da utilizzare in protocolli di terapia cellulare."

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:  
36813.17

Costo Complessivo Progetto:  
102500

Data ricezioni fondi 5 per mille:  
17-06-2020

Dettagli progetto 5M-2018-23680351:

Codice Progetto:

5M-2018-23680351

Anno:

2018

Titolo:

TTGFA0416TT - Restoration of hematopoiesis following gene correction in beta-thal

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTGFA0416TT - Restoration of hematopoiesis following gene correction in beta-thal

Abstract Progetto:

La Beta-talassemia (Bthal) è una malattia genetica dovuta a mutazioni nel gene beta-globina, che porta una ridotta o assente produzione di HbA, che interferisce con la maturazione delle cellule eritroidi e produzione di globuli rossi. I pazienti sono affetti da grave anemia, epatosplenomegalia e anomalie scheletriche a causa della rapida espansione del compartimento eritroide nel midollo osseo dovuta a eritropoiesi inefficace. Nella visione classica dell'ematopoiesi, le cellule del sangue vengono prodotte, attraverso uno schema gerarchico, a partire da cellule staminali multipotenti che diventano sempre più limitate nel loro potenziale di differenziamento attraverso progenitori oligopotenti e poi unipotenti. Recentemente, strategie di purificazione basate sull'espressione differenziale di molecole di superficie CD49f e CD90 sono in grado di isolare cellule staminali ematopoietiche (CSE) con capacità ripopolante a lungo termine (CD49f+) e a breve termine (CD49f-), con proprietà diverse nel ciclo cellulare, ma stesso potenziale di differenziamento mieloide (My) che linfocitario. Recenti lavori hanno proposto che i  $\gamma$ lineages $\gamma$  eritroide (Ery) e megakaryocitico (Mk) derivino direttamente dalle CSE 49f+. Il midollo osseo dei pazienti affetti da questa malattia è caratterizzato da una condizione perturbata e da stress il cui impatto sull' $\gamma$ eritropoiesi è risaputo, mentre sull' $\gamma$ ematopoiesi è per lo più sconosciuto. Col fine di poter delineare il modello gerarchico ematopoietico in talassemia, abbiamo definito, mediante analisi immunofenotipica, il processo di differenziamento nei diversi  $\gamma$ lineages $\gamma$  maturativi sia in pazienti affetti da questa patologia che in donatori sani. Inoltre, questo tipo di analisi è stata effettuata nei pazienti trattati in un protocollo di terapia genica (TIGET-BTHAL, #NCT02453477) e ci ha permesso di studiare la ricostituzione ematopoietica delle cellule CD34+ trasdotte trapiantate. Risultati preliminari hanno mostrato differenze nel compartimento staminale con una maggiore percentuale di progenitori multipotenti nei pazienti talassemici rispetto ai donatori sani. Siamo stati anche in grado di valutare differenze legate all'età, grazie alla disponibilità di campioni di soggetti adulti e pediatrici. Analizzando i progenitori ematopoietici con un nuovo schema di  $\gamma$ sorting $\gamma$  in grado di risolvere in modo efficiente il differenziamento My, Ery e Mk, abbiamo quantificato nuovi progenitori My ed Ery all'interno del compartimento CD34+CD38+ e abbiamo trovato una riduzione delle popolazioni Ery nei campioni Bthal. Inoltre, nei pazienti trattati con la terapia genica sono state osservate fluttuazioni nel contributo di CSE e MPP all'ematopoiesi durante il follow-up.

In futuro, analisi di RNA-seq eseguita su CSE e sui progenitori delineerà i processi trascrizionali che governano l'ematopoiesi in talassemia.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

39528.35

Costo Complessivo Progetto:

199860

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020

Dettagli progetto 5M-2018-23680370:

Codice Progetto:

5M-2018-23680370

Anno:

2018

Titolo:

TTLNE0416TT - Advanced genetic engineering of hematopoiesis

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTLNE0416TT - Advanced genetic engineering of hematopoiesis

Abstract Progetto:

