

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

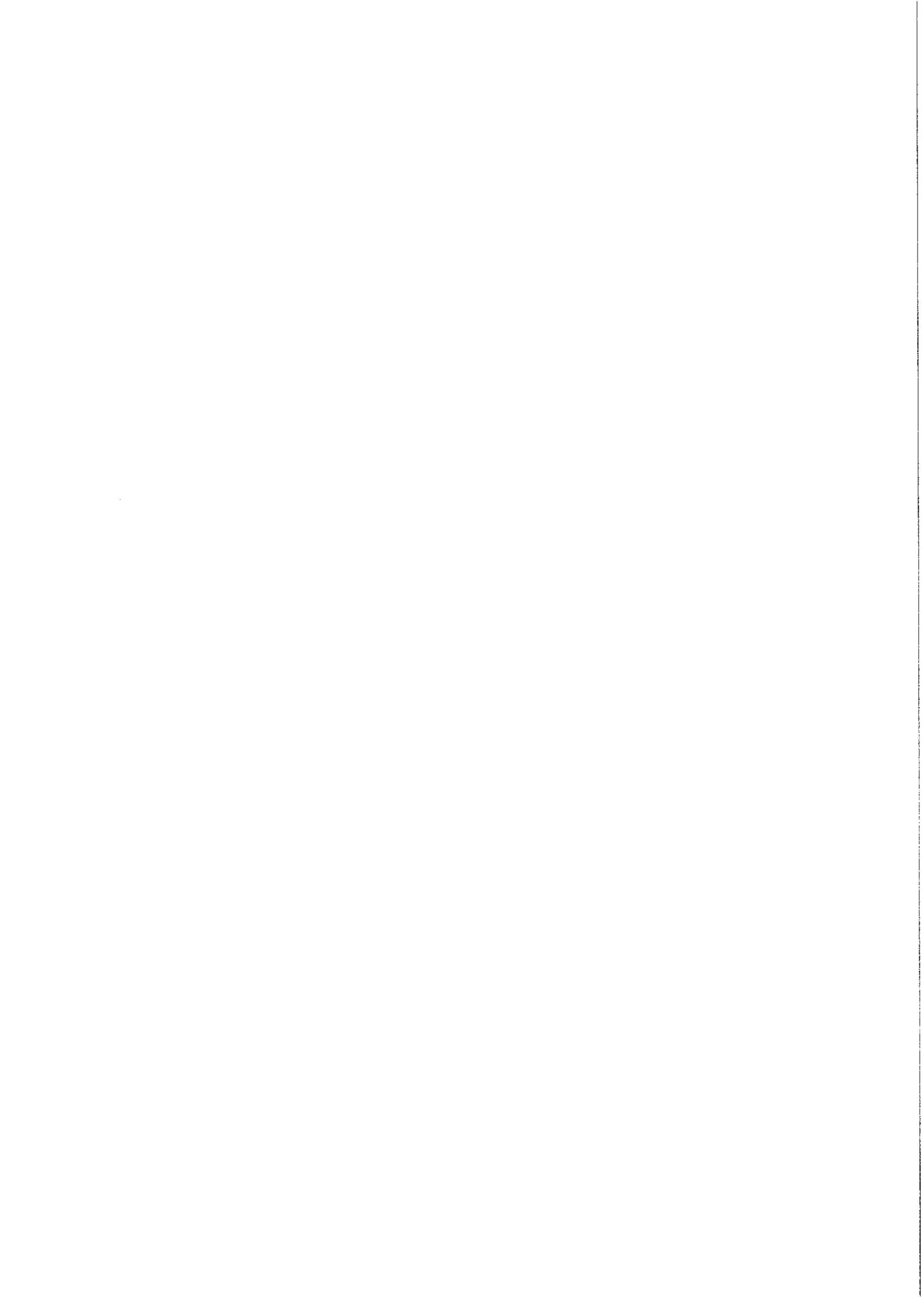
**LE CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE COME TARGET TERAPEUTICO
PER IL TRATTAMENTO DELLE LEUCEMIE**

**LEUKEMIA STEM CELLS AS A THERAPEUTIC TARGET FOR THE
TREATMENT OF LEUKEMIAS**

RELATRICE: CHIAR.MA PROF.SSA MARIA TERESA CONCONI

LAUREANDA: JESSICA MELOTTI

ANNO ACCADEMICO 2017-2018



INDICE GENERALE

INTRODUZIONE	3
1. IL MIDOLLO OSSEO	5
1.1. STRUTTURA	6
1.1.1. Vascolarizzazione nel midollo osseo	6
1.1.2. Nicchia midollare	7
1.1.3. Micro-ambiente immunitario del midollo osseo	9
1.1.4. Interazioni fra midollo osseo ed endostio	12
2. TUMORI MALIGNI NEL MIDOLLO OSSEO	13
2.1. MIELOMA MULTIPLO	13
2.2. SINDROMI MIELO-DISPLASTICHE (MDS)	14
2.3. LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	17
2.4. LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA	19
2.5. METASTASI OSSEE	20
3. LE CELLULE STAMINALI TUMORALI	23
3.1. ETEROGENEITÀ GENETICHE ED EPIGENETICHE DELLE LSC	25
3.2. MOLECOLE DI SUPERFICIE E MICROAMBIENTE DELLE LSC E RELATIVE IMPLICAZIONI CLINICHE	26
3.2.1. Molecole di superficie delle LSC	26
3.2.2. Micro-ambiente associato alle LSC	28
3.3. MOLECOLE INTRACELLULARI E SEGNALAZIONE DELLE LSC	28
3.3.1. Vie di segnale critiche coinvolte nella regolazione delle LSC	28
3.3.2. Coinvolgimento funzionale di RNA non codificanti nella emopoiesi tumorale	30
3.3.3. Regolazione delle neoplasie ematopoietiche da parte dei miRNA	30
3.3.4. Coinvolgimento di lncRNA nella genesi della leucemia	31
4. EVASIONE IMMUNITARIA DA PARTE DELLE CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE E NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI PER EVITARLA	33
4.1. CARATTERISTICHE IMMUNO-FENOTIPICHE E FUNZIONALI DELLE LSC	33
4.2. TARGETING DI ANTIGENI ASSOCIATI A LSC PER SUPERARE LA RESISTENZA TERAPEUTICA	37

5. STRATEGIA DI DELIVERY DI FARMACI AL MIDOLLO OSSEO	46
5.1. TARGETING PASSIVO	48
5.2. TARGETING DEL MIDOLLO OSSEO MEDIATO DALLA CATTURA DEI MACROFAGI	49
5.3. TARGETING DEL MIDOLLO OSSEO MEDIATO DAL LEGAME ALLA SUPERFICIE OSSEA	51
5.4. TARGETING VASCOLARE	53
5.5. TARGETING SPECIFICO DELLE CELLULE TUMORALI SPECIFICHE ALL' INTERNO DEL MIDOLLO OSSEO	56
CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA	60
SITOGRAFIA	77
RINGRAZIAMENTI	78

INTRODUZIONE

La leucemia è una neoplasia delle cellule del sangue che interessa i tessuti ematopoietici del corpo, incluso il midollo osseo e il sistema linfatico. La parola leucemia deriva dal greco: *Leukos* "bianco" e *aima* "sangue", letteralmente "sangue bianco" poiché la maggior parte delle leucemie comporta una significativa alterazione della morfologia e funzione dei leucociti o globuli bianchi (numero elevato di leucociti anormali). In base alle caratteristiche cliniche e al tipo di cellule coinvolte nel processo tumorale le leucemie sono classificate in acute, croniche, mieloidi e linfoidei.

-Leucemie linfoidei (o linfoatiche): quando il tumore colpisce i linfociti (soprattutto i *linfociti B*) o cellule della linea linfoide

-Leucemie mieloidi: quando la trasformazione maligna riguarda le componenti della linea mieloide (eritrociti, piastrine e alcuni tipi di globuli bianchi come monociti e granulociti)

-Leucemie acute: accumulo di cellule immature a livello del midollo osseo e del sangue periferico. Sono caratterizzate da decorso rapido e comparsa precoce dei sintomi (emorragia, anemia, infezione, infiltrazione di organi). E' richiesto un trattamento immediato. Sono più comuni nei bambini

-Leucemie croniche: accumulo progressivo nel midollo osseo e nel sangue periferico di cellule relativamente mature, in parte ancora funzionanti. Hanno un decorso più lento, la proliferazione è meno rapida per poi diventare più aggressiva col tempo (peggioramento della sintomatologia). Molti pazienti sono asintomatici mentre altri manifestano febbre, perdita di peso, splenomegalia (aumento di volume della milza), trombosi, emorragie ed infezioni frequenti. Possono essere monitorate per un certo tempo prima di iniziare il trattamento al fine di garantire la massima efficacia della terapia. Sono più comuni nelle persone anziane.

Questa tesi, suddivisa in cinque capitoli, vuole dimostrare la presenza e l'importanza delle cellule staminali tumorali nella nicchia midollare in seguito al danno acuto o cronico che causa la leucemia, riportando i principali interventi farmacologici ad esse correlate.

Il primo capitolo spiega la struttura e le funzioni del midollo osseo: vascolarizzazione e caratteristiche generali della nicchia midollare la quale comprende numerose cellule di origine mesenchimale ed ematopoietica e rappresenta un micro-ambiente unico in grado di mantenere le cellule staminali ematopoietiche. Oltre al suo ruolo di organo linfoide primario il midollo osseo ospita vari tipi di cellule linfoide mature, tra cui cellule T naïve, cellule T della memoria e plasmacellule ed elementi mieloidi maturi come monociti/macrofagi e neutrofili che sono tutti di fondamentale importanza per controllare l'inizio della leucemia e la sua progressione. La nicchia midollare fornisce un ambiente idoneo per la colonizzazione da parte delle cellule tumorali data la sua capacità di fornire segnali che accelerano la proliferazione delle cellule tumorali e ne facilitano la sopravvivenza. La parte finale

del capitolo è, infatti, incentrata sulle interazioni molecolari e strutturali tra cellule tumorali e midollo osseo malato.

Il secondo capitolo riassume le molteplici malattie maligne che coinvolgono il midollo osseo compresa la leucemia acuta e cronica, il mieloma multiplo, le sindromi mielo-displastiche e le metastasi ossee da tumori solidi. Queste neoplasie influenzano la normale omeostasi e rimodellano il microambiente del midollo osseo.

Il terzo capitolo descrive gli studi che hanno contribuito all'identificazione e alla caratterizzazione delle cellule staminali leucemiche (LSC) o cellule staminali tumorali (CSC) in vari tessuti le quali sono state scoperte per la prima volta nel 1997 nella leucemia mieloide acuta (AML). Le LSC sono ora generalmente riconosciute come una **popolazione cellulare eterogenea** che possiede le **capacità di auto-rinnovamento, proliferazione e differenziazione**. È stato dimostrato che le LSC sono regolate da antigeni di superficie critici, dal microambiente, da vie di segnalazione intrinseche e da nuove molecole come alcuni ncRNA. Ad oggi sono stati compiuti significativi progressi nella comprensione delle LSC, portando allo sviluppo di numerose terapie mirate. Inoltre, vari nuovi agenti terapeutici destinati alle LSC sono attualmente in studio clinico. Nell'ultima parte del capitolo vengono, infatti, discusse le potenziali terapie e le relative sfide che sono state testate in studi clinici per la valutazione dei loro effetti sulle leucemie.

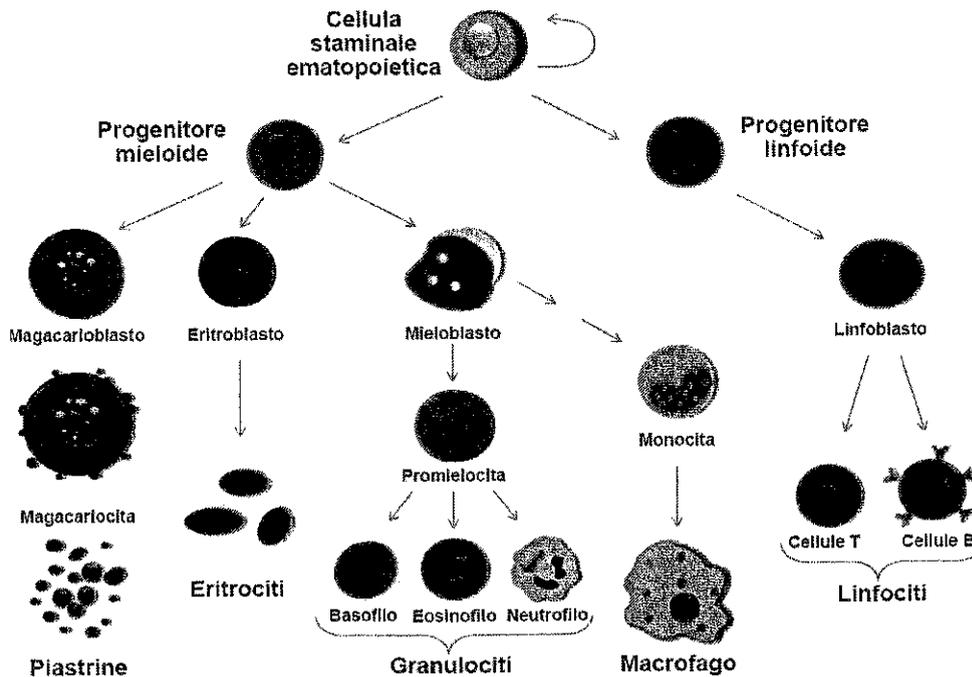
Il quarto capitolo illustra le caratteristiche immuno-fenotipiche e funzionali delle CSC le quali possiedono un distinto profilo immunologico rispetto alle cellule tumorali che formano la massa del tumore e hanno evoluto strategie complesse per sopprimere le risposte immunitarie attraverso meccanismi multipli, quali il rilascio di fattori solubili e la sovra-espressione di molecole implicate nell'evasione immunitaria del tumore. Nella parte conclusiva del capitolo vengono messe in evidenza le strategie immuno-terapiche attuali e future per colpire le CSC leucemiche e superare la farmaco-resistenza in clinica.

