



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo

*Laboratorio Sperimentale di Oncoematologia Pediatrica e
Trapianto di Midollo Osseo*

***Sviluppo di un protocollo per la produzione di un
farmaco cellulare specifico per multipli antigeni di
leucemia mieloide acuta***

Relatore:

Prof.ssa Ornella Semino

Correlatore:

Dott.ssa Patrizia Comoli

Tesi
Sperimentale di
*Federica
De Marco*

Anno Accademico 2025/2026

Abstract

La leucemia mieloide acuta (LMA) è un tumore ematologico che si sviluppa in seguito alla proliferazione incontrollata di blasti di *lineage* mieloide. Negli ultimi anni, la disponibilità di nuove terapie farmacologiche e biologiche ha migliorato i risultati clinici. Malgrado le innovazioni diagnostiche e terapeutiche, l'aspettativa di vita per i pazienti affetti da LMA non è ottimale. Ad oggi, il trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE) rimane il miglior approccio per il trattamento di consolidamento della remissione. Tuttavia, alcuni pazienti sviluppano una recidiva di malattia dopo il trapianto. In questo caso, le probabilità di sopravvivenza a lungo termine sono pari a circa il 10% negli adulti e del 20-25% nei bambini. Recenti evidenze hanno dimostrato il ruolo centrale della sorveglianza immunologica derivata dal donatore nell'indurre un effetto trapianto contro leucemia (graft-versus-leukemia, GVL) per il controllo di eventuali blasti leucemici sopravvissuti alla chemioterapia di condizionamento. È stato, infatti, riscontrato come nei soggetti affetti da leucemia acuta possano svilupparsi popolazioni circolanti di linfociti T citotossici (CTL) specifici per la leucemia, che correlano al controllo della malattia e a tassi di sopravvivenza più elevati. Questi dati suggeriscono come gli interventi immunologici, compresa la somministrazione di linfociti del donatore non manipolati (DLI) o il trasferimento di CTL specifici per gli antigeni leucemici derivati dal donatore, possano contribuire a prevenire le recidive e a migliorare gli esiti del trapianto. Quest'ultima strategia, già in atto presso la Cell Factory della Fondazione Policlinico San Matteo, richiede al momento la disponibilità di cellule leucemiche del paziente criopreservate al momento della diagnosi, e questo costituisce un limite per i pazienti che sono inviati da centri esterni.

Questo lavoro di tesi si prefigge di superare le limitazioni descritte attraverso lo sviluppo di un farmaco cellulare ad attività antileucemica, la cui metodica di espansione si avvalga dell'impiego di peptidi ricombinanti derivati da proteine espresse in modo particolare dai blasti di origine mieloide, come il neoantigene nucleofosmina mutata NPM^{mut}, e WT1, PRAME e Survivin, sovraespressi su blasti di LAM. In particolare, il lavoro si è focalizzato sull'ottimizzazione delle condizioni di coltura in Good Manufacturing Practice (GMP).

Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) ottenute da donatori sani sono state utilizzate per attivare ed espandere CTL multi-specifici diretti contro gli antigeni leucemici WT1, PRAME, Survivin e NPM1^{mut}. Le PBMC sono state stimulate in vitro con pool di peptidi derivati dai quattro antigeni ed espanse sia con il metodo tradizionale in piastra sia in bioreattore G-Rex, per migliorare la performance del metodo, in presenza delle citochine

IL-2, IL-7 e IL-15. I CTL ottenuti sono stati caratterizzati mediante citometria a flusso multiparametrica per valutarne il fenotipo di membrana ed il profilo di polifunzionalità mediante analisi di espressione intracellulare delle citochine IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Dal punto di vista dell'attività leucemia-specifica, è stata analizzata l'attività citotossica mediante test di rilascio del ^{51}Cr utilizzando come bersagli blasti PHA pulsati con i peptidi di stimolazione, linee cellulari di leucemia mieloide OCI-2 ed OCI-3 e cellule NK-resistenti P815. La capacità di produrre IFN- γ e IL-2 è stata inoltre quantificata mediante saggi ELISpot.

I dati ottenuti hanno mostrato un vantaggio della coltura con bioreattore nell'ottenere una espansione cellulare ottimale. Il prodotto cellulare derivato dal protocollo in bioreattore, che ha il vantaggio di non richiedere dei passaggi intermedi di ristimolazione cellulare, si è, inoltre, dimostrato non inferiore nell'attività antitumorale, misurata come produzione specifica di citochine, e, addirittura, migliorativo nel caso dell'attività citotossica, rispetto alla coltura in piastra, con un vantaggio in termini di fenotipo. Infatti, i CTL multiantigene ottenuti in bioreattore avevano prevalentemente un profilo memoria di tipo "early memory", a differenza dei CTL in piastra che avevano anche una percentuale elevata di cellule effector memory e central memory. Questo profilo è particolarmente favorevole in quanto consente una rapida evoluzione verso il fenotipo effettore, mantenendo però una lunga persistenza di risposta in vivo.

Inoltre, la sostituzione dei peptidi NPMmut in-house con peptidi commerciali GMP non ha modificato significativamente la produzione di citochine, ma ha determinato un incremento della citotossicità verso cellule leucemiche, in particolare verso la linea OCI ($p < 0,05$). Questi risultati indicano come il bioreattore G-Rex rappresenti una strategia più efficiente per la produzione di CTL leucemia-specifici e che l'impiego di peptidi GMP migliora ulteriormente le prestazioni del protocollo, favorendone l'applicazione clinica.

In conclusione, la procedura di produzione di CTL leucemia-multiantigene specifici sviluppata presso la Cell Factory della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo con l'ausilio di un bioreattore monouso ha permesso di ottenere recuperi cellulari maggiori, ma anche una attività litica più efficace rispetto al metodo tradizionale di coltura in piastra. Sarà ora necessario procedere con la convalida in GMP del protocollo di coltura presso l'area di produzione dell'officina farmaceutica, in vista della possibile applicazione in vivo del prodotto cellulare nella prevenzione della recidiva ematologica di LMA dopo TCSE allogenico.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1. Leucemie: generalità e definizione	4
1.1.1. Leucemia Acuta	5
1.1.2. Epidemiologia.....	6
1.2. Leucemia Mieloide Acuta.....	7
1.2.1. Dentro la Leucemia Mieloide Acuta: tra Geni e Cromosomi.....	12
1.2.2. Manifestazioni cliniche della Leucemia Mieloide Acuta.....	22
1.2.3. Approcci diagnostici alla Leucemia Mieloide Acuta.....	22
1.2.4. Fattori prognostici nella Leucemia Mieloide Acuta.....	24
1.3. Opzioni terapeutiche nella Leucemia Mieloide Acuta	24
1.4. Riprogrammare l'immunità: il ruolo della terapia cellulare nelle risposte immunitarie	27
1.4.1. Immunologia della LMA	27
1.4.2. Evasione immunitaria	30
1.4.3. Microambiente immunosoppressivo	33
1.4.4. Immunoterapia e Terapia Cellulare	34
2. SCOPO DEL LAVORO	39
3. MATERIALI E METODI	41
4. RISULTATI	53
5. DISCUSSIONE	66
6. BIBLIOGRAFIA	69

1. INTRODUZIONE

1.1. Leucemie: generalità e definizione

Il termine **leucemia** deriva dalle parole greche: “λευκος”, bianco, e “αιμα”, sangue. Il termine in questione pone l’attenzione sulla caratteristica comune riscontrata nei pazienti affetti da queste malattie, ovvero una presenza eccessiva di globuli bianchi nel sangue. Questa patologia comprende, a sua volta, un’ampia gamma di neoplasie ematopoietiche. L’ematopoiesi è un processo altamente regolato attraverso il quale le cellule staminali si differenziano e maturano in eritrociti, megacariociti e cellule immunitarie di origine mieloide, linfoide o monocitica, all'interno del midollo osseo o dei tessuti linfatici. La maturazione delle cellule staminali, durante le varie fasi dell’ematopoiesi, può essere alterata portando ad una proliferazione incontrollata di cellule immature e leucemiche (*Figura 1*). Questa alterazione viene associata a errori genetici, quali traslocazioni cromosomiche reciproche, delezioni cromosomiche, mutazioni puntiformi e alterazioni epigenetiche.

Le 4 principali tipologie di leucemia sono:

- **Leucemia linfoblastica acuta (LLA):** si verifica nei pazienti che subiscono trasformazione blastica dei precursori dei linfociti B e T. È la leucemia più comune nella popolazione pediatrica, diffusa fino all'80% dei casi in questo gruppo contro il 20% dei casi negli adulti.
- **Leucemia mieloide acuta (LMA):** è caratterizzata da blasti mieloidi superiori al 20% ed è la leucemia acuta più comune negli adulti. È il cancro più aggressivo con una prognosi variabile a seconda dei sottotipi molecolari.
- **Leucemia linfocitica cronica (LLC):** si manifesta con la proliferazione di cellule linfoidi monoclonali. Si verifica principalmente in persone di età compresa tra 60 e 70 anni. La LLC è considerata una malattia indolente, questo comporta che non tutti i pazienti con una diagnosi debbano iniziare il trattamento fino al momento in cui manifestano i sintomi della malattia stessa.

- **Leucemia mieloide cronica (LMC):** deriva nella maggior parte dei casi dalla traslocazione e dalla fusione reciproca di BCR sul cromosoma 22 e ABL1 sul cromosoma 9, con successiva disregolazione della tirosin-chinasi sul cromosoma 22 e formazione del cromosoma Philadelphia (Ph). Questo porta a una popolazione monoclonale di granulociti non funzionali, soprattutto neutrofili, basofili ed eosinofili (Vardiman, 2010);(Siegel et al., 2017); (Yamamoto & Goodman, 2008).

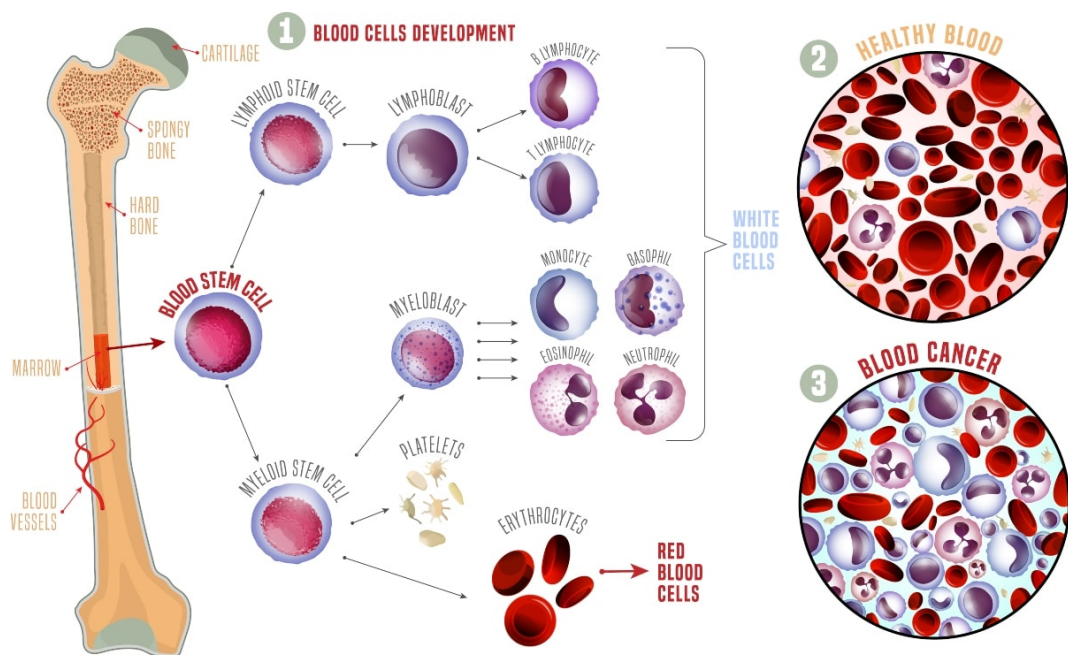


Figura 1: Differenziazione cellulare midollare a partire da una cellula staminale ematopoietica.

1.1.1. Leucemia Acuta

La leucemia acuta tende a presentarsi con sintomi aspecifici, a volte solo con febbre e letargia e segni di pancitopenia. Tra i principali indizi per la diagnosi ci sono epatosplenomegalia, linfadenopatia e sintomi muscolo-scheletrici.

Nella leucemia acuta, il midollo osseo è caratterizzato da una quota di blasti, ovvero precursori immaturi o indifferenziati di globuli rossi, bianchi o piastrine, superiore al 20%, anche se a volte, nei soggetti di età pediatrica, un quadro iniziale può mostrare % inferiori, che, se monitorate nel tempo, inevitabilmente aumenteranno. I precursori immaturi sono abitualmente presenti nel midollo osseo, ma nelle leucemie acute hanno caratteristiche monomorfiche, e acquisiscono alterazioni genetiche aggiuntive. I blasti possono essere presenti anche nel sangue periferico.

I marcatori tradizionalmente associati alla leucemia linfoblastica e mieloide acuta sono rispettivamente CD7, CD5, CD10, CD19, HLA-DR, CD34, e CD13, CD33, CD14, CD15, (Chennamadhavuni et al., 2026); (Leszczenko et al., 2021).

1.1.2. Epidemiologia

Alcuni tipi di leucemia sono più comuni nei bambini, altri negli adulti e negli anziani. Infatti, la distribuzione in base all'età è nettamente diversa per LLA e LMA.

La diffusione della LLA si concentra nella prima infanzia, con l'80% dei pazienti di età inferiore ai 15 anni. Al contrario, l'incidenza della LMA aumenta con l'età, meno del 20% dei pazienti sono bambini e più dell'80% sono adulti.

Per semplificare, tra le leucemie acute, la leucemia mieloide acuta può comparire a qualsiasi età ma più frequentemente in età adulta. La leucemia linfoblastica acuta, invece, è tipica dell'infanzia e colpisce soprattutto i soggetti pediatrici sotto i 15 anni, sebbene possa insorgere anche in età adulta (El Chaer et al., 2026).

Nelle società industrializzate vi è un'incidenza superiore probabilmente correlata ai fattori ambientali (Tebbi, 2021); (Terwilliger e Abdul-Hay, 2017).

- Sono, di conseguenza, identificati innumerevoli fattori di rischio genetici e ambientali: l'esposizione alle radiazioni ionizzanti è associata a un aumento del rischio di più sottotipi di leucemia (Bispo et al., 2020);
- l'esposizione al benzene è un fattore di rischio per la leucemia negli adulti, in particolare per la LMA (Snyder, 2012);
- la precedente esposizione alla chemioterapia, in particolare agli agenti alchilanti e agli inibitori della topoisomerasi II, aumenta il rischio di leucemia acuta in età avanzata (Bispo et al., 2020);
- una predisposizione genetica di qualsiasi neoplasia ematologica è un fattore di rischio per lo sviluppo successivo di un altro sottotipo di leucemia (D. L. Friedman et al., 2010);
- le infezioni virali (ad esempio, virus della leucemia a cellule T umane e virus di Epstein-Barr) sono associate a sottotipi di LLA (Davis et al., 2014);
- alcune sindromi genetiche (ad esempio, sindrome di Down, anemia di Fanconi) sono associate a un aumento del rischio di LMA e LLA (Chennamadhavuni et al., 2026); (Stieglitz & Loh, 2013).

1.2. Leucemia Mieloide Acuta

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una malattia maligna eterogena caratterizzata da una proliferazione incontrollata, una differenziazione alterata e una capacità di auto-rinnovamento acquisita di cellule mieloidi immature. Questo porta all'accumulo di blasti nel midollo osseo e nel sangue periferico, causando un'insufficienza ematopoietica (**Figura 2**).

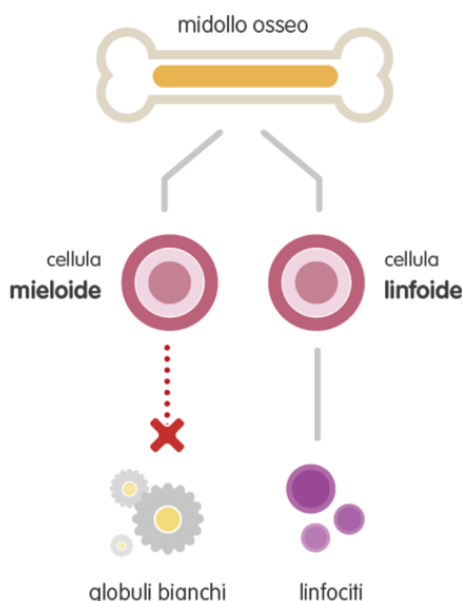


Figura 2: Schema rappresentativo della Leucemia mieloide acuta.

E' quindi definita come un disturbo del midollo osseo che deriva dall'espansione clonale delle cellule staminali ematopoietiche geneticamente alterate (HSC) e delle cellule progenitrici ematopoietiche in cui queste aberrazioni genomiche rappresentano un vantaggio di crescita per le cellule stesse, limitando il normale svolgimento della ematopoiesi (Arber et al., 2016).

La LMA può anche essere descritta come un gruppo di disturbi altamente complessi ed eterogenei che derivano dall'acquisizione graduale di mutazioni somatiche, comprese le aberrazioni cromosomiche e le varianti a singolo nucleotide (SNV), che interrompono i normali meccanismi di auto-rinnovamento, proliferazione e differenziazione nelle cellule ematopoietiche (K. Döhner & Döhner, 2008);(Welch et al., 2012);(Greaves & Maley, 2012). La LMA ha un tasso di sopravvivenza di 5 anni nel 30-40% nei pazienti di età inferiore ai 60 anni e inferiore al 10-15% nei pazienti più anziani (60 anni e oltre) (Desai et al., 2022). La LMA è comunemente identificata tramite immunofenotipizzazione citometrica a flusso e, occasionalmente, immunoistochimica. La leucemia mieloide acuta è costituita da blasti

che esprimono marcatori mieloidi, in particolare mieloperossidasi (MPO) o marcatori monocitici come CD64, CD11c e CD14, di solito in combinazione con altri marcatori come CD117, CD13 o CD33.

Gli studi moderni che riguardano l'identificazione di anomalie e mutazioni citogenetiche hanno permesso di ipotizzare nuove idee sulla patogenesi della LMA. Inoltre, alcune mutazioni sono correlate ad una predisposizione dovuta alla linea germinale e, di conseguenza, aumentano il rischio di LMA ereditaria, che richiede lo screening familiare. Pertanto, i momenti più importanti nella gestione del paziente affetto da LMA sono la diagnosi e la precisa classificazione della LMA (Fröhling et al., 2006).

La classificazione franco-americano-britannica (FAB) e la più recente classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sono i due sistemi principali che sono stati utilizzati per classificare la LMA in sottotipi (Padmakumar et al., 2021).

Nel 1974, 150 vetrini di sangue periferico colorati e delle biopsie del midollo osseo di pazienti con leucemia acuta e altri disturbi sono stati condivisi tra un gruppo di sette ematologi esperti provenienti da Francia, America e Gran Bretagna (FAB). In seguito a questo studio, nel 1976 è stato pubblicato un primo documento di classificazione sul *British Journal of Hematology*. In particolare, questo è stato uno dei primi sforzi per distinguere la leucemia mieloide acuta (LMA) dalla leucemia linfoblastica acuta. Il motivo per cui tale classificazione è ad oggi particolarmente ricordata è la sua suddivisione in sei gruppi: M1, M2, M3, M4, M5 e M6 (gli sforzi successivi avrebbero ampliato questo noto sistema per includere M0 e M7) (**Tabella 1**) (Pollyea, 2025).

Il sistema di classificazione FAB si basava su criteri morfologici e citochimici. Al contrario, la classificazione proposta da EGIL (Gruppo europeo per la caratterizzazione immunologica delle leucemie) si basava sull'immunofenotipizzazione, puntando ad una associazione più precisa del lignaggio ematologico e dello stadio di differenziazione di specifici tipi di leucemia. L'immunofenotipizzazione è diventata fondamentale per la classificazione ed essenziale per il riconoscimento dei vari sottotipi di AL.

La classificazione dell'OMS per le leucemie acute (2008/2009) ha incorporato citomorfologia, immunofenotipizzazione, cambiamenti citogenetici e molecolari (Angelescu et al., 2012).

	FORMA	DIFFUSIONE	SOTTOFORME	ANTIGENI
M0	Mieloblastica acuta minimamente differenziata	Dal 2 al 5%	-	CD34, CD117, CD13, CD33, HLA-DR
M1	Mieloblastica senza maturazione	Dal 15 al 20%	-	CD13, CD31, CD33, CD34, HLA-DR
M2	Mieloblastica con maturazione	Dal 25 al 35%	-	CD13, CD15, CD31, CD33, HLA-DR
M3	Promielocitica tipica	Dal 25 al 30%	M3v: promielocitica microgranulare	CD13, CD31, CD33
M4	Mielomonoblastica	Dal 20 al 25%	-	CD11c, CD13, CD14, CD15, CD31, CD33, HLA- DR
M5	Monoblastica	Dal 2 al 15%	M5a: senza maturazione M5b: con maturazione	CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD31, CD33
M6	Eritroblastica	Dal 3 al 5%	-	Glicoforina A
M7	Megacarioblastica	Dall'1 al 3%	-	CD41, CD42, CD61

Tabella 1: Classificazione FAB della leucemia mieloide acuta (LMA), basata su criteri morfologici e citochimici, che suddivide la malattia nei sottotipi M0–M7 in base al grado di differenziazione e alla linea cellulare coinvolta.

Quindi, basandosi sulla classificazione FAB la LMA era stata storicamente classificata in base alla morfologia e all'immunofenotipo, ma dalla 3^a edizione della Classificazione dei tumori dei tessuti ematopoietici e linfoidi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le anomalie genetiche sono state incorporate nei criteri diagnostici (Arber et al., 2016).

Le anomalie genetiche ricorrenti includono traslocazioni cromosomiche che coinvolgono fattori di trascrizione associati a diverse caratteristiche cliniche, morfologiche e immunofenotipiche che permettono di identificare un'entità clinica, patologica e genetica. Nella 4^a edizione della classificazione dell'OMS pubblicata nel 2017, la LMA è classificata in 6 categorie: LMA con anomalie genetiche ricorrenti, LMA con cambiamenti correlati alla

mielodisplasia (MRC), neoplasie mieloidi correlate alla terapia (t-MN), LMA non altrimenti specificata (NOS), sarcoma mieloido e proliferazioni mieloidi legate alla sindrome di Down (DS) (**Figura 3**).

WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms
 AML with recurrent genetic abnormalities
 AML with t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
 AML with inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22);
CBFB-MYH11
 APL with *PML-RARA*
 AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLLT3*
 AML with t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
 AML with inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2*,
MECOM
 AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.1);
RBM15-MKL1
Provisional entity: AML with BCR-ABL1
 AML with mutated *NPM1*
 AML with biallelic mutation of *CEBPA*
Provisional entity: AML with mutated RUNX1
 AML with myelodysplasia-related changes
 Therapy-related myeloid neoplasms
 AML, not otherwise specified (NOS)
 AML with minimal differentiation
 AML without maturation
 AML with maturation
 Acute myelomonocytic leukemia
 Acute monoblastic and monocytic leukemia
 Pure erythroid leukemia
 Acute megakaryoblastic leukemia
 Acute basophilic leukemia
 Acute panmyelosis with myelofibrosis
 Myeloid sarcoma
 Myeloid proliferations associated with Down syndrome
 Transient abnormal myelopoiesis (TAM) associated with
 Down syndrome
 Myeloid leukemia associated with Down syndrome

Figura 3: Classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) delle neoplasie mieloidi e della leucemia acuta.

Questa suddivisione include la LMA con traslocazione/inversioni bilanciate, nonché la LMA con mutazioni geniche che rappresenta circa il 20-30% dei pazienti. Le LMA con traslocazioni bilanciate includono: t(8;21)(q22;q22; *RUNX1*); *RUNX1-RUNX1T1*, inv(16)(p13.1;q22) o t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*, t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLLT3*, t(6;9) (p23;q34.1); *DEK-NUP214*; inv(3)(q21.3;q26.2) o t(3;3)(q21.3; q26.2); *GATA2*, *MECOM*, t(1;22) (p13.3;q13.1); *RBM15-MKL1*; e LMA con *BCR-ABL1*. La LMA con traslocazione *BCR-ABL1* è un gruppo provvisorio appena introdotto che è stata incluso separatamente nonostante la bassa incidenza (Hwang, 2020).

Recentemente, sia l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) sia l'International Consensus Classification (ICC) hanno incorporato ulteriori cambiamenti genomici negli schemi di classificazione della LMA, che includono risultati citogenetici e molecolari. Oltre

all'espansione delle anomalie genetiche nella classificazione della LMA, è stato modificato il limite percentuale di blasti per la maggior parte delle categorie, con notevoli differenze tra i diversi sistemi di classificazione.

L'OMS ha deciso di eliminare il requisito di blasti del 20% per tutti i tipi di LMA con aberrazioni genetiche. Al contrario, l'ICC ha scelto di ridurre l'assegnazione del taglio dei blasti al 10% per quasi tutti i tipi di LMA, ad eccezione della LMA con t(9;22)(34.1;q11.2)/BCR::ABL (Snaith et al., 2024).

La LMA è la leucemia acuta più comune negli adulti negli USA, con circa 22.010 nuovi casi nel 2025 (circa l'1% di tutti i tumori negli adulti negli USA), e rappresenta il maggior numero di decessi per leucemia acuta, con una stima di 11.090 decessi nel 2025 (Siegel et al., 2025). A livello globale, sulla base degli ultimi dati provenienti dallo studio Global Burden of Disease (GBD), l'incidenza della LMA è passata da 79.372 casi nel 1990 a 144.645 nel 2021 (Zhou et al., 2024), sebbene questo aumento dell'incidenza dell'87,3% negli ultimi trent'anni sia probabilmente una sottostima del reale valore. Questo aumento è stato accompagnato da un modesto calo del tasso di incidenza standardizzato per età (ASIR) nello stesso periodo (da 1,77 casi a 1,73 casi ogni 100.000). Ad eccezione dell'Asia orientale, l'incidenza della LMA è aumentata nella maggior parte delle regioni geografiche, con l'aumento più marcato dell'ASIR in Australia (da 3,19 a 4,53 ogni 100.000), nell'Europa centrale (da 1,78 a 2,11 ogni 100.000) e nell'Europa occidentale (da 2,25 a 2,79 ogni 100.000) (Zhou et al., 2024);(El Chaer et al., 2026).

Nelle leucemie, inclusa la LMA, lo studio degli antigeni tumorali e dei biomarcatori molecolari è diventato sempre più importante per comprendere meglio le caratteristiche prognostiche di malattia, valutare in modo più preciso la risposta ai trattamenti, e sviluppare nuovi farmaci bersaglio.