La modificazione sito-specifica del genoma ha spinto la correzione genica alla portata della terapia genica. Abbiamo osservato, tuttavia, che questa modificazione è limitata in cellule staminali-progenitrici ematopoietiche (HSPC). Migliorando condizioni di coltura e veicolazione dell'apparato di correzione, abbiamo superato in parte questi limiti e avuto prova di principio di correzione in HSPC umane di una mutazione ereditaria causa di immunodeficienza primaria (PID) (Genovese et al., Nature 2014). Adesso, miriamo a migliorare l'efficienza della procedura e stabilire un protocollo di correzione traslabile in clinica. Stiamo testando nuove piattaforme di veicolazione basate su CRISPR/Cas9 e comparando potenza e specificità con ZFNs specifiche per lo stesso locus. Ottimizzando dosi e tempistiche, abbiamo osservato che vettori AAV6 performano meglio di IDLV per la veicolazione del template per HDR, raggiungendo il 40% di integrazione sito-specifica in HSPC. Inoltre, l'incorporazione di nucleotidi modificati e la purificazione HPLC dopo trascrizione in vitro di mRNA diminuiscono la risposta IFN- $\alpha$  innata cellulare e aumentano la frazione di cellule corrette. Aggiungendo derivati pirimido-indolici in coltura per l'espansione di HSPC preservandone il fenotipo primitivo, abbiamo ottenuto alte rese di cellule corrette. Usando elettroporatori ad alti volumi, abbiamo portato su larga scala il processo di produzione e trattato con successo numeri clinicamente rilevanti di HSPC. Tuttavia, la correzione genica con questo protocollo è limitata in HSPC. La resa di HSPC corrette può essere sufficiente per la traslazione clinica in PID dove linfociti corretti hanno vantaggio proliferativo selettivo, ma limita l'ampio uso di questa tecnologia. Dato che questa è basata sull'uso di mRNA e proteine per esprimere l'apparato di correzione, stiamo usando lo stesso sistema per co-indurre transientemente una nuova funzione alle cellule corrette che ne promuova l'espansione in vivo e conferisca vantaggio competitivo sulle HSPC residenti anche quando il gene corretto non lo faccia di per se. In primis, abbiamo modulato l'espressione di due molecole coinvolte nella protezione da fagocitosi o nell'attecchimento nella nicchia delle cellule staminali. In vitro, l'overespressione LV-mediata (O/E) di queste molecole inibisce la fagocitosi di HSPC opsonizzate da parte di macrofagi o potenzia la migrazione di HSPC verso una sorgente di CXCL12. Dopo trapianto in NSG, l'O/E di queste molecole aumenta, rispettivamente, la percentuale di cellule umane a lungo termine, indicando beneficio per HSPC più primitive o l'attecchimento precoce e a lungo termine. Stiamo ora valutando la migliore finestra temporale e strategie per O/E per combinare questi vantaggi alla

correzione genica. Nel complesso, se questi dati saranno confermati, avremo definito un modello per una nuova generazione di ingegneria genetica dell'ematopoiesi per trattamento di malattie ereditarie.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

131761.03

Costo Complessivo Progetto:

484440

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020



Dettagli progetto 5M-2018-23680350:

Codice Progetto:

5M-2018-23680350

Anno:

2018

Titolo:

TTPGE0316TT - Gene correction of CD40LG gene in T cells and HSPC for the treatment of X-linked hyper-IgM immunodeficiency

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTPGE0316TT - Gene correction of CD40LG gene in T cells and HSPC for the treatment of X-linked hyper-IgM immunodeficiency

Abstract Progetto:

L'ingegneria genetica di cellule staminali/progenitrici emopoietiche (HSPC) si è ampliata fino a permettere la modificazione sito-specifica di geni endogeni tramite l'uso di diverse nucleasi artificiali. Per primi abbiamo mostrato che questa strategia può essere usata su HSPC per inserire un cDNA funzionale in un gene difettivo ereditario, a valle del suo promotore, ripristinando così; funzione e controllo fisiologico della sua espressione, ma evitando il rischio di mutagenesi inserzionale (Genovese, Nature 2014). La prima caratteristica è molto rilevante se il gene affetto necessita di una stretta regolazione poiché impatta sulla proliferazione cellulare, come nell'Immunodeficienza Combinata Severa (SCID)-X1 e nella Sindrome da Iper-IgM legata all'X (HIGM1). Abbiamo sviluppato nuove ZFN e CRISPR/Cas9 che bersagliano un introne a monte dei geni IL2RG e CD40LG, per correggere con una sola combinazione di nucleasi e donatore la maggioranza delle mutazioni causative. Abbiamo validato il nostro protocollo in cellule T umane ed in HSPC, raggiungendo fino al 40% di correzione sia con ZFN che con CRISPR/Cas9. Per supportare il rationale scientifico ed esplorare la sicurezza del trattamento, stiamo usando appropriati modelli pre-clinici. Per SCID-X1 abbiamo sviluppato un modello murino che porta, al posto del gene murino Il2rg, il gene umano IL2RG con una comune mutazione SCID. Per valutare l'efficacia e la sicurezza della ricostituzione emopoietica da un numero limitato di HSPC corrette, abbiamo eseguito trapianti competitivi con HSPC wild-type e IL2RG<sup>-/-</sup> con i quali abbiamo dimostrato che l'1% di cellule WT sono sufficienti per ricostituire parzialmente i compartimenti linfoidi, e che un regime di condizionamento prima dell'infusione è necessario per evitare lo sviluppo di linfomi dai progenitori trapiantati. Esperimenti simili sono in corso con il modello murino di HIGM1, per identificare il regime di condizionamento e il grado di chimerismo richiesti per correggere la patologia. Per dimostrare la correzione del fenotipo patologico, abbiamo sviluppato un protocollo basato su CRISPR/Cas9 che permette di ottenere alti livelli di riparo sito-specifico del genoma tramite NHEJ (70%) e HDR (25%) su HSPC murine IL2RG<sup>-/-</sup>. Dopo il trapianto, solo le cellule corrette sono state in grado di generare progenie linfoide B e T funzionale, mostrando un vantaggio selettivo rispetto alle cellule non corrette. Queste cellule linfoidi corrette persistono a lungo termine nei topi e hanno generano una risposta T funzionale dopo infezione dei

topi stessi con un patogeno murino, indicando che cellule progenitrici corrette per il gene IL2RG sono in grado di sostenere la linfopoiesi e di correggere parzialmente il fenotipo patologico. Nel complesso, questi risultati permetteranno di stabilire la sicurezza e la solidità della nostra strategia di modificazione genica sito-specifica in HSPC e saranno determinanti per il disegno del protocollo per i primi test clinici.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