Il quinto ed ultimo capitolo riporta le opzioni di trattamento per le neoplasie riguardanti il midollo osseo le quali risultano essere limitate a causa dell'inevitabile peggioramento di queste neoplasie. L'attuale somministrazione sistemica degli agenti antitumorali difficilmente raggiunge una dose terapeutica ideale per sopprimere la crescita tumorale nei siti affetti del midollo osseo ed è sempre associata ad un'alta incidenza di recidiva e a gravi effetti collaterali. Le limitazioni dei trattamenti attuali sollecitano i ricercatori a sviluppare sistemi di rilascio dei farmaci mirati al midollo osseo destinati al trattamento del midollo osseo malato, che possono migliorare l'efficacia degli agenti terapeutici e ridurre i loro effetti collaterali sistemici dose-limitanti sui tessuti sani. Vengono dunque evidenziate le diverse razionalità e strategie progettuali, dei sistemi di rilascio al midollo osseo e le loro applicazioni terapeutiche per il trattamento delle neoplasie nel midollo osseo.

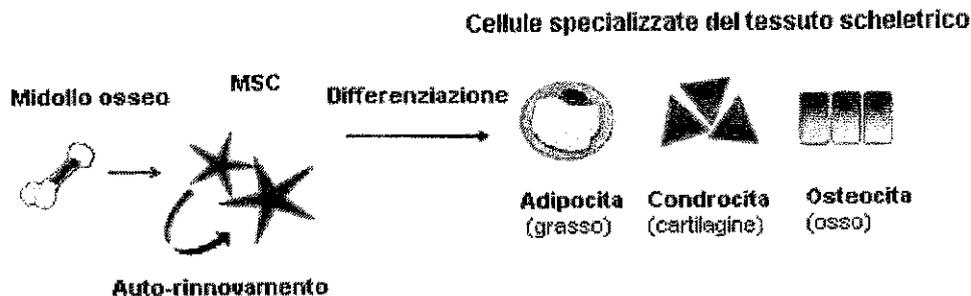
1. IL MIDOLLO OSSEO

Il midollo osseo è l'organo ematopoietico primario dove avviene la produzione delle cellule ematiche a partire dal 6-7° mese di vita fetale. Nell'adulto, è presente in alcune ossa del cranio, nello sterno, nell'osso iliaco, nelle costole e nel tessuto spugnoso delle epifisi delle ossa lunghe, quali femore e omero. Contiene:

- **Cellule staminali ematopoietiche (HSC)** che si differenziano in linee cellulari mieloidi e linfoidi.



- **Cellule staminali mesenchimali (MSC)** che danno origine a diverse linee cellulari, come osteoblasti, fibroblasti, cellule endoteliali e altre cellule stromali.



Tutti questi tipi di cellule, assieme alla matrice extracellulare (ECM) e ai micro-vasi (capillari ed arteriole) includono il microambiente del midollo osseo in una struttura spugnosa. Le MSC principalmente supportano il processo di emopoiesi tramite contatto diretto cellula-cellula o attraverso interazioni indirette con HSC o cellule progenitrici tramite rilascio di fattori solubili (chemochine, citochine, fattori di crescita, ecc.) nel midollo osseo.

1.1 STRUTTURA

1.1.1. VASCOLARIZZAZIONE NEL MIDOLLO OSSEO

Ci sono tantissimi vasi sanguigni e capillari che attraversano l'osso e il midollo osseo. La vascolarizzazione del midollo osseo comprende una complessa e funzionale rete micro-vascolare che fornisce sostanze nutritive e ossigeno, un supporto strutturale e una via di uscita per le cellule del sangue mature [Ewalt M.D. et al, 2016]. Inoltre, l'osso e la rete micro-vascolare del midollo osseo sono ampiamente interconnesse. Vasi sanguigni intra-ossei, presenti in modo non uniforme all'interno del osso trabecolare o corticale, si connettono con vasi del midollo e fluiscono continuamente all'interno dell'osso. (figura 1A). I micro-vasi si distribuiscono in modo casuale nell'osso (figura 1B), e il flusso sanguigno si muove attraverso percorsi tortuosi e cambia velocità attraverso l'osso e il midollo osseo. Il lento flusso sanguigno facilita l'interazione tra le cellule del sangue e le cellule endoteliali attraverso molecole di adesione cellulare nei sinusoidi. L'endostio è un sottile strato di connettivo localizzato all'interfaccia tra osso e midollo osseo. Un'abbondanza di arteriole e sinusoidi è presente vicino all'endostio (Figura 1C). La nascente cavità midollare scavata dagli osteoclasti contribuisce alla trasformazione delle arteriole in sinusoidi di grandi dimensioni (figura 1D).

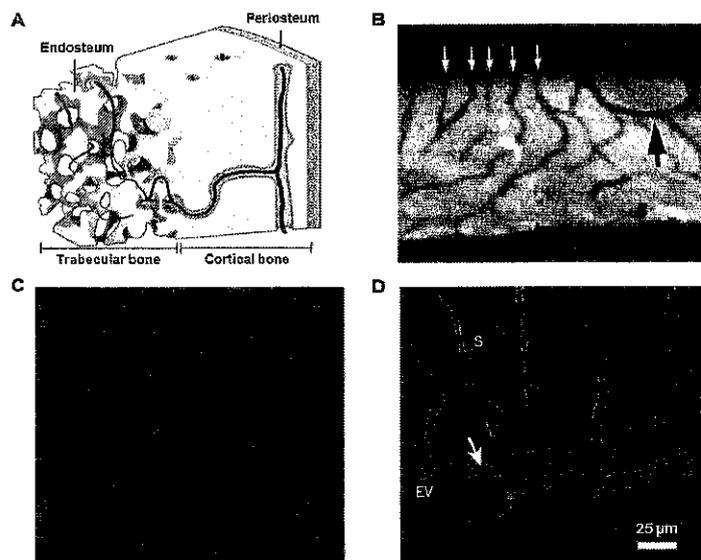


Figura 1. Vascolarizzazione nell'osso e nel midollo osseo. [da Nombela-Arrieta C. et al, 2013]
(A) Distribuzione dei vasi sanguigni nell'osso trabecolare e corticale.
(B) Rete di vasi intra-corticali che si aprono nel midollo osseo sulla superficie ossea (freccie bianche) nel micro-radiografia di una sezione della tibia di ratto (50 micrometri). **La freccia nera** indica il vaso che si avvolge nell'osso e rientra nel midollo osseo.
(C) Rete di vasi (rosso) dal midollo osseo verso la superficie dell'endostio (blu) nella microfotografia ricostruita in 3D da 50 micrometri sotto la superficie.
(D) La sezione trasversale dei vasi sanguigni lungo la superficie dell'endostio (blu).

EV: vasi dell'endostio; S: sinusoidi; freccie bianche: transizione da arteriole a sinusoidi

I vasi sanguigni tra il midollo osseo e la circolazione periferica formano una barriera funzionale estremamente sottile (meno di 2-3 micrometri), definita come barriera sangue-midollo. È compresa di seni con uno strato continuo di cellule endoteliali e uno strato non continuo di cellule reticolari. I sinusoidi sono venule specializzate che costituiscono una struttura reticolare di capillari fenestrati che permettono alle cellule di entrare e uscire dalla circolazione. Ci sono fenestrazioni relativamente grandi (30-40 micrometri di diametro) nell'endotelio dei capillari sinusoidali. Questi consentono ai globuli rossi maturi (7,5-25 micrometri), alle proteine del siero e a particelle estranee di passare e questo processo è facilitato da una lamina basale, che viene attivata tramite l'interazione tra questi costituenti e l'endotelio. D'altra parte, era stato riportato che le cellule tumorali migrando nel midollo osseo prima aderiscono all'endotelio dei sinusoidi e poi oltrepassano la barriera sangue-midollo. Le cellule tumorali trasmigrano attraverso la barriera con successo grazie al loro legame selettivo alla rete di cellule reticolari avventiziali e alla matrice extra-sinusoidale. Vasi sanguigni sono richiesti per rilasciare nutrienti vitali e ossigeno per la progressione del tumore. Cellule endoteliali con caratteristiche funzionali e morfologiche hanno la capacità di indurre la neovascolarizzazione, promuovere la crescita del tumore tramite segnali e fattori di crescita paracrini. L'angiogenesi gioca un ruolo chiave non solo nei tumori solidi ma anche in neoplasie ematologiche come leucemie acute e croniche, linfoma, sindromi mielodisplastiche e mieloma multiplo [Stasi R et al, 2002]. Una densità micro-vascolare del midollo significativamente più alta assieme all'aumento dei livelli sierici del *fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)* sono stati osservati nei pazienti con neoplasie ematologiche rispetto a volontari sani. Il livello di angiogenesi nel midollo osseo di pazienti con diversi tipi di leucemia è associato alle loro implicazioni terapeutiche e alla loro prognosi.

1.1.2. NICCHIA MIDOLLARE

La nicchia midollare è un'entità fisica e funzionale, un microambiente specializzato di essenziale importanza e di supporto per l'auto-rinnovamento e la differenziazione a lungo termine delle cellule staminali. È una struttura 3D situata in prossimità dell'osso trabecolare [Reagan M.R. et al, 2016]. L'osso spugnoso (o trabecolare) lo si ritrova principalmente nella parte più interna delle ossa, a livello delle ossa più brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe. Si presenta come una spugna e al suo interno si notano molti spazi tra le trabecole variamente orientate ed intersecate tra loro che determinano cavità dette *cavità midollari* contenenti midollo rosso (ematopoietico) e giallo (grasso). L'osso spugnoso permette ai muscoli di muovere le ossa più agevolmente ed è quindi adatto a sopportare sollecitazioni non troppo forti ma che arrivano da diverse direzioni. Questo tipo di osso è più abbondante a livello della colonna vertebrale, delle costole, della mascella e del polso. Costituisce il 20% della massa scheletrica ma rappresenta la componente metabolica più attiva.

I componenti cellulari della nicchia del midollo osseo possono essere classificati in 2 tipi funzionali:

1. cellule essenziali come cellule endoteliali, cellule stromali mesenchimali (MSC) e megacariociti che forniscono segnali in stretta vicinanza alle cellule staminali ematopoietiche (HSC) che sono destinate alla differenziazione e alla successiva esportazione nella circolazione
2. cellule accessorie come osteoblasti, macrofagi specializzati residenti nel tessuto e cellule nervose con effetto a lungo raggio ed influenze spesso indirette sulle HSC.

Le cellule staminali si trovano sull'endostio in prossimità degli osteoblasti (nicchia endostale) e sono anche associate alle cellule endoteliali vascolari attorno a vasi sinusoidali (nicchia vascolare) nella cavità del midollo osseo (Fig. 2).

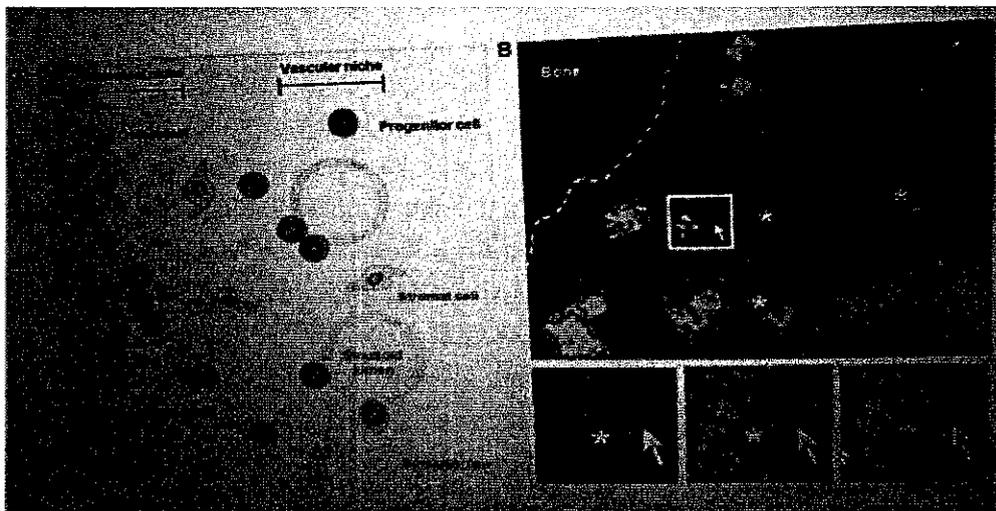


Figura 2. La nicchia endostale e quella vascolare all'interno del midollo osseo

Le cellule vascolari ed endostali contribuiscono alla formazione delle nicchie delle HSC.

(A) Illustrazione schematica della nicchia endostale e di quella vascolare.

Osteoblasti, osteoclasti e altre cellule stromali producono vari fattori coinvolti nella regolazione delle HSC. Le cellule endoteliali, le cellule reticolari peri-vascolari e le cellule stromali mesenchimali partecipano alla regolazione delle HSC attorno ai sinusoidi.

(B) Un tipico complesso della nicchia vascolare con HSC nel midollo osseo (*, lume dei sinusoidi).

Le HSC (freccia bianca) sono CD150⁺CD48⁻CD41⁻ lineage⁻ (Rosso: CD150; Verde: CD48, CD41 e lineage). [da Kiel M.J. et al, 2008]

Quindi le HSC risiedono all'interno di aree specializzate del micro-ambiente midollare, definite come due distinte nicchie osteoblastiche e vascolari:

1. La nicchia osteoblastica localizzata sulla superficie interna della cavità ossea fornisce un micro-ambiente per le HSC a lungo termine che contribuiscono all'ematopoiesi come cellule quiescenti o a ciclo lento.
2. La nicchia vascolare consiste delle cellule endoteliali dei sinusoidi che rivestono i vasi sanguigni e promuovono la proliferazione e la

differenziazione delle ciclanti HSC a breve termine. Numerosi altri elementi cellulari con funzioni specializzate, quali le cellule immunitarie, forniscono distinti segnali chimici e interazioni fisiche essenziali per il mantenimento delle HSC e per regolare la produzione di sangue. La nicchia comprende anche elementi della matrice e micro-capillari che modellano la composizione biochimica unica dell'ambiente midollare. Per esempio, le HSC quiescenti tendono a risiedere in aree relativamente ipossiche (carenti di ossigeno) poco perfuse che attivano adattamenti metabolici che impediscono la differenziazione.

La nicchia midollare gioca un ruolo importante nella sopravvivenza, differenziazione, proliferazione, migrazione e resistenza ai farmaci delle cellule tumorali maligne all'interno del midollo osseo. La normale nicchia delle cellule staminali come nuovo microambiente ospite non è ben adatta alle cellule tumorali che differenziano e che si diffondono per metastasi in essa, ma può essere modificata dalle cellule tumorali leucemiche o di un tumore solido, risultando nella sostituzione del midollo osseo con la leucemia o la metastasi. E' stato infatti dimostrato che le cellule progenitrici ematopoietiche derivate dal midollo osseo che esprimono il recettore 1 per VEGF (VEGFR1) e il *very late antigen 4* (VLA-4) nelle nicchie del midollo osseo avviano un sito pre-metastatico per l'attecchimento delle cellule tumorali [Kaplan et al, 2005]. Le nicchie di cellule staminali trasformate aberranti spingono ulteriormente la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali, e regolano la resistenza alla chemioterapia.