A tale proposito, sia WT1 che PRAME sono altamente espressi nei pazienti affetti da LMA. Il gene WT1 si trova sul cromosoma 11p13 e codifica per un fattore di trascrizione che si lega al DNA attraverso una struttura *zinc finger*. Nei casi di leucemia funge da oncogene. L'antigene PRAME è stato originariamente riconosciuto in un paziente con melanoma. Codifica per una proteina composta da 509 aminoacidi. Nonostante la sua funzione non sia del tutto nota, si ipotizza sia coinvolto nella morte cellulare indipendente dalla caspasi e agisca anche come repressore dominante della segnalazione del recettore dell'acido retinoico (Qin et al., 2009). Survivin (BIRC5) è una proteina che appartiene alla famiglia degli inibitori dell'apoptosi, espressa principalmente nei tessuti embrionali e in

numerosa neoplasie; al contrario, risulta quasi del tutto assente nei tessuti adulti normali. Essa svolge un ruolo chiave nel controllo della sopravvivenza cellulare e della mitosi, contribuendo alla progressione tumorale e rappresentando un potenziale target terapeutico (Altieri, 2008). La nucleofosmina (NPM), è un *chaperone* molecolare che può prevenire l'aggregazione proteica nel nucleolo e regolare l'assemblaggio e il trasporto di particelle pre-ribosomiali attraverso la membrana nucleare (Falini et al., 2005).

1.2.1. Dentro la Leucemia Mieloide Acuta: tra Geni e Cromosomi

La LMA è una malattia altamente eterogenea, caratterizzata da un processo di leucemogenesi che si manifesta con un accumulo graduale di alterazioni genetiche nelle varie fasi dell'evoluzione della malattia. Il concetto di leucemogenesi si basa sul modello delle “due mutazioni cooperative” (*two-hit model*), secondo cui sono necessarie almeno due alterazioni genetiche per determinare la trasformazione maligna e la formazione della cellula leucemica (Gilliland et al., 2004).

La diversità delle anomalie genetiche e genomiche riflette la sua complessità. Il riconoscimento di queste alterazioni è fondamentale per la diagnosi, la stratificazione del rischio e il trattamento della LMA. I riarrangiamenti cromosomici sono ben consolidati nella classificazione diagnostica della LMA, così come alcune mutazioni geniche, in diversi sistemi di classificazione internazionali. Inoltre, il riconoscimento di nuovi profili mutazionali durante la recidiva e l'identificazione delle mutazioni nelle impostazioni pre e post-trapianto sono illuminanti nella comprensione dell'evoluzione della malattia e sono rilevanti per la valutazione del rischio dei pazienti con LMA (Snaith et al., 2024).

Nella leucemia mieloide acuta pediatrica alcune alterazioni ricorrenti sono considerate indicatori prognostici favorevoli. La loro presenza è infatti associata a una maggiore probabilità di remissione e a una sopravvivenza più prolungata. Una serie di anomalie cariotipiche come le monosomie dei cromosomi 5 e/o 7, la delezione del braccio lungo del cromosoma 5 e le anomalie del braccio lungo del cromosoma 3, come inv (3)(q21q26) e t(3;3)(q21;q26) o cariotipo complesso, ovvero 5 o più anomalie citogenetiche non correlate, sono state collegate con una scarsa risposta alla terapia iniziale e un aumento significativo del rischio di ricaduta.

Questi sono classificati come gruppo di prognosi avversa con sopravvivenza globale più breve. Al contrario, circa il 40%-50% di tutti i casi di LMA sono citogeneticamente normali (CN-AML) e questo gruppo ha un rischio intermedio di recidiva (Padmakumar et al., 2021).

La componente genetica, che include sia le alterazioni citogenetiche classiche sia mutazioni di diversi geni, rappresenta il fattore più rilevante nella definizione della prognosi. Inoltre, negli ultimi anni sono state sviluppate terapie farmacologiche a bassa tossicità che hanno come bersaglio alcuni dei geni mutati.

Di particolare rilevanza è la t(15;17), caratteristica della leucemia promielocitica acuta, che porta alla formazione del gene di fusione PML-RARA. Inoltre, sono identificati riarrangiamenti a carico della regione 11q23, coinvolgenti il gene KMT2A (precedentemente noto come MLL). La mutazione più frequente e impattante nei pazienti affetti da LMA pediatrica è l'AML del fattore di legame del nucleo (AML CBF), che comprende circa il 25% dei casi, che in genere colpisce individui con un'età media di 8-9 anni (Creutzig et al., 2012).

Le mutazioni CBF AML includono t(8;21)(q22;q22) e inv(16)(p13q22), riconosciuto anche come t(16;16)(p13;q22), spesso denominate rispettivamente come t(8;21) e inv(16). Queste anomalie genetiche danno origine rispettivamente a geni di fusione RUNX1-RUNX1T1 e CBFβ-MYH11, che interrompono il complesso CBF (composto da RUNX1-3 + CBFβ), fondamentale per l'ematopoiesi (Quessada et al., 2021).

La famiglia CBF è composta da quattro proteine, le subunità 3 α, RUNX1 (AML1, Cbfa2), RUNX2 (Cbfa1) e RUNX3 (Cbfa3) e la singola subunità β, CBFβ (Ogawa et al., 1993). Le interruzioni sia di CBFβ che di RUNX1 sono associate alla leucemia mieloide acuta (LMA). CBFβ è coinvolto nell'anomalia cromosomica ricorrente inv(16)(p13q22) e nella meno comune traslocazione t(16;16)(p13q22), entrambe le quali creano una fusione tra il gene CBFB su 16q22 e MYH11 su 16p13, il gene che codifica la catena pesante della miosina muscolare liscia (SMMHC).

Il gene di fusione CBFB-MYH11 risultante, che codifica l'oncoproteina CBFβ-SMMHC, si trova in quasi tutti i pazienti con sottotipo M4 di classificazione franco-americano-britannico (FAB) con eosinofilia (M4Eo) LMA. Rispettivamente, RUNX1 è coinvolto nella traslocazione t(8;21) che si traduce in una fusione tra RUNX1 e il gene per una proteina della famiglia E-box, ETO (RUNX1T1, MTG8), per generare AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1), che è associato al sottotipo AML M2 (Rowley, 1973). Insieme, le traslocazioni inv(16)(p13q22) e t(8;21) rappresentano circa il 20-25% della LMA adulta, rendendo RUNX1 e CBFB i geni più comunemente mutati nella LMA umana (Hyde e Liu, 2010). Mentre t(8;21) porta comunemente ad un leggero aumento della conta dei leucociti e livelli ridotti di cellule originarie del midollo osseo, causando trombocitopenia e anemia, inv(16) tende a colpire aree come la pelle, i polmoni o il sistema nervoso centrale,

manifestandosi come epatosplenomegalia, linfadenopatia e iperplasia gengivale (Solh et al., 2014).

Tuttavia, il gene di fusione CBF è essenziale ma spesso insufficiente per innescare la leucemogenesi (Rau, 2016). Vi è quindi un'ipotesi, detta "second hit", che propone un ruolo patogenetico per mutazioni secondarie, come quelle a carico di RAS-KIT e FLT3, che possono coesistere nella LMA CBF (Ferrando et al., 2020). La leucemia promielocitica acuta (APL) è una variante ampiamente studiata della LMA, responsabile del 5%-10% dei casi, ed è identificata dalla traslocazione $t(15;17)(q24;q21)$, che porta alla generazione del riarrangiamento PML-RARA (Liquori et al., 2020).

Il gene di fusione PML-RARA mutato provoca una proliferazione incontrollata e l'accumulo di globuli bianchi leucemici (WBC) che si bloccano allo stadio dei promielociti, non riuscendo a maturare o differenziarsi. Tale mancata proliferazione devia lo sviluppo dei precursori delle cellule del sangue all'interno del midollo osseo, con conseguente sintomi comuni come anemia, sanguinamento prolungato e infezioni ricorrenti. Una grave complicazione dell'APL è la coagulazione intravascolare disseminata (DIC). Mentre circa il 90% dei casi di APL mostra la caratteristica traslocazione reciproca PML-RARA $t(15;17)$, ci sono casi di altre traslocazioni che coinvolgono il gene RARA e altri geni oltre al PML. La presenza di PML-RARA può essere determinata attraverso tecniche come RQ-PCR (reazione a catena della polimerasi quantitativa in tempo reale), FISH (ibridazione in situ della fluorescenza) e analisi cromosomica (Mrózek e Bloomfield, 2008); (Tseng et al., 2023). Di particolare rilevanza sono i riarrangiamenti a carico della regione 11q23 i quali coinvolgono il gene KMT2A. La N-metiltransferasi 2A specifica della lisina (KMT2A), nota anche come MLL, è comunemente coinvolta in riarrangiamenti cromosomici bilanciati, caratterizzati da una riorganizzazione del materiale genetico senza variazioni quantitative dello stesso. Sono stati identificati due punti di interruzione: una regione principale tra l'introne 7 e l'esone 13 e una regione minore tra l'introne 20 e l'esone 24.

Questi riarrangiamenti sono molto diversi e, a causa della natura eterogenea dei partner di fusione (Guarnera et al., 2024). In genere, questi riarrangiamenti sono associati a una prognosi sfavorevole, probabilmente a causa dei marcati cambiamenti epigenetici indotti dalle lesioni, con fusioni che mostrano un aumento anormale della metilazione H3K79. Riarrangiamenti che coinvolgono KMT2A e i suoi geni partner di fusione si trovano nella leucemia linfoblastica acuta precursore a cellule B (B-ALL), T-ALL, AML, neoplasia mielodisplastica (MDS), leucemia a lignaggio misto (MPAL) e leucemia

secondaria (Meyer et al., 2023); (Górecki et al., 2023); (Larson et al., 2023). Tra questi, il più frequente è MLLT3 (30,4%) (Guarnera et al., 2024).

Sebbene più comunemente associata alla leucemia mieloide cronica, la traslocazione t(9;22)(q34;q11), che genera il cromosoma Philadelphia, può essere riscontrata, seppur raramente, anche nella leucemia mieloide acuta. Il cromosoma Philadelphia (Ph) risultante dalla traslocazione t(9;22) genera la proteina di fusione oncogenica BCR-ABL1, che è più comunemente associata alla leucemia mieloide cronica (LMC) e alla leucemia linfoblastica acuta Ph-positiva (Ph+) (ALL). Ci sono anche rari casi di pazienti ($\leq 1\%$) con leucemia mieloide acuta (AML) di recente diagnosi che presentano questa traslocazione (Paietta et al., 1998); (Rosenberg et al., 2022).

La traslocazione del gene ABL1, proto-oncogene tirosina-proteina chinasi situato sul cromosoma 9 al gene BCR della regione del cluster del punto di interruzione situato sul cromosoma 22 porta alla formazione del gene di fusione BCR-ABL1 sul cromosoma Philadelphia (Rowley, 1973b). Tre ibridi di gene di fusione BCR-ABL1 codificano le isoforme proteiche BCR-ABL1 p210, p190 e p230, che hanno costantemente migliorato l'attività della tirosin chinasi (TK). Queste chinasi attivate in modo errato alterano le vie di segnalazione a valle, causando una maggiore proliferazione, arresto di differenziazione e resistenza alla morte cellulare (Kurzrock et al., 1988); (S. Li et al., 1999). Gli inibitori della tirosin chinasi (TKI) che prendono di mira la proteina BCR-ABL1 sono la terapia mirata di maggior successo per la leucemia Ph-positiva. Tuttavia, migliorare la prognosi dei pazienti con leucemia caratterizzata dalla presenza di cromosoma Philadelphia risulta difficile a causa della resistenza terapeutica e della progressione della malattia (Ottmann et al., 2002); (Tojo et al., 2009); (Kang et al., 2016).

In aggiunta alle anomalie citogenetiche, un ruolo centrale nella patogenesi della leucemia mieloide acuta è rappresentato dalle mutazioni geniche, le quali contribuiscono in modo significativo all'eterogeneità biologica della malattia. Le alterazioni principali interessano geni coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare, della differenziazione ematopoietica e dei meccanismi epigenetici, tra cui FLT3, NPM1, CEBPA, IDH1/IDH2, DNMT3A, TET2 e ASXL1. Tali geni svolgono un ruolo cruciale sia per valutare la positività prognostica sia per le scelte terapeutiche. La nucleofosmina 1 (NPM1) è uno dei geni comunemente mutati e si trova in circa il 30% dei casi di leucemia negli adulti (Falini et al., 2005). NPM1 è una proteina chaperon nucleare multifunzionale che si snoda tra il nucleo e il citoplasma con localizzazione nucleare primaria. Strutturalmente, il wild type NPM1 (NPMwt) è una proteina da 37 kDa con un N-terminale idrofobo, un nucleo acido centrale e

un C-terminale di base. L'N-terminale contiene due segnali di esportazione nucleare ricchi di leucina (NES). Il nucleo centrale, contenente acido aspartico e glutammico, è responsabile del legame dell'istone e dell'attività della ribonucleasi e ha un segnale di localizzazione nucleare bipartita (NLS), responsabile della localizzazione nucleare dell'NPM1wt. Il C-terminale contiene una regione di base coinvolta nel legame con l'acido nucleico. L'NPM1wt partecipa alla biosintesi ribosomiale e alla crescita cellulare mediando l'esportazione nucleare e l'incorporazione dell'RNA ribosomiale 5 S nella subunità ribosomiale 60 S (Yu et al., 2006). NPM1wt si lega anche al centrosoma e previene la duplicazione incontrollata durante la fase di riposo del ciclo cellulare.

Si separa brevemente e consente una duplicazione limitata del centrosoma durante le fasi S e G2 del ciclo cellulare e si rilega di nuovo con il risultato che ogni cellula figlia contiene un singolo centrosoma legato NPM1 dopo la mitosi (Okuda et al., 2000). In caso di lesione ossidativa, NPM1 attraverso la sua interazione con p53 aumenta la stabilità cellulare e promuove l'arresto della crescita prevenendo così la mutagenesi (Colombo et al., 2002). In sintesi, NPM1wt è una proteina nucleare essenziale per varie fasi del ciclo cellulare e svolge un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare (Falini et al., 2020).

Le mutazioni in NPM1 sono sempre eterozigoti e derivano da inserimenti di 4 bp che causano una mutazione frameshift in prossimità della porzione C-terminale con conseguente perdita di triptofano (W288 e W290 o W290 da solo) e un guadagno di nuovo NES che porta alla rottura della struttura dell'elica piegata con perdita di NoLS, che sposta l'equilibrio verso l'esportazione nucleare e la localizzazione citoplasmatica di NPM1mut (Falini et al., 2005). Questo trasferimento extra-nucleare è mediato dall'interazione tra NPM1 mutato ed exportina 1 (XPO1).

L'exportina 1, un trasportatore nucleare identificato per la prima volta nel lievito (*S. cerevisiae*) con funzioni omologhe nell'uomo, agisce come vettore diretto che media l'esportazione di proteine contenenti NES nel citoplasma (Stade et al., 1997). Quasi tutte le mutazioni in NPM1 sono limitate all'esone 12, ma raramente (<1%) possono coinvolgere l'esone 6, l'esone 9 e l'esone 11, portando anche alla delocalizzazione citoplasmatica di NPM1mut (Sharma e Liesveld, 2023) (**Figura 4**).

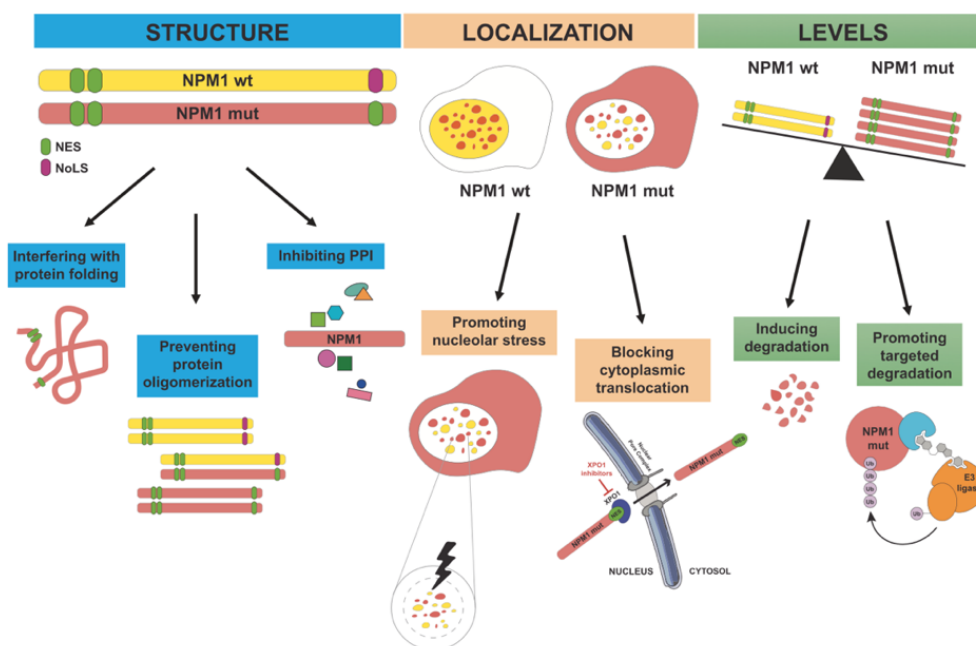


Figura 4: Targeting della struttura, della localizzazione e dei livelli delle proteine NPM1 wild-type e mutanti.

FMS-like tirosin chinasi 3 (FLT3) è un recettore della tirosin chinasi responsabile della proliferazione delle cellule ematopoietiche e della sopravvivenza all'attivazione. È caratterizzato da due diversi tipi di mutazioni: duplicazione tandem interna della membrana giusta (FLT3-ITD) e mutazione puntuale o delezione del dominio tirosin chinasi (FLT3-TKD); queste mutazioni sono comuni in NPM1mut-LMA e sono ora riclassificate come categoria di rischio intermedio secondo la classificazione European Leukemia Net (ELN) 2022. In presenza di due mutazioni correlate, la mutazione FLT3 è considerata una mutazione secondaria che aiuta nella leucemogenesi. In questi casi, poiché diversi mutanti FLT3-ITD sono stati identificati contro un mutante NPM1, questo indica l'evoluzione di vari mutanti FLT3 che si evolvono da un singolo clone mutato NMP1 (Thiede et al., 2006);(Metzeler et al., 2016).

La mutazione DNMT3A è stata identificata nel circa 60% dei pazienti con LMA che presentano NMP1mut (Yang et al., 2015). La frequenza di questo gene è sempre maggiore nelle popolazioni che invecchiano senza leucemia evidente (Genovese et al., 2014). DNMT3A è un gene driver che precede NMP1mut, fornendo un vantaggio di auto-rinnovamento ai cloni leucemici. Non è quindi considerata una mutazione ad alto rischio secondo la classificazione della leucemia ELN 2022 e risponde in modo ottimale alla terapia standard con remissione e cura completa a lungo termine.

La tripla mutazione con interazione a tre vie tra NPM1, DNMT3A e FLT3 si verifica in circa il 6% dei casi di LMA ed è caratterizzata da un'alta frequenza di cellule staminali leucemiche (LSC), immunofenotipo aberrante (con CD34 basso e CD56 alto) e sovraespressione del fattore di leucemia epatica (HLF) (Garg et al., 2019). Questo genotipo triplo mutato provoca una malattia aggressiva chemio-resistente a causa del rimodellamento del nucleosoma compromesso e di una prognosi complessiva sfavorevole con un alto tasso di ricaduta, una minore sopravvivenza libera da malattia e una sopravvivenza globale (Papaemmanuil et al., 2016);(Bezerra et al., 2020); (Sharma e Liesveld, 2023).

La mutazione CEBPA è una delle alterazioni genetiche comuni nei pazienti con leucemia mieloide acuta de novo (LMA) ma raramente osservata nella LMA secondaria o correlata alla terapia. L'incidenza della mutazione CEBPA è di circa il 5,1-18,9% nei pazienti con LMA; si osserva un tasso di incidenza più elevato nei pazienti con LMA dall'Asia rispetto ai paesi occidentali (Preudhomme et al., 2002); (Tien et al., 2018). La presenza di mutazioni CEBPA è stata identificata come un fattore prognostico favorevole. La proteina legante CCAAT/enhancer α (CEBPA), situata sul cromosoma 19q13.1, è un fattore di trascrizione di 42 kDa caratterizzato da un dominio di cerniera di leucina di base che lega il DNA (bZIP) al terminale COOH (C-terminale) e due domini di transattivazione (TAD), TAD 1 e TAD 2, al terminale NH2 (N-terminale) (A. D. Friedman e McKnight, 1990). Tale proteina svolge il ruolo di fattore di trascrizione ed è di notevole rilevanza nella differenziazione granulocitica. Una diminuzione dell'attività CEBPA è implicata nella trasformazione dei progenitori mieloidi (Smith et al., 1996). La maggior parte dei pazienti con mutazioni CEBPA ospita mutazioni bialleliche che coinvolgono sia la regione TAD N-terminale che il dominio bZIP C-terminale (Tien e Hou, 2024).

Nel 2008 venne per la prima volta sequenziato il genoma di un paziente affetto da LMA. In seguito a tale sequenziamento, è stata descritta per la prima volta la mutazione dell'isocitrato deidrogenasi (IDH) associata alla LMA stessa (Mardis et al., 2009). Ad oggi è confermato che le leucemia mieloidi acute sono soggette a mutazioni IDH1 o IDH2 nel 8% e 12% dei casi rispettivamente, con una piccola percentuale presente anche in altre neoplasie mieloidi come la sindrome mielodisplastica (MDS) e le neoplasie mieloproliferative accelerate (MPN) (DiNardo et al., 2015).

Le mutazioni in IDH1 e IDH2 avvengono nei residui di arginina all'interno del sito attivo enzimatico. Queste mutazioni causano una perdita di funzione nella normale reazione del ciclo di Krebs dell'isocitrato all'alfa-chetoglutarato (aKG). Al contrario innescano una reazione inversa in cui aKG viene ridotto a 2-idrossiglutarato (2-HG) (Dang et al., 2009). In

questo modo, 2HG funziona come un cancro "oncometabolita", ovvero inibisce in maniera competitiva gli enzimi dipendenti da α KG, come gli enzimi della famiglia TET e le lisina demetilasi, e porta a un fenotipo ipermetilato caratteristico della LMA (Figueroa et al., 2010). La fisiopatologia che deriva da un'errata produzione di 2HG si manifesta attraverso la funzione anomala di HIF1 α e l'induzione della dipendenza da BCL2 attraverso l'inibizione della citocromo C ossidasi (Heuser et al., 2015); (Issa e DiNardo, 2021) (**Figura 5**).

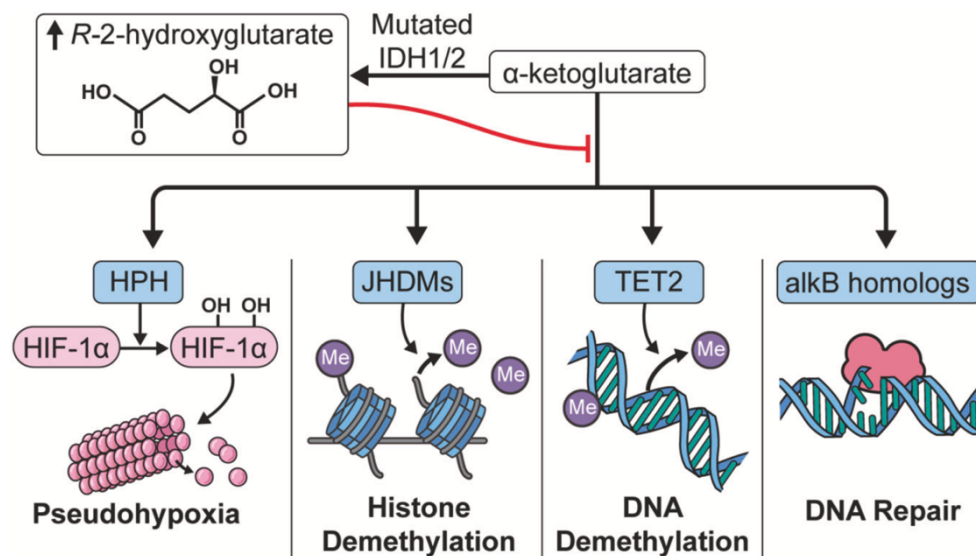


Figura 5: Le forme mutate di IDH1 e IDH2 convertono l' α -chetoglutarato in R-2-idrossiglutarato, il quale agisce come inibitore competitivo degli enzimi dipendenti dall' α -chetoglutarato.

Il ruolo di tale mutazioni non sembra essere del tutto chiarito, nonostante ciò, si osserva un risultato inferiore per le mutazioni IDH1 e, al contrario, una prognosi favorevole per le mutazioni IDH2, in particolare le mutazioni R172K IDH2, nel contesto della chemioterapia intensiva standard (Thol et al., 2010); (Paschka et al., 2010); (Boissel et al., 2010).

Le mutazioni dei geni IDH1 e IDH2 sono associate a specifiche caratteristiche cliniche e biologiche della malattia. In particolare, si riscontrano più frequentemente in pazienti di età avanzata e in presenza di un cariotipo normale o appartenente alla categoria di rischio intermedio, come nel caso della trisomia 8.

La prognosi delle mutazioni IDH1 e IDH2 non è univoca, ma dipende dal contesto genetico in cui si inseriscono. In particolare, quando coesistono con mutazioni di NPM1 in assenza

di FLT3-ITD, sembrano essere associate a un esito clinico migliore (J. P. Patel et al., 2012); (Issa e DiNardo, 2021).

TET2 è uno dei geni appartenenti alla famiglia di traslocazione (TET) che codificano le DNA diossigenasi; esso regola il processo di demetilazione del genoma ed è anche coinvolto nella modifica dell'istone (Zhang et al., 2023). Il gene TET2 si trova sul cromosoma 4q24, con una lunghezza di 133,9 kb, e codifica una proteina TET2 lunga 2.002 aminoacidi. Le mutazioni TET2 sono spesso identificate nelle neoplasie ematologiche (Zhang et al., 2023), motivo per cui è sempre espresso nel compartimento ematopoietico (Z. Li et al., 2011). È inoltre coinvolto nella regolazione del processo di demetilazione del DNA. Grazie al suo coinvolgimento nella regolazione epigenetica, le mutazioni somatiche TET2 sono spesso rilevate negli anziani e sono una delle mutazioni genetiche più importanti nell'ematopoiesi clonale (Kessler et al., 2022). Le mutazioni in TET2 sono presenti nel 7%-28% dei pazienti adulti con LMA (Shen et al., 2011), provocano una perdita di funzione dell'enzima TET2, portando a modelli di metilazione del DNA alterati (Bussaglia et al., 2019). Questa disregolazione epigenetica influisce sulla proliferazione e sulla differenziazione delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche (HSPC), contribuendo potenzialmente all'ematopoiesi clonale e alla differenziazione anormale delle cellule staminali ematopoietiche e progenitrici (HSPC) (Gao et al., 2024). Tuttavia le mutazioni TET2 sono raramente associate ad altre caratteristiche cliniche e hanno un valore prognostico limitato, sebbene dimostrino una correlazione significativa con l'età (Buscarlet et al., 2017). Studi su pazienti con LMA con bassi livelli di TET2 hanno dimostrato che la conseguenza primaria della perdita di TET2 nelle cellule ematopoietiche di pazienti pre-leucemici è l'ipermetilazione del DNA (Tulstrup et al., 2021). Questi siti di metilazione sono arricchiti in isole non CpG contenenti potenziatori ematopoietici specifici e siti di legame del fattore di trascrizione (Pan et al., 2017); (Yamazaki et al., 2015). Questi cambiamenti nei profili di espressione genica portano a una maggiore proliferazione, auto-rinnovamento delle cellule e alterazioni nel processo di differenziazione (Gao et al., 2024).