21391.59

Costo Complessivo Progetto:

313110

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020

Dettagli progetto 5M-2018-23680362:

Codice Progetto:

5M-2018-23680362

Anno:

2018

Titolo:

TTROF0416TT - Genomic mechanisms of human myelopoiesis: implications for bone marrow reconstitution after gene therapy

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTROF0416TT - Genomic mechanisms of human myelopoiesis: implications for bone marrow reconstitution after gene therapy

Abstract Progetto:

La rapida rigenerazione del sistema immunitario dopo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (CSE) è essenziale per la sicurezza ed efficacia della terapia genica. In questo progetto, utilizziamo tecnologie all'avanguardia per studiare con elevata risoluzione la dinamica di ricostituzione di neutrofili e monociti, tra i tipi cellulari più importanti per la difesa contro le infezioni, in pazienti sottoposti a trapianto di CSE. I nostri studi sono altamente innovativi perché applicano complesse metodologie di indagine genomica e computazionale a materiale biologico di interesse clinico. Questi dati permetteranno di identificare nuovi marcatori o bersagli terapeutici per rendere ancora più efficiente e sicuro il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, con ampie ricadute sulle procedure di terapie genica per il trattamento di malattie genetiche.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

179581.84

Costo Complessivo Progetto:

591000

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020

Dettagli progetto 5M-2018-23680369:

Codice Progetto:

5M-2018-23680369

Anno:

2018

Titolo:

TTSGG0216TT - In vivo induction of Ag-specific tolerance by hepatocyte-targeted gene transfer

Ente:

Fondazione Telethon

Codice Fiscale Ente:

04879781005

Sede Legale Ente:

Via Varese, 16/B Roma

Indirizzo Posta Elettronica Ente:

[direzione.generale@telethon.legalmail.it](mailto:direzione.generale@telethon.legalmail.it)

Rappresentante Legale Ente:

Luca Cordero di Montezemolo

Titolo progetto:

TTSGG0216TT - In vivo induction of Ag-specific tolerance by hepatocyte-targeted gene transfer

Abstract Progetto:

I vettori lentivirali (LV) sono veicoli ampiamente utilizzati per la terapia genica, sia in modelli animali pre-clinici sia in studi clinici nell'uomo, con risultati promettenti in termini di sicurezza ed efficacia. Tuttavia, le risposte immunitarie dirette verso questi vettori, il gene terapeutico (transgene) o entrambi possono limitare l'efficacia della terapia genica. Per superare questa limitazione, è stata sviluppata la piattaforma LV.ET.142T e applicata efficacemente come terapia genica nell'emofilia B o per promuovere/ripristinare la tolleranza nel diabete autoimmune. L'espressione del gene terapeutico negli epatociti rappresenta un nuovo modo per promuovere tolleranza. Nel presente progetto di ricerca ci proponiamo di ampliare l'applicazione della piattaforma LV.ET.142T e di migliorarne la sua efficacia. Nello specifico, esamineremo la capacità di LV.ET.142T di indurre tolleranza ad alloantigeni. La terapia combinata con LV.ET.142T codificante per la catena di insulina B 9-23 (LV.ET.InsB9-23.142T) e anti-CD3 mAb verrà utilizzata per prevenire il rigetto di isole pancreatiche autologhe o allogeniche nel modello pre-clinico di diabete. Diversi fattori possono influire negativamente sull'efficacia della terapia geniche con LV.ET.142T: l'espressione del transgene anche in cellule diverse dagli epatociti, il tipo di transgene e la presenza di una risposta immune verso il transgene pre-esistente alla terapia genica. Il topo knockout IDUA, il modello di mucopolisaccaridosi I, è particolarmente resistente alla tolleranza indotta da LV.ET.142T: rappresenta perciò un modello utile per comprendere meglio come viene indotta la risposta immune verso il transgene dopo la terapia genica e per testare vettori ottimizzati con l'aggiunta di nuovi elementi di regolazione e/o terapie combinate finalizzate a pre-tollerizzare il ricevente prima della terapia genica. I risultati ottenuti in questo progetto miglioreranno la piattaforma LV.ET.142T e ne amplieranno l'applicazione non solo finalizzata alla introduzione di un gene terapeutico nelle malattie monogeniche ma anche come possibile trattamento delle malattie autoimmuni.

Data Inizio Progetto:

01-01-2019

Data Fine Progetto:

31-12-2021

Quota 5 per mille progetto:

65816.65

Costo Complessivo Progetto:

233120

Data ricezioni fondi 5 per mille:

17-06-2020