1.1.3. IL MICROAMBIENTE IMMUNITARIO DEL MIDOLLO OSSEO

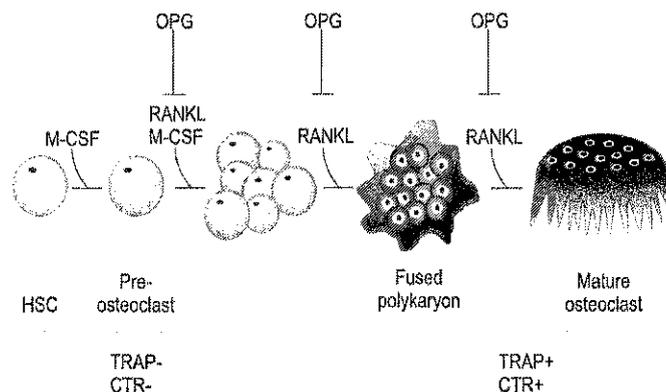
Il midollo osseo è convenzionalmente visto come un organo linfoide primario contenente varie popolazioni di cellule immunitarie (Figura 3). Durante il giorno miliardi di linfociti ri-circolano attraverso il midollo osseo. I linfociti sono distribuiti attraverso il parenchima e lo stroma del midollo, sono condensati in strutture simili ai follicoli e comprendono l'8-20% delle cellule mononucleate midollari, con un rapporto tra le cellule T e le cellule B di 5:1. Le plasmacellule produttrici di anticorpi rappresentano l'1% della popolazione mononucleata del midollo osseo. Le plasmacellule si trovano nelle vicinanze di cellule reticolari (RC) ricche di CXCL12 e dipendono dalla segnalazione di CXCL12 attraverso CXCR4 per l'*homing* nel midollo osseo [Nie Y. et al, 2004]. Altri tipi di cellule mature, come megacariociti ed eosinofili, hanno mostrato di contribuire alla nicchia delle plasmacellule. All'inizio nello sviluppo linfoide, i precursori delle cellule B rimangono nel midollo osseo, mentre i progenitori delle cellule T migrano al timo. Le RC (cellule reticolari), una sottopopolazione di MSC (cellule staminali mesenchimali) identificate in un modello genetico di topo [Sugiyama T. et al, 2006], si sono rilevate essere in stretta associazione con le cellule pre-proB, i primi precursori delle cellule B [Tokoyoda K. et al, 2004]. Le RC mantengono anche le HSC in uno stato indifferenziato, come dimostrato dalla differenziazione mieloide accelerata in risposta ad un'ablazione di

queste cellule [Omatsu Y. et al, 2010]. Gruppi di cellule dendritiche (DC) coesistono con cellule T naïve (cellule T a cui non è stato ancora presentato l'antigene) e cellule B nella spazio peri-sinusoidale del midollo osseo, come mostrato dall'imaging multi fotonico [Sapoznikov A. et al, 2008]. Le DC residenti nel midollo osseo trasmettono segnali di sopravvivenza alle cellule B attraverso la produzione del fattore di inibizione della migrazione dei macrofagi (MIF) e la loro ablazione porta alla perdita specifica di cellule B mature [Sapoznikov A. et al, 2008]. I fattori richiesti per la sopravvivenza delle cellule T nel midollo osseo sono meno chiaramente definiti. Le DC peri-sinusoidali possono cross-presentare antigeni presenti nel sangue, alle cellule T residenti nel midollo osseo, indicando un ruolo protettivo contro i patogeni [Feuerer M. et al, 2003].

Circa un terzo delle cellule T CD4⁺ midollari sono cellule T regolatorie (Treg) nell'uomo, includendo cellule Treg "attivate" o della memoria il cui traffico è regolato da CXCL12 in condizioni omeostatiche. Le cellule T naïve contribuiscono per il 20% delle cellule T CD8⁺ residenti nel midollo osseo, con i sottogruppi più grandi (circa 30% ciascuno) che sono cellule T CD45RA⁻CCR7⁺ della memoria centrale e cellule T effettrici CD45RA⁻CCR7⁻ della memoria [Mazo I.B. et al, 2005]. Una frazione più piccola è costituita da cellule T effettrici CD45RA⁺CCR7⁻. Le cellule T CD4⁺ della memoria a lunga vita sono localizzate a stretto contatto con cellule stromali secernenti IL-7. IL-7 (interleuchina 7) è responsabile del mantenimento della quiescenza delle cellule T in assenza di reclutamento e segnalazione del recettore dell'antigene. Esperimenti su topi hanno dimostrato che le cellule T della memoria centrale aderiscono ai micro-vasi del midollo osseo più efficientemente rispetto alle cellule T effettrici [Mazo I.B. et al, 2005]. Questa interazione è mediata da PSGL-1 (ligando della glicoproteina P-selectina1) su cellule T circolanti della memoria centrale e da selectine su cellule endoteliali. Inoltre, l'integrina α -4 VLA-4 (very late antigen-4) e il suo ligando vascolare VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecole-1) svolgono un ruolo importante nell'arresto delle cellule T della memoria centrale nei micro-vasi del midollo osseo [Mazo I.B. et al, 2005]. È interessante notare che i marcatori che indicano un'esperienza antigenica, come CD44 e CD122, possono essere rilevati su due terzi delle cellule T del midollo osseo. Infine, le cellule immunitarie mieloidi, come i neutrofili e i monociti, risiedono in nicchie specifiche all'interno del midollo osseo. In condizioni di stato stazionario (steady state), entrambi i tipi di cellule esprimono CXCR4 e vengono trattenuti nel midollo osseo attraverso la segnalazione indotta da CXCL12. Durante l'infiammazione, i neutrofili vengono rilasciati attraverso l'interazione con CXCL1 e CXCL2, cioè con ligandi CXCR2 prodotti dai megacariociti. Al contrario, i monociti vengono rilasciati attraverso l'interazione di CCR2 con CCL2 prodotto da RC, MSC e cellule endoteliali. Il midollo osseo serve anche per altre funzioni, fungendo da organo linfoide secondario dove le risposte delle cellule T e delle cellule B sono iniziate. Altre caratteristiche di un organo linfoide secondario includono la presenza di strutture simili ai follicoli e la capacità del midollo osseo di controllare le malattie sistemiche, come quelle infiammatorie, infettive e autoimmuni. Nei topi, il midollo osseo contiene 1-5% di cellule T CD3⁺ e 1-2% di cellule dendritiche (DC)

1.1.4. INTERAZIONI TRA MIDOLLO OSSEO ED ENDOSTIO

L'endostio come interfaccia tra l'osso e il midollo osseo è ricoperto da osteoblasti che formano l'osso, osteoclasti che riassorbono l'osso (cellule multi-nucleate differenziate originate da progenitori mononucleati della linea mieloide) e cellule di rivestimento. Tutte queste cellule derivano da specifiche cellule progenitrici nel midollo osseo. Un gran numero di segnali interni ed esterni manipola i delicati equilibri della differenziazione delle MSC e dei precursori delle HSC. Questi diversi fattori inducono varie vie di segnalazione e attivano fattori di trascrizione che facilitano questi precursori a differenziarsi in osteoblasti o osteoclasti nel midollo osseo. In condizioni patologiche anormali come il mieloma multiplo e metastasi ossee da tumori solidi, le cellule tumorali producono mediatori chimici tra cui l'interleuchina 6 (IL-6) e il *receptor activator of nuclear factor κ -B ligand* (RANKL) per stimolare l'attività degli osteoclasti nel midollo osseo [Ara T. et al, 2010]. L'aumento della formazione e dell'attività degli osteoclasti portano ad un riassorbimento osseo superiore alla formazione, che provoca lesioni osteolitiche dolorose e aumento dei rischi di frattura ossea. D'altra parte, osteoblasti e osteoclasti regolano direttamente la nicchia endostale delle HSC. Sebbene le cellule leucemiche non causino lo squilibrio del rimodellamento osseo tra la formazione e il riassorbimento osseo, alterano il microambiente vicino all'endostio. Le isoforme di CD44 si legano all'acido ialuronico espresso attorno all'endostio, che è in grado di aiutare le cellule staminali leucemiche (LSC) ad installarsi nel midollo osseo per la progressione della leucemia [Williams D.A. et al, 2006].



Il paratormone (PTH) stimola l'osteoclasto-genesi in maniera indiretta, agendo cioè sugli osteoblasti. Questi ultimi sotto l'influenza del PTH secernono una citochina (M-CSF) e una proteina chiamata RANKL per le quali i monociti possiedono un recettore specifico. Queste molecole prodotte interagiscono con i monociti inducendoli a differenziare in osteoclasti. Per mitigare l'azione di RANKL gli osteoblasti secernono un finto recettore solubile, chiamato osteoprotegerina (OPG), che legandosi a RANKL ne impedisce l'interazione col corretto recettore RANK presente, come già detto, sulla superficie dei monociti. L'equilibrio fra produzione di RANKL, M-CSF e OPG stabilisce il livello di osteoclasto-genesi.

2. TUMORI MALIGNI NEL MIDOLLO OSSEO

Ci sono molte condizioni anormali e malattie incluse le neoplasie o le infezioni in grado di influenzare la funzione e rimodellare la struttura del midollo osseo. In corrispondenza, anche il microambiente del midollo osseo promuove la progressione della malattia e influenza la risposta agli agenti terapeutici all'interno del midollo osseo. In questa parte vengono riassunte le neoplasie più tipiche coinvolte nel midollo osseo. Sono evidenziate le interazioni molecolari tra le cellule tumorali e il microambiente midollare, così come le attuali situazioni terapeutiche di questi tumori maligni.

2.1. MIELOMA MULTIPLO

Il mieloma multiplo è una malattia ematologica aggressiva causata dall'accumulo e dalla proliferazione di plasmacellule neoplastiche nel midollo osseo. Rappresenta approssimativamente il 10% dei tumori ematologici. Le cellule del mieloma multiplo migrano nel midollo osseo e diffondono in nicchie specializzate che facilitano la loro sopravvivenza a lungo termine [Morgan G.J. et al, 2012]. *SDF-1/C-X-C chemokine receptor-4* (CXCR4) è un regolatore critico dell'*homing* del mieloma multiplo nel microambiente del midollo osseo e della formazione di nicchie neo-angiogeniche. Questo asse chemochina-recettore può essere un target desiderabile per le terapie al fine di abrogare il *trafficking* del mieloma multiplo. Nel frattempo, anche gli osteoblasti possono mantenere la sopravvivenza e la crescita delle cellule di mieloma multiplo secernendo IL-6. In particolare, l'interazione tra queste cellule e quelle stromali innesca la via di segnalazione del fattore nucleare k-B (NFkB) e la secrezione di IL-6 nelle cellule stromali. Questo ciclo paracrino altera l'ambiente del midollo osseo per la crescita delle cellule del mieloma multiplo. Inoltre, le cellule del mieloma multiplo sono anche in grado di aderire alle cellule stromali del midollo osseo e alla ECM tramite proteine di adesione come la molecola di adesione cellulare vascolare 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*: VCAM-1), collagene di tipo I e fibronectina, che attiva molte vie con conseguente sovra-regolazione dei regolatori del ciclo cellulare e delle proteine anti-apoptotiche [Gupta D. et al, 2001]. Negli ultimi decenni, la sopravvivenza media dei pazienti con mieloma multiplo è stata aumentata notevolmente, grazie al trapianto autologo di cellule staminali e ai trattamenti con combinazioni di farmaci (bortezomib, talidomide, melfalan e ciclofosfamide ecc.) [Rajkumar S.V. et al, 2011]. Inoltre, sono anche somministrati bifosfonati (pamidronato e acido zoledronico) per prevenire la frattura patologica causata dal mieloma multiplo. Sebbene tutti questi trattamenti inducano una remissione duratura e prolunghino la sopravvivenza globale, non sono curativi a causa dell'incapacità di eradicare le cellule tumorali all'interno del midollo osseo.

2.2. SINDROMI MIELO-DISPLASTICHE (MDS)

Le sindromi mielo-displastiche (MDS) comprendono un gruppo eterogeneo di disordini maligni delle HSC caratterizzati da un rischio variabile di trasformazione in AML. Il sistema di punteggio prognostico internazionale (IPSS) permette alle MDS di essere suddivise in categorie di rischio più basso e più alto, quest'ultima categoria associata a un maggior numero di blasti, ad un aumento del rischio di trasformazione leucemica e a una sopravvivenza globale media più breve [Greenberg P. et al, 1997]. La disregolazione delle citochine contribuisce alla disfunzione immunitaria nei pazienti con MDS. IL-32, che è costitutivamente espressa a livelli elevati dalle cellule stromali derivanti da pazienti con MDS non trattata, altera la funzione delle NK (cellule natural killer) e promuove l'apoptosi, che si traduce in emopoiesi inefficiente, un segno pato-fisiologico di MDS [Marcondes A.M. et al, 2008]. Gli studi alla fine degli anni '90 hanno descritto per la prima volta la prevalenza delle LSC in campioni di AML primaria umana usando saggi di trapianto con diluizione al limite, che riportavano frequenze delle LSC variabili su un intervallo di 500 volte (da 1 su 10.000 a 1 su 5 milioni). La quiescenza sia delle cellule staminali normali che delle LSC è determinata in modo critico dalle interazioni con la nicchia delle HSC, includendo cellule endoteliali, cellule peri-vascolari, adipociti, macrofagi e cellule del sistema immunitario adattivo [Riether C. et al, 2015]. La maggior parte dei campioni di AML esprimono sulla superficie cellulare CD34 e la maggior parte degli studi sulle LSC si sono concentrati sul compartimento cellulare CD34⁺CD38⁻, che è stato associato all'iniziazione della leucemia e alla recidiva [Thomas D. et al, 2017]. Tuttavia, gli studi di trapianto hanno dimostrato che le LSC sono presenti anche in almeno un'altra sottopopolazione, solitamente la frazione CD34⁺CD38⁺ o talvolta la frazione CD34⁻, come mostrato in metà dei casi di AML con nucleofosmina-1 mutata (NPM1), una lesione molecolare solitamente associata ad una bassa espressione di CD34 [Taussig D.C. et al, 2010]. Sono state identificate anche popolazioni di LSC ciclianti in AML con riarrangiamento del gene KMT2A (MLL) e sono caratterizzate dall'espressione di CD93, una lectina trans-membrana di tipo C con funzione sconosciuta che può essere rilevata precocemente durante la maturazione delle cellule B nel midollo osseo ed è indotta di nuovo durante la differenziazione sui plasmablasti e sulle plasmacellule [Chevrier S. et al, 2009]. Inoltre, le LSC definite dal punto di vista funzionale sono state identificate nelle popolazioni provenienti da campioni di AML recidivante che contenevano tutte le permutazioni dell'espressione di CD34 e CD38, suggerendo che le LSC sono dinamiche ed instabili e possono divergere ed evolvere con l'acquisizione di diversi fenotipi alla recidiva [Ho T.C. et al, 2016]. Infine, le mutazioni FLT3-ITD sono state rilevate nelle cellule staminali primitive umane e in quelle progenitrici con un fenotipo CD34⁺CD38⁻, compresi i progenitori multipotenti linfoidi (LMPP) [Goardon N. et al, 2011]. Il profilo trascrizionale di sottoinsiemi di cellule staminali ematopoietiche (HSC) fenotipicamente definiti ha dimostrato che la proteina accessoria del recettore di IL-1 (IL1RAP) è disregolata nelle cellule staminali e progenitori clono-tipici (generati dallo stesso clone) dei pazienti con AML ad alto rischio (-7 / 7q-) ed è sovra-espressa