ASXL1, trovato sul cromosoma 20q11, è suggerito per avere ruoli modulatori epigenetici. La maggior parte delle mutazioni ASXL1 si trovano sull'esone 12, generalmente mutazioni frameshift o mutazioni missenso (Fisher et al., 2003), frequentemente rilevate nella LMA. Sebbene il loro ruolo esatto nelle neoplasie ematologiche non sia stato completamente chiarito, diversi studi dimostrano che ASXL1 funziona come un gene soppressore del tumore (Paschka et al., 2015).

Le mutazioni somatiche ASXL1 sono state precedentemente suggerite come potenziali marcatori di prognosi sfavorevole. Tuttavia, la loro prevalenza varia in diverse malattie, che vanno da quasi la metà dei pazienti con leucemia mielomonocitica cronica (CMML) a circa il 10% nella LMA (30% nella LMA secondaria contro il 6,5% nella LMA de-novo) e il 16% nelle sindromi mielodisplastiche (MDS) (Paschka et al., 2015). Inoltre, recenti studi sugli animali hanno dimostrato che l'ASXL1 mutante può portare a una compromissione dell'ematopoiesi e della trasformazione mieloide attraverso alterazioni dei marcatori di istoni (Asada e Kitamura, 2019); (Sheikhi et al., 2024).

Il gene soppressore del tumore TP53 si trova mutato nell'8%–14% dei casi di LMA. Queste mutazioni e delezioni sono principalmente associate nella LMA con un cariotipo complesso (69%) e sono rare nei pazienti senza delezioni cromosomiche. In generale, le mutazioni TP53 conferiscono una prognosi molto avversa con chemioresistenza persistente (Saultz & Garzon, 2016) (*Figura 6*).

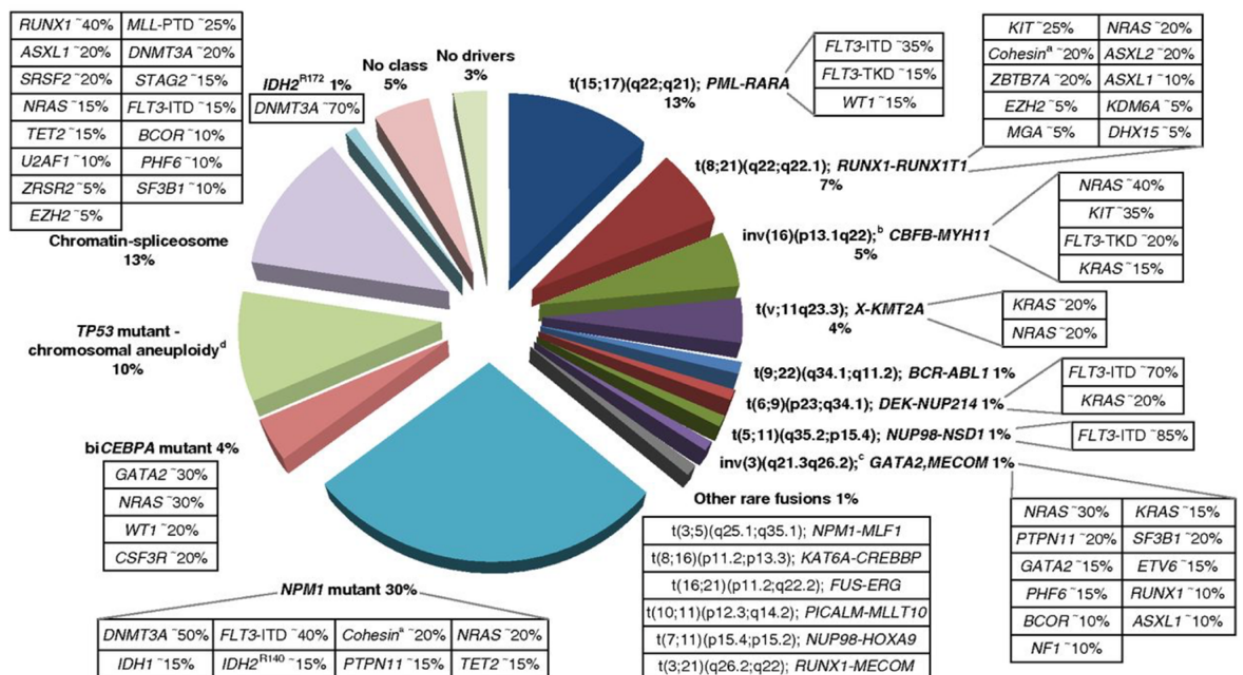


Figura 6: Classi molecolari di AML e mutazioni geniche concomitanti in pazienti adulti fino a ~65 anni di età.

1.2.2. Manifestazioni cliniche della Leucemia Mieloide Acuta

I pazienti affetti da LMA possono manifestare vari sintomi, tra cui i segni di anemia, quali pallore, astenia e difficoltà respiratoria, manifestazioni cliniche di piastrinopenia, quali presenza di petecchie o lividi cutanei, e di leucopenia, quali infezioni ricorrenti. Inoltre, la presenza di blasti a livello midollare o di altri tessuti, porta a dolore osseo, noduli cutanei, ed altri sintomi d'organo. L'insorgere di tali sintomi è relativamente rapido, spesso con tempistiche di giorni o settimane.

Come rappresentazione della LMA, i risultati più diffusi dell'esame fisico includono pallore, lividi ed epatosplenomegalia, mentre la linfadenopatia è rara. Il sarcoma mieloide, un equivalente mieloide, può presentarsi come lesioni cutanee ispessite, iperpigmentate e grossolane. La coagulazione intravascolare disseminata (DIC), caratterizzata clinicamente da emorragie della mucosa orale, porpora, petecchie delle estremità e sanguinamento da siti di linea endovenosa, è comune nella LMA (Vakiti et al., 2024).

1.2.3. Approcci diagnostici alla Leucemia Mieloide Acuta

Il campo della diagnostica delle leucemie acute, inizialmente basato esclusivamente sulla valutazione morfologica, si avvale ora di un approccio multidisciplinare. In particolare, la diagnostica della LMA si basa su citomorfologia, citochimica, immunofenotipizzazione, citogenetica e genetica molecolare. Solo l'integrazione di tutti questi metodi consente una caratterizzazione completa di ciascun caso, prerequisito fondamentale per ottenere una diagnosi precisa e dati utili al monitoraggio del trattamento (Haferlach e Schmidts, 2020).

Numerose tecniche sono utilizzate per rilevare anomalie citogenetiche e genomiche nella LMA. Per gli studi citogenetici, le principali tecniche comprendono l'analisi cromosomica (cariotipizzazione), l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), i microarray cromosomici (CMA) e la mappatura ottica del genoma (OGM). Le tecniche molecolari includono il Sequenziamento Sanger, vari saggi basati su PCR e Next Generation Sequencing (NGS)/Massively Parallel Sequencing (MPS) (Batayneh et al., 2026). Queste tecniche consentono di identificare marcatori di malattia specifici per ogni singolo caso, che saranno utilizzati per monitorare la malattia residua minima (MRD) nel corso del percorso terapeutico.

La citomorfologia rappresenta un punto di partenza nella diagnosi delle malattie ematologiche. Essa permette infatti un'analisi rapida dei campioni, rendendo possibile un approccio diagnostico, efficiente sia in termini di tempo che di costi. Attraverso

l'osservazione al microscopio, l'ematologo esperto è in grado di riconoscere rapidamente alterazioni cellulari, distinguendo le cellule normali da quelle atipiche o sospette per patologia, comprese quelle potenzialmente leucemiche. Inoltre, la valutazione della distribuzione e della percentuale delle diverse linee cellulari, eritroide, granulocitaria e monocitaria, consente di orientarsi verso numerose condizioni ematologiche. Le tecniche citochimiche, come la colorazione per la mieloperossidasi, per le esterasi non specifiche e la colorazione del ferro, contribuiscono ulteriormente alla definizione del quadro diagnostico. Questi strumenti permettono infatti di identificare eventuali alterazioni cellulari. Una biopsia del midollo osseo fornisce informazioni complementari sulle cellule nel contesto tissutale, ad esempio sulla cellularità e sull'istotopografia, nonché sulla proporzione e la maturazione delle cellule ematopoietiche. Inoltre, la valutazione istologica aiutata dall'immunoistochimica può convalidare la classificazione, specialmente per i casi del sottogruppo di LMA non altrimenti specificato (NOS), e facilitare la differenziazione tra sindromi mielodisplastiche (MDS) e LMA (Orazi, 2007); (Haferlach e Schmidts, 2020).

Gli approcci diagnostici basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) e il sequenziamento di nuova generazione (NGS) rappresentano il *gold standard*. La PCR consente l'amplificazione specifica di sequenze bersaglio conosciute. Con il metodo della PCR quantitativa (qPCR), le aberrazioni possono essere rilevate e monitorate in modo sensibile. L'amplificazione del modello viene misurata in tempo reale utilizzando sonde fluorescenti e la quantificazione viene eseguita rispetto a un modello standard. L'input di cDNA, cioè RNA trascritto al contrario (RT), consente il rilevamento e la quantificazione della trascrizione (RT-qPCR). Il vantaggio principale di tali saggi è la loro alta sensibilità fino a 10^{-6} . L'NGS, a differenza delle tecniche di sequenziamento più vecchie (ad es. Sequenziamento Sanger), offre la capacità di una massiccia parallelizzazione. Ciò consente il sequenziamento di centinaia di campioni e/o loci genomici in un'unica esecuzione. Il sequenziamento basato su pannello rappresenta l'attuale metodologia NGS all'avanguardia. Tale sequenziamento ha portato a una migliore caratterizzazione molecolare nella LMA. Con la tecnica di sequenziamento dell'intero genoma o dell'intero esoma, cioè tutti i geni codificanti proteine, (WGS/WES), è possibile rilevare variazioni di sequenza e aberrazioni numeriche e strutturali. Il sequenziamento dell'intero trascrittoma (WTS/RNA-Seq) consente l'analisi dell'espressione genica a livello genomico, il rilevamento di trascrizioni di fusione e anche l'analisi mutazionale dei loci espressi (Haferlach e Schmidts, 2020).

La presenza e l'espressione di antigeni sulla superficie o nel citoplasma cellulare costituiscono l'immunofenotipo di una cellula, che è indicativo dell'identità cellulare e del

grado di maturazione. L'analisi dell'immunofenotipo è uno dei cardini della diagnosi delle leucemie acute, ed è cruciale per il monitoraggio della MRD in assenza di specifiche alterazioni o quando non è stato possibile ottenere un campione di blasti dell'esordio di malattia. Oltre alla caratterizzazione delle cellule leucemiche, è possibile evidenziarne aberrazioni, classificate come segue (Swerdlow *et al.*, 2017):

1. Espressione di antigeni a linea incrociata (ad esempio, espressione di marcatori linfoidi nelle cellule AML, come la LMA CD19⁺);
2. Espressione asincrona dei marcatori maturazionali (ad esempio, espressione contemporanea di CD34 e CD11b nella LMA);
3. Espressione antigenica assente o ridotta dei marcatori tipici (ad esempio, HLA-DR-negativo nelle LMA);
4. Sovraespressione di antigeni (ad es. CD33⁺⁺ CD34⁺⁺ LMA).

1.2.4. Fattori prognostici nella Leucemia Mieloide Acuta

La prognosi nella LMA dipende dalla caratterizzazione citogenetica e molecolare. Una LMA a rischio favorevole, ad esempio, può essere identificata dalla presenza di traslocazioni quali t(8;21), t(15;17) inversione del cromosoma 16, o t(16;16), presenza di NPM mutata isolata. Aberrazioni o mutazioni citogenetiche a rischio elevato di recidiva, come t(6;9)(p23.3;q34.1) o mutazioni in ASXL1 e U2AF1, o ancora la presenza di FLT3-IDM, indicano una prognosi meno favorevole. Fattori prognostici negativi sono rappresentati da una conta di globuli bianchi maggiore di 100.000 alla diagnosi, dalla presenza di LMA secondaria, e dalla presenza di cellule leucemiche nel sistema nervoso centrale.

Le tecniche recenti, tra cui PCR e citometria a flusso, possono rilevare la presenza di una malattia residua minima nei pazienti con remissione completa. Livelli persistentemente elevati di RUNX1-RUNX1T1, nonostante la terapia di induzione, nei pazienti con LMA t(8;21) sono associati a una maggiore incidenza di ricaduta (Vakiti *et al.*, 2024).

1.3. Opzioni terapeutiche nella Leucemia Mieloide Acuta

L'obiettivo del trattamento della LMA è l'eradicazione della malattia. Questo risultato si ottiene idealmente inducendo una remissione completa (CR) con terapia iniziale, seguito da terapie di consolidamento e/o mantenimento per consolidare la remissione e massimizzare la durata della risposta (H. Döhner *et al.*, 2022).

Per i pazienti con LMA de novo, la chemioterapia intensiva (IC) è stata la cura standard per decenni. Il regime 7+3 comunemente usato, riportato nella storia dei trattamenti per LMA per la prima volta nel 1973, consiste in un'infusione continua di citarabina per 7 giorni in combinazione con una dose giornaliera di antraciclina per i primi 3 giorni (Yates et al., 1973). Ancora oggi, il regime di induzione iniziale 7+3 è utilizzato nelle terapie di prima linea. Sebbene ci siano state implementazioni terapeutiche, in particolare lo sviluppo di terapie "targeted" dirette verso specifici bersagli, come l'impiego di gemtuzumab ozogamicina (nome commerciale Mylotarg), un coniugato anticorpo-farmaco (ADC) che agisce veicolando un agente citotossico sulle cellule LMA CD33-positive o gli inibitori di FLT3 nella LMA FLT3-mutata, le antracicline e la citarabina rimangono il cardine della terapia di induzione nei pazienti più giovani (McMahon, 2025).

L'inibitore di BCL-2 Venetoclax, somministrato in combinazione con un agente ipometilante (HMA), ha rinnovato il trattamento della LMA di nuova diagnosi in pazienti più anziani o con tossicità che non permette l'impiego di IC (DiNardo et al., 2020).

Le opzioni alternative sono regimi che includono Fludarabina e Idarubicina (FLAG-IDA) e Mitoxantrone (H. Döhner et al., 2022). Studi recenti hanno dimostrato alti tassi di risposta quando Venetoclax è combinato con i regimi di induzione intensiva FLAG-IDA e CLIA (Cladribina, Idarubicina e Citarabina) (DiNardo et al., 2022). Dagli studi emerge come FLAG-IDA combinato con Venetoclax in pazienti adulti con LMA di nuova diagnosi induca un tasso di remissione completa (CR) dell'89%, con il 93% di questi risultati negativi per MRD in citometria a flusso multiparametro (DiNardo et al., 2022).

L'inibitore della tirosin-chinasi Midostaurina è stato inserito nella terapia di prima linea nei pazienti con LMA FLT3-mutata dopo dimostrazione di un miglioramento della sopravvivenza globale (OS) a 4 anni dal 44 al 51% quando utilizzato nei regimi di induzione o consolidamento in pazienti adulti (Stone et al., 2012); (Stone et al., 2017).

Anche la combinazione di Ivosidenib, un inibitore dell'isocitrato deidrogenasi mutante 1 (IDH1), e Azacitidina ha mostrato un'attività clinica positiva in uno studio di fase 1b che ha coinvolto pazienti con leucemia mieloide acuta con mutazione di IDH1. Ivosidenib e Azacitidina hanno mostrato un beneficio clinico significativo rispetto al placebo e all'Azacitidina in questa popolazione difficile da trattare (Montesinos et al., 2022).

La terapia di mantenimento viene somministrata in pazienti che hanno raggiunto la remissione dopo la chemioterapia intensiva. La FDA definisce la terapia di mantenimento per la LMA come un ciclo di trattamento prolungato ma limitato nel tempo, che di solito è meno tossico, somministrato dopo il raggiungimento della CR con l'obiettivo di ridurre il

rischio di ricaduta (H. Döhner et al., 2022). Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche (allo-HSCT) è il principale trattamento di consolidamento della remissione nei soggetti affetti da LMA, in quanto svolge un ruolo importante nel ridurre le ricadute e migliorare la sopravvivenza a lungo termine. Tuttavia, i rischi associati all'allo-HSCT rimangono elevati, comprendendo il fallimento della ricostituzione ematopoietica, la ricostituzione immunitaria ritardata, la Graft versus Host Disease e la ricaduta post-trapianto (Chen et al., 2023).

La ricaduta è ancora uno scenario comune nel trattamento della leucemia mieloide acuta (LMA) e si verifica nel 40-50% dei pazienti più giovani e nella grande maggioranza degli anziani. La prognosi nei pazienti con LMA recidivata è generalmente negativa, sebbene dipenda dalla tempistica della ricaduta e dalla possibilità di eseguire un allo-TCSE. Al momento della ricaduta, si esegue un nuovo screening mutazionale e un'analisi citogenetica in tutti i pazienti con LMA poiché l'evoluzione clonale della malattia è frequente. Nei pazienti non precedentemente trapiantati, si esegue TCSE dopo la terapia di salvataggio. Nei pazienti che sviluppano una recidiva dopo il TCSE, la terapia intensiva può essere presa in considerazione con successiva terapia cellulare come l'infusione di linfociti del donatore (DLI) o un secondo allo-TCSE. Tuttavia, meno del 20% di questi pazienti è vivo dopo 5 anni. Per quei pazienti che non sono in condizioni di ricevere una terapia intensiva, l'obiettivo terapeutico è prolungare la sopravvivenza con una qualità di vita accettabile. Gli agenti ipometilizzanti (HMA), AraC a basso dosaggio (LDAC) o terapia citoriduttiva con Idrossiurea sono valide opzioni. Per quei pazienti che non sono stati trattati con Venetoclax in prima linea, la terapia combinata di Venetoclax con agenti demetilanti presenta una risposta incoraggiante. È importante sottolineare che, per i pazienti con LMA isocitrato deidrogenasi (IDH) 1/2-mutata, Ivosidenib, un inibitore IDH1, ed Enasidenib, un inibitore IDH2, rappresentano opzioni ben tollerate nel contesto di malattia refrattaria o recidivante, anche in pazienti anziani e fortemente pre-trattati, con tassi di risposta del 30-40%.

Per i pazienti con mutazioni della Fms-like tirosin chinasi 3 (FLT3), il trattamento con l'inibitore selettivo del FLT3 Gilteritinib è tollerato bene e porta a un risultato migliore rispetto alla terapia standard. Al fine di migliorare l'esito nella recidiva della LMA, sarà importante utilizzare terapie combinate. Lo sviluppo di terapie con anticorpi bispecifici o con cellule T modificate mediante inserzione di recettori chimerici (CAR-T) è ancora in fase di sviluppo iniziale (Thol e Ganser, 2020).

1.4. Riprogrammare l'immunità: il ruolo della terapia cellulare nelle risposte immunitarie

La leucemia mieloide acuta (LMA) è una malattia neoplastica altamente aggressiva. I farmaci chemioterapici tradizionali non solo hanno gravi effetti collaterali, ma sono comunque gravati da una possibilità di recidiva e da resistenza farmacologica. Tra le strategie terapeutiche emergenti, l'immunoterapia, incluso l'impiego di anticorpi monoclonali, inibitori del checkpoint immunitario e terapie cellulari ha mostrato un grande potenziale nel campo del trattamento della LMA (Wang et al., 2025).

1.4.1. Immunologia della LMA

L'immunità è la capacità dell'organismo di riconoscere ed eliminare agenti estranei al *self*, ovvero patogeni e cellule tumorali (in quanto mutate). Si distingue tra immunità innata e immunità acquisita.

L'**immunità innata** è presente fin dalla nascita e rappresenta il fondamento del sistema immunitario. È la prima linea difensiva contro le infezioni ed altri agenti *non-self*, ma è aspecifica in quanto formata da cellule effettrici non in grado di esercitare risposte mirate ad uno specifico antigene. Appartengono all'immunità innata i linfociti NK (Natural killer), i linfociti attivati da citochine (LAK o CIK), i mastociti, gli eosinofili, i basofili, i macrofagi, i neutrofili e le cellule dendritiche.

L'**immunità acquisita**, o adattativa o specifica, è costituita da cellule effettrici in grado di riconoscere un bersaglio antigenico mediante specifici recettori (*T-cell receptor* per i linfociti T e *B-cell receptor* per i linfociti B). L'immunità specifica possiede due caratteristiche fondamentali: la specificità, come già detto, e la memoria: è, cioè, in grado di riattivarsi quando “riconosce” antigeni con cui era già stata in contatto.

La risposta immunitaria adattativa inizia negli organi linfoidi secondari, dove le cellule presentanti l'antigene (APC), in particolare le cellule dendritiche (DC), processano e presentano gli antigeni non self sulla superficie cellulare, legati al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). I linfociti T immaturi, che non hanno mai incontrato l'antigene, viaggiano negli organi linfoidi in attesa di essere attivati. Il riconoscimento e il legame dell'antigene da parte dei linfociti T, avviene tramite il *T cell receptor* (TCR) e la trasduzione del segnale (che oltre al TCR, coinvolge anche la proteina transmembrana CD3 e i co-recettori) ne induce la proliferazione e il differenziamento in cellule effettrici, in grado così di migrare nei tessuti infiammati per svolgere la propria funzione immunitaria. Il

riconoscimento dell'antigene evoca una serie di cambiamenti nelle cellule linfocitarie che portano al differenziamento non solo in cellule effettrici, in grado di eliminare e neutralizzare potenziali agenti dannosi, ma anche in altri sottogruppi di cellule che conferiscono all'organismo la capacità di sviluppare un meccanismo di risposta più rapida e specifica a seguito di un incontro secondario con l'antigene: tale meccanismo prende il nome di "memoria immunologica" (Sallusto et al., 1999); (Sallusto et al., 2000). L'attivazione dei linfociti T, solitamente, porta anche alla generazione di cellule della memoria circolanti, specifiche per un determinato antigene, che possono persistere nell'organismo per anni, o addirittura per tutta la vita; queste cellule della memoria si sviluppano a partire dall'espansione e il differenziamento di cloni di linfociti antigene-specifici attivati. La caratteristica della memoria è quella di conferire un'immediata protezione nei tessuti periferici e contemporaneamente d'innescare una risposta antigenica negli organi linfoidi secondari. Le cellule della memoria si dividono in:

- T "effector memory" (T EM), in grado di migrare nei tessuti periferici infiammati, con una funzione effettrice immediata o di helper; all'interno di questa classe abbiamo sia i linfociti T CD8+, sia i linfociti T CD4+, definiti rispettivamente linfociti T citotossici (CTL) e linfociti T Helper 1 e 2 (TH1 e TH2) (Hamann et al., 1997); (Sallusto et al., 2004). Entrambe le cellule CD8+ e CD4+ secernono interferon γ (INF γ), IL-4 e IL-5; le T CD8+ generalmente non secernono IL2 ma possono produrre TNF α , mentre le T EM CD4+ producono IL2.
- T "central memory" (T CM), che mediano la memoria T-cellulare a lungo termine, si trovano negli organi linfoidi secondari, hanno una funzione effettrice minima o nulla, ma sono in grado di andare incontro a cicli di rapida divisione cellulare e di differenziare in effettrici ad un secondo incontro con l'antigene. Proprio per la capacità di self-renewal e di generare cellule specifiche, le T CM possono essere considerate una sorta di "cellule staminali" della risposta T cellulare antigene-specifica (Sallusto et al., 2004). La risposta più efficace nei confronti del tumore è mediata da linfociti T effettori e della memoria, sia di tipo CD8+ sia CD4+.

Nella fase iniziale dello sviluppo tumorale, il sistema immunitario riesce a rimuovere le cellule tumorali e permette il risanamento del tessuto colpito (Pulendran et al., 1997); (Kim e Cho, 2022).

Tuttavia, le cellule tumorali crescono e proliferano spontaneamente più velocemente di quanto il sistema immunitario possa gestire, attraverso strategie che aggirano il sistema

immunitario stesso e prevengono gli attacchi delle cellule immunitarie. Per fare ciò, le cellule tumorali iniziano a costruire un microambiente tumorale a partire dal momento dell'insorgenza del cancro.

Affinché la risposta immunitaria antitumorale elimini in maniera efficace le cellule tumorali, è necessario che si verifichino una serie di passaggi, che sono parte del “ciclo immuno-oncologico”:

1. I neoantigeni prodotti durante la formazione del tumore vengono rilasciati dalle cellule tumorali morte e vengono acquisiti dalle cellule dendritiche (DC) le quali si spostano al linfonodo drenante (DLN) più vicino.
2. Le DC presentano l'antigene acquisito alle cellule T attraverso le principali molecole di istocompatibilità MHC-I e MHC-II.
3. Le cellule T effettrici vengono attivate riconoscendo questo antigene (S. A. Patel e Minn, 2018).
4. Le cellule T specifiche del cancro che riconoscono l'antigene nel linfonodo drenante vicino esprimono le molecole di adesione cellulare e i recettori delle chemochine necessari per la migrazione e l'infiltrazione nel tumore, successivamente escono dal DLN e si mobilitano attraverso il sangue verso il tessuto tumorale.
5. Le cellule T si infiltrano quindi nel tumore, riconoscono e legano il complesso MHC-antigene presentato dalle cellule tumorali attraverso il recettore delle cellule T (TCR).
6. Infine, le cellule tumorali vengono lisate. Le cellule T CD8⁺ eliminano le cellule tumorali attraverso meccanismi di esocitosi di granuli mediati da perforina e granzima, mentre le cellule CD4 agiscono mediante interazione tra ligandi-recettori di apoptosi: questi ultimi meccanismi sono più lenti rispetto alla lisi mediata da cellule CD8⁺.
7. Quando le cellule tumorali sono lisate, i neoantigeni vengono rilasciati; viene quindi attivata la reazione immunitaria che permette di far ricominciare il ciclo dall'inizio e di amplificarlo rispetto alla versione precedente (Mozz et al., 2013). Nei pazienti oncologici, almeno uno di questi passaggi è difettoso e il ciclo immuno-oncologico non funziona correttamente (Kim e Cho, 2022) (**Figura 7**).

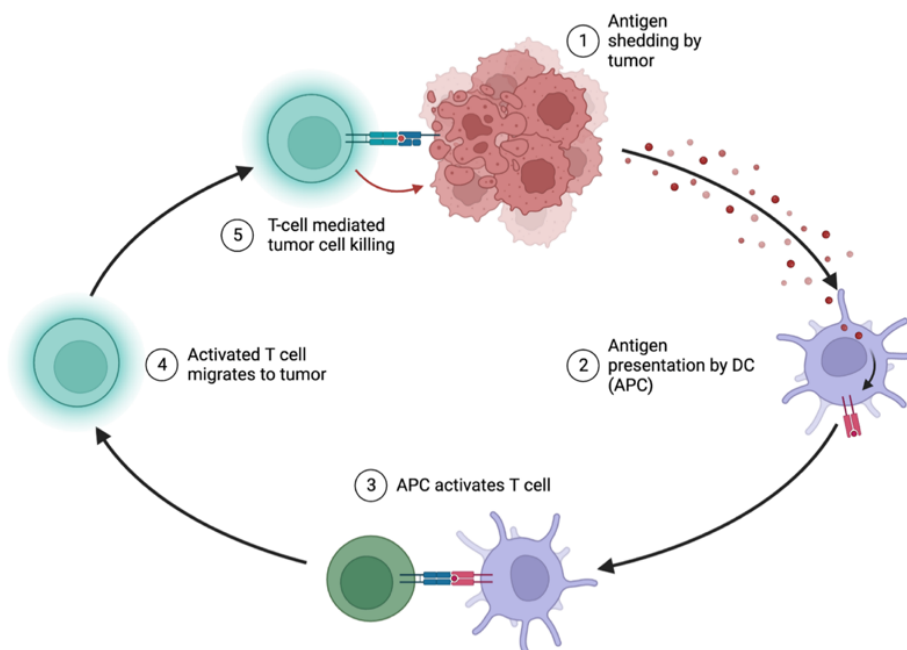


Figura 7: La presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche (DC) porta all'attivazione delle cellule T e alla distruzione delle cellule tumorali.

1.4.2. Evasione immunitaria

Per evasione immunitaria si intende la capacità delle cellule leucemiche di sottrarsi al controllo e all'eliminazione da parte del sistema immunitario attraverso diversi meccanismi. Questo consente alle cellule di proliferare in modo incontrollato nell'organismo, favorendo la progressione della malattia e le possibili ricadute. Tra i principali fenomeni coinvolti vi sono l'alterata espressione di molecole di superficie, la produzione e modulazione di citochine, la secrezione di fattori immunosoppressivi e l'inibizione dei processi di apoptosi. I meccanismi comprendono:

- a) **Mutazioni, delezioni o espressione negativa delle molecole di superficie cellulare:** le cellule leucemiche possono alterare l'espressione delle molecole di superficie attraverso meccanismi come mutazioni o cambiamenti epigenetici, evitando così il riconoscimento e l'attacco da parte del sistema immunitario.
- b) **Presentazione alterata dell'antigene.** Le molecole MHC-I e MHC-II presentano continuamente peptidi antigenici alle cellule T $CD8^+$ e $CD4^+$. Tuttavia, il numero di molecole MHC è spesso ridotto o assente nelle cellule tumorali; tale riduzione è considerata uno degli ostacoli più rilevanti nel riconoscimento delle cellule T e nell'eliminazione delle cellule tumorali (Khong e Restifo, 2002).

- c) **Produzione e mediazione di citochine:** le cellule di LMA possono produrre e rilasciare alcune citochine immunosoppressive, come IL-10 e TGF- β , per sopprimere la funzione delle cellule immunitarie, evitando così l'attacco da parte del sistema immunitario.
- d) **Inibizione dell'apoptosi cellulare:** le cellule leucemiche possono attivare alcune vie anti-apoptotiche, come i membri della famiglia Bcl-2, per resistere all'apoptosi cellulare indotta dalle cellule immunitarie (Mu et al., 2023).
- e) **Secrezione di sostanze immunosoppressive:** le cellule leucemiche possono secernere alcune sostanze immunosoppressive, come IDO e PDL-1, per sopprimere la funzione delle cellule immunitarie, evitando così l'attacco da parte del sistema immunitario (Paczulla et al., 2019).
- f) **Upregolazione di ligandi inibitori:** i ligandi/recettori regolatori negativi modulano le risposte delle cellule T, limitando così il danno mediato dalle cellule T ai tessuti-self. I recettori multi-regolatori sono meccanismi importanti nelle cellule immunitarie per consentire loro di eludere il sistema immunitario. I recettori regolatori includono la proteina di morte cellulare programmata-1 (PD-1), l'immunoglobulina a cellule T e il dominio della mucina-3 (TIM-3), l'immunorecettore delle cellule T con domini Ig e ITIM (TIGIT) e l'attivazione dei linfociti 3 (LAG3), nonché i loro ligandi sulle cellule di LMA, come il ligando della morte programmato 1 (PD-L1), PLC2, galectina-9 e i recettori poliovirus. Le cellule di LMA possono aumentare l'espressione di ligandi inibitori sulla loro superficie, attivando segnali intracellulari che bloccano le vie di attivazione del sistema immunitario anche dopo il riconoscimento dell'antigene e la co-stimolazione.

PD-1/PD-L1: al fine di deviare il controllo immunitario, le cellule AML esprimono in quantità eccessive i ligandi del checkpoint immunitario (IC), che inibiscono la funzione delle cellule T e NK. Tra i ligandi AML degli IC, PD-L1 si lega al recettore PD-1 sulle cellule T, portando alla riduzione delle cellule T e alla loro differenziazione in cellule T regolatorie (Tregs) (Dong et al., 2020) (**Figura 8**). Questo processo può contribuire all'ambiente immunosoppressivo, consentendo una crescita e una sopravvivenza continue delle cellule tumorali. Pertanto, il targeting di tale interazione può essere considerato per ideare una strategia promettente per superare l'evasione immunitaria (Mu et al., 2023).

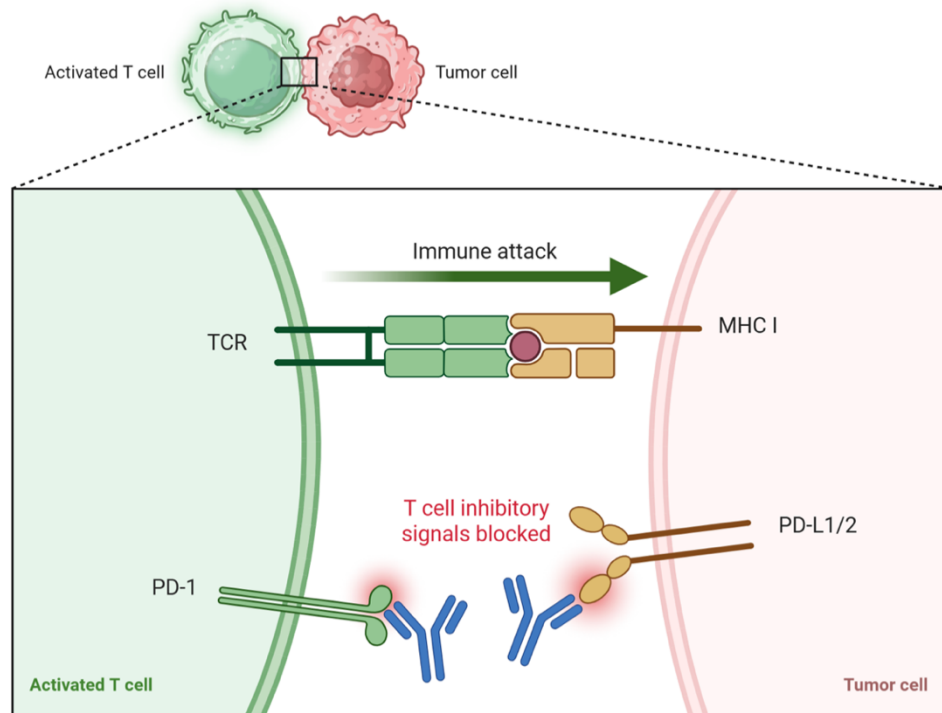


Figura 8: Meccanismo con cui un anticorpo anti-PD-1 interrompe l'interazione inibitoria tra PD-1 sulle cellule T attivate e PD-L1 espresso dalle cellule tumorali.

TIM3/GAL-9: TIM-3, un recettore co-inibitore, porta all'attivazione dei pathway a valle, compresi PI3K/AKT/mTOR, β -catenina e NF- κ B, nei blasti di LMA che esprimono galectin-9 (GAL-9), meccanismi fondamentali per la sopravvivenza cellulare e la progressione della malattia. In particolare, l'asse TIM-3/GAL-9 promuove la produzione di IFN- γ ad opera delle NK, fondamentale per l'espressione dell'indoleammina 2,3-diossigenasi 1 (IDO1) nei blasti, con disfunzione finale delle cellule NK (Kamal et al., 2021).

TIGIT-CD155/CD112: Tra i nuovi bersagli per l'immunoterapia del cancro, il recettore TIGIT è altamente espresso su cellule T attivate, cellule NK e Tregs (Chauvin e Zarour, 2020). In particolare, TIGIT mostra un'affinità di legame molto più elevata per CD155 e CD112 rispetto a CD226, e sia CD155 che CD112 sono espressi su blasti di AML. Allo stesso modo, TIGIT è stato anche implicato nell'evasione immunitaria delle cellule AML.

Altri recettori inibitori, come LAG3, sono coinvolti nel malfunzionamento delle cellule T. Sebbene i Treg che esprimono LAG3 producano citochine immunosoppressive (IL-10 e TNF- α), il meccanismo con cui LAG3 regola l'anti-immunità non è stato chiarito. Una maggiore frequenza di cellule T LAG3 positiva è stata trovata nei pazienti con LMA

con un'associata prognosi sfavorevole. L'espressione di CTLA-4 sia sulle cellule T attivate che sulle cellule T regolatorie ha permesso alle cellule T di legarsi a CD80 e CD86 su cellule APC. L'affinità di CTLA-4 per le molecole B7 gli consente di sostituire CD28 in una sinapsi immunitaria e quindi inibire la co-stimolazione delle cellule T e PPC (Chao et al., 2019).

1.4.3. Microambiente immunosoppressivo

Il tessuto tumorale, oltre alle cellule tumorali, include anche altri tipi di cellule come cellule T, cellule NK, macrofagi, fibroblasti, cellule dendritiche e adipociti. Il microambiente tumorale è caratterizzato da cellule tumorali che hanno meccanismi metabolici distinti in base alla loro eterogeneità, in relazione alla proliferazione e alla metastasi. Di conseguenza, affinché vi sia un miglioramento nella immunoterapia tumorale è necessario che vi sia un correlato miglioramento nel microambiente tumorale stesso (Kim & Cho, 2022).

Il microambiente immunosoppressivo è considerata come una condizione patologica, caratterizzata dalla presenza di vari meccanismi di evasione immunitaria impiegati dalle cellule tumorali e da altri fattori all'interno del microambiente tumorale (**Figura 9**). Questi meccanismi possono includere la down-regulation delle molecole di presentazione dell'antigene, la sovraespressione di molecole inibitorie come PD-L1 e Gal-9 e il rilascio di vari fattori immunosoppressivi come le specie reattive dell'ossigeno, l'indoleammina 2,3-diossigenasi e le cellule soppressori derivate dal mieloide.

Questi fattori possono inibire la funzione citotossica delle cellule T e NK, indurre l'esaurimento delle cellule T e l'apoptosi, promuovere la generazione di cellule T regolatorie e passare i macrofagi da un fenotipo M1 a M2 soppressivo. Il microambiente immunosoppressivo è una sfida importante per un'efficace immunoterapia del cancro e rappresenta una complessa interazione tra le cellule tumorali e il sistema immunitario (Mu et al., 2023).

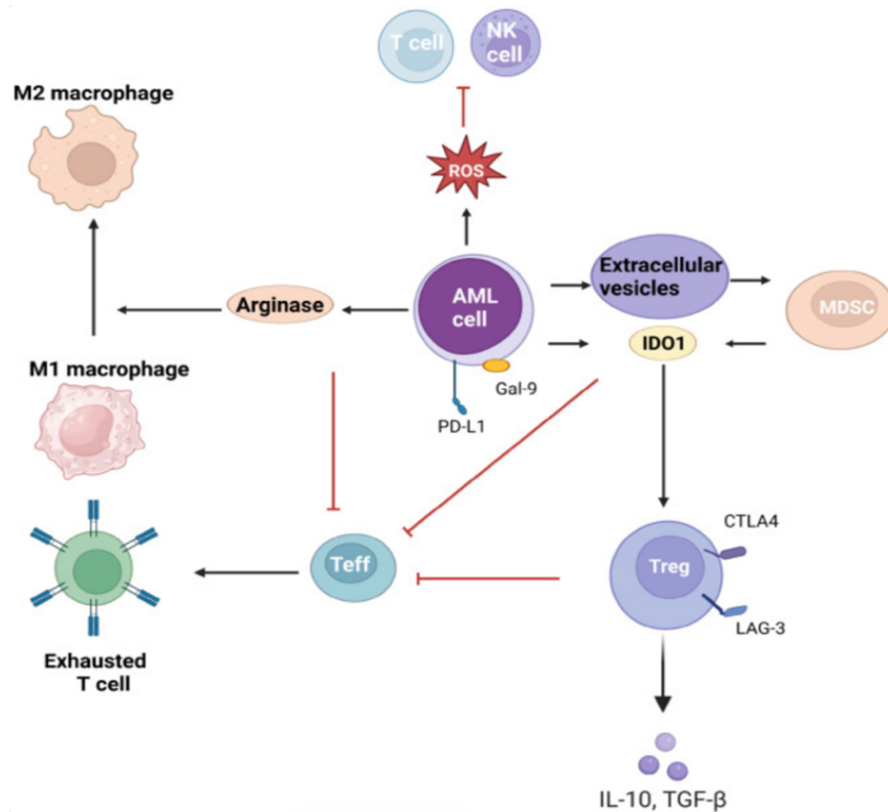


Figura 9: Microambiente immunitario patologico della leucemia mieloide acuta.

1.4.4. Immunoterapia e Terapia Cellulare

L'immunoterapia è un potenziale trattamento per la leucemia acuta e comprende l'impiego di anticorpi monoclonali diretti verso antigeni tumorali, i vaccini terapeutici, l'infusione di linfociti del donatore dopo il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-TCSE) e le terapie con cellule T o NK naturali o ingegnerizzate.

Tra gli agenti più promettenti per il trattamento della LMA vi sono gli anticorpi monoclonali diretti verso specifici antigeni, quali CD33, CD123, CD32, CD47, CD56 e LILRB espressi sulla superficie cellulare (Schürch, 2018).

Una delle tecniche di immunoterapia attiva utilizzate per il trattamento della LMA è la vaccinazione, ovvero l'induzione di una risposta anti-leucemica del sistema immunitario del paziente mediante stimolazione in vivo con cellule presentanti antigeni tumorali, come cellule dendritiche pulstate con peptidi di proteine leucemiche (Wilms tumor 1, WT1; proteinasi 3) o cellule tumorali intere (Coppage et al., 2007). Tuttavia, le risposte indotte con la vaccinazione, che hanno avuto successo nel controllare le leucemie mieloidi croniche, possono essere transitorie nelle LMA, e non portare ad una remissione duratura.

L'allo-TcSE, che è la terapia di consolidamento della remissione d'elezione nei soggetti "fit", quindi giovani, si associa ad un'azione antileucemica anche grazie all'effetto immunologico definito come "Graft-versus-Leukemia" (GVL). Per aumentare il potenziale anti-leucemico del trapianto è possibile somministrare dosaggi definiti di cellule T non manipolate del donatore, procedura chiamata *donor lymphocyte infusion* (DLI). Nelle LMA dell'adulto sono stati osservati potenziali benefici, in termini di miglioramento della sopravvivenza libera da malattia. Tuttavia, tale trattamento comporta un rischio notevole di sviluppo di malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), dovuta ad una risposta citotossica nei confronti degli antigeni del sistema di istocompatibilità (HLA) del paziente, presenti anche su cellule sane, con elevato rischio di comorbidità e mortalità (Mu et al., 2023). La GVHD è dovuta a meccanismi immunologici molto vicini alla GVL, seppure non completamente sovrapponibili. Per questo motivo, gli sforzi si sono diretti ad ottenere un effetto GVL disgiunto dallo sviluppo di GVHD, attraverso la somministrazione di cellule del donatore parzialmente manipolate per escludere sottopopolazioni associate allo sviluppo di GVHD o per incrementare la loro attività anti-tumorale. L'espansione di linfociti T specifici per antigeni espressamente leucemici è stata considerata una strategia utile per ridurre il rischio di GVHD (Smits et al., 2009) mantenendo un effetto GVL. Inoltre, le cellule leucemiche lisate in vivo durante la risposta immunoterapica possono essere fagocitate dalle cellule APC, e peptidi derivati da antigeni leucemici normalmente non visibili dal sistema immunitario, o non derivati dall'antigene verso il quale è stata stimolata la risposta, possono essere presentati sulla superficie cellulare; in questo modo, si amplifica la risposta antileucemica (epitope/antigen spreading) e si limita il fenomeno degli *escape mutants*, ovvero la pressione selettiva sui blasti leucemici che favorisce la crescita di quelli negativi per l'antigene utilizzato nella terapia (Smits et al., 2009). Questo fenomeno può contribuire al controllo leucemico in vivo (Comoli et al., 2017).

Una delle tecniche di immunoterapia più innovative riguarda l'ingegnerizzazione di cellule T e NK mediante inserimento di recettori specifici per antigeni leucemici, di derivazione naturale (T cell receptor, TCR) o sintetica (chimeric antigen receptor, CAR). Queste strategie, già note a partire dagli anni '90, hanno avuto uno sviluppo importante solo di recente, grazie ad importanti miglioramenti tecnologici che hanno portato ad un significativo miglioramento dei risultati clinici (Sadelain et al., 2017).

Le cellule CAR-T esprimono un recettore chimerico (CAR) che comprende tre domini funzionali:

1. Un dominio extracellulare, tipicamente un frammento variabile a catena singola, scFv, derivato da un anticorpo, per il riconoscimento dell'antigene;
2. Un dominio transmembrana per l'ancoraggio del dominio extracellulare alla membrana;
3. Un dominio di segnalazione intracellulare che include la catena CD3 ζ per l'attivazione primaria delle cellule T e domini co-stimolatori (ad esempio, CD28 o 4-1BB) per favorire l'attivazione cellulare, la secrezione di citochine pro-infiammatorie e la proliferazione cellulare.

Il CAR deriva da una porzione di un'immunoglobulina; come l'anticorpo da cui deriva, si lega al suo target direttamente, e per il segnale d'attivazione cellulare, non richiede che l'antigene sia complessato con una specifica molecola MHC; questa caratteristica funzionale dei CAR è molto importante, in quanto, a differenza di CTL naturali, o linfociti trasdotti con TCR di derivazione naturale, l'azione delle cellule CAR-T non è HLA-ristretta (Porter D.L. et al., 2011; Grupp S.A. et al., 2013, Heiblig M. et al., 2015; Sadelain M. et al., 2013).

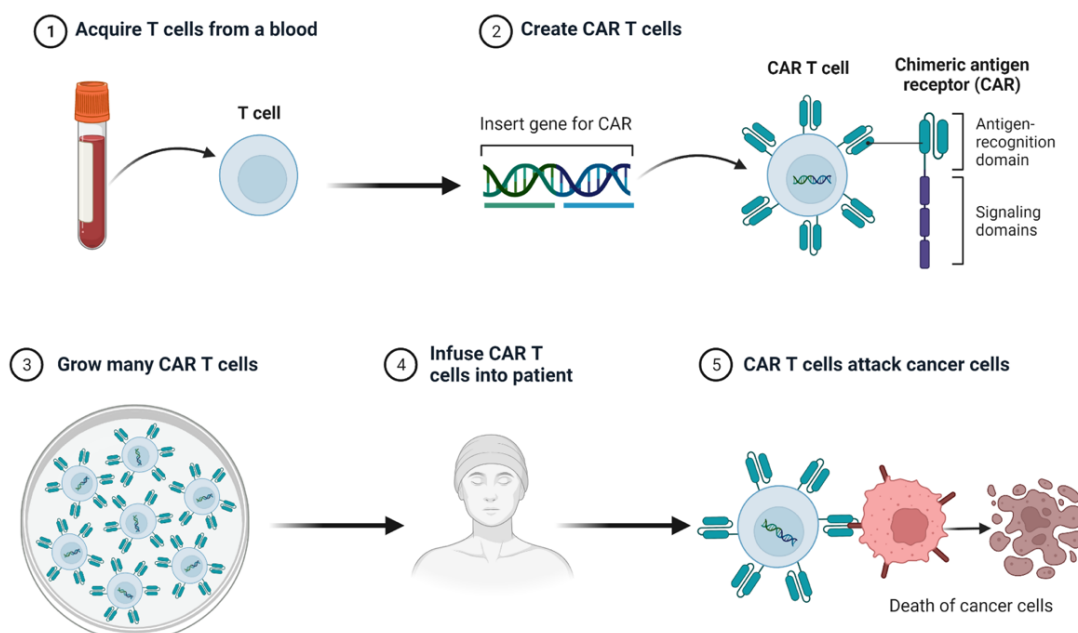


Figura 10: Panoramica schematica del flusso di lavoro della terapia cellulare CAR-T e dell'uccisione mirata delle cellule AML.

Quando le cellule CAR-T sono infuse in un paziente, cercano e si legano agli antigeni per cui hanno specificità antigenica, innescando una cascata di risposte immunitarie (**Figura 10**).

La terapia genica con cellule CAR-T ha ottenuto uno sviluppo applicativo esponenziale negli ultimi anni, anche grazie ai rilevanti risultati ottenuti nell'ambito delle leucemie e dei linfomi B cellulari (Maude et al., 2018), e sono stati approvati diversi prodotti cellulari basati sulla tecnologia CAR nel trattamento della leucemia linfatica cronica, e mieloma multiplo (Sengsayadeth et al., 2022).

Malgrado i risultati incoraggianti ottenuti nel trattamento delle LLA B-cellulari, l'impiego clinico della terapia con cellule CAR-T in pazienti con LMA è ancora una sfida aperta. Infatti, non sono ancora stati identificati antigeni di superficie LMA-specifici, espressi selettivamente nelle cellule tumorali mieloidi e non nei tessuti sani (Koedam et al., 2022). Diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato tramite degli studi preclinici nell'animale come cellule CAR-T anti-CD33, anti-CD123, anti-CLL1 o anti-FLT3 abbiano la capacità di eradicare la LMA, al prezzo, tuttavia, di una tossicità a lungo termine, che riguarda non solo lo sviluppo di sindrome da rilascio di citochine (CRS) e tossicità neurologiche (Lee et al., 2014), ma anche una importante tossicità midollare (Kenderian et al., 2015); (Pizzitola et al., 2014); (Tashiro et al., 2017); (Jetani et al., 2018); (Wu et al., 2025).

Le cellule CAR-NK uniscono la capacità delle cellule T di riconoscere l'antigene specifico con la loro naturale inclinazione a uccidere cellule tumorali. Le cellule NK mostrano somiglianze funzionali con le cellule T CD8+.

L'attività delle cellule NK è regolata da un equilibrio tra segnali attivatori e segnali inibitori, generati da diversi recettori naturali (come NKG2D). Grazie a questi recettori, le cellule NK possono continuare a uccidere le cellule tumorali anche senza l'intervento del CAR.

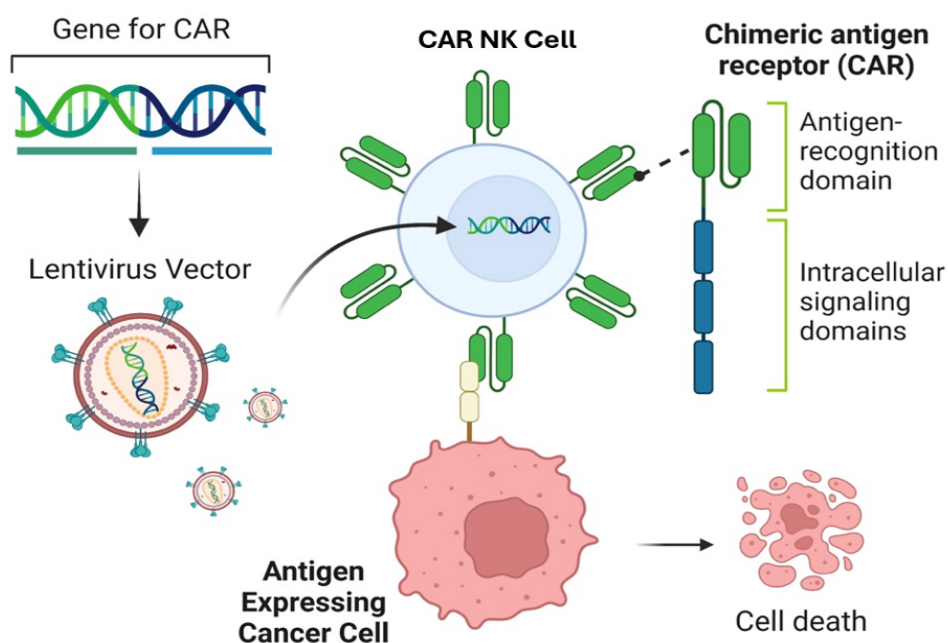


Figura 11: Rappresentazione schematica della terapia cellulare CAR-NK nella LMA.

Modificare le cellule NK per far esprimere un CAR può renderle più efficaci nell'eliminare tumori composti da cellule diverse tra loro e ridurre il rischio di recidiva. Di conseguenza, la terapia con cellule CAR-NK rappresenta un'opportunità per superare i limiti associati alle terapie con cellule CAR-T (**Figura 11**).

2. SCOPO DEL LAVORO

La leucemia mieloide acuta (LMA) è un tumore ematologico che si sviluppa in seguito alla proliferazione incontrollata di blasti di *lineage* mieloide. Negli ultimi anni, la disponibilità di nuove terapie farmacologiche e biologiche ha migliorato i risultati clinici. Malgrado le innovazioni diagnostiche e terapeutiche, l'aspettativa di vita per i pazienti affetti da LMA non è ottimale: nei giovani adulti si osserva una sopravvivenza libera da malattia intorno al 40%, mentre nei bambini la sopravvivenza in remissione si attesta intorno al 55% (Estey, 2018); (Pession et al., 2013).