nelle HSC lineage⁻ CD34⁺CD38⁻ da pazienti con MDS ad alto rischio [Will B. et al, 2012]. Inoltre, l'espressione di IL1RAP era associata in modo indipendente a una scarsa sopravvivenza globale in 3 coorti indipendenti di pazienti con AML citogeneticamente normale, essendo un fattore prognostico ancora più forte dello stato di mutazione di FLT3. In contrasto, IL1RAP non poteva essere rilevato su HSC derivate da pazienti con MDS a basso rischio. Da un punto di vista meccanicistico, la down-regolazione di IL1RAP inibiva la capacità clonogenica delle cellule AML e portava ad un aumento dell'apoptosi [Will B. et al, 2012]. Il ruolo svolto da IL1RAP nel regolare le risposte a IL-1, IL-33 e IL-36 (interleuchine pro-infiammatorie), così come nel regolare l'attivazione dei mastociti e delle cellule T, suggerisce che le vie di segnalazione del sistema immunitario innato potrebbero contribuire alla sopravvivenza e alla crescita aberrante delle HSC da pazienti con MDS. STAT3 (fattore di trascrizione) può essere ipo-metilato e sovra-espresso nelle HSC CD34⁺ da pazienti con MDS [Will B. et al, 2012]. Importante: il trattamento delle HSC MDS con inibitori STAT3 permeabili alle cellule si è tradotto in una riduzione della formazione delle colonie *in vitro*. Gli approcci trascrittomici a singola cellula potrebbero svelare l'eterogeneità e la resistenza selettiva delle popolazioni CSC ad approcci molecolarmente mirati. Un nuovo protocollo, che integra la separazione cellulare tramite FACS, il rilevamento ad alta sensibilità di mutazioni nella singola cellula e il sequenziamento dell'RNA a singola cellula della stessa singola cellula, è stato applicato per analizzare più di 2000 cellule staminali ematopoietiche da pazienti con CML e per definire le caratteristiche molecolari delle sottopopolazioni delle LSC, includendo l'espressione di BCR-ABL, in campioni di CML umana dalla diagnosi attraverso la remissione e la progressione della malattia [Giustacchini A. et al, 2017]. È interessante notare che le scarse risposte agli inibitori tirosin-chinasici (TKI) erano associate a una sovra-regolazione di geni associati alla vie TGF- β (fattore di crescita tumorale beta) e TNF- γ (fattore di necrosi tumorale gamma), che potrebbero essere colpite in modo selettivo nelle CML-SC (cellule staminali della leucemia mieloide cronica), e a uno stato molto quiescente delle CML-SC. Popolazioni di HSC specifiche per la trasformazione in crisi blastica della CML sono state identificate e caratterizzate in un paziente in fase cronica che successivamente sviluppano una crisi blastica. Questo elegante approccio supporta il fatto che le cellule staminali della CML resistenti agli inibitori tirosin-chinasici (TKI) sono trascrizionalmente distinte dalle normali HSC quiescenti e potrebbero essere ampiamente applicabili ad altri contesti tumorali per identificare sottopopolazioni di CSC resistenti alla terapia. Dato il loro potenziale di resistenza a una varietà di modalità terapeutiche, tra cui radioterapia, chemioterapia, immunoterapia e farmaci che colpiscono a livello molecolare come TKI, le LSC probabilmente contribuiscono al fallimento del trattamento e alla recidiva della leucemia. Un recente studio del Centro di Cura dei Tumori di Toronto (Princess Margaret Cancer Center Group) ha tracciato la complessa storia evolutiva della AML all'interno dei singoli pazienti dalle prime fasi di sviluppo pre-leucemico alla diagnosi e fino alla progressione e alla recidiva [Shlush L.I. et al, 2017]. Le varianti somatiche che predicevano un effetto dannoso sulla proteina codificata (varianti che danneggiano la proteina) sono state

definite pre-leucemiche se presenti nelle cellule T separate da campioni di pazienti o leucemiche se assenti in queste cellule T. La prova di una popolazione di cellule pre-leucemiche fu trovata in 10 pazienti su 11. Studi funzionali hanno anche stabilito che le LSC sono geneticamente diverse sia in sede di diagnosi che in sede di recidiva, indicando un'evoluzione continua dopo la trasformazione leucemica. È interessante notare che la frazione di progenitori multi-linfoidi (MLP) ha mostrato una stretta relazione con i sottocloni delle LSC in evoluzione del campione alla diagnosi, suggerendo che le LSC con un fenotipo MLP potrebbero guidare l'inizio della AML. In alcuni pazienti, l'origine cellulare della recidiva era una rara popolazione di cellule con un fenotipo primitivo simile a quello delle HSC, che erano già presenti al momento della diagnosi prima dell'inizio della terapia. Questi casi sono stati definiti come aventi origine primitiva da recidiva. In altri pazienti, la recidiva era originata da cellule con un immuno-fenotipo più differenziato (*committed*) (casi di ricaduta con origine differenziata (*committed*)). Un'importante implicazione di questa osservazione è che la chemioterapia non induce mutazioni che portano all'insorgenza di nuovi cloni, ma potrebbe piuttosto selezionare sottocloni preesistenti che erano già resistenti alla terapia [Shlush L.I. et al, 2017]. In tre pazienti, nessuna variante di recidiva poté essere validata in nessuna delle popolazioni cellulari selezionate derivanti dal campione alla diagnosi.

Altri studi hanno identificato una caratteristica genica delle cellule AML utilizzando in vivo modelli murini di xenotrapianto [Saito Y. et al, 2010]. In circa il 50% dei campioni di AML primaria, le LSC sovra-esprimevano CD32, CD25, o entrambi gli antigeni. Un'analisi dettagliata dei livelli di espressione di CD32 ha rivelato tre distinti modelli, cioè:

1. casi di AML con un picco singolo positivo (categoria CD32-a),
2. casi di AML CD32-negativi con un'espressione bimodale e con una popolazione CD32⁺ minore ma separabile (categoria CD32-b);
3. casi di AML CD32 negativi con un picco negativo singolo (categoria CD32-c).

Le cellule staminali leucemiche CD34⁺CD38⁻CD32⁺ e CD34⁺CD38⁺CD25⁺ che potevano avviare lo sviluppo della AML nei topi NSG, erano a ciclo-quiescente e resistenti alla chemioterapia in vivo ed esprimevano il fattore di trascrizione WT1 e la chinasi HCK. CD32 e CD25 potrebbero quindi rappresentare bersagli validi per la terapia diretta contro le LSC, come suggerito dal mantenimento della capacità di ricostituzione ematopoietica multi-linea a lungo termine da parte delle normali cellule staminali ematopoietiche (HSC) private delle cellule che esprimono CD32/CD25. Tuttavia, CD32 è stato rilevato con elevati livelli di espressione in un gran numero di macrofagi alveolari nel polmone [Saito Y. et al, 2010]. È interessante notare che nei pazienti AML con l'espressione di CD25 superiore al 10% è stata riportata una più alta frequenza della malattia minima residua dopo il primo ciclo di chemioterapia di induzione e una sopravvivenza globale (OS) e una sopravvivenza

libera da recidiva (RFS) significativamente più brevi rispetto a pazienti che mostravano un'espressione inferiore di CD25. Nell'analisi multivariata, l'espressione di CD25 era un fattore avverso indipendente per OS e RFS, specialmente se combinato con positività a FLT3-ITD. Un elenco di geni espressi in modo differenziale nelle cellule staminali leucemiche CD34⁺CD38⁻ rispetto alle loro controparti di non staminali leucemiche CD34⁺CD38⁺ è stato recentemente prodotto utilizzando campioni di midollo osseo (BM) di 78 pazienti con AML [Ng S.W. et al, 2016]. L'accuratezza della prognosi della "mappatura" a 17 geni ("LSC17 score") è stata suggerita dalla sua correlazione con maggiori percentuali di cellule blastiche nel midollo osseo (BM) al momento della diagnosi, dalla maggiore incidenza di mutazione FLT3-ITD e da avverse caratteristiche citogenetiche, dai più elevati tassi di recidiva e dai più bassi tassi di risposta alla chemioterapia di induzione. Inoltre, un alto punteggio LSC17 è stato associato ad una sopravvivenza globale (OS) più breve, indipendentemente dal fatto che i pazienti avessero ricevuto o meno un successivo trapianto di cellule staminali allogeniche. Il punteggio LCS17 ("LCS17 score") potrebbe anche favorire l'identificazione di casi di AML a basso rischio molecolare (LMR) al momento della diagnosi, come mostrato in un grande studio di coorte comprendente pazienti di tutti i sottotipi, incluso il 9% di casi a basso rischio molecolare (LMR), cioè pazienti con citogenetica normale, mutazione NPM1 (nucleofosmina 1) e assenza di FLT3-ITD [Ng S.W. et al, 2017]. Un sottopunteggio a 13 geni ha identificato accuratamente i pazienti con LMR in sei grandi studi indipendenti su circa 1600 pazienti con AML citogeneticamente e molecolarmente diverse [Ng S.W. et al, 2017]. Questa strategia potrebbe consentire la valutazione di nuove strategie di trattamento in anticipo per i casi di LMR a rischio più elevato. È stato inoltre dimostrato che il profilo LSC17 predice l'esito clinico nella AML pediatrica [Smith J.L. et al, 2017]. Pazienti nella coorte con alto LSC17 avevano una maggiore incidenza di citogenetica avversa e mutazioni ricorrenti, come ad esempio la mutazione FLT3-ITD; viceversa, il gruppo a basso punteggio aveva una percentuale più alta di citogenetica favorevole. Nell'analisi multivariata, il punteggio LSC17 era un forte ed indipendente indicatore prognostico [Smith J.L. et al, 2017].

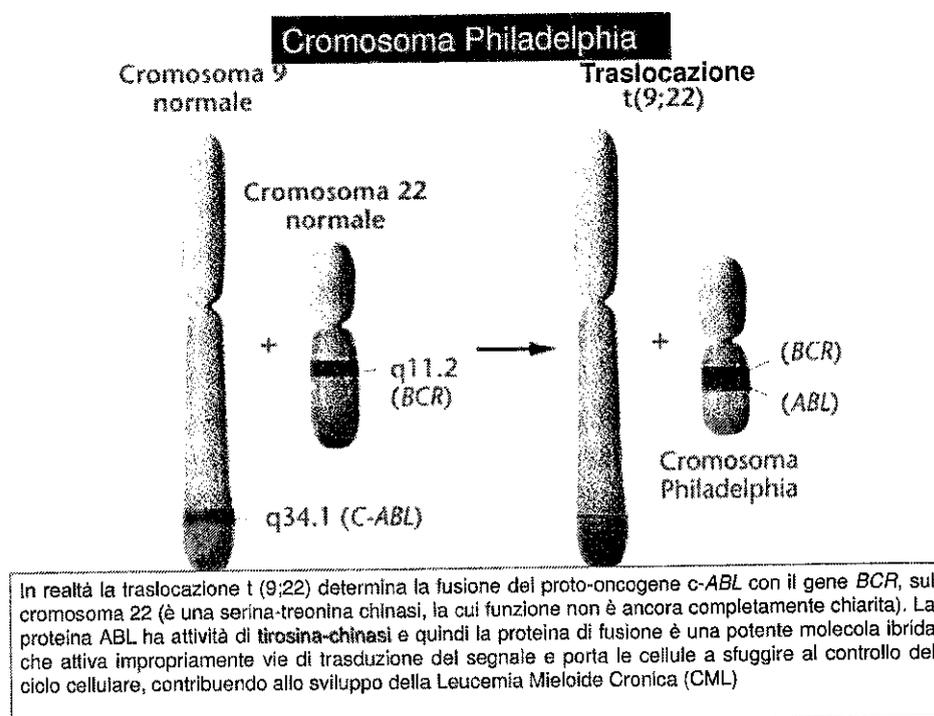
2.3. LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA

La leucemia mieloide acuta (AML) è la più comune leucemia che colpisce gli adulti e la seconda leucemia infantile più comune. È geneticamente eterogenea ed è caratterizzata dall'infiltrazione nel midollo osseo di cellule differenziate in modo anormale e di cellule proliferanti di origine ematopoietica (alta proliferazione di globuli bianchi anormali con conseguente interferenza dell'emopoiesi normale nel midollo osseo). Essendo un disturbo autonomo cellulare, presenta eventi genetici mutanti che portano alla conversione delle normali cellule ematopoietiche per la generazione della leucemia. A causa dell'eterogeneità funzionale delle cellule della AML, una piccola popolazione di LSC ha un potenziale di differenziazione a lungo termine e la capacità di proliferare e, infine, di conservare il sottotipo di AML [Lane S.W. et al, 2009]. Le LSC sono generalmente quiescenti e vicine al regione endostale

ricca di osteoblasti nel microambiente del midollo osseo. Le interazioni tra blasti di AML e il microambiente midollare mediate da fattori solubili secreti dallo stroma e il contatto cellula-cellula sono coinvolti nella chemioterapia e resistenza alla terapia molecolare nella AML [Rashidi A. et al, 2015]. Le opzioni di trattamento della AML dipendono molto dal sotto-tipo della malattia e da altre condizioni del paziente. Quando si utilizza la chemioterapia come scelta primaria per il trattamento della AML, la risposta dei pazienti al singolo agente chemioterapico ha vita breve e non è curativo. La combinazione di due o tre farmaci antitumorali tra cui citarabina, 6-tioguanina, idarubicina, idrossiurea e mitoxantrone ecc. è spesso usata per la terapia di AML. La chemioterapia per la AML ha sempre vari effetti collaterali a seconda dei farmaci usati. Gli standard correnti di cura includono trattamenti con numerosi cicli di alte dosi di chemioterapici e spesso includono il trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche per pazienti con caratteristiche ad alto rischio come aberrazioni molecolari o citogenetiche avverse. Agenti a bersaglio molecolare come la Midostaurina per pazienti FLT3⁺ e Enasidenib per pazienti con mutazione della isocitrato deidrogenasi-2 (IDH2) sono stati approvati da U.S. Food and Drug Administration nel 2017 per l'uso in pazienti con AML recidivante/resistente. Nonostante il concomitante HSCT nei pazienti con AML alto rischio, la sopravvivenza globale e priva di ricadute rimane scarsa [Rowe J.M. et al, 2010] La guarigione è raggiunta nel 35-40% dei pazienti adulti che hanno 60 anni di età o sono più giovani e nel 5-15% dei pazienti che hanno superato i 60 anni di età. L'esito nei pazienti più vecchi che non possono sottoporsi a chemioterapia intensiva rimangono deludenti con una sopravvivenza media di 5-10 mesi. Sono necessari nuovi approcci terapeutici per migliorare i risultati. Il modello delle CSC è stato dimostrato in AML tramite separazione cellulare di popolazioni multiple da 16 campioni di AML primaria umana e successiva identificazione delle frazioni contenenti LSC in studi di xenotrapianto nei topi [Eppert K. et al, 2011]. L'analisi dell'espressione genica da popolazioni validate funzionalmente ha dimostrato caratteristiche di geni specifici per LSC e HSC e ha identificato programmi trascrizionali condivisi da LSC e HSC. È interessante notare che entrambi i programmi delle cellule staminali predicono, in modo significativo e indipendente, la sopravvivenza del paziente. Il profilo mutazionale completo tra i diversi sottotipi di pazienti con AML consentirà di prendere in considerazione una terapia mirata a bersagli molecolari, da sola o in combinazione con chemioterapici, che migliorerà complessivamente gli esiti del trattamento [Coombs C.C. et al, 2016]. Inoltre, la AML è un tumore progressivo rapido sempre caratterizzato da un evidente aumento della densità dei micro-vasi nel midollo osseo. I pazienti con AML hanno mostrato un aumento dei livelli di blasti della AML associati a VEGF e neovascolarizzazione rispetto al normale midollo osseo. Pertanto, anche gli agenti che hanno come target VEGF possono essere usati come nuove terapie anti-angiogeniche nella AML [Rodriguez-Ariza A. et al, 2011].

2.4. LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

La leucemia mieloide cronica (LMC) come malattia mielo-proliferativa origina da una cellula ematopoietica primitiva trasformata dall'oncogene BCR-ABL, che definisce gli eventi molecolari successivi della leucemia [Daley G.Q. et al, 1990]. L'attività deregolata della tirosin chinasi BCR-ABL è responsabile della modulazione di diverse vie di segnale, e di conseguenza porta ad un aumento della proliferazione delle cellule staminali ematopoietiche e progenitrici. Inoltre, disturba l'interazione delle cellule staminali ematopoietiche e dei progenitori con la ECM e lo stroma, causando un'espansione anomala di cellule mieloidi differenziate.



L'attività costitutiva della tirosin chinasi BCR-ABL può essere efficacemente inibita con piccole molecole inibitrici della tirosin-chinasi (TKI) come imatinib, nilotinib, dasatinib e ponatinib ecc. [Hantschel O. et al, 2012]. La terapia con TKI mirata all'oncogene BCR-ABL ha trasformato la leucemia mieloide cronica (CML) in una malattia che non minaccia la vita. Tuttavia, recenti scoperte suggeriscono che la maggior parte dei pazienti con CML di solito vanno incontro a recidiva dopo la sospensione del trattamento con TKI a causa dell'esistenza di cellule leucemiche residue nel midollo osseo [Corbin A.S. et al, 2011]. I progenitori primitivi della CML non sono oncogene-dipendenti e una piccola popolazione di LSC nel midollo osseo è probabilmente la fonte di recidiva della malattia dopo la cessazione degli TKI [Chu S. et al, 2011]. L'evidenza indica che il microambiente del midollo osseo (cellule stromali o ECM) protegge le cellule primitive della CML/LSC dagli effetti della chemioterapia e dalla terapia mirata con piccole molecole fornendo alle cellule

stimoli di sopravvivenza critici indipendenti da BCR-ABL. La maggior parte degli studi suggerisce che l'eradicazione di LSC possa richiedere o il *targeting* dei loro meccanismi di auto-rinnovamento o il blocco delle interazioni con il microambiente del midollo osseo [Corbin A.S. et al, 2011]. Dall'altra parte, gli eventi avversi vascolari (VAE) sono emersi come potenziali eventi collaterali con la terapia a base di TKI in pazienti con CML [Moslehi J.J. et al, 2015]. I principali VAE identificati finora sono la malattia occlusiva arteriosa periferica, che si verifica principalmente nei pazienti che ricevono a lungo termine un trattamento con TKI di seconda o di terza generazione. Ci sono anche alcune prove che la frequenza dei VAE è innescata in un modo dose-dipendente [Valent P. et al, 2015]. Le percentuali di gravi VAE possono essere notevolmente ridotte abbassando la dose o riducendo il tempo di esposizione attraverso l'alterazione della via di somministrazione degli TKI e l'aumento della loro biodisponibilità in vivo [Mu C.F. et al, 2017].

2.5. METASTASI OSSEE

L'osso è uno degli organi più comuni per la metastasi da tumori solidi in pazienti con cancro avanzato. Le interazioni strette tra le cellule tumorali e il microambiente del midollo osseo facilitano l'adesione e la crescita delle cellule tumorali metastatiche nell'osso. Le cellule tumorali che circolano nel sangue invadono i sinusoidi presenti nel midollo osseo per iniziare il processo di metastasi ossea. Durante le metastasi ossee, l'interazione tra le cellule del tumore e il microambiente del midollo osseo perturbano il normale metabolismo dell'osso e favoriscono la formazione di focolai ossei metastatici (Fig. 4). Le cellule osteoblastiche partecipano alla colonizzazione delle cellule tumorali e controllano la loro dormienza nel midollo osseo [Croucher P.I. et al, 2016]. Successivamente le cellule tumorali stimolano la secrezione di citochine per innalzare l'attività degli osteoclasti tramite interleuchine (IL), proteina correlata all'ormone paratiroideo (PTHrP) e fattore di crescita trasformante b (TGFb) ecc. [Swami A. et al, 2014]. I cambiamenti seriali nel microambiente aumentano il riassorbimento osseo e favoriscono l'accesso alla superficie dell'osso demineralizzato. I pazienti con metastasi ossee altamente disseminate sono di solito incurabili. Sebbene ogni fase del processo metastatico rappresenti un potenziale bersaglio per il trattamento al fine di abrogare le metastasi ossee, esso non è ancora curativo a causa della scarsa distribuzione nell'osso di agenti antitumorali iniettati per via endovenosa e delle resistenze alla chemioterapia delle cellule tumorali impaccate nel midollo osseo [Swami A. et al, 2014]. Qui, principalmente sottolineiamo la resistenza alla chemioterapia indotta da IL-6 nel trattamento della metastasi ossea. Le cellule tumorali stimolano la secrezione di IL-6 nelle cellule mononucleate del midollo osseo all'interno del midollo osseo metastatico. Allo stesso modo, anche le cellule tumorali della prostata e del cancro mammario secernono elevate quantità di IL-6 in modo autocrino [Ara T. et al, 2010]. Il ciclo a feedback infiammatorio di IL-6 porta all'auto-rinnovamento delle cellule tumorali simili alle staminali (*stem-like*) e all'induzione della transizione epiteliale-mesenchimale, entrambi implicati nella resistenza terapeutica [Cohen E.N. et al, 2015]. La via di

segnale IL-6/ JAK2 /STAT3 promuove lo sviluppo del tumore attraverso l'ambiente stromale nella nicchia del tumore solido e metastatico. La tumorigenicità dei carcinomi mammari HR-/HER2⁺ è stata diminuita inibendo l'attività della via di segnalazione IL-6 / JAK2 / STAT3-calprotectina [Rodriguez-Barrueco R. et al, 2015]. Quindi, la combinazione di inibitori di JAK2 e agenti chemioterapici può avere il vantaggio di superare la resistenza alla chemioterapia causata dal microambiente del midollo osseo per il trattamento delle metastasi ossee.

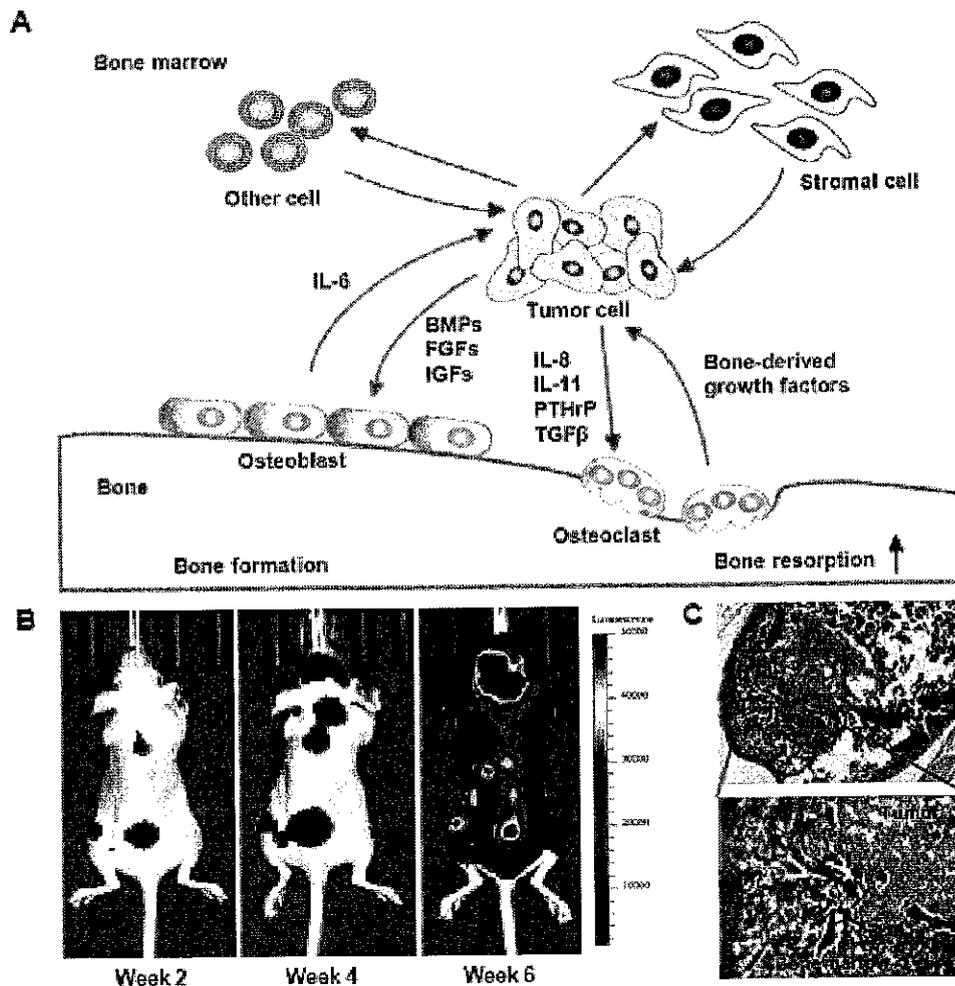


Figura 4. Metastasi ossee da tumori solidi

(A) Interazioni di cellule di tumori solidi con costituenti del midollo osseo, osteoblasti residenti e osteoclasti nelle metastasi ossee.

(B) Processo di metastasi ossea del carcinoma mammario umano in topi nudi atimici (con timo assente o non funzionale) monitorato mediante bioluminescenza dopo iniezione intracardiaca di cellule MDA-MB-231.

(C) Sezione colorata con H & E del nodulo tumorale MDA-MB-231 all'interno dell'osso trabecolare del femore di topo. L'interfaccia tra cellule del midollo osseo e cellule tumorali è chiara (linea tratteggiata).

BMP = proteina morfogenetica dell'osso; FGF = fattore di crescita dei fibroblasti;

IGF = fattore di crescita insulino-simile.

Riassumendo, molteplici malattie maligne sono correlate al midollo osseo compreso il mieloma multiplo, le sindromi mielo-displastiche, la leucemia e le metastasi ossee originate da tumori primari. Inoltre, queste malattie, a loro volta, influenzano anche la normale omeostasi e rimodellano il microambiente del midollo osseo. Le citochine e i fattori di crescita secreti dal tumore e da altre cellule midollari sono regolati attraverso vie di segnalazione autocrine e paracrine all'interno del microambiente del midollo osseo. Variazioni aberranti in osteoblasti, fibroblasti, cellule endoteliali, componenti della ECM, citochine e fattori di crescita supportano la sopravvivenza e la crescita di queste cellule tumorali maligne. Anche l'angiogenesi del midollo osseo aumenta nelle neoplasie ematologiche come la leucemia mieloide acuta, la leucemia linfatica cronica, i linfomi non-Hodgkin e il mieloma multiplo, ecc.. [Podar K. et al, 2009]. Metastasi ossee e mieloma multiplo possono portare all'aumento dell'attività delle cellule osteoclastiche con conseguente dolore, ipercalcemia, compressione del midollo spinale e frattura patologica nelle fasi avanzate. In clinica non esistono approcci terapeutici curativi per i tumori all'interno del osso a causa dell'inevitabile peggioramento dei tumori del sangue e dei tumori solidi metastatici ossei [Swami A. et al, 2014]. È difficile raggiungere una dose terapeutica sufficiente di agenti antitumorali nei siti tumorali all'interno del midollo osseo per sopprimere la crescita del tumore attraverso somministrazione endovenosa. Gli agenti chemioterapici sono sempre somministrati ad alte dosi o frequentemente per raggiungere l'efficacia terapeutica effettiva nel midollo osseo malato, che può portare a gravi effetti collaterali inclusa la mielo-soppressione e una tossicità dose-limitante per i tessuti sani. D'altra parte, il microambiente del midollo osseo provoca la resistenza delle cellule tumorali, in particolare delle cellule che iniziano il cancro/ le cellule staminali, alla chemioterapia e conferisce loro un potenziale proliferativo che media la recidiva della malattia. Pertanto, il targeting di tumori presenti nel midollo osseo rimane un' enorme sfida a causa della scarsa disponibilità dei farmaci nel midollo e perché il microambiente causa la resistenza ai farmaci [Swami A. et al, 2014]. Tutte queste limitazioni degli attuali trattamenti dei tumori residenti nel midollo osseo ci spingono a sviluppare strategie di rilascio di agenti terapeutici mirate al midollo osseo con lo scopo di migliorare l'efficacia terapeutica e ridurre al minimo le tossicità dose-limitanti sui tessuti sani. Le strategie di rilascio mirate al midollo osseo possono offrire un grande potenziale per diagnosi precise, e/o terapie delle neoplasie nel midollo osseo.