Ad oggi, il trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE) rimane il miglior approccio per il trattamento di consolidamento della remissione. Tuttavia, alcuni pazienti sviluppano una recidiva di malattia dopo il trapianto. In questo caso, le probabilità di sopravvivenza a lungo termine è di circa il 10% negli adulti e del 20-25% nei bambini (Bertaina et al., 2018). Tra le strategie adottate per ridurre il rischio di recidiva post-TCSE, quando possibile si procede ad un'intensificazione della terapia pre-trapianto, che è, però, gravata da un'alta tossicità, e non sempre ha successo nel migliorare lo stato di remissione. In alternativa, è possibile monitorare precocemente la comparsa di recidiva post-trapianto mediante studio della MRD. È, tuttavia, fondamentale avere a disposizione terapie a bassa tossicità, da utilizzare per il controllo della MRD post allo-TCSE (Kállay et al., 2021).

Recenti evidenze hanno dimostrato il ruolo centrale della sorveglianza immunologica derivata dal donatore nell'indurre un effetto trapianto contro leucemia (graft-versus-leukemia, GVL) per il controllo di eventuali blasti leucemici sopravvissuti alla chemioterapia di condizionamento. È stato, infatti, riscontrato come nei soggetti affetti da leucemia acuta possano svilupparsi popolazioni circolanti di linfociti T citotossici (CTL) specifici per la leucemia, che correlano al controllo della malattia e a tassi di sopravvivenza più elevati (Greiner et al., 2013); (Riva et al., 2010). Questi dati suggeriscono che gli interventi immunologici, compresa la somministrazione di linfociti del donatore non manipolati (DLI) o il trasferimento di CTL specifici per gli antigeni leucemici derivati dal donatore (Montagna et al., 2025), possano contribuire a prevenire le recidive e a migliorare gli esiti del trapianto.

Tuttavia, il trattamento con DLI è gravato da tossicità, quale lo sviluppo di malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), mentre la necessità di materiale blastico leucemico crioconservato, prelevato al momento della diagnosi di malattia, necessario per la produzione di CTL anti-leucemia, limita la diffusione di questa strategia terapeutica.

Questo lavoro di tesi si prefigge di superare le limitazioni descritte, attraverso lo sviluppo di un farmaco cellulare ad attività antileucemica, la cui metodica di espansione si avvalga dell'impiego di peptidi ricombinanti derivati da proteine espresse in modo particolare dai blasti di origine mieloide (Comoli et al., 2017). La proteina NPM mutata è un potenziale bersaglio per lo sviluppo di terapie immunitarie personalizzate (Forghieri et al., 2019). Tuttavia, poiché solo una parte dei pazienti (30% degli adulti e 10% dei bambini) presenta questa mutazione, si è pensato di includere anche altri antigeni bersaglio per ampliare l'efficacia terapeutica. Tra questi vi sono WT1, PRAME e SURVIVIN, antigeni sovraespressi in molte neoplasie ematologiche.

In particolare, il lavoro sperimentale è stato focalizzato allo sviluppo di un protocollo rapido di attivazione ed espansione di un prodotto cellulare multiantigene-specifico, ottimizzandone la traslazione GMP mediante impiego di un bioreattore, e valutando l'efficacia di due diverse miscele di peptidi derivati dalla proteina NPM mutata.

3. MATERIALI E METODI

Campioni biologici

I campioni di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) utilizzati per lo studio, derivano da donatori sani, con consenso informato in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. In particolare, le PBMC sono state ottenute mediante procedura leucaferetica e successiva stratificazione su gradiente di densità.

Separazione cellulare: isolamento di cellule mononucleate (PBMC)

Il sangue periferico è stato trasferito in una provetta da 50 ml e raddoppiato con Tampone fosfato PBS Dulbecco's (Gibco). La soluzione ottenuta è stata stratificata su pari o inferiore volume di Lymphocyte separation medium (Lymphoprep) in provette sterili, le quali sono state centrifugate per 30 minuti a 800 g, a temperatura compresa tra 20° e 25°C. Una volta recuperate le cellule mononucleate (PBMC) all'interfaccia, sono stati effettuati 2 lavaggi con PBS, infine, le cellule sono state risospese in RPMI 1640 (Gibco). La concentrazione cellulare è stata infine valutata, contando un'aliquota (50µl) di cellule diluita in liquido di Turk nella camera di Bürker, osservata al microscopio a luce riflessa ad un ingrandimento di 40x. Il liquido di Turk porta alla lisi dei globuli rossi e, di conseguenza, tale diluizione viene effettuata per contare esclusivamente le cellule mononucleate. Le cellule sono state utilizzate il giorno stesso o congelate per essere utilizzate successivamente (**Figura 12**).

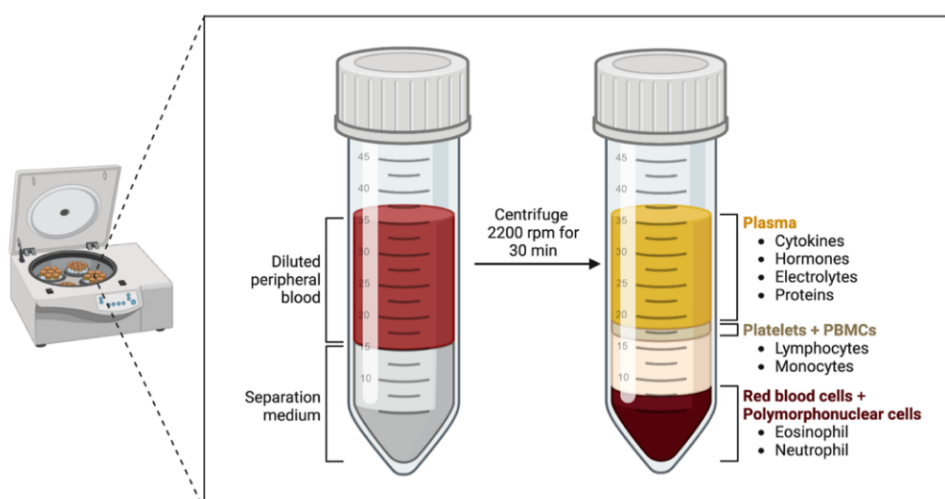


Figura 12: Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) mediante centrifugazione su gradiente di densità.

Congelamento cellulare

Le cellule mononucleate, che devono essere congelate, vengono centrifugate per 10 minuti a 300g per eliminare il sovrantante e mantenere solo il pellet. Si aggiunge 1 ml di crio-mix per ogni vial da congelare che vengono quindi trasferite in un contenitore Nalgene e messe over-night a -80°C e quindi trasferite in azoto liquido.

La miscela di congelamento è composta da fisiologica, albumina e DMSO (Dimetilsolfossido) in rapporto 6.5:2.5:1.

Valutazione della vitalità cellulare

50 μl di sospensione cellulare vengono portati a volume con soluzione Trypan blue. Il conteggio dev'essere eseguito in tempi brevi al microscopio ottico: le cellule morte si colorano in blu, quelle vive restano incolori (**Figura 13**).

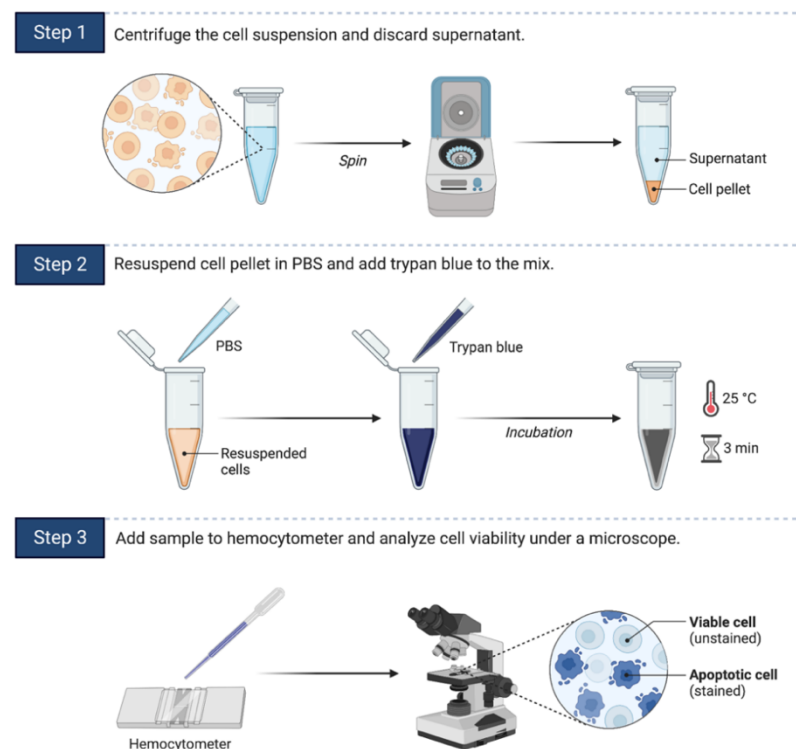


Figura 13: Il saggio si basa sull'incubazione delle cellule con il colorante Trypan Blue, che penetra nelle cellule morte o danneggiate ma non in quelle vive con membrana integra; il conteggio al microscopico consente di distinguere cellule colorate (non vitali) da cellule non colorate (vitali), permettendo di determinare la percentuale di vitalità del campione.

Peptidi

Miscele di peptidi di proteine virali sono stati utilizzati come antigeni.

In particolare:

- Miscela di peptidi 15-mer con 11 amminoacidi sovrapposti che coprono l'intera sequenza della proteina WT1 (PepTivator WT1, research grade, human, Miltenyi Biotec) (WT1);
- Miscela di peptidi 15-mer con 11 amminoacidi sovrapposti che coprono l'intera sequenza dell'antigene PRAME (PepTivator PRAME, research grade, Miltenyi Biotec) (PRAME);
- Miscela di peptidi 15-mer con 11 amminoacidi sovrapposti che coprono l'intera sequenza della proteina umana Survivin-1 (PepTivator Survivin-1, research grade, Miltenyi Biotec) (Survivin 1);
- Pool di 18 peptidi sovrapposti (9-, 11- e 18-mer) che coprono l'intera regione C-terminale della proteina NPM-1 mutata; nello specifico, 15 peptidi corti (9- e 11-mer) e 3 peptidi lunghi (18-mer) sono stati progettati per coprire le varianti A–D della regione C-terminale di NPM-1 mutata(NPM-1^{mut}) ;
- Pool di peptidi NPM-1 mutata costituito da peptidi 15-mer con 11 amminoacidi sovrapposti che coprono l'intera regione C-terminale della proteina NPM-1 mutata (PepTivator NPM-1^{mut}, research grade, Miltenyi Biotec) (NPM-1^{mut} Miltenyi).

Attivazione ed espansione in vitro di linfociti T citotossici multi-specifici per WT1, PRAME, SURVIVIN e NPM1^{mut}.

In questo lavoro, sono state allestite linee di linfociti T-citotossici (CTL), specifici per le proteine WT1, PRAME, Survivin e NPM1^{mut}, ottenute mediante coltura in vitro di PBMC di donatori sani. I PBMC sono stati piastrati in piastre da 24 well, ad una concentrazione di 2×10^6 /pozzetto in 1,5 ml di RPMI addizionato con 5% di plasma autologo in presenza di 10ng/ml dei peptidi WT1, PRAME, Survivin e NPM1^{mut}. Le linee sono state incubate a 37 ° C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ per 7 giorni.

Al giorno 7 le cellule sono state raccolte, contate in vitalità e sottoposte a ristimolazione in presenza di PBMC autologhi irradiati e pulsati con 100 ng/ml di ogni peptide e interleuchina-2 umana ricombinante (r-IL2, Novartis, Basilea, Svizzera) (20 u/ml).

Al giorno 10 e al giorno 13 alle colture è stata aggiunta IL-2 (20 u/ml). Al giorno 15 le cellule sono state raccolte, testate per specificità tramite saggio di citotossicità e saggio Elispot, ne è stato valutato l'immunofenotipo e sono state crioconservate.

Bioreattore G-Rex

I bioreattori G-Rex (Gas Permeable Rapid Expansion) sono dispositivi ampiamente utilizzati per applicazioni di terapia cellulare, grazie alla loro capacità di espandere grandi quantità di cellule T in modo efficiente, senza richiedere interventi tecnici complessi. La struttura del G-Rex è caratterizzata da una membrana in silicone permeabile ai gas, posta alla base di ciascun dispositivo, che consente uno scambio ottimale di ossigeno. Questo elemento chiave permette alle cellule T di accedere illimitatamente all'ossigeno in un ambiente statico e ideale alla crescita, eliminando la necessità di agitare o perfondere la coltura.

L'utilizzo di volumi maggiori di mezzo di coltura garantisce una disponibilità superiore di nutrienti e una diluizione efficace dei rifiuti metabolici. Questo, insieme alla disposizione costante all'ossigeno, crea un ambiente più stabile per la crescita, favorendo le interazioni cellulari. Di conseguenza, i bioreattori G-Rex offrono un ambiente ideale per la coltura e l'espansione delle cellule T, migliorando l'efficacia dei processi di terapia cellulare (*Figura 14*).

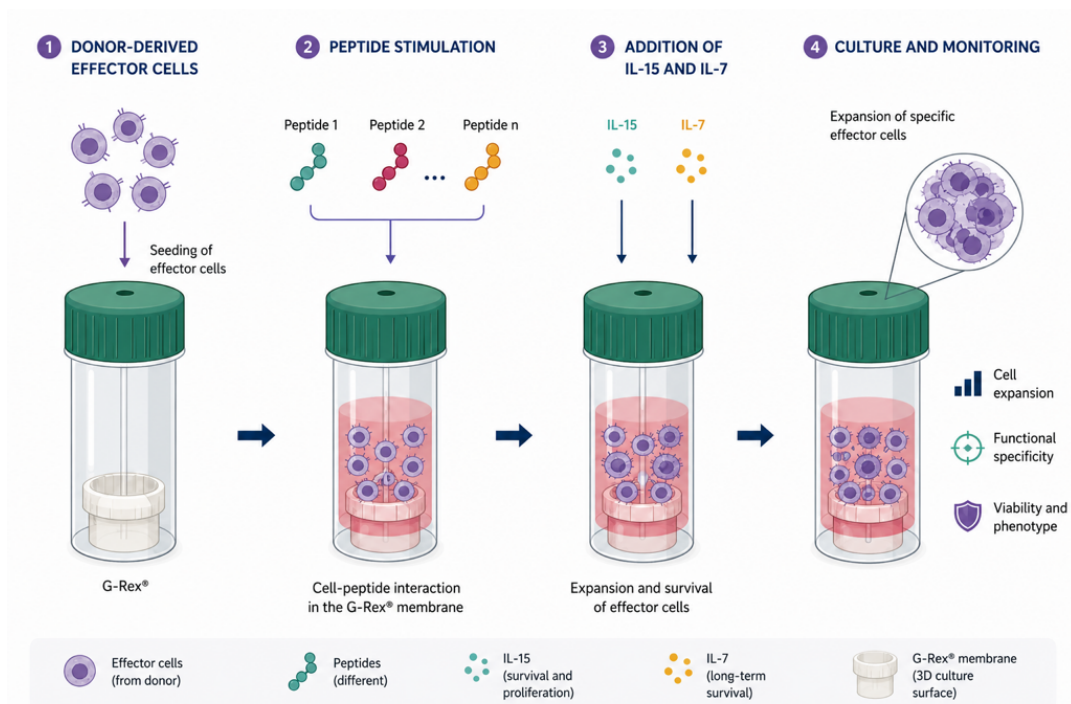


Figura 14: Struttura base del bioreattore G-Rex.

Attivazione ed espansione in vitro di linfociti T citotossici multi-specifici in bioreattore G-Rex

Con lo scopo di traslare in Good Manufacturing Practice (GMP) il protocollo di attivazione ed espansione di CTL multi-antigene specifici, è stata sviluppata una metodica per la produzione cellulare in bioreattore. Questo consente di applicare manipolazioni minime alla lavorazione in Cell Factory, ottenendo prodotti cellulari con caratteristiche sovrapponibili e numerosità aumentata.

A questo fine, è stato utilizzato un bioreattore tipo G-Rex (Wilson Wolf, Saint Paul, MN, USA). I CTL sono stati ottenuti mediante coltura in bioreattore di PBMC di donatori sani. 25×10^6 PBMC sono stati incubati in un volume di 1 ml di RPMI + 5% di plasma per 2 ore in presenza di 10 ng/ml dei peptidi WT1, PRAME, Survivin1, NPM1^{mut} e successivamente risospesi in 20 ml di terreno con 10 ng/ml di interleuchina-7 umana ricombinante (r-IL7, Novartis, Basilea, Svizzera) e 20 ng/ml di interleuchina-15 umana ricombinante (r-IL15, Miltenyi Biotec).

La sospensione di cellule è stata piastrata nel G-Rex, incubato a 37 ° C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Al giorno 2 sono stati aggiunti rispettivamente:

- 30 ml di terreno RPMI addizionato con 5% di plasma autologo, 10 ng/ml di IL-7 e 20 ng/ml di IL-15 (G-Rex B1);
- 80 ml di terreno RPMI addizionato con 5% di plasma autologo, 10 ng/ml di IL-7 e 20 ng/ml di IL-15 (G-Rex B2).

La crescita cellulare è stata monitorata attraverso l'analisi delle concentrazioni di glucosio. Il recupero cellulare è avvenuto al giorno +14.

Allestimento blasti PHA

Al fine del test di citotossicità, sono stati allestiti blasti di fitoemagglutina (PHA) a partire da PBMC degli stessi donatori. I PBMC sono stati piastrati ad una concentrazione di 1×10^6 /pozzetto in terreno (RPMI addizionato al 10% FCS e allo 0,5% di PHA) e tenuti a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ per 5-7 giorni. I blasti di PHA pulsati con peptidi il giorno precedente il test, sono stati utilizzati come target dei CTL.

Attività T-citotossica multiantigene-specifica valutata come rilascio di ^{51}Cr

Al giorno +20 (cellule T specifiche espanse in piastra) e +14 (cellule T specifiche espanse nel G-Rex) le cellule *responders* sono state testate per capacità litica verso blasti autologhi di PHA, pulsati con peptidi WT1, PRAME, Survivin e NPM1^{mut}.

Tutte le cellule target sono state marcate con ^{51}Cr per 18 ore a 37°C.

Il giorno successivo, i target sono stati lavati 3 volte in RPMI 1640 (Gibco) al 10% FCS. In piastre multiwell da 96 pozzetti sono stati inizialmente piastrati gli effettori a diverse concentrazioni, in doppietta, al fine di ottenere i rapporti effettore : target desiderati (20:1, 10:1; 5:1; 2.5:1; 1.25:1; 0.6:1), in un volume finale di 100 μL . Successivamente, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti i target alla concentrazione di 1×10^3 /pozzetto in un volume di 100 μL . Ogni target è stato piastrato anche in assenza di effettori, per valutare il rilascio spontaneo e il rilascio totale del ^{51}Cr . Le piastre sono state centrifugate per 4 minuti a 100 g ed incubate in termostato a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 , rispettivamente per 6h e 10h. Al termine del periodo d'incubazione, la radioattività liberata nel sovrinatante (25 μL) è stata valutata in un γ -counter (**Figura 15**).

La lisi spontanea delle cellule è stata valutata incubandole con il solo terreno di coltura, mentre il rilascio totale di isotopo radioattivo incorporato dalle cellule marcate è stato ottenuto lisando lo stesso numero di cellule aggiunte ai pozzetti.

La percentuale di citotossicità specifica, espressa come media delle determinazioni in doppio, è stata ricavata dalla seguente formula:

$$\% \text{ Citotossicità specifica: } \left(\frac{\text{Rilascio sperimentale} - \text{Rilascio spontaneo}}{\text{Rilascio totale} - \text{Rilascio spontaneo}} \right) \times 100$$

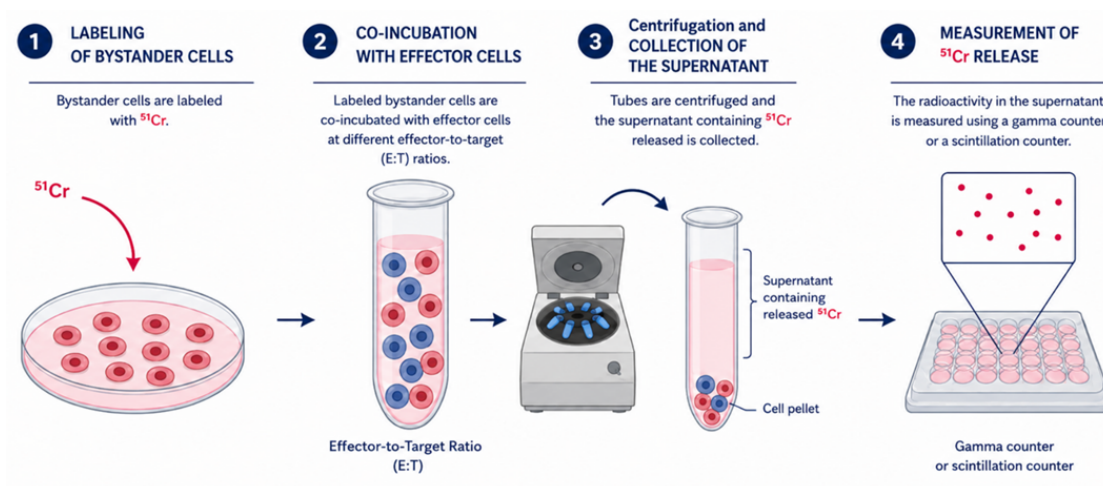


Figura 15: Analisi di citotossicità mediante test di rilascio di ^{51}Cr .

Citotossicità contro cellule di linea mieloide OCI2 e cellule OCI3

Le cellule OCI2 e OCI3 sono linee cellulari umane che derivano da leucemia mieloide acuta e sono state sviluppate dall'Ontario Cancer Institute. Le OCI2 non presentano mutazione nel gene NPM1, bensì alterazioni dei geni coinvolti nella segnalazione o trascrizione. In queste, il gene TP53 può essere mutato. Le OCI3 invece presentano mutazioni del gene NPM1 e, frequentemente, anche del gene DNMT3A. In tale linea, il gene TP53 risulta funzionale.

Citotossicità CD3 redirected

Il test di citotossicità mediata da CD3 (CD3 redirected cytotoxicity assay) è un saggio in vitro utilizzato per valutare la capacità delle cellule T di eliminare cellule bersaglio (es. cellule tumorali). Sfrutta l'anticorpo bispecifico anti-CD3 (OKT3) (Miltenyi Biotec) per forzare il legame tra il recettore CD3 dei linfociti e un antigene bersaglio, attivando la lisi cellulare. Questo cross-linking bypassa il normale riconoscimento antigenico, attivando il linfocita che rilascia granuli citotossici (perforine e granzimi) per distruggere il bersaglio. Come cellule bersaglio è stata utilizzata la linea cellulare murina P815, marcata con ^{51}Cr per 18 ore a 37°C.

Il giorno successivo, il target è stato lavato 3 volte in RPMI 1640 (Gibco) al 10% FCS. In piastre multiwell da 96 pozzetti sono stati inizialmente piastrati gli effettori a diverse concentrazioni, in doppietta, al fine di ottenere i rapporti effettore : target desiderati (10:1; 5:1; 2.5:1), in un volume finale di 100 μL . Ai pozzetti sono stati aggiunti 50 μL di anticorpo anti CD3 alla concentrazione finale di 1 mg/ml. Dopo 15 minuti di incubazione, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti i target alla concentrazione di 1×10^3 /pozzetto in un volume di 50 μL . Contemporaneamente effettori e target sono stati piastrati agli stessi rapporti senza anticorpo anti-CD3 per valutare la capacità citotossica delle cellule NK in condizioni controllate. Il target è stato piastrato anche in assenza di effettori, per valutare il rilascio spontaneo e il rilascio totale del ^{51}Cr . Le piastre sono state centrifugate per 4 minuti a 100 g ed incubate in termostato a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 per 5h. Al termine del periodo d'incubazione, la radioattività liberata nel sovranatante (25 μL) è stata valutata in un γ -counter

Alla lisi ottenuta in presenza di OKT3 va sottratta la lisi ottenuta in assenza dello stesso.

Saggio ELISpot per la rilevazione di IFN- γ

La tecnica ELISpot (Enzyme-Linked immunoSPOT) è una procedura estremamente sensibile e rapida per l'identificazione, la quantificazione e la caratterizzazione di cellule secernenti anticorpi e citochine, applicata in questo contesto per valutare la capacità dei CTL di secernere IFN- γ .

Al giorno 0 è stato eseguito un coating della piastra: dopo permeabilizzazione della membrana della piastra con EtOH al 35%, 100 μ l di anticorpo primario IFN- γ (Mabtech, Nacka, Svezia) alla concentrazione di 5 μ g/ml sono stati incubati in pozzetti di piastre da 96 pozzetti con filtro multiscreen (MAIPS, 4510, Millipore, Bedford, MA) e lasciati tutta la notte a 4°C.

Il giorno successivo, le cellule *responder* sono state contate e risospese alla densità cellulare appropriata (2×10^6 /ml) in RPMI 1640 con il 10% di FBS (siero fetale bovino).

Successivamente, queste cellule sono state distribuite in piastre a 96 pozzetti, precedentemente incubate con l'anticorpo anti-IFN- γ primario, alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto in presenza di PBMC irradiati e pulsati con gli antigeni tumorali selezionati, WT1, Prame, Survivin, NPM1^{mut} e NPM1^{mut} Miltenyi, anch'essi alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto. Come controlli negativi sono stati utilizzati pozzetti contenenti solo medium completo. Al contrario, come controlli positivi, alle cellule *responder* sono stati aggiunti 100 μ l di PhA allo 0,5% finale.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C con atmosfera umidificata e 5% di CO₂, sono stati aggiunti 100 μ l di anticorpo secondario biotinilato (Mabtech, 1 μ g/ml) e le piastre sono state processate secondo la procedura standard. Gli spots di IFN- γ prodotti, ovvero il numero di cellule formanti macchie (SFCs), sono stati analizzati utilizzando un lettore automatizzato per piastre ELISPOT. Il numero di macchie per pozzetto è stato calcolato sottraendo il background, quantificato come la media di 24 pozzetti contenenti solo mezzo di coltura sterile, e un background specifico, quantificato come la somma delle macchie associate solo ai rispondenti (**Figura 16**).