3. LE CELLULE STAMINALI TUMORALI

L'ipotesi delle cellule staminali tumorali fu per la prima volta descritta nella leucemia nel 1994 dove si è dimostrato che solo le cellule leucemiche che esprimevano gli stessi marcatori delle normali cellule staminali ematopoietiche adulte ($CD34^+ CD38^-$) potevano iniziare la neoplasia ematopoietica e hanno indicato queste cellule come cellule che iniziano la leucemia, cellule staminali leucemiche o cellule staminali tumorali [Dick J.E. et al, 1994 e 1997]. È importante sottolineare che tale popolazione possiede capacità di auto-rinnovamento, proliferazione e differenziazione. Prove crescenti hanno dimostrato che le LSC sono clinicamente rilevanti indicando che le terapie mirate a tali cellule nella AML migliorerebbero gli esiti di sopravvivenza [Eppert K. et al, 2011].

La strategia antitumorale convenzionale è una combinazione di chirurgia, chemioterapia e radioterapia con trapianto di cellule staminali allogeniche per i candidati idonei. Tuttavia i pazienti anziani non possono tollerare regimi così intensi e i pazienti solitamente sono esposti a rischi di recidiva, metastasi e resistenza ai farmaci. Si ritiene che queste terapie siano prevalentemente mirate alle cellule tumorali che formano la massa del tumore tralasciando le CSC. Tuttavia, queste CSC, con elevate espressioni di trasportatori ABC (ATP-binding cassette), hanno dimostrato di proteggere se stesse dagli attacchi degli agenti chemioterapici [Raaijmakers M.H., 2007]. Quindi, l'inefficace terapia dei tumori è attribuita principalmente al fallimento dell'eliminazione delle CSC maligne. È ben riconosciuto che lo sviluppo di terapie selettive contro le CSC è importante per trattare tumori contenenti questo tipo di cellule [Mohle R. et al, 1998]. In questa tesi vengono riassunte le attuali conoscenze sulle LSC e anche i vari agenti terapeutici che colpiscono le LSC e che sono stati studiati in test clinici. L'esistenza delle CSC inizialmente evidenziata nella AML ed è stata ora estesa ad un ampio spettro di tumori solidi e prevede lo sviluppo del cancro in una maniera gerarchica dalle CSC che si auto-rinnovano e danno origine a una progenie differenziata attraverso divisione asimmetrica [Testa U., 2011]: in condizioni normali, delle 2 cellule figlie che si originano dalla divisione di una HSC una rimane HSC (va a sostituire la cellula generatrice) mentre l'altra mantiene la multi-potenza delle HSC andando incontro a cicli ripetuti di crescita e replicazione espandendosi in modo esponenziale (capacità di differenziarsi nelle varie linee ematiche). Le cellule staminali leucemiche (LSC) sono state fenotipicamente e funzionalmente caratterizzate nella leucemia mieloide cronica (CML) [Hamilton A. et al, 2012], nella leucemia mieloide acuta (AML) e nelle sindromi mielodisplastiche (MDS) [Ho T.C. et al, 2016]. Le LSC contano su un numero di *vie di segnalazione* che sono associate alla loro capacità di auto-rinnovamento e che sono condivise con le HSC normali, come la via *Wnt/beta-catenina*, la via *Hedgehog* e la proteina BMI-1 (*B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*). Le LSC sono in uno stato quiescente, una proprietà che influenza la loro relativa sensibilità ai farmaci chemioterapici che hanno come bersaglio il ciclo cellulare. L'interazione fra CXCR4 (recettore) sui progenitori leucemici e CXCL12 sulle cellule stromali (di sostegno) del midollo osseo favorisce

l'homing delle LSC nel microambiente midollare [Mohle R. et al, 1998]. Il fattore di derivazione stromale (SDF)-1alfa, un ligando chemochinico per CXCR4 che è anche prodotto dagli osteoblasti immaturi che rivestono l'endostio, induce un significativo flusso di calcio nei blasti della AML mielomonocita [Mohle R. et al, 2000]. Al contrario, la AML promielocitica così come la AML M4 con eosinofilia mostrano un'attività intermedia. Di conseguenza l'espressione di CXCR4 è bassa in AML indifferenziata, AML mieloide e AML eritroide ma è alta in AML promielocitica, AML mielomonocita e leucemia linfoblastica acuta di linea-B (ALL). L'espressione di CXCR4 è significativamente più elevata in pazienti affetti da AML con una duplicazione tandem di FLT3 (Fms- like tyrosine Kinase 3), mutazione del gene FLT3 che codifica per un recettore tirosin-chinasico, espresso dalle cellule ematopoietiche immature, molto importante per lo sviluppo delle cellule staminali e del sistema immunitario. I pazienti AML con un'alta espressione di CXCR4 in cellule CD34⁺ hanno una sopravvivenza media senza recidive (RFS) di soli 8,3 mesi [Rombouts E.J. et al, 2004]. La somministrazione settimanale di anticorpi umani anti-CXCR4 a topi precedentemente innestati con blasti primari di AML diminuisce il numero di cellule AML nel sangue, midollo osseo e milza, con effetti minimi sul numero delle normali HSC innestate in topi NOD/SCID (immunodeficienti) [Tavor S. et al, 2004]. La CML è un raro disordine clonale delle HSC associato con t (9; 22): traslocazione di materiale genetico fra il cromosoma 9 e il cromosoma 22 risultante in un riarrangiamento di BCR-ABL1 e ha un'incidenza annuale di 1 o 2 casi su 100000 individui [Holyoake T.L. et al, 2017]. La CML è presente nella fase cronica nell' 85-90 % dei pazienti e, se non trattata, usualmente progredisce in crisi blastiche mieloidi o linfoidei entro 5 anni. La sopravvivenza globale (OS) dei pazienti con CML è notevolmente migliorata con l'uso di inibitori tirosin-chinasici come l'imatinib o il dasatinib, insieme al trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche (HSCT), con un'aspettativa di vita nei pazienti con CML che si avvicina a quella della popolazione generale. Tuttavia, la persistenza delle cellule LSC nella CML rimane un ostacolo da curare in tutti i pazienti. La CML sta sempre più diventando resistente agli inibitori tirosin-chinasici durante la progressione verso crisi blastiche. Mutazioni nel dominio chinasico di BCR-ABL sono il meccanismo prevalente responsabile della resistenza all'IMATINIB [O'Hare T. et al, 2007]. Le LSC della CML con fenotipo CD34⁺CD38⁻ esprimono CD26, un enzima di superficie che agisce sulle citochine e che non è rivelabile su normali cellule staminali o su LSC in altre neoplasie ematologiche [Culen M. et al, 2016]. Nei saggi funzionali, CD26 distrugge l'asse SDF-1alfa-CXCR4 scindendo SDF-1alfa (chemochina facente parte delle citochine deputate al reclutamento dei leucociti) e facilitando l'uscita delle cellule leucemiche dalla nicchia midollare. Le LSC CD26⁺ diminuiscono a bassi livelli o non rilevabili dopo il trattamento riuscito con IMATINIB. La capacità delle LSC di esprimere CD26 una volta innestate nel topo è significativamente ridotta quando queste abbiano subito un pre-trattamento in vitro con gliptine. Due pazienti con CML ricevendo gliptine in presenza anche di diabete mellito hanno avuto una diminuzione dei livelli di BCR-ABL1 durante il trattamento. Le cellule CML derivate da pazienti e le LSC nei modelli di topo di CML esprimono PD-L1

(*programmed death ligand-1*). Il blocco di questo innesca la perdita di LSC e previene lo sviluppo di malattie simili a CML, se combinato con l'immunoterapia con cellule T [Riether C. et al, 2015]. Le LSC della CML possono eludere l'immunosorveglianza attraverso una varietà di meccanismi molecolari, includendo la down-regolazione mediata da citochine delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II.

3.1. ETEROGENEITÀ GENETICHE ED EPIGENETICHE DELLE LSC

Le leucemie sono ora viste come degli aberranti processi ematopoietici iniziati da rare LSC, che sorgono dalla trasformazione di cellule staminali ematopoietiche (HSC) o di cellule progenitrici indirizzate. Durante il corso di una trasformazione maligna, le LSC acquisiscono la capacità di auto-rinnovamento, proliferazione e differenziazione attraverso continue alterazioni genetiche ed epigenetiche e diversificazione clonale. Così la comprensione di come le eterogeneità genetiche ed epigenetiche si sviluppano nelle differenti leucemie è diventata un'importante area per la ricerca tumorale. Sebbene le CSC siano state trovate sia nella leucemia che nei tumori solidi, non tutte le CSC nei tumori solidi seguono il modello eterogeneo delle LSC. Indagini effettuate usando la tecnica del *deep genome sequencing* hanno identificato molti ricorrenti geni mutati in modo critico implicati nella patogenesi della AML umana [Ley T.J. et al, 2008]. Nel 2013, la CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK ha analizzato il genoma di 200 pazienti affetti da AML e ha definito in modo completo le mutazioni ricorrenti nella AML. Sono stati identificati circa 30 geni che risultano essere mutati in più del 2% dei pazienti. Molti di questi geni mutati codificano per proteine che normalmente funzionano a livello epigenetico includendo modificazioni di residui di citosina del DNA e modifiche post-traslazionali degli istoni. In aggiunta, altri studi hanno mostrato che la composizione clonale delle AML sembra essere cambiata abbastanza marcatamente sia a livello genetico che epigenetico dopo la terapia nella malattia recidivante [Ding L. et al, 2012]. Interessante è stato scoprire che c'è un ordine sequenziale per l'acquisizione di queste mutazioni genetiche durante la genesi della leucemia. Per esempio alcuni ricercatori hanno osservato che mutazioni somatiche in modificatori epigenetici che regolano la metilazione della citosina, come la DNA metiltransferasi 3 alfa (DNMT3A), l'isocitrato deidrogenasi 1/2 (IDH1/2) e la tet metilcitosina diossigenasi 2 (TET2), si verificano presto nelle HSC pre-leucemiche [Welch J.S. et al, 2012]. Tuttavia, altre mutazioni somatiche nelle vie di segnalazione che guidano la proliferazione come nucleofosmina 1 (NPM1), duplicazione "tandem" interna del gene FLT3 (FLT3-ITD) e l'oncogene virale Kirsten del sarcoma di ratto/ oncogene virale del neuroblastoma sarcoma di ratto (KRAS/NRAS), sono eventi successivi nella trasformazione della AML [Corces-Zimmerman M.R. et al, 2014]. Questi risultati suggeriscono che la rottura del profilo epigenetico è probabilmente un iniziale e significativo evento che si verifica durante la genesi della leucemia. Al fine di caratterizzare il profilo di espressione delle LSC nella leucemia mieloide cronica (CML) è stata eseguita un'analisi *genome-wide* del trascrittoma di LSC della CML

usando la tecnica dell'*Exon microarrays* [Gerber J.M. et al, 2013]. Hanno identificato 97 geni che sono differenzialmente espressi fra le LSC della CML e le HSC normali. Ulteriori analisi hanno rivelato la disregolazione della proliferazione, della differenziazione e delle vie del segnale nelle LSC della CML. Questi dati possono fornire potenziali target terapeutici unici per le LSC della CML.

3.2. MOLECOLE DI SUPERFICIE E MICROAMBIENTE DELLE LSC E RELATIVE IMPLICAZIONI CLINICHE

3.2.1. MOLECOLE DI SUPERFICIE DELLE LSC

Le LSC della AML sono il tipo di CSC per primo riportato e meglio caratterizzato e mostrano in modo specifico un immunofenotipo CD34⁺CD38⁻. Tuttavia, studi successivi hanno dimostrato che i marcatori di superficie delle LSC della AML sono considerevolmente eterogenei. Per esempio queste cellule sono state trovate non solo nella frazione Lin⁻/CD38⁻ ma anche nelle frazioni CD34⁻, Lin⁺, CD38⁺ e CD45RA⁺ [Sarry J.E. et al, 2011]. E' stato inoltre scoperto che le vere LSC della AML nelle frazioni CD34⁺/CD38⁻, originariamente descritte da Bonnet e Dick, erano molto rare e comprendevano una gerarchia di cellule con diverso potenziale di auto-rinnovamento [Hope K.J. et al, 2004]. Inoltre, alcuni marcatori di superficie delle LSC della AML (CD34⁺ CD38⁻ CD71⁻ e HLA-DR⁻) sono condivisi con le HSC normali e altri (Lin⁺, CD38⁺, CD45RA⁺) sono associati con i normali progenitori indirizzati. Queste scoperte sollevarono un dibattito circa la questione se le LSC nella AML derivassero dalle normali HSC o dalle cellule progenitrici indirizzate. D'altra parte i marcatori di superficie delle LSC sono eterogenei, fatto che rende difficile la classificazione delle LSC e persino i trattamenti mirati alle LSC in clinica. Recentemente, un grande progresso è stato fatto nella comprensione dei marcatori di superficie delle LSC e nelle loro applicazioni cliniche specialmente nei casi di AML. Per prima cosa, un numero di marcatori di superficie unici per LSC della AML è stato identificato. Per esempio è stato rivelato che CD90 e CD117 sono deficienti nelle LSC della AML, mentre CD123, TIM3, CD47, CD96, CLL-1 e IL-1RAP (proteina accessoria del RECETTORE DELL' INTERLEUCHINA 1) sono altamente espressi. Il targeting di questi marcatori di superficie è una promettente strategia per eradicare le LSC. Precedenti studi avevano dimostrato che CD123 (catena alfa del recettore di IL-3) è preferibilmente espresso nelle cellule CD34⁺/CD38⁻ della AML quando paragonato alle normali HSC. Il pretrattamento di cellule AML con anticorpo monoclonale 7G3 anti-CD123 ha provocato una diminuzione dell'attecchimento quando le cellule sono stati iniettate in un modello xeno-trapiantato [Jin L, Busfield S.J. et al, 2009 e 2014]. Fino ad oggi gli studi clinici di fase I sull'uso di anticorpi clonali diretti contro CD123 (CSL360 e il migliorato CSL362) sono stati testati nei pazienti con CD123⁺ affetti da AML. Inoltre altri anticorpi monoclonali contro CD47 [Weiskopf K. et al, 2013], CD96 [Hosen N., Mohseni Nodehi S. et al 2007 e 2012], TIM3 [Kikushige Y., Jan M. et al, 2010 e 2011] e CLL-1 [Zhao X. et al, 2010] sono stati investigati in modelli

preclinici per la loro abilità di eliminare le LSC della AML. Vale la pena ricordare che Gemtuzumab Ozogamicin, un anti-corpo anti-CD33, è stato il primo anticorpo monoclonale approvato dal FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) degli USA nel 2000 per il trattamento della AML sebbene possa non colpire in modo specifico le LSC [Bross P.F. et al, 2001]. In secondo luogo nuove terapie vengono continuamente sviluppate per colpire specificatamente questi antigeni di superficie delle LSC e sono sottoposte a studi clinici nei casi di AML. Oltre agli anticorpi monoclonali sopra menzionati queste nuove terapie includono frammenti di anticorpi bi-specifici e tri-specifici, immunotossine [Frankel A. et al, 2008], cellule T modificate con recettori chimerici per l'antigene (CAR T-cells) e nano-particelle contenenti farmaci mirati ai marcatori di superficie. DT388IL3 (SL-401) è un' immunotossina ricombinante che è stata creata dalla fusione della tossina difterica con un recettore che ha come bersaglio il recettore di IL-3. Attualmente DT388IL3 è sottoposto alla fase I e alla fase II degli studi clinici nella AML (tabella 1).

Tabella 1: Agenti anti-LSC in fase di sperimentazione clinica nella AML
[da Frankel A. et al, 2008]

Targets	Nome degli agenti	Proprietà degli agenti	Fase del trial clinico	Identificatore del trial clinico
Antigeni di superficie cellulare				
CD123	CSL360	Anticorpo Monoclonale	Phase I	NCT00401739
	CSL362	Anticorpo Monoclonale	Phase I	NCT01632852
	DT388IL-3 (SL-401)	Immunotossina	Phase I/II	NCT02113982, NCT02270463
Vie del segnale				
PI3K	CAL-101 (Idelalisib)	Inibitori di PI3K	Phase I	NCT00710528
AKT	-Perifosine -MK-2206	-Inibitori di AKT -Inibitori di AKT	Phase I Phase II	NCT00301938, NCT01253447
mTOR	-Everolimus (RAD001) -Temozolomide	-Inibitori di mTOR -Inibitori di mTOR	Phase II Phase II	NCT00762632, NCT00775593
NF- κ B	Bortezomib	Inibitori di I κ B	Phase I/II	NCT00651781, NCT00742625
Wnt	CWP232291	Inibitori di β -catenina	Phase I	NCT01398462
Microambiente				
CXCR4	Plerixafor (AMD3100)	Antagonisti di CXCR4	Phase I/II	NCT00990054, NCT00822770

3.2.2. MICROAMBIENTE ASSOCIATO ALLE LSC

In normali condizioni le HSC dipendono dalle interazioni con la nicchia del midollo osseo che è fondamentale per il loro corretto funzionamento e mantenimento. Il rimodellamento della nicchia midollare è comunemente osservato nei tumori maligni del sangue. C'è la prova che la crescita delle cellule leucemiche distrugge le nicchie midollari delle normali cellule progenitrici ematopoietiche e crea un microambiente ospitale per loro [Colmone A. et al, 2008]. All'interno di tale microambiente le LSC sono capaci di comunicare con le cellule stromali del midollo osseo attraverso citochine, chemochine e segnali intracellulari iniziati dall'adesione cellulare. Questi segnali influenzano la capacità delle LSC di auto-rinnovo, mantengono la loro quiescenza e prevengono l'apoptosi. In aggiunta, la nicchia midollare fornisce 2 distinte zone micro-ambientali (la nicchia osteoblastica e la nicchia vascolare) che probabilmente regolano il ciclo delle LSC. Perciò bloccare le interazioni tra LSC e il loro micro-ambiente rappresenta una promettente strategia per distruggere l'omeostasi delle LSC e ripristinare la normale ematopoiesi. Una di queste strategie è quella di rimuovere le LSC dalla loro nicchia midollare protettiva e perciò sensibilizzare le LSC alle convenzionali chemioterapie. È stato dimostrato che le LSC migrano dentro e rimangono all'interno della nicchia midollare attraverso l'interazione tra il recettore per le chemochine CXC di tipo 4 (CXCR4) e il fattore 1 derivante dalle cellule stromali (SDF-1 alfa), anche conosciuto come CXCL12 (CXC motif chemokine 12) [Spoo A.C. et al, 2007]. Recentemente, la manipolazione dell'asse CXCL12-CXCR4 usando PLERIXAFOR (immunostimolante) nella AML recidivante è stata riportata come strategia sicura nella fase I/II degli studi clinici (NCT00990054 e NCT00822770) [Mohty M., Uy G.L. et al, 2011-2012]. In aggiunta il legame della molecola di adesione CD44 e della molecola di adesione delle cellule vascolari (VCAM-1) con i loro anticorpi monoclonali è già stata testata in clinica. Altre strategie come l'alterazione della nicchia midollare e il rimodellamento del microambiente infiammatorio, come il targeting delle citochine pro-infiammatorie fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa), IL-1, IL-6 può essere molto promettente ma principalmente agli stadi pre-clinici [Schepers K. et al, 2013].

3.3. MOLECOLE INTRACELLULARI E SEGNALAZIONE DELLE LSC

3.3.1. VIE DI SEGNALE CRITICHE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DELLE LSC

Le LSC sono caratterizzate da illimitato auto-rinnovamento, proliferazione e differenziazione. Vie di segnalazione come Wnt/ β -catenina e Hedgehog svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'auto-rinnovamento delle LSC. Queste vie di segnale sono anche criticamente necessarie per lo sviluppo delle normali HSC [Reya T. et al 2001]. Inoltre, si ritiene che le LSC possano evitare l'APOPTOSI attraverso l'up-regolazione di NF- κ B o la down-regolazione di Fas/CD95. Qui, vengono riassunte alcune vie di segnale chiave coinvolte nella regolazione della

sopravvivenza e auto-rinnovamento delle LSC. La ben nota via di segnale Wnt/ β -catenina svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento delle popolazioni di CSC. L'attivazione della via Wnt/ β -catenina porta alla traslocazione di β -catenina nel nucleo, dove essa induce l'espressione di geni bersaglio come c-Myc, c-Jun e cyclin D1. Vari esperimenti hanno dimostrato che la via Wnt/ β -catenina agisce come regolatore chiave nel controllo della proliferazione, sopravvivenza e differenziazione delle cellule ematopoietiche [Cobas M., Duchartre Y. et al, 2004 e 2016]. L'attivazione aberrante di tale via è stata trovata sia in AML che in CML. Studi successivi hanno dimostrato che essa è necessaria per l'efficiente auto-rinnovamento delle LSC, indicando che è un'attraente target terapeutico per AML e CML [Hu Y., Wang Y. et al, 2009 e 2010]. Inoltre, è stato documentato che la via di segnalazione Wnt e la proteina BMI1 del gruppo polycomb sono coinvolti nell'espansione delle LSC [Lessard J., Park I.K., Schuringa J.J. et al, 2003 e 2010].

Janus chinasi (JAK)/trasduttore di segnale e attivatore della trascrizione (STAT) e fosfatidilinositolo3-chinasi (PI3K)/proteina chinasi B (AKT) sono due vie di segnale cruciali che sono state implicate nella sopravvivenza delle LSC e nella formazione di tumori multipli. È ben noto che la trasformazione maligna di molti tipi di cellule, in particolare delle cellule ematopoietiche, comporta la disregolazione di JAK /STAT e/o PI3K / AKT che regolano la proliferazione cellulare e la sopravvivenza. Ad esempio, c'è una considerevole prova dimostrante che le aberrazioni in queste vie di segnale sono associate a numerose leucemie. Nelle CML, le vie di segnale JAK/STAT/PIM (inserzione pro-virale nel modello murino) e PI3K/AKT/mTOR (target di rapamicina) sono attivate costitutivamente da Bcr-Abl, una tirosina chinasi non recettoriale, risultando in un' incontrollata proliferazione cellulare. Bcr-Abl può anche causare la fosforilazione della tirosina di SOCS-1 e SOCS-3, due potenti soppressori del segnale JAK/STAT e quindi diminuisce i loro effetti inibitori sull'attivazione di JAK/STAT [Qiu X. et al, 2012]. È interessante notare che la mutazione di PI3K e la mutazione di AKT1 (E17K) sono state identificate in una varietà di tumori. AKT1 mutante (E17K), una forma costitutivamente attivata di AKT1, può promuovere in modo significativo la genesi dei tumori. Inoltre, è stato osservato che altri membri della via PI3K/AKT/mTOR, come PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) e mTOR, funzionano nel mantenimento delle LSC [Gutierrez A. et al, 2009]. Di recente, è stato dimostrato che esiste un'interazione (cross-talk) tra le vie di segnale JAK/STAT/PIM e PI3K/AKT/mTOR che convergono sul fattore eucariotico di inizio della traduzione 4B (eIF4B) per regolare la sopravvivenza di Abl trasformanti [Yang J, Chen K. et al, 2013 e 2016]. In breve, le prove raccolte hanno suggerito che vie di segnalazione multiple sono coinvolte nello sviluppo delle LSC. Una profonda delucidazione della complicata rete di segnalazione nelle LSC è significativa per la comprensione delle LSC e per progettare un trattamento preciso della leucemia attraverso il targeting delle LSC. Attualmente, sono in corso varie sperimentazioni cliniche per testare l'efficacia di agenti che hanno come bersaglio proteine intracellulari e vie di segnalazione associate alle LSC. Per esempio, studi clinici sul farmaco CAL-101, un inibitore di PI3K, hanno mostrato un notevole successo nella leucemia linfocitica cronica (CLL). È stato anche scoperto che CAL-

101 ha alcuni effetti sul microambiente tumorale [Fruman D.A. et al, 2011]. Inoltre, altri inibitori che in clinica hanno come bersaglio le vie di segnalazione PI3K/AKT/mTOR, NF- κ B e Wnt sono elencati in Tabella 1 [Frankel A. et al, 2008].

3.3.2. COINVOLGIMENTO FUNZIONALE DI RNA NON CODIFICANTI NELLA EMOPOIESI TUMORALE

RNA non codificanti (ncRNA), come i microRNA (miRNA) e lunghi RNA non codificanti (lncRNA), giocano ruoli critici in molteplici processi biologici. L'espressione e il funzionamento aberrante di questi ncRNA è associato a vari tumori e alle cellule staminali tumorali. Qui, vengono evidenziati diversi miRNA e lncRNA come regolatori chiave nelle cellule ematopoietiche e nelle LSC (Figura 5).

3.3.3. REGOLAZIONE DELLE NEOPLASIE EMATOPOIETICHE DA PARTE DEI miRNA

I miRNA sono ncRNA a 18-22 nucleotidi che in generale regolano l'espressione genica promuovendo la degradazione dell'mRNA o inibendo la traduzione dell'mRNA. Durante la genesi dei tumori, alcuni miRNA agiscono come oncogeni, mentre altri funzionano come soppressori del tumore. Possono regolare la crescita cellulare, la proliferazione, la sopravvivenza, la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali. In particolare, i ruoli di noti miRNA nell'ematopoiesi normale e maligna sono stati ampiamente rivisti. Questi mi-RNA regolano quasi ogni fase dello sviluppo e della differenziazione sia delle normali cellule ematopoietiche che delle LSC.

MiR-125 è un miRNA altamente conservato. Ci sono tre omologhi di miR-125 (hsa-miR-125b-1, hsa-miR-125b-2 e hsa-miR-125a) nell'uomo [Shaham L. et al, 2012]. Indagini precedenti hanno rivelato che miR-125 altamente espresso aumenta l'auto-rinnovamento e la sopravvivenza delle HSC e la disregolazione di miR-125 si verifica in molteplici neoplasie ematopoietiche. In particolare, miR-125 è implicato nell'ematopoiesi attraverso la rete di regolazione che coinvolge p53 [Tarasov V. et al, 2007].

Recentemente è stato dimostrato che miR-126 conserva la quiescenza delle LSC nella AML e promuove la resistenza alla chemioterapia agendo sulla via PI3K/AKT/mTOR [Lechman E.R. et al, 2016]. È interessante notare che la riduzione del livello di miR-126 danneggia il mantenimento delle LSC, ma gioca un ruolo opposto nelle normali HSC [Lechman E.R. et al, 2016]. Inoltre, è stato anche scoperto un coinvolgimento funzionale di miR-29a nelle LSC della AML [Han Y.C. et al, 2010]. Esperimenti precedenti hanno dimostrato che anche miR-29a era altamente espresso nei campioni di AML. Inoltre, i risultati hanno mostrato che miR-29a può promuovere la proliferazione dei progenitori ematopoietici, e può trasformare la AML convertendo i progenitori mieloidi in LSC [Han Y.C. et al, 2010].