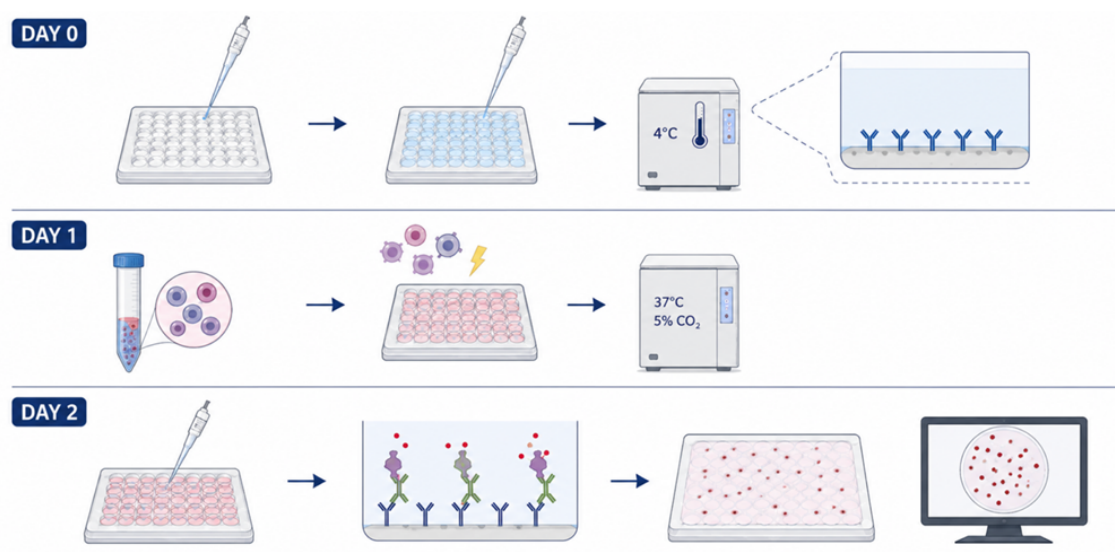


Figura 16: Protocollo ELISpot usato per valutare il rilascio di INF- γ .

Saggio ELISpot per la rilevazione di IL-2

La tecnica ELISpot (Enzyme-Linked immunoSPOT può essere anche applicata in questo contesto per valutare la capacità dei CTL di secernere IL-2.

Al giorno 0 è stato eseguito un coating della piastra: dopo permeabilizzazione della membrana della piastra con EtOH al 35%, 100 μ l di anticorpo primario Anti-human IL2 (Mabtech, Nacka, Svezia) alla concentrazione di 5 μ g/ml sono stati incubati in pozzetti di piastre da 96 pozzetti con filtro multiscreen (MAIPS, 4510, Millipore, Bedford, MA) e lasciati tutta la notte a 4°C.

Il giorno successivo, le cellule *responder* sono state contate e risospese alla densità cellulare appropriata (2×10^6 /ml) in RPMI 1640 con il 10% di FBS (siero fetale bovino).

Successivamente, queste cellule sono state distribuite in piastre a 96 pozzetti, precedentemente incubate con l'anticorpo primario, alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto in presenza di PBMC irradiati e pulsati con gli antigeni tumorali selezionati, WT1, Prame, Survivin, NPM1^{mut} e NPM1^{mut} Miltenyi, anch'essi alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto. Come controlli negativi sono stati utilizzati pozzetti contenenti solo medium completo. Al contrario, come controlli positivi, alle cellule *responder* sono stati aggiunti 100 μ l di PhA allo 0,5% finale.

Dopo 24 ore di incubazione a 37°C con atmosfera umidificata e 5% di CO₂, sono stati aggiunti 100 μ l di anticorpo secondario biotinilato alla concentrazione di 0.25 μ g/ml

(Mabtech, Nacka, Svezia) e le piastre sono state processate secondo la procedura standard. Gli spots di IL-2 prodotti, ovvero il numero di cellule formanti macchie (SFCs), sono stati analizzati utilizzando un lettore automatizzato per piastre ELISPOT. Il numero di macchie per pozzetto è stato calcolato sottraendo il background, quantificato come la media di 24 pozzetti contenenti solo mezzo di coltura sterile, e un background specifico, quantificato come la somma delle macchie associate solo ai rispondenti.

Tecnica di citometria a flusso

La citometria a flusso multiparametrica (CFM) è una tecnica che consente di analizzare vari parametri di elementi corpuscolati, come le cellule, sospesi in un mezzo fluido, come una sospensione cellulare. Questa tecnica permette anche il conteggio, la selezione e l'isolamento delle cellule. All'interno di una popolazione eterogenea, vengono analizzate le singole cellule per determinare le loro proprietà fisiche, chimiche o biochimiche, come vitalità e dimensioni.

Le cellule sono trasportate in un flusso laminare, che consente il loro allineamento all'interno di un capillare molto stretto. Questo allineamento permette alle cellule di passare singolarmente davanti a una sorgente luminosa, che consente un'analisi dettagliata e multiparametrica di ciascuna cellula. Questo passaggio è cruciale per garantire che ogni cellula sia illuminata singolarmente, evitando che agglomerati cellulari producano risultati errati.

Per studiare le popolazioni cellulari del sistema immunitario, vengono utilizzati anticorpi specifici per antigeni di superficie e antigeni intracellulari, marcati con fluorocromi.

Le misure vengono eseguite sfruttando i fenomeni di diffusione e rifrazione della luce e di fluorescenza, infatti, l'interazione della luce della sorgente laser con i componenti biologici delle particelle porta a tre fenomeni:

1. Forward scatter è un rilevatore posto di fronte alla sorgente luminosa e capta la luce diffusa ad un angolo di circa 1° . Questo valore ci dà informazioni circa la dimensione della particella;
2. Side scatter è un rilevatore posto a 90° della sorgente luminosa e rileva la luce riflessa e rifratta. Ci dà informazioni circa la complessità interna della cellula (struttura, composizione ecc.).
3. Fluorescenza (previo trattamento delle cellule con fluorocromi) appositi rilevatori dotati di specchi dicroici sono in grado di selezionare una precisa lunghezza d'onda (λ).

La grande varietà di dati deriva da diversi sistemi ottici di rilevamento (lenti, specchi dicroici e filtri ottici) in grado di amplificare i segnali luminosi e trasferirli ad un sistema di sensori che li convertono in segnali elettrici. L'insieme delle misure viene effettuato su di un consistente numero di cellule (minimo consigliato è di 10000).

Maggiore è il numero di cellule acquisite e migliore è la rappresentazione della popolazione in esame, di cui le cellule analizzate sono un campione significativo. Unendo i dati provenienti dai parametri analizzati, grazie ad un software si ottiene un citogramma, che rappresenta il numero di cellule che possiedono una determinata intensità di fluorescenza e dispone le cellule analizzate sulla base della morfologia, dimensione e della lunghezza d'onda di emissione di fluorescenza emessa (**Figura 17**).

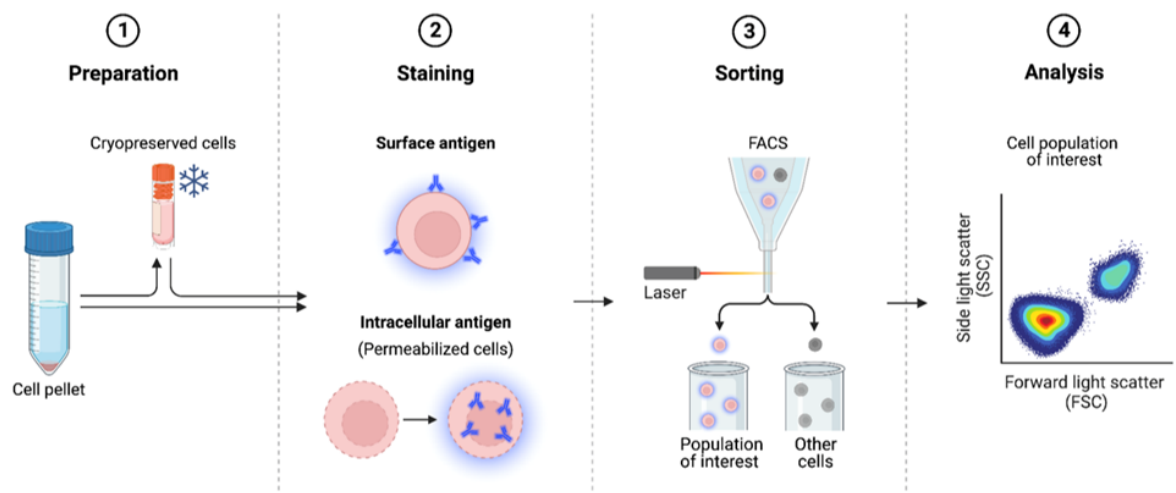


Figura 17: Schema esplicativo dei passaggi della citometria a flusso.

Valutazione del fenotipo di membrana

Il fenotipo di membrana delle popolazioni cellulari ottenute, sia in piastra che in bioreattore, è stato determinato mediante marcatura con anticorpi monoclonali e analisi citofluorimetrica.

In dettaglio: 50 µl di sospensione cellulare contenente 3×10^5 - 5×10^5 CTL risospese in soluzione fisiologica allo 0,5% di Human Serum. sono stati incubati con 15 µl di anticorpo monoclonale (anti-CD3 FITC, anti TCR- $\gamma\delta$ PE, anti- CD19 PeCy7, anti-CD8 APC-H7, anti-CD56 APC, anti-CD4 V450, anti-CD14 V500, CCR7 FITC, anti-CD45RA PE, anti

CD95 PerCP-Cy5.5, CXCR3 PeCy7, CD62L APC, CD27 V500) (BD, Becton Dickinson) per 30 minuti a 4°C.

Al termine dell'incubazione dopo un lavaggio delle cellule con soluzione fisiologica per eliminare l'eccesso di anticorpo, alle cellule sono stati aggiunti 500 µl di soluzione fisiologica. Per ciascun campione sono state acquisite ed analizzate 10⁴ cellule con il citofluorimetro.

Analisi citochine intracitoplasmatiche

La produzione di citochine intracitoplasmatiche delle popolazioni cellulari ottenute, sia in piastra che in bioreattore, è stata determinata mediante marcatura con anticorpi monoclonali e analisi citofluorimetrica. La sospensione cellulare è stata portata ad una concentrazione di 1x10⁶/ml in Medium (RPMI + 5% AB). Per ogni popolazione cellulare sono stati allestiti, in piastra multiwell 48, due pozzetti, uno senza stimolo e uno in presenza di 100 ng/ml dei peptidi WT1, Prame, Survivin1, NPM1^{mut} e NPM1^{mut} Miltenyi.

La piastra è stata incubata per 3 ore. La sospensione cellulare è poi stata raccolta, suddivisa in due provette, in modo da avere un controllo negativo in assenza di marcatura anticorpale. Dopo un lavaggio con 2 ml Buffer (PBS + 0,5% FBS), sono stati aggiunti 90 µl di medium (RPMI + 5% HS) addizionati con 30 µl di Catch Reagent: 10 µl INFγ FITC, 10 µl IL-2 PE, 10 µl TNFα APC e la sospensione è stata incubata, prima in ghiaccio per 5 minuti, poi per 45 minuti a 37°C, dopo aver aggiunto 1,5 ml di Medium.

Le provette sono state trasferite successivamente in ghiaccio ed è stato effettuato un lavaggio con Buffer (300g per 10 minuti a 4°C). Il pellet è stato risospeso in: 90 µl di Medium + 10 µl di ciascun Detection Antibody: INFγ, IL-2 e TNFα. Nelle provette di controllo negativo sono stati aggiunti solo i 90 µl di Medium.

Alle provette sono aggiunti 10 µl di anticorpi anti-CD4 e anti-CD8 e, dopo una incubazione in ghiaccio di 10 minuti, è stato effettuato un ulteriore lavaggio con Buffer. Le cellule sono state risospese in 300 µl di soluzione fisiologica e si è potuto procedere con l'acquisizione al citofluorimetro.

4. RISULTATI

Espansione di linee T cellulari leucemia-multispecifiche in piastra e in bioreattore

Utilizzando un protocollo di stimolazione e coltura precedentemente identificato come idoneo, sono state attivate ed espanse in vitro linee T citotossiche specifiche per gli antigeni leucemici NPM^{mutato} (NPM^{mut}), WT1, PRAME e Survivin, a partire da donatori sani. In dettaglio, sono stati generati CTL leucemia-multispecifici da 7 donatori, partendo da una cellularità pari a 25×10^6 PBMC, ottenendo una cellularità mediana di 6×10^6 CTL (range $2-20 \times 10^6$) alla fine del periodo di coltura in piastra. Contestualmente, con le due tipologie di coltura in bioreattore G-Rex (B1: coltura in 50 ml di medium; B2 coltura in 100 ml di medium), è stata ottenuta una cellularità mediana di 100×10^6 (range $65-132 \times 10^6$) e 164×10^6 (range $79-239 \times 10^6$), rispettivamente per le condizioni B1 e B2 (**Figura 18**).

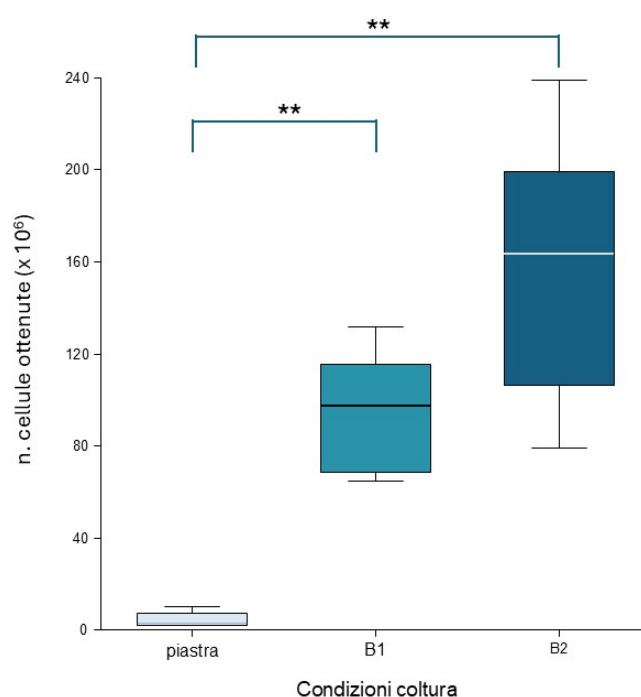


Figura 18. Espansione delle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in piastra o bioreattore.

Il recupero cellulare è significativamente aumentato dopo coltura in bioreattore (analisi con Mann Whitney U test: ** $p < 0.005$).

Il recupero cellulare al termine delle colture convenzionali era pari a circa il 25% della cellularità iniziale, risultato atteso trattandosi di una risposta primaria antitumorale. Nel caso dei CTL ottenuti dopo coltura in bioreattore, il recupero è risultato significativamente aumentato (recupero dalle colture convenzionali vs condizione bioreattore B1 vs condizione

B2, $p<0.005$), con una differenza tra i due approcci a favore delle colture in bioreattore, risultate superiori in ogni esperimento eseguito.

Analisi comparativa delle caratteristiche fenotipiche dei CTL multi-antigene specifici ottenuti con il metodo colturale in piastra e con coltura in bioreattore

La caratterizzazione fenotipica dei CTL multi-antigene leucemia-specifici è stata eseguita analizzando le popolazioni cellulari mediante marcatura con anticorpi monoclonali e lettura in citofluorimetria. L'analisi dei marcatori di superficie ha mostrato come le linee cresciute in piastra includessero il 93% di cellule CD3+ (range: 70-95%) con il 64% di cellule CD3+/CD4+ (range: 46-70%) e il 24% di cellule CD3+/CD8+ (range: 12-34%).

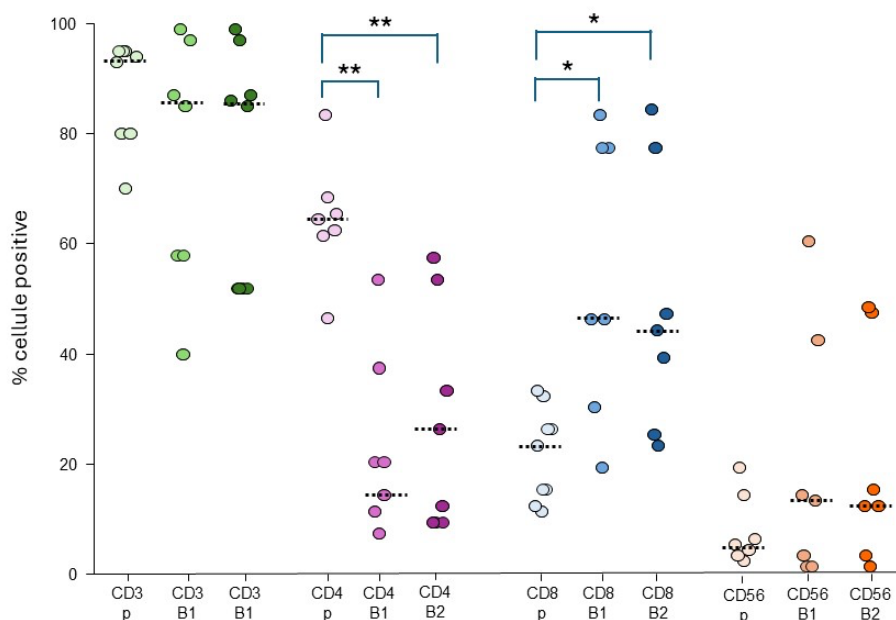


Figura 19. Fenotipo dei CTL leucemia-specifici coltivati in piastra (p) o bioreattore (B1, B2).

Il numero di cellule CD3+/CD8+ citotossiche è significativamente aumentato dopo coltura in bioreattore (analisi con Mann Whitney U test: $*p<0.05$), contestualmente al decremento delle cellule T CD4+ ($**p<0.005$).

Le linee espanse in bioreattore sono risultate sovrapponibili nelle due condizioni di coltura, avendo osservato una percentuale di cellule CD3+ pari a 86% (range: 40-99%) di cui il 17% CD3+/CD4+ (range: 7-53%) e il 47% di cellule CD3+/CD8+ (range: 20-84%) per la condizione B1 e 86% (range: 52-99%) di cui il 26% CD3+/CD4+ (range: 9-57%) e il 45% di cellule CD3+/CD8+ (range: 24-85%) per la condizione B2.

Come si evince dalla **Figura 19**, i linfociti NK CD3-CD56+ contenuti nelle colture di CTL multi-antigene erano pari al 5% (range: 2-19%) per la piastra e al 13% (range: 1-60%) e 12% (range: 1-48%), rispettivamente, per le condizioni in bioreattore. Da questi dati è possibile osservare come, nella coltura in bioreattore, aumentino significativamente le cellule CD8+ responsabili dell'effetto citotossico ($p < 0.05$ per entrambe le condizioni B1 e B2), con parallelo calo della % di cellule CD4+ ($p < 0.005$ per entrambe le condizioni B1 e B2). Abbiamo poi analizzato le popolazioni memoria all'interno dei subset T CD8+ e CD4+ (**Figura 20 e 21**). L'analisi delle popolazioni memoria ha evidenziato come sia i linfociti di tipo CD8+ sia i CD4+ includevano una percentuale tra il 26% ed il 48% di cellule di tipo CCR7+CD45RA+ naive, che si riducono significativamente nelle condizioni in bioreattore (p vs B1 e p vs B2, $p < 0.01$) ed un incremento delle popolazioni EMRA (p vs B1, $*p < 0.05$). Queste cellule, che sembrerebbero avere un fenotipo naïve, sono in realtà early memory, in quanto, soprattutto nelle popolazioni derivate dalla coltura in bioreattore, esprimono gli antigeni CD95 (CD8+ naive piastra vs bioreattore B1 vs B2: 73% vs 100% vs 100%, $p < 0.005$; CD4+ naive piastra vs bioreattore B1 vs B2: 80% vs 99% vs 98%, $p < 0.005$) e CXCR3 (CD8+ naive piastra vs bioreattore B1 vs B2: 67% vs 78% vs 87%, $p < 0.05$ per p vs B2; CD4+ naive piastra vs bioreattore B1 vs B2: 53% vs 67% vs 64%, $p = ns$).

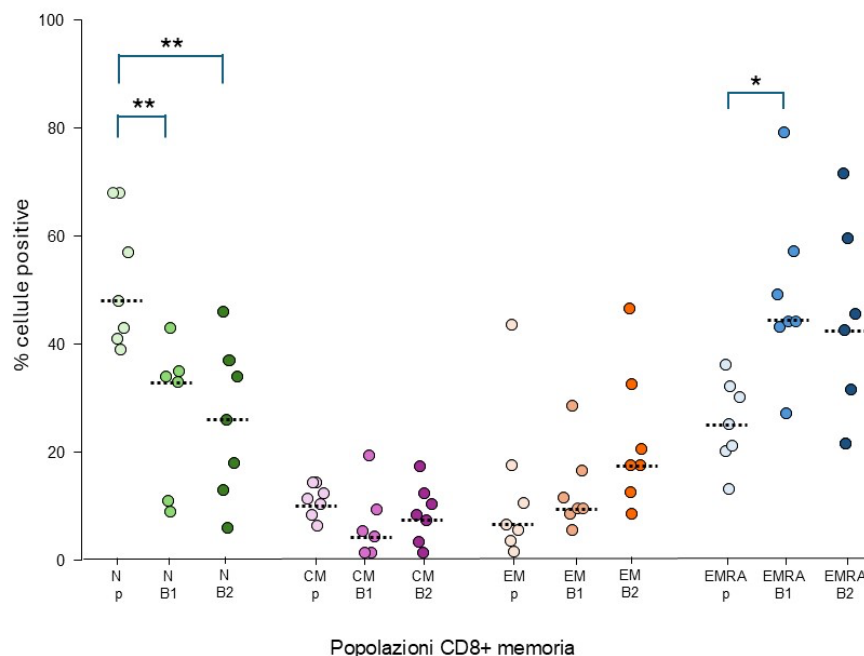


Figura 20. Distribuzione delle popolazioni memoria nell'ambito della sottopopolazione T CD8+ nelle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in piastra (p) o bioreattore (B1, B2). Nel grafico sono mostrate le popolazioni naive (N), central memory (CM), effector memory (EM) ed effettori terminali (EMRA). Si osserva un significativo decremento delle popolazioni N (** $p < 0.01$) ed un incremento delle popolazioni EMRA (p vs B1, $*p < 0.05$).

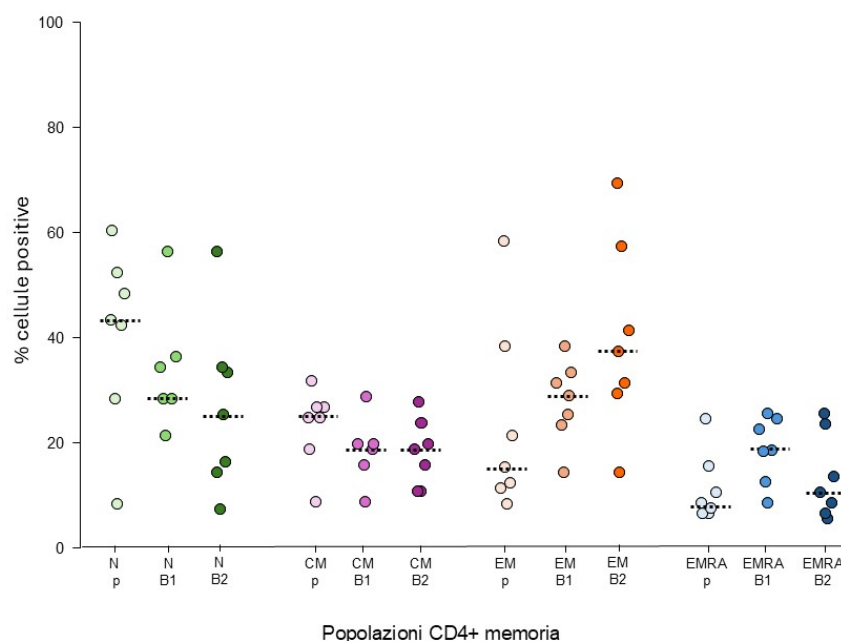


Figura 21. Distribuzione delle popolazioni memoria nell'ambito della sottopopolazione T CD4+ nelle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in piastra (p) o bioreattore (B1, B2). Nel grafico sono mostrate le popolazioni naive (N), central memory (CM), effector memory (EM) ed effettori terminali (EMRA).

Le altre popolazioni central memory (CM), effector memory (EM) ed effettori che ri-esprimono il CD45RA (EMRA) sono rappresentate in % variabili. Tuttavia, si è osservato un incremento di popolazioni EM ed EMRA nelle condizioni in bioreattore. In particolare, le mediane registrate per gli effettori CD8+ sono state le seguenti: CM CCR7+CD45RA- piastra 11%, bioreattore B1 5%, bioreattore B2 8%; EM CCR7-CD45RA- piastra 7%, bioreattore B1 11%, bioreattore B2 18%; effettori terminali CCR7-CD45RA+ piastra 26%, bioreattore B1 47%, bioreattore B2 44%; gli effettori CD4+ hanno mostrato: CM CCR7+CD45RA- piastra 25%, bioreattore B1 20%, bioreattore B2 19%; EM CCR7-CD45RA- piastra 15%, bioreattore B1 28%, bioreattore B2 37%; effettori terminali CCR7-CD45RA+ piastra 9%, bioreattore B1 21%, bioreattore B2 11%.

Abbiamo, poi, valutato, mediante analisi citofluorimetrica, la produzione di citochine Th1 da parte delle linee multiantigene-specifiche. Le citochine valutate sono state l'interleuchina 2 (IL-2), l'interferone gamma (IFN γ) ed il tumor necrosis factor alfa (TNF- α). Nella Figura 12 è mostrato un esempio di lettura delle popolazioni producenti citochine nelle linee di linfociti T leucemia-specifici.

Abbiamo osservato come i CTL multiantigene-specifici abbiano caratteristiche di polifunzionalità, in quanto una buona percentuale di cellule risultano doppie o triple positive per IFN γ , IL-2 e TNF α .

Analisi comparativa delle caratteristiche funzionali dei CTL multiantigene specifici ottenuti con il metodo colturale in piastra e con coltura in bioreattore

La caratterizzazione funzionale di attività dei CTL multispecifici è stata eseguita analizzando l'attività citotossica e la produzione di citochine specifica verso gli antigeni testati.

Citotossicità verso cellule target pulsate con peptidi derivati da antigeni tumorali

L'attività litica delle linee è stata valutata, sia per i CTL ottenuti in piastra che per quelli da coltura in bioreattore, mediante un saggio di citotossicità basato sulla lisi di cellule target marcate con ^{51}Cr . In particolare, è stata valutata la capacità citotossica dei CTL leucemia-multispecifici verso blasti di PHA pulsati con i peptidi utilizzati nel protocollo di stimolazione (**Figure 22 e 23**). La comparazione dei risultati ottenuti nelle tre condizioni è stata effettuata al fine di valutare se un eventuale vantaggio in termini di espansione cellulare avesse un impatto sulla capacità di mediare un'attività citotossica antigene-specifica. La misura della citotossicità specifica è stata effettuata a due intervalli di tempo differenti: a 6 ore per determinare la citotossicità mediata dagli effettori CD8⁺ e a 10 ore per quella mediata dagli effettori CD4⁺. In entrambe le condizioni, i CTL espansi sono stati in grado di esibire una attività litica antigene specifica. Considerando le cellule ottenute tramite coltura in piastra, 4 su 7 prodotti cellulari hanno mostrato alle 6 ore una citotossicità specifica superiore al 10% per almeno due specificità antigeniche. In particolare, le 4 linee hanno dimostrato un massimo di 2 specificità verso i singoli antigeni. Due linee cellulari non hanno mostrato risposta ad alcun antigene tumorale. Valutando l'entità della risposta citotossica per i singoli antigeni è stata riscontrata una mediana pari al 12% per NPM^{mut} (range 6-32%), 4% per WT1 (range 0-14%), 0% per PRAME (range 0-5%) e 0% per Survivin (range 0-15%).

Per quanto riguarda i prodotti cellulari ottenuti tramite bioreattore, una citotossicità superiore al 10% per almeno due specificità antigeniche è stata osservata in tutti i casi. In dettaglio, 2 linee hanno presentato 2 specificità, 3 linee hanno presentato 3 specificità, e infine 2 linee hanno dimostrato una specificità maggiore al 10% per tutti gli antigeni. La condizione B1 è quella che ha mostrato maggiore attività citotossica a 6h. La lisi mediana registrata per ogni antigene è stata rispettivamente B1: 27% per NPM^{mut} (range 13-41%), 13% per WT1 (range 0-34%), 11% per PRAME (range 5-40%) e 11% per Survivin (range 0-13%); B2: 14% per NPM^{mut} (range 5-29%), 9% per WT1 (range 0-21%), 2% per PRAME (range 0-14%) e 8% per Survivin (range 0-36%).

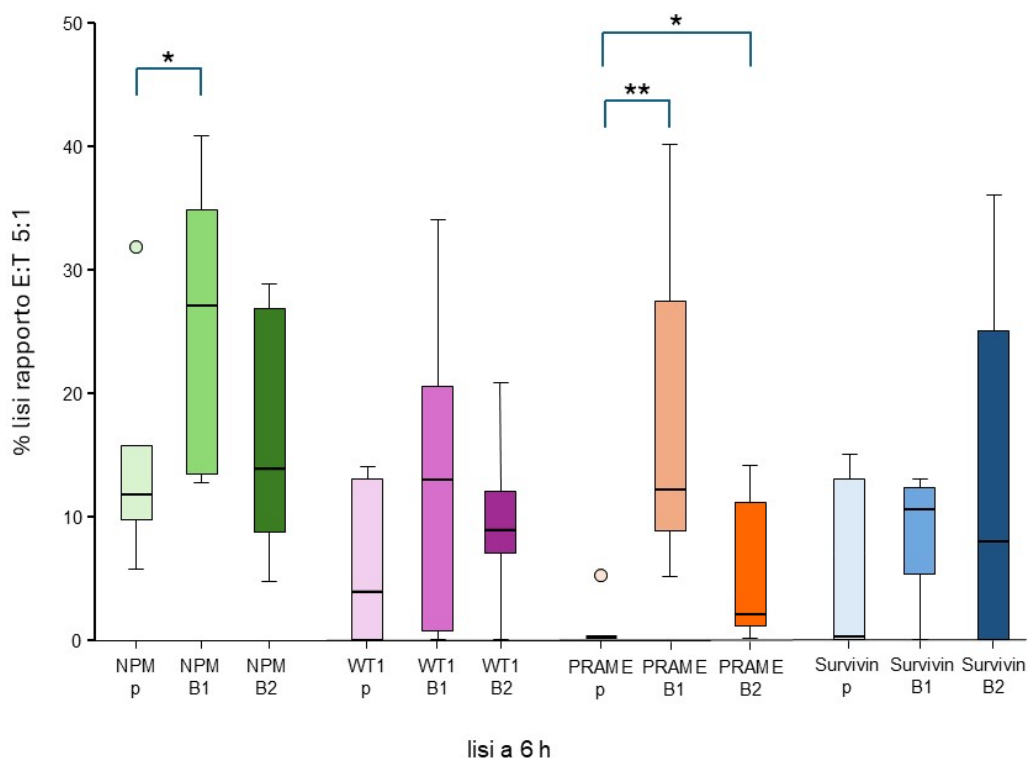


Figura 22. Attività citotossica specifica verso gli antigeni utilizzati nel protocollo di stimolazione da parte di cellule CD8 derivate dalle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in piastra (p) o bioreattore (condizioni B1 e B2).

Sono mostrate le specificità verso NPM, WT1, PRAM, e Survivin; la citotossicità verso NPM (p vs B1, * $p < 0.05$) e PRAME (p vs B1, ** $p < 0.005$; p vs B2, * $p < 0.05$) risulta aumentata significativamente dopo coltura in bioreattore).

Un'analisi comparativa dei risultati per la coltura in bioreattore verso la coltura in piastra mostra la presenza di risposta a più di 2 antigeni in 5 su 7 (71%) vs 0 su 7 (0%) donatori, ed evidenzia un chiaro aumento dell'attività citotossica a 6 ore per i 4 antigeni nei prodotti derivati dal bioreattore (**Figura 22**).

Nel test a 10 ore (**Figura 23**), le mediane di lisi registrate per i CTL da coltura convenzionale sono: 4% per NPM^{mut} (range 0-30%), 2% per WT1 (range 0-28%), 0% per PRAME (range 0-35%) e 6% per Survivin (range 0-29%). I valori ottenuti con il prodotto in bioreattore sono rispettivamente B1: 18% per NPM^{mut} (range 7-73%), 10% per WT1 (range 2-43%), 16% per PRAME (range 0-59%) e 7% per Survivin (range 0-17%); B2: 6% per NPM^{mut} (range 0-31%), 3% per WT1 (range 0-30%), 12% per PRAME (range 0-35%) e 16% per Survivin (range 0-45%).

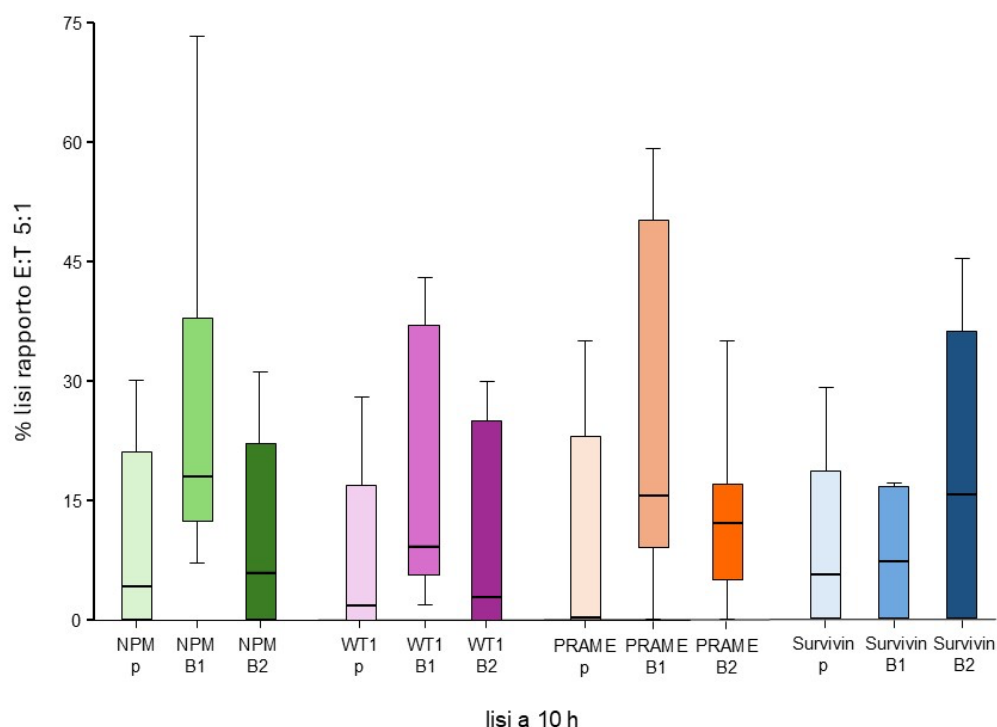


Figura 23. Attività citotossica specifica verso gli antigeni utilizzati nel protocollo di stimolazione da parte di cellule CD4 derivate dalle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in piastra (p) o bioreattore (B1 e B2).

Sono mostrate le specificità verso NPM^{mut}, WT1, PRAME, survivin.

Dalla comparazione dei dati ottenuti emerge che, anche a 10 ore, l'attività citotossica è aumentata nei CTL ottenuti tramite coltura in G-Rex. In particolare, 2 delle 7 linee CTL coltivate in piastra non hanno mostrato risposta ad alcun antigene leucemico. Al contrario, tutti i prodotti cellulari coltivati in bioreattore hanno mostrato risposta >10% ad almeno 2 dei 4 antigeni testati. Anche in questo caso, la condizione di coltura B1 è risultata superiore come efficacia rispetto alla condizione B2.

Citotossicità verso cellule target tumorali e cellule allogeniche non tumorali

Oltre alla capacità litica specifica dei CTL verso blasti di PHA pulsati singolarmente con gli antigeni di interesse, è stata valutata anche la lisi indotta su linee tumorali.

In particolare, a 6 ore è stata valutata la potenzialità citotossica dei CTL multiantigene-specifici in un saggio di citotossicità definito CD3-redirected, basato sulla lisi verso la linea cellulare NK-resistente P815, in presenza di anticorpo monoclonale agonista anti-CD3, che permette di valutare l'attività citotossica esercitata dalla popolazione in esame, quando è presente un anticorpo che fa da "ponte" tra i linfociti citotossici e la cellula target.

Come illustrato nella Figura 24, i CTL mostravano una lisi mediana pari al 4% (range 1-12%) per la coltura in piastra, e una lisi mediana pari al 15% (range 5-17%) per la coltura in bioreattore B1 e 13% (range 5-27%) per il bioreattore B2 (p vs B1, $p<0.05$; p vs B2, $p<0.05$; B1 vs B2, $p=ns$). Inoltre, è stata testata la lisi verso una linea stabilizzata derivata da una leucemia mieloide acuta NPM^{mut+}, denominata OCI 3 (Figura 24). Comparando la percentuale di lisi registrata, la risposta è risultata significativamente aumentata nei CTL ottenuti dal bioreattore [lisi mediana pari al 6% (range 0-18%) per la coltura in piastra, lisi mediana del 18% (range 13-23%) per la coltura in bioreattore B1 e 8% (range 5-57%) per il bioreattore B2 (p vs B1, $p<0.01$; p vs B2, $p=ns$; B1 vs B2, $p=ns$).

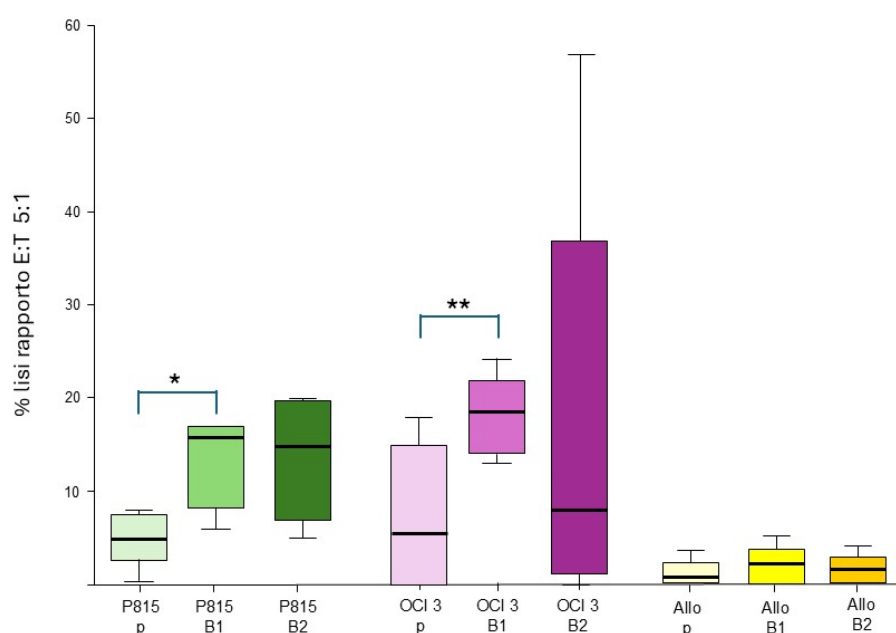


Figura 24. Attività citotossica verso linee cellulari tumorali stabilizzate (P815, OCI 3), e verso blasti PHA allogenici non pulsati, delle linee cellulari tumore-specifiche coltivate in piastra (p) o bioreattore (B1 e B2).

La citotossicità risulta aumentata dopo coltura in bioreattore, sia nel caso della linea P815, sia della linea OCI 3, con aumento statisticamente significativo (rispettivamente $p<0.05$ e $p<0.01$).

Abbiamo, poi, dimostrato la sicurezza dei CTL multi-antigene attraverso un test di citotossicità verso cellule target allogeniche (**Figura 24**), mostrando come non si sia verificata una attività litica verso cellule allogeniche non tumorali (lisi mediana di blasti PHA allogenici: piastra 2% vs 3% vs 2.5% per bioreattore B1 e B2), a conferma della specificità delle linee di CTL e della prevedibile mancata reattività verso cellule sane dei

pazienti che potrebbero ricevere le cellule terapeutiche, a testimonianza di una relativa bassa tossicità del farmaco cellulare.

Attività di produzione di citochine

Oltre alla capacità litica specifica dei CTL leucemia multi-specifici, è stata valutata anche la loro capacità di secernere citochine di tipo Th1 in seguito a stimolazione specifica con i peptidi utilizzati nel protocollo di espansione. In particolare, è stata valutata la produzione di IFN γ (**Figura 25**) e di IL-2 (**Figura 26**).

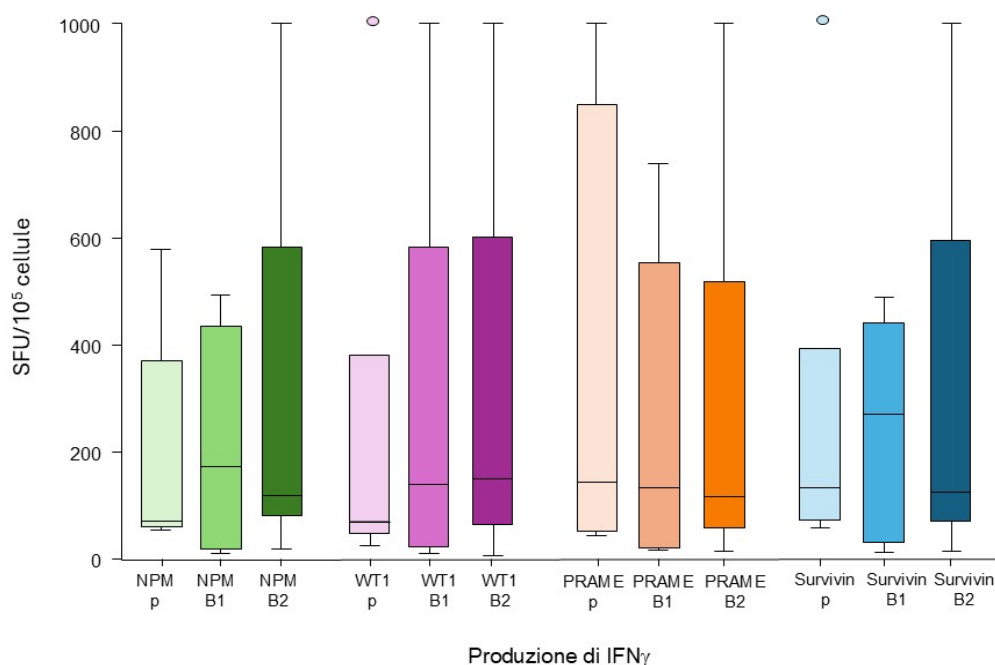


Figura 25. Attività di produzione specifica di IFN γ verso gli antigeni utilizzati nel protocollo di espansione da parte di cellule derivate dalle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in piastra (p) o bioreattore (B1 e B2). Sono mostrate le specificità verso NPM^{mut}, WT1, PRAME, survivin.

Abbiamo potuto osservare come non vi siano differenze significative nella produzione di IFN γ da parte delle linee CTL coltivate in piastra o in bioreattore. In dettaglio, la frequenza mediana di cellule che producono IFN γ nei prodotti cellulari testati è stata la seguente: condizione di coltura in piastra, 118 SFU/10⁵ cellule per NPM^{mut} (range 17-1000), 125 SFU/10⁵ cellule per WT1 (range 15-1000), 150 SFU/10⁵ cellule per PRAME (range 7-1000) e 116 SFU/10⁵ cellule per Survivin (range 13-1000); condizione coltura in bioreattore B1: 172 SFU/10⁵ cellule per NPM^{mut} (range 10-495), 271 SFU/10⁵ cellule per WT1 (range 12-

490), 140 SFU/10⁵ cellule per PRAME (range 11-1000) e 135 SFU/10⁵ cellule per Survivin (range 16-738); condizione coltura in bioreattore B2: 70 SFU/10⁵ cellule per NPM^{mut} (range 54-577), 135 SFU/10⁵ cellule per WT1 (range 59-1000), 69 SFU/10⁵ cellule per PRAME (range 24-1000) e 144 SFU/10⁵ cellule per Survivin (range 44-1000).

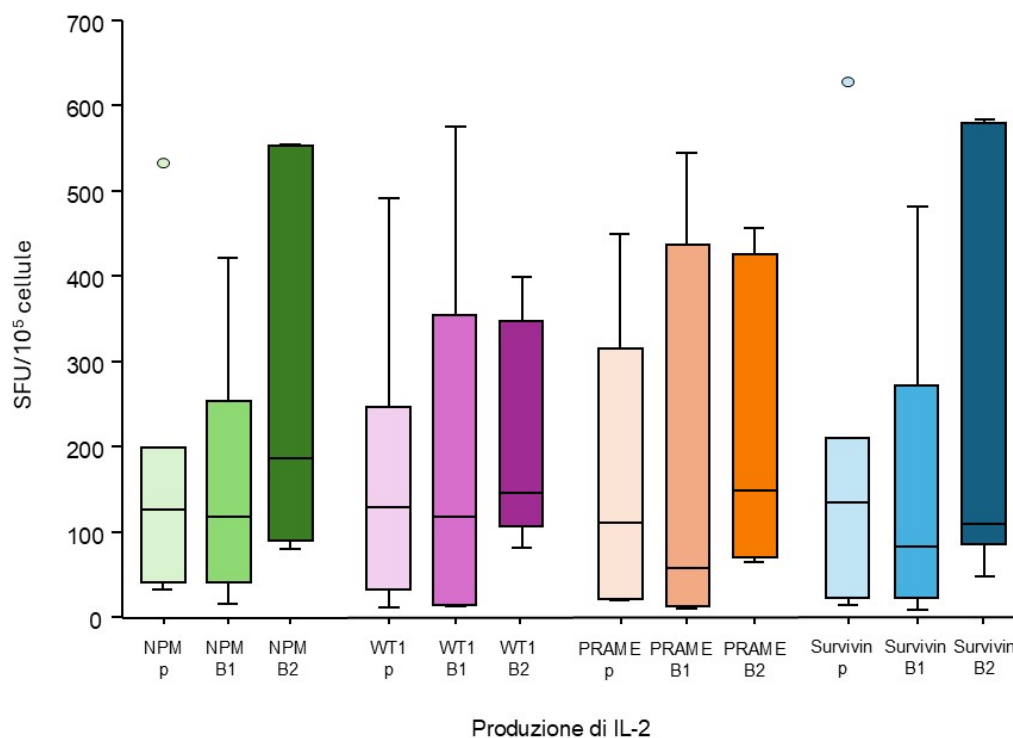


Figura 26. Attività di produzione specifica di IL-2 verso gli antigeni utilizzati nel protocollo di espansione da parte di cellule derivate dalle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in piastra (p) o bioreattore (B1 e B2).

Sono mostrate le specificità verso NPM^{mut}, WT1, PRAME, survivin.

Anche nel caso della produzione di IL-2, abbiamo potuto osservare come non vi siano differenze significative da parte delle linee CTL coltivate in piastra o in bioreattore.

Nello specifico, la frequenza mediana di cellule che producono IL-2 nei prodotti cellulari testati è stata la seguente: condizione di coltura in piastra, 186 SFU/10⁵ cellule per NPM^{mut} (range 80-554), 109 SFU/10⁵ cellule per WT1 (range 48-584), 146 SFU/10⁵ cellule per PRAME (range 81-399) e 148 SFU/10⁵ cellule per Survivin (range 65-457); condizione coltura in bioreattore B1: 118 SFU/10⁵ cellule per NPM^{mut} (range 15-422), 83 SFU/10⁵ cellule per WT1 (range 9-481), 117 SFU/10⁵ cellule per PRAME (range 12-575) e 58 SFU/10⁵ cellule per Survivin (range 10-545); condizione coltura in bioreattore B2: 126 SFU/10⁵ cellule per NPM^{mut} (range 32-527), 135 SFU/10⁵ cellule per WT1 (range 14-638),

129 SFU/10⁵ cellule per PRAME (range 11-492) e 110 SFU/10⁵ cellule per Survivin (range 19-449).

Considerando l'attività di produzione di citochine, l'analisi comparativa dei risultati per la coltura in bioreattore verso la coltura in piastra mostra la presenza di risposta a più di 2 antigeni in tutti i donatori e in tutte le condizioni. Solo in 1 donatore si è osservata assenza di risposta ad 1 antigene (PRAME) in una coltura in piastra.

Analisi comparativa delle caratteristiche funzionali dei CTL multiantigene-specifici utilizzando peptidi in-house vs peptidi commerciali per NPM^{mut} nella miscela di stimolazione

Per questa sezione del lavoro, è stata utilizzata la coltura in bioreattore, avendone dimostrato la superiorità in termini di recuperi cellulari e capacità citotossica leucemia-specifica. La caratterizzazione funzionale di attività è stata eseguita analizzando la produzione di citochine verso gli antigeni leucemici e l'attività citotossica. Sono stati eseguiti esperimenti su 4 diversi donatori.

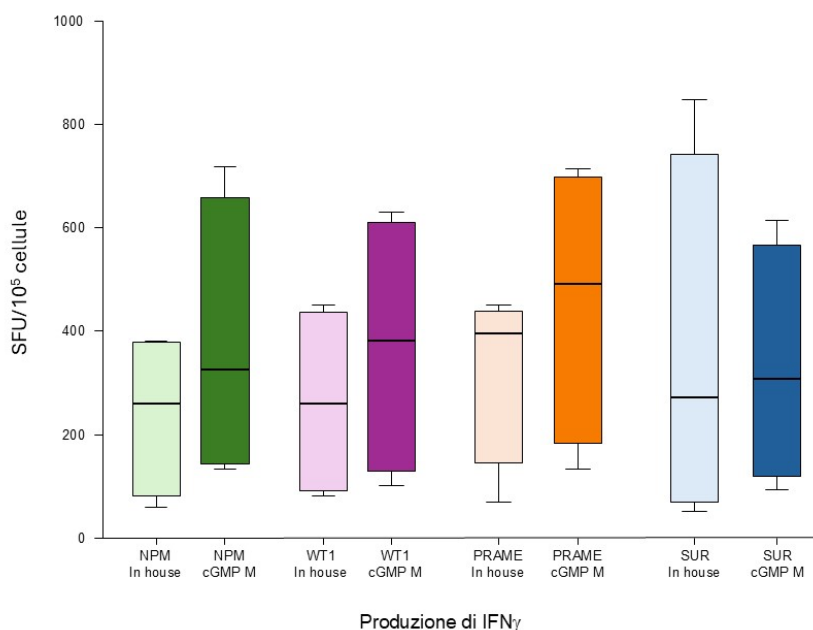


Figura 27. Attività di produzione specifica di IFN γ verso gli antigeni utilizzati nel protocollo di espansione da parte di cellule derivate dalle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in bioreattore B2 con peptidi NPM^{mut} in-house o peptidi NPM^{mut} commerciali GMP (cGMP M).

Sono mostrate le specificità verso NPM^{mut}, WT1, PRAME, survivin.

Abbiamo potuto osservare come non vi siano differenze significative nella produzione di IFN γ da parte delle linee CTL coltivate con i peptidi NPM^{mut} in-house utilizzati negli esperimenti della prima parte dello studio, e i peptidi NPM^{mut} GMP commerciali.

In dettaglio, la frequenza mediana di cellule che producono IFN γ nei prodotti cellulari testati è stata la seguente: condizione di coltura con peptidi in-house vs peptidi commerciali, NPM^{mut}: 260 SFU/10⁵ cellule (range 60-380) vs 327 SFU/10⁵ cellule (range 134-717); WT1: 260 SFU/10⁵ cellule (range 82-450) vs 381 SFU/10⁵ cellule (range 103-630); PRAME: 394 SFU/10⁵ cellule (range 69-449) vs 489 SFU/10⁵ cellule (range 135-714); survivin: 272 SFU/10⁵ cellule (range 52-848) vs 307 SFU/10⁵ cellule (range 95-613).

Come si evince dalla **Figura 27**, per tutti gli antigeni è stato osservato un incremento della frequenza mediana di produzione di IFN γ , sebbene non statisticamente significativo.

Dati analoghi sono stati osservati per la produzione in vitro di IL-2, che è risultata aumentata, sebbene in modo non significativo, dopo coltura in presenza di miscela di peptidi contenente peptidi NPM^{mut} commerciali GMP.

Per quanto riguarda l'attività citotossica, non sono state osservate differenze significative nell'attività litica a 6 ore nelle due diverse condizioni di coltura. Tuttavia, considerando il test di attività citotossica leucemia specifica, ovvero la lisi di cellule tumorali, in particolare di cellule P815 e, soprattutto, cellule OCI derivate da lineage mieloide, abbiamo potuto osservare un aumento, che è risultato statisticamente significativo, della citotossicità leucemia-diretta (**Figura 28**).

In dettaglio, i CTL coltivati in bioreattore B2 con peptidi NPM^{mut} commerciali GMP vs peptidi NPM^{mut} in-house mostravano una lisi mediana delle P815 pari al 5% (range 0-29%) vs 9% (range 0-22%) e delle OCI pari al 14% (range 0-19%) vs 31% (range 16-44%).

Questi dati indicano come l'implementazione del protocollo di coltura con peptidi commerciali è migliorativa non solo in termini di GMP, ma anche come performance del protocollo di attivazione/espansione.