3.3.4. COINVOLGIMENTO DI lncRNA NELLA GENESI DELLA LEUCEMIA

Negli ultimi dieci anni, numerosi lncRNA sono stati identificati e riconosciuti come nuovi regolatori che sono implicati in vari processi cellulari. LncRNA sono generalmente più di 200 nucleotidi in lunghezza, e modulano l'espressione genica attraverso l'interazione con DNA, RNA e proteine. Funzionano a più livelli, includendo la trascrizione genica, l'elaborazione post-trascrizionale, la traduzione dell'RNA e le modifiche epigenetiche [Mercer T.R. et al, 2013]. È stato segnalato che alcuni lncRNA sono coinvolti nella regolazione delle CSC. Ad esempio, l'lncRNA, chiamato lncTCF7, è stato identificato promuovere l'auto-rinnovamento delle CSC del fegato e la propagazione del tumore attivando la segnalazione Wnt [Wang Y. et al, 2015]. Inoltre, molti lncRNA sono stati visti essere associati alle normali cellule ematopoietiche e a vari tipi di leucemia (Fig. 5). La disregolazione di lncRNA H19 è stata osservata in vari tumori, compresa la leucemia indotta da Bcr-Abl. H19 agisce come regolatore duale in diversi tipi di cancro (come oncogene o soppressore del tumore) e serve anche come precursore per miR-675, noto per la down-regolazione del gene RB soppressore del tumore nel cancro colon-retto umano [Cai X., Tsang W.P. et al, 2007 e 2010]. È importante sottolineare che H19 è altamente espresso nelle HSC a lungo termine (LT-HSC). Il deficit di H19 si risolve con l'attivazione della via del fattore di crescita insulino-simile di tipo 2 (IGF2)- recettore di IGF1, che porta ad aumentare la proliferazione e diminuisce l'auto-rinnovamento a lungo termine delle HSC. Recentemente è stata analizzata in modo esauriente l'espressione di lncRNA nelle cellule umane della CML [Guo G. et al, 2015]. In particolare, un lncRNA definito lncRNA-BGL3 era altamente indotto in risposta al silenziamento dell'espressione di Bcr-Abl o all'inibizione dell'attività della chinasi Bcr-Abl nelle cellule K562 e nelle cellule leucemiche derivate da pazienti con CML. Inoltre, lncRNA-BGL3 funziona come RNA endogeno competitivo (ceRNA) per cross-regolare l'espressione di PTEN, modulando in tal modo la sopravvivenza delle cellule leucemiche. Quindi, lncRNA-BGL3 è stato identificato come soppressore del tumore nella trasformazione cellulare mediata da Bcr-Abl. Ad oggi, miRNA e lncRNA sono stati confermati da numerose evidenze sperimentali come mediatori funzionali nelle cellule tumorali e nelle cellule staminali tumorali. Alcuni ncRNA associati al cancro sono attualmente considerati come bio-marcatori per la prognosi del paziente e potenziali agenti terapeutici per particolari tumori. Per esempio, MRX34, il primo miRNA mimic, è entrato negli studi clinici di fase I in pazienti con carcinoma epato-cellulare avanzato nel 2013 [Bouchie A., 2013]. In AML si è osservato che miR-126 si arricchisce di LSC della AML e contribuisce al mantenimento a lungo termine e all'auto-rinnovamento delle LSC. Il trattamento con nuove nano-particelle contenenti antagomiR-126 (micro RNA antisense) si traduce in una riduzione delle LSC in vivo [Dorrance A.M. et al., 2015]. Pertanto, una migliore comprensione dei meccanismi alla base del coinvolgimento funzionale di miRNA e lncRNA nello sviluppo delle LSC e nella

genesi della leucemia è di grande importanza per un trattamento preciso dei tumori maligni ematopoietici.

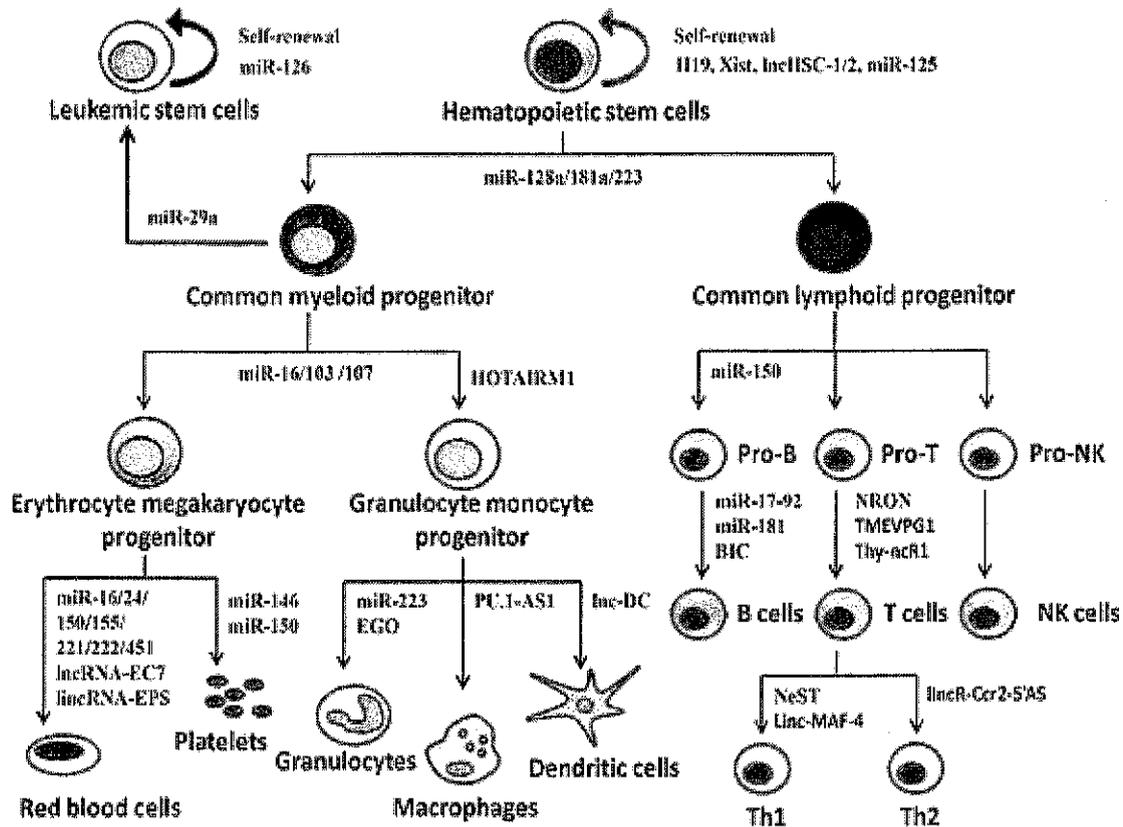


Figura 5. Il coinvolgimento di miRNA e lncRNA nell'ematopoiesi normale e maligna miRNA e lncRNA regolano quasi tutte le fasi dello sviluppo/differenziazione delle cellule ematopoietiche durante l'ematopoiesi sia normale che maligna. La disregolazione di ncRNA (in colore rosso) è associata con la trasformazione delle cellule ematopoietiche [da Satpathy A.T., Guo G. et al, 2015].

4. EVASIONE IMMUNITARIA DA PARTE DELLE LSC E NUOVI APPROCCI TERAPEUTICI PER EVITARLA

4.1. CARATTERISTICHE IMMUNO-FENOTIPICHE E FUNZIONALI DELLE CELLULE STAMINALI LEUCEMICHE (LSC)

Le cellule leucemiche e le LSC esprimono antigeni che sono immunogenici (sostanze in grado di stimolare il sistema immunitario) e che possono essere riconosciuti dalle cellule immunitarie, come molecole MHC e ligandi co-stimolatori che consentono l'interazione con le cellule T endogene. Le risposte immunitarie innate alla leucemia sono state clinicamente documentate nei pazienti [Molldrem J.J. et al, 2000]. È stata anche confermata l'immunogenicità in vivo degli antigeni associati alla leucemia (LAA) in pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche (HSCT) per AML e CML. Sono state riportate risposte dei linfociti T citotossici (CTL) contro un'ampia gamma di LAA (antigeni associati alla leucemia) e CTA (antigeni del cancro testicolare), tra cui HOXA9, proteinasi-3, survivin (proteina), WT1 e PRAME (antigene espresso preferenzialmente nel melanoma). Alcuni antigeni della leucemia, possibili bersagli terapeutici, sono originati dall'oncogenesi stessa e sono specifici delle cellule leucemiche, come la proteina di fusione BCR/ABL1 nella CML e il Philadelphia (Ph)+ALL, PML/RAR- α nella leucemia promielocitica acuta, FLT3-ITD e NPM1 mutato nella leucemia mieloide acuta e IDH1/2. Nonostante ciò, solo pochi riarrangiamenti cromosomici specifici per la leucemia danno origine a proteine antigeniche, e questi includono le proteine di fusione AML1-ETO (t (8; 21)), DEK-CAN (t (6; 9)) e PML / RAR- α (t(15; 17)). La maggior parte degli antigeni è stata caratterizzata come LAA, cioè molecole espresse sulle cellule leucemiche, ma anche su cellule normali non maligne. Ad esempio, WT1 non è una molecola specifica per la leucemia, essendo rilevata a bassi livelli in vari tessuti normali, come le gonadi, i reni e il sistema ematopoietico, ma è altamente sovra-espressa dalle cellule leucemiche. L'espressione di BMI-1, un repressore epigenetico del locus del gene soppressore tumorale CDKN2A e regolatore dell'auto-rinnovamento delle HSC umane, è più alto nelle cellule CD34⁺ derivanti da pazienti con CML rispetto a quelle derivanti da donatori sani e aumenta anche con la progressione della malattia da fase cronica a fase avanzata [Rizo A. et al, 2010]. È interessante notare che BMI-1 può essere un bersaglio delle risposte dell'impianto contro la leucemia (GVL) in pazienti con CML che ricevono il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) da un fratello con HLA (sistema antigenico leucocitario umano) identico [Mohty M. et al, 2008]. Livelli di espressione elevati di BMI-1 prima del trapianto allogenico (HSCT) erano un marker indipendente associato a minore incidenza e gravità della malattia dell'impianto contro l'ospite (GVHD) acuta = una delle maggiori complicanze che si può verificare dopo trapianto di midollo osseo (di cellule staminali ematopoietiche allogeniche) e trattasi di una reazione del sistema immunitario del donatore contro i tessuti dell'ospite (ricevente) e contro le cellule tumorali, minore mortalità senza recidiva, migliore sopravvivenza globale (OS) in pazienti con CML in fase cronica.

Linfociti T citotossici (CTL) specifici per BMI-1 sono stati rilevati nel 20% dei donatori fratelli di cellule staminali ematopoietiche (HSC) e nel 42% dei pazienti con leucemia mieloide cronica HLA-A*0201 prima del trapianto (HSCT) [Young A.S. et al, 2011]. La maggior parte dei linfociti T citotossici (CTL) specifici per BIM-1 rilasciavano IFN- γ , ma non IL-2, IL-4 o IL-10, in seguito all'esposizione al peptide. In una minoranza di donatori di HSC, sono state rilevate anche la produzione di TNF- γ e la de-granulazione delle cellule NK (Natural killer). Le cellule T specifiche per BMI-1 esibivano un fenotipo di memoria, prontamente si espandevano in colture in vitro a breve termine (7 giorni) e potevano essere rilevate in pazienti che avevano subito il trapianto da donatori di HSC positivi ai linfociti T citotossici (CTL-positive). Sebbene non si sia riusciti a raggiungere un significato statistico a causa delle ridotte dimensioni di questo studio di coorte sulla CML, i pazienti i cui donatori hanno manifestato risposte immunitarie ai peptidi BMI-1 hanno mostrato una migliore sopravvivenza libera da leucemia (LFS), quindi senza recidiva, dopo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (80%) rispetto ai pazienti i cui donatori non avevano manifestato risposta immunitaria a BMI-1 (60%) [Young A.S. et al, 2011]. Questi studi suggeriscono che le proteine del gruppo Polycomb (proteine che promuovono la repressione genica) possono avere una rilevanza per il controllo della malattia attraverso le risposte immunologiche GVL e possono essere un potenziale biomarcatore per identificare quei pazienti che potrebbero sviluppare GVHD. La sovra-espressione di BIM-1, CLL-1 e TIM-3 era anche correlata ad una sopravvivenza globale (OS) più breve in uno studio di coorte di 40 pazienti con AML di diagnosi recente [Darwish N.H. et al, 2016].

Altri antigeni associati alla leucemia (LAA) appartengono alla famiglia degli antigeni del cancro al testicolo (CTA), un ampio gruppo di proteine immunogene che sono normalmente espresse solo nelle cellule germinali dei testicoli e, in misura minore, nelle ovaie e nei trofoblasti placentari. Dato lo stato immunitario privilegiato dei tessuti appena citati, i CTA sono considerati essere di fatto antigeni specifici del tumore e promettenti/potenziati bersagli per approcci immunoterapici. PRAME è stato ampiamente caratterizzato come un CTA associato alla AML, sebbene il suo profilo di espressione nei tessuti normali, come le ghiandole surrenali, l'endometrio e il pancreas, è più ampio di quello dei CTA "classici". Le cellule T specifiche per PRAME possono anche riconoscere normali cellule epiteliali renali e cellule dendritiche. È importante sottolineare che alcuni LAA potrebbero essere down-regolati nelle LSC rispetto alle cellule leucemiche più differenziate. In uno studio, l'analisi di 5 campioni AML tramite microarray Affymetrix Hu133A, ha permesso l'identificazione di 261 riparazioni del DNA, la trasduzione del segnale e i geni del ciclo cellulare, l'espressione dei quali era significativamente inferiore nelle LSC derivate da AML confrontati con le cellule leucemiche CD34⁺CD38⁺ [Gal H. et al, 2006]. Questi risultati erano coerenti con l'aumento delle aberrazioni cromosomiche e delle mutazioni che sono tipiche della AML. È interessante notare che la glicoproteina trans-membrana CD123 (la catena- α trans-membrana del recettore di IL-3), una molecola precedentemente identificata come marcatore specifico delle LSC in AML e trovato essere co-espreso con CD33 nel 70% dei casi adulti di AML,

è stato rilevato sulle LSC, ma non sulle cellule *bulk* della leucemia. CD123 è stato trovato essere espresso più frequentemente di CD33 o CD34 in un gruppo di campioni di AML umana primaria [Gill S. et al, 2014]. Esperimenti di selezione cellulare hanno dimostrato che entrambe le popolazioni CD123^{dim} e CD123^{bright} formavano colonie in mezzi semisolidi e hanno suggerito che potenzialmente tutti i blasti della AML sono funzionalmente CD123⁺. È importante sottolineare che l'espressione di CD123 non era più elevata sulle LSC fenotipicamente definite rispetto alla massa di cellule leucemiche.

La proporzione delle cellule CD34⁺CD38^{low}/CD123⁺ si è dimostrata essere altamente variabile nelle AML “*de novo*”, andando dallo 0,01 al 67% e predittiva della risposta al trattamento e della sopravvivenza. In particolare, una frequenza di cellule CD34⁺CD38^{low}/CD123⁺ superiore al 15% al momento della diagnosi e un cariotipo sfavorevole si correlano con la mancanza di una risposta completa alla chemioterapia di induzione in 100 pazienti di età minore di 65 anni [Vergez F. et al, 2011]. Inoltre, una popolazione superiore all'1% di cellule CD34⁺CD38^{low}/CD123⁺ influenza negativamente la sopravvivenza libera dalla malattia e quella globale (OS) nei gruppi con cariotipo intermedio e favorevole.

La coppia ligando/recettore CD70/CD27 della superfamiglia del TNF (fattore di necrosi tumorale) è stato mostrato essere espresso sui blasti della AML e sulle cellule staminali/progenitrici della AML, ma non su HSC provenienti da donatori sani di midollo osseo [Reither C. et al, 2017]. La segnalazione CD70/CD27 attiva programmi di