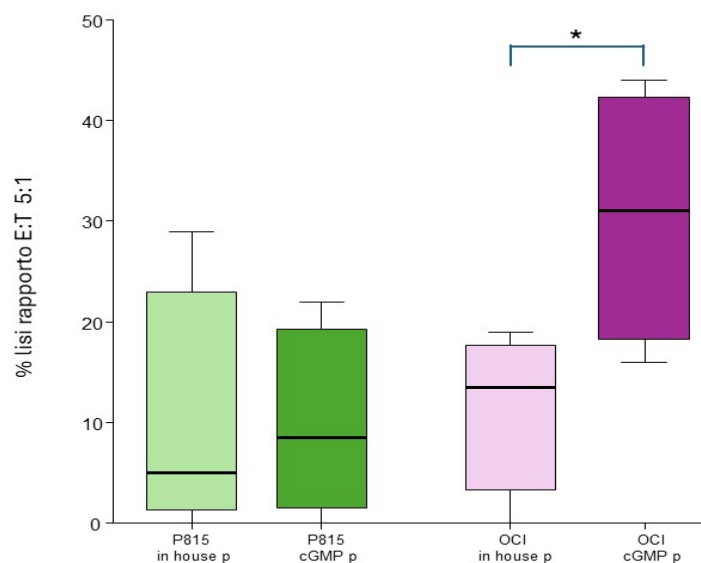


Figura 28. Attività citotossica verso linee cellulari tumorali stabilizzate (P815, OCI) delle linee cellulari leucemia-specifiche coltivate in bioreattore B2 con peptidi NPM^{mut} in-house o peptidi NPM^{mut} commerciali GMP (cGMP M).

La citotossicità risulta aumentata dopo coltura con peptidi NPM^{mut} commerciali GMP, sia nel caso della linea P815, sia della linea OCI, con aumento statisticamente significativo nel caso delle OCI ($p < 0.05$).

Abbiamo anche controllato la performance delle due tipologie di peptidi quando utilizzati nei test di controllo qualità (Elispot IFN γ e IL-2), ed abbiamo potuto osservare come i due diversi reagenti siano sovrapponibili nella performance se utilizzati in test analitici. In entrambi i casi i reagenti sono risultati pressoché sovrapponibili, con un coefficiente di correlazione pari a $r=0,92$ ed $r=0,98$ rispettivamente, per la produzione di IFN γ e IL-2.

5. DISCUSSIONE

Il progetto di tesi aveva lo scopo di ottenere un farmaco cellulare innovativo diretto contro antigeni espressi sulle LMA, per indurre il controllo della malattia leucemica a lungo termine dopo trapianto allogenico di cellule staminali (allo-TCSE) per LMA. L'ipotesi era che un prodotto di terapia cellulare somatica basato su linfociti T citotossici leucemia-specifici del donatore, espansi in vitro e selezionati in coltura, potesse mediare una buona attività *graft-versus-leukemia* (GVL) senza aumentare significativamente il rischio di stimolare risposte alloreattive in grado d'indurre una malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD). La scelta degli antigeni leucemia-associati da utilizzare per la stimolazione del prodotto cellulare è caduta su antigeni che erano già stati descritti come immunogenici in lavori pubblicati in letteratura, ovvero WT1, PRAME e survivin (Weber et al., 2013); (Weber et al., 2009); (Ferulli et al., 2019); (Lulla et al., 2021), associati ad un neoantigene LMA-specifico come NPM^{mut}, che si è dimostrato in grado di indurre risposte protettive in vivo in pazienti con LMA NPM^{mut}-positiva (Greiner et al., 2012); (Forghieri et al., 2019), e che è espresso in un'alta percentuale di LMA. Un ulteriore vantaggio dell'impiego di NPM^{mut} è la possibile efficacia anche verso le cellule staminali leucemiche, che sono relativamente resistenti alla chemioterapia, e rappresentano una quota importante della malattia minima residua post-trapianto. NPM1^{mut} è, infatti, espresso nelle cellule staminali leucemiche, che possono, quindi diventare suscettibili all'eradicazione immunologica. Di particolare rilevanza è l'osservazione che, malgrado la stimolazione simultanea con i diversi antigeni, potenzialmente in grado di condurre ad una mancata attivazione verso specificità presenti a bassa frequenza come nel caso di antigeni tumorali, il bioreattore abbia facilitato la risposta citotossica verso la maggioranza degli antigeni nella gran parte dei donatori. Questo potrebbe dipendere dalla notevole espansione delle cellule CD8⁺ nel prodotto derivato dal bioreattore. La presenza di cellule CD4⁺ nei prodotti cellulari, sebbene in percentuale ridotta rispetto alle colture in piastra, dovrebbe anch'essa favorire la persistenza delle cellule in vivo, una volta impiegate nel paziente, in quanto è noto il ruolo omeostatico dei T CD4⁺ nel mantenere le risposte T CD8⁺ a lungo termine.

L'uso del bioreattore permette di incrementare i volumi di lavoro e di ottenere una maggiore cellularità al termine del periodo di espansione. Inoltre, questo metodo contribuisce a ridurre sia i tempi di coltura, sia le manipolazioni da parte dall'operatore.

I risultati dei nostri esperimenti dimostrano la fattibilità di ottenere un prodotto medicinale per terapia avanzata (ATMP) somatica specifico per multipli antigeni leucemici, con

un'efficiente attività litica verso cellule target positive per gli antigeni di LMA, incluse linee cellulari leucemiche mieloidi, e bassa o assente alloreattività, da linfociti del sangue periferico di donatori sani. Un aspetto intrigante di questo lavoro è proprio la possibilità di attivare risposte specifiche per proteine tumorali da soggetti sani che dovrebbero essere antigene-naïve, in quanto gli antigeni non sono generalmente espressi da cellule adulte normali. Il meccanismo alla base di questa osservazione è, verosimilmente, un fenomeno di molecular mimicry, dovuto ad un cross-riconoscimento di epitopi presenti nella sequenza degli antigeni utilizzati per la stimolazione cellulare da parte di linfociti con specificità diretta verso piccole sequenze omologhe ripetute di antigeni batterici o virali, come già documentato per alcune risposte al melanoma (Snyder et al., 2014) o ad antigeni leucemici (Greiner et al., 2012); (Forghieri et al., 2019).

Un altro aspetto importante riguarda l'implementazione del protocollo con l'impiego di peptidi GMP commerciali. Vi erano dubbi sulla fattibilità dell'impiego, in quanto la miscela commerciale utilizzata poteva teoricamente causare una riduzione nella risposta specifica a NPM^{mut}. Infatti, la miscela in-house contiene alcuni epitopi derivati dalle porzioni mutate della proteina, mentre la composizione della miscela commerciale non è nota in quanto sottoposta a brevetto. Tuttavia, gli esperimenti condotti mostrano come vi sia un aumento significativo della risposta alle cellule OCI, che derivano appunto da cellule mieloidi con mutazione NPM. Quindi, è ipotizzabile che la miscela commerciale contenga peptidi derivati anche dalle diverse varianti della proteina NPM mutata.

L'impiego di linee T cellulari leucemia multiantigene-specifiche avrebbe diversi vantaggi in vivo: i) la possibilità di utilizzare un singolo prodotto per trattare pazienti con molteplici tipologie di LMA, incluse le LMA positive per FLT3, la cui presenza induce sovraespressione di survivina, WT1 e PRAME; ii) possibile riduzione del rischio di immune-escape da parte dei blasti leucemici, per la presenza di specificità per diversi antigeni, seppure a variabile affinità in lotti diversi. Anche nel caso di prodotti con specificità limitate a 1 o 2 antigeni, l'efficacia clinica potrebbe essere mantenuta ed amplificata attraverso il fenomeno del reclutamento attraverso l'antigen-spreading, ovvero l'esposizione di antigeni criptici da parte di blasti leucemici lisati dai CTL ad alta affinità, che fungono da "vaccino" per stimolare nuove risposte nei linfociti del donatore che maturano dai precursori midollari (Comoli et al., 2017).

Il prodotto cellulare sviluppato in questo lavoro di tesi ha un grosso vantaggio rispetto ad alcuni farmaci cellulari leucemia- o tumore-specifici descritti in letteratura, ed ottenuti

mediante stimolazione con blasti leucemici o derivati da linfociti infiltranti il tumore (TIL) (Daudt et al., 2008); (Dudley et al., 2013), che riguarda la facilità di produzione, in termini di semplificazione del protocollo di coltura ed accorciamento dei tempi necessari alla produzione. A questo proposito, il protocollo modificato, che prevede l'attivazione cellulare in bioreattore, in assenza di ristimolazione, ma in presenza di alte dosi di citochine, è in grado di indurre CTL con caratteristiche funzionali sovrapponibili al protocollo con ristimolazione. Di particolare interesse è l'osservazione che con questo protocollo semplificato si attivino popolazioni cellulari di tipo early memory, dotate di buona funzione citotossica ma meno "exhausted" delle cellule effector-memory, e quindi potenzialmente in grado di rigenerare rapidamente delle risposte effettrici, e di persistere più a lungo nell'ospite (Caccamo et al., 2018).

In conclusione, la procedura di produzione di CTL leucemia-multiantigene specifici sviluppata presso la Cell Factory della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo con l'ausilio di un bioreattore monouso ha permesso di ottenere recuperi cellulari maggiori, ma anche una attività litica più efficace rispetto al metodo tradizionale di coltura in piastra. Sarà ora necessario ottimizzare ulteriormente il protocollo traslandolo in Good Manufacturing Practice (GMP), in vista della possibile applicazione del prodotto cellulare nella prevenzione della recidiva ematologica di LMA dopo TCSE allogenico.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Altieri D. C. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(1), 61–70.
2. Angelescu S. et al. Value of Multifaced Approach Diagnosis and Classification of Acute Leukemias. *Maedica (Bucur)*. 2012; 7(3), 254–260.
3. Anusha V. et al. Acute Myeloid Leukemia. 2024.
4. Arber D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20), 2391–2405.
5. Asada S., Kitamura T. Aberrant histone modifications induced by mutant ASXL1 in myeloid neoplasms. *Int J Hematol*. 2019; 110(2), 179–186.
6. Batayneh O. et al. Characterizing KMT2A Rearrangement in Acute Myeloid Leukemia: A Comprehensive Genomic Study. *Cancers (Basel)*. 2026; 18(1), 161.
7. Bertaina A. et al. Unrelated donor vs HLA-haploidentical α/β T-cell- and B-cell-depleted HSCT in children with acute leukemia. *Blood*. 2018; 132(24), 2594–2607.
8. Bezerra M. F. et al. Co-occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis. *Blood*. 2020; 135(11), 870–875.
9. Bispo J. A. B. et al. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020; 10(6), a034819.
10. Boissel N. et al. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: A study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol*. 2010; 28(23), 3717–3723.
11. Buscarlet M. et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood*. 2017; 130(6), 753–762.
12. Bussaglia E. et al. TET2 missense variants in human neoplasia. A proposal of structural and functional classification. *Mol Genet Genomic Med*. 2019; 7(7), e00772.
13. Caccamo N, Joosten SA, Ottenhoff THM, Dieli F. Atypical Human Effector/Memory CD4+ T Cells With a Naive-Like Phenotype. *Front Immunol*. 2018; 9, 2832.
14. Chao M. P. et al. Therapeutic Targeting of the Macrophage Immune Checkpoint CD47 in Myeloid Malignancies. *Front Oncol*. 2019; 9, 1380.

15. Chauvin J.-M. et al. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020; 8(2), e000957.
16. Chen Y.-F. et al. Allogeneic stem cell transplantation in the treatment of acute myeloid leukemia: An overview of obstacles and opportunities. *World J Clin Cases*. 2023; 11(2), 268–291.
17. Chennamadhavuni A. et al. Leukemia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. 2026.
18. Colombo E. et al. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(7), 529–533.
19. Comoli P. et al. BCR-ABL-specific T-cell therapy in Ph⁺ ALL patients on tyrosine-kinase inhibitors. *Blood*. 2017; 129(5), 582–586.
20. Coppage M. et al. In vitro generation of tumor specific T cells that recognize a shared antigen of AML: Molecular characterization of TCR genes. *Leuk Res*. 2007; 31(2), 195–202.
21. Creutzig U. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2012; 120(16), 3187–3205.
22. Dang L. et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009; 462(7274), 739–744.
23. Daudt L, et al. Interleukin-15 favors the expansion of central memory CD8⁺ T cells in ex vivo generated, antileukemia human cytotoxic T lymphocyte lines. *J Immunother*. 2008 May;31(4):385-93.
24. Davis A. S. et al. Leukemia: An overview for primary care. *Am Fam Physician*. 2014; 89(9), 731–738.
25. Desai R. H. et al. Dissecting the Genetic and Non-Genetic Heterogeneity of Acute Myeloid Leukemia Using Next-Generation Sequencing and In Vivo Models. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(9), 2182.
26. DiNardo C. D. et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2020; 383(7), 617–629.
27. DiNardo C. D. et al. Venetoclax combined with FLAG-IDA induction and consolidation in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2022; 97(8), 1035–1043.
28. DiNardo C. D. et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol*. 2015; 90(8), 732–736.

29. Döhner H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2022; 140(12), 1345–1377.
30. Döhner K., Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008; 93(7), 976–982.
31. Dong Y. et al. PD-L1 Is Expressed and Promotes the Expansion of Regulatory T Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol*. 2020; 11, 1710.
32. Dudley ME, et al. Randomized selection design trial evaluating CD8+-enriched versus unselected tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy for patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2152-9.
33. El Chaer F. et al. The global epidemiology of acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2026a; 23(2), 107–120.
34. El Chaer F. et al. The global epidemiology of acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2026b; 23(2), 107–120.
35. Estey E. H. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2018; 93(10), 1267–1291.
36. Falini B. et al. NPM1-mutated acute myeloid leukemia: From bench to bedside. *Blood*. 2020; 136(15), 1707–1721.
37. Falini B. et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005; 352(3), 254–266.
38. Ferrando M. et al. The continuum of ovarian response leading to BIRTH, a real world study of ART in Spain. *Fertil Res Pract*. 2020; 6, 13.
39. Ferulli F, et al. Generation of donor-derived Wilms tumor antigen 1-specific cytotoxic T lymphocytes with potent anti-leukemia activity for somatic cell therapy in children given haploidentical stem cell transplantation: a feasibility pre-clinical study. *Cytotherapy*. 2019; 21(9), 958-972.
40. Figueroa M. E. et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010; 18(6), 553–567.
41. Fisher C. L. et al. A human homolog of Additional sex combs, ASXL1 maps to chromosome 20q11. *Gene*. 2003; 306, 115–126.
42. Forghieri F. et al. Characterization and dynamics of specific T cells against nucleophosmin-1 (NPM1)-mutated peptides in patients with NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2019; 10(8), 869–882.

43. Friedman A. D., McKnight S. L. Identification of two polypeptide segments of CCAAT/enhancer-binding protein required for transcriptional activation of the serum albumin gene. *Genes Dev.* 1990; 4(8), 1416–1426.
44. Friedman D. L. et al. Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: The Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(14), 1083–1095.
45. Fröhling S. et al. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years. *Blood.* 2006; 108(10), 3280–3288.
46. Gao Q. et al. TET2 mutation in acute myeloid leukemia: Biology, clinical significance, and therapeutic insights. *Clin Epigenetics.* 2024; 16, 155.
47. Garg S. et al. Hepatic leukemia factor is a novel leukemic stem cell regulator in DNMT3A, NPM1, and FLT3-ITD triple-mutated AML. *Blood.* 2019; 134(3), 263–276.
48. Genovese G. et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014; 371(26), 2477–2487.
49. Gilliland D. G. et al. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004; 80–97.
50. Górecki M. et al. Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomedicines.* 2023; 11(3), 821.
51. Greaves M. et al. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012; 481(7381), 306–313.
52. Greiner J et al. Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012; 120, 1282-9.
53. Greiner J. et al. Immune responses against the mutated region of cytoplasmatic NPM1 might contribute to the favorable clinical outcome of AML patients with NPM1 mutations (NPM1mut). *Blood.* 2013; 122(6), 1087–1088.
54. Guarnera L. et al. KMT2A Rearrangements in Leukemias: Molecular Aspects and Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(16), 9023.
55. Haferlach T., Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2020; 188(1), 36–48.
56. Hamann D. et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 1997; 186(9), 1407–1418.
57. Heuser M. et al. Enigmas of IDH mutations in hematology/oncology. *Exp Hematol.* 2015; 43(8), 685–697.

58. Hwang S. M. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res.* 2020; 55(Suppl), S1–S4.
59. Hyde R. K., Liu P. P. RUNX1 Repression Independent Mechanisms of Leukemogenesis by Fusion Genes CBFB-MYH11 and AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1). *J Cell Biochem.* 2010; 110(5), 1039–1045.
60. Issa G. C., DiNardo C. D. Acute myeloid leukemia with IDH1 and IDH2 mutations: 2021 treatment algorithm. *Blood Cancer J.* 2021; 11(6), 107.
61. Jetani H. et al. CAR T-cells targeting FLT3 have potent activity against FLT3-ITD+ AML and act synergistically with the FLT3-inhibitor crenolanib. *Leukemia.* 2018; 32(5), 1168–1179.
62. Kállay K. M. et al. Bispecific Antibodies and Other Non-CAR Targeted Therapies and HSCT: Decreased Toxicity for Better Transplant Outcome in Paediatric ALL? *Front Pediatr.* 2021; 9, 795833.
63. Kamal A. M. et al. Expression of immune check point gene TIM-3 in patients newly diagnosed with acute myeloid leukemia: Significance and impact on outcome. *Oncol Lett.* 2021; 21(4), 325.
64. Kang Z.-J. et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer.* 2016; 35, 48.
65. Kenderian S. S. et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015; 29(8), 1637–1647.
66. Kessler M. D. et al. Common and rare variant associations with clonal haematopoiesis phenotypes. *Nature.* 2022; 612(7939), 301–309.
67. Khong H. T., Restifo N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of ‘tumor escape’ phenotypes. *Nat Immunol.* 2002; 3(11), 999–1005.
68. Kim S. K., Cho S. W. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol.* 2022; 13, 868695.
69. Koedam J. et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol.* 2022; 29(2), 74–83.
70. Kurzrock R. et al. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 1988; 319(15), 990–998.
71. Larson J. K. et al. KMT2A-D pathogenicity, prevalence, and variation according to a population database. *Cancer Med.* 2023; 12(6), 7234–7245.

72. Lee D. W. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*. 2014; 124(2), 188–195.
73. Leszczenko P. et al. Towards Raman-Based Screening of Acute Lymphoblastic Leukemia-Type B (B-ALL) Subtypes. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(21), 5483.
74. Li S. et al. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med*. 1999; 189(9), 1399–1412.
75. Li Z. et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*. 2011; 118(17), 4509–4518.
76. Liquori A. et al. Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(3), 624.
77. Lulla PD, et al. Clinical effects of administering leukemia-specific donor T cells to patients with AML/MDS after allogeneic transplant. *Blood*. 2021;137(19), 2585–2597.
78. Mardis E. R. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009; 361(11), 1058–1066.
79. Maude S. L. et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018; 378(5), 439–448.
80. McMahon C. M. Beyond conventional 7+3 in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2025; 145(17), 1831–1832.
81. Metzeler K. H. et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016; 128(5), 686–698.
82. Meyer C. et al. The KMT2A recombinoome of acute leukemias in 2023. *Leukemia*. 2023; 37(5), 988–1005.
83. Montagna D. et al. Phase I/II clinical trial on the safety and preliminary efficacy of donor-derived anti-leukemia cytotoxic T lymphocytes for the prevention of leukemia relapse in children given haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: Study rational and design. *Front Immunol*. 2025; 16, 1601961.
84. Montesinos P. et al. Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2022; 386(16), 1519–1531.
85. Motz G. T., Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity*. 2013; 39(1), 61–73.

86. Mrózek K., Bloomfield C. D. Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008; (39), 52–57.
87. Mu X. et al. Immunotherapy in leukaemia. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2023; 55(6), 974–987.
88. Ogawa E. et al. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(14), 6859–6863.
89. Okuda M. et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell.* 2000; 103(1), 127–140.
90. Orazi A. Histopathology in the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndromes, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases. *Pathobiology.* 2007; 74(2), 97–114.
91. Ottmann O. G. et al. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood.* 2002; 100(6), 1965–1971.
92. Paczulla A. M. et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature.* 2019; 572(7768), 254–259.
93. Padmakumar D. et al. A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2021; 111, 106727.
94. Paietta E. et al. Biologic heterogeneity in Philadelphia chromosome-positive acute leukemia with myeloid morphology: The Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Leukemia.* 1998; 12(12), 1881–1885.
95. Pan F. et al. Tet2 loss leads to hypermutagenicity in haematopoietic stem/progenitor cells. *Nat Commun.* 2017; 8, 15102.
96. Papaemmanuil E. et al. Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016; 375(9), 900–901.
97. Paschka P. et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol.* 2010; 28(22), 3636–3643.
98. Paschka P. et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: A study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica.* 2015; 100(3), 324–330.

99. Patel J. P. et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366(12), 1079–1089.
100. Patel S. A., Minn A. J. Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies. *Immunity*. 2018; 48(3), 417–433.
101. Pession A. et al. Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 122(2), 170–178.
102. Pizzitola I. et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Leukemia*. 2014; 28(8), 1596–1605.
103. Pollyea D. A. The French-American-British classification system for acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2025; 110(10), 2246–2247.
104. Preudhomme C. et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: A study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. 2002; 100(8), 2717–2723.
105. Pulendran B. et al. Immunological tolerance in germinal centres. *Immunol Today*. 1997; 18(1), 27–32.
106. Qin Y. et al. Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease. *Leuk Res*. 2009; 33(3), 384–390.
107. Quessada J. et al. Cytogenetics of Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Current Knowledge. *Genes (Basel)*. 2021; 12(6), 924.
108. Rau R. E. Beyond KIT in CBF-AML: Chromatin and cohesin. *Blood*. 2016; 127(20), 2370–2371.
109. Riva G. et al. Emergence of BCR-ABL-specific cytotoxic T cells in the bone marrow of patients with Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia during long-term imatinib mesylate treatment. *Blood*. 2010; 115(8), 1512–1518.
110. Rosenberg M. W. et al. Comprehensive molecular characterization of a rare case of Philadelphia chromosome–positive acute myeloid leukemia. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2022; 8(6), a006218.
111. Rowley J. D. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet*. 1973; 16(2), 109–112.

112. Rowley J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973; 243(5405), 290–293.
113. Sadelain M. et al. Therapeutic T cell engineering. *Nature*. 2017; 545(7655), 423–431.
114. Sallusto F. et al. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22, 745–763.
115. Sallusto F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999; 401(6754), 708–712.
116. Sallusto F. et al. The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18, 593–620.
117. Saultz J. N., Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med*. 2016; 5(3), 33.
118. Schürch C. M. Therapeutic Antibodies for Myeloid Neoplasms-Current Developments and Future Directions. *Front Oncol*. 2018; 8, 152.
119. Sengsayadeth S. et al. Overview of approved CAR-T therapies, ongoing clinical trials, and its impact on clinical practice. *EJHaem*. 2022; 3(Suppl 1), 6–10.
120. Sharma N., Liesveld J. L. NPM1 Mutations in AML—The Landscape in 2023. *Cancers (Basel)*. 2023; 15(4), 1177.
121. Sheikhi M. et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Caspian J Intern Med*. 2024; 15(2), 202–214.
122. Shen Y. et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011; 118(20), 5593–5603.
123. Siegel R. L. et al. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin*. 2025; 75(1), 10–45.
124. Siegel R. L. et al. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017; 67(1), 7–30.
125. Smith L. T. et al. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 1996; 88(4), 1234–1247.
126. Smits E. L. J. M. et al. Immunotherapy of acute myeloid leukemia: Current approaches. *Oncologist*. 2009; 14(3), 240–252.

127. Snaith O. et al. Cytogenetics and genomics of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2024; 37(1), 101533.
128. Snyder R. Leukemia and benzene. *Int J Environ Res Public Health.* 2012; 9(8), 2875–2893.
129. Snyder A. et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med.* 2014; 371(23), 2189-2199.
130. Solh M. et al. Core-binding factor acute myeloid leukemia: Heterogeneity, monitoring, and therapy. *Am J Hematol.* 2014; 89(12), 1121–1131.
131. Stade K. et al. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell.* 1997; 90(6), 1041–1050.
132. Stieglitz E., Loh M. L. Genetic predispositions to childhood leukemia. *Ther Adv Hematol.* 2013; 4(4), 270–290.
133. Stone R. M. et al. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012; 26(9), 2061–2068.
134. Stone R. M. et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med.* 2017; 377(5), 454–464.
135. Tashiro H. et al. Treatment of Acute Myeloid Leukemia with T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Directed to C-type Lectin-like Molecule 1. *Mol Ther.* 2017; 25(9), 2202–2213.
136. Tebbi C. K. Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers (Basel).* 2021; 13(9), 2256.
137. Terwilliger T., Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017; 7(6), e577–e577.
138. Thiede C. et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 2006; 107(10), 4011–4020.
139. Thol F. et al. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010; 116(4), 614–616.
140. Thol F., Ganser A. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* 2020; 21(8), 66.
141. Tien F.-M. et al. CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: Implications in risk stratification and treatment. *Int J Hematol.* 2024; 120(5), 541–547.

142. Tien F.-M. et al. Concomitant WT1 mutations predict poor prognosis in acute myeloid leukemia patients with double mutant CEBPA. *Haematologica*. 2018; 103(11), e510–e513.
143. Tojo A. et al. A Phase I/II study of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL. *Int J Hematol*. 2009; 89(5), 679–688.
144. Tseng S. et al. A Review of Childhood Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis and Novel Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023; 16(11), 1614.
145. Tulstrup M. et al. TET2 mutations are associated with hypermethylation at key regulatory enhancers in normal and malignant hematopoiesis. *Nat Commun*. 2021; 12(1), 6061.
146. Vardiman J. W. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact*. 2010; 184(1–2), 16–20.
147. Wang Y. et al. A review of common immunotherapy and nano immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Front Immunol*. 2025; 16, 1505247.
148. Weber G, et al. Generation of multi-leukemia antigenspecific T cells to enhance the graft-versus-leukemia effect after allogeneic stem cell transplant. *Leukemia*. 2013; 27(7), 1538-47.
149. Weber G, et al. WT1 peptide-specific T cells generated from peripheral blood of healthy donors: possible implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2009; 23(9), 1634-42.
150. Welch J. S. et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012; 150(2), 264–278.
151. Wu H. et al. CAR-T and CAR-NK cell therapies in AML: Breaking barriers and charting the future. *J Transl Med*. 2025; 23, 1163.
152. Yamamoto J. F., Goodman M. T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control*. 2008; 19(4), 379–390.
153. Yamazaki J. et al. TET2 Mutations Affect Non-CpG Island DNA Methylation at Enhancers and Transcription Factor-Binding Sites in Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Cancer Res*. 2015; 75(14), 2833–2843.
154. Yang L. et al. DNMT3A in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2015; 15(3), 152–165.

155. Yates J. W. et al. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep.* 1973; 57(4), 485–488.
156. Yu Y. et al. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(10), 3798–3809.
157. Zhang X. et al. TET (Ten-eleven translocation) family proteins: Structure, biological functions and applications. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8(1), 297.
158. Zhou Y. et al. Global, regional, and national burden of acute myeloid leukemia, 1990-2021: A systematic analysis for the global burden of disease study 2021. *Biomark Res.* 2024; 12(1), 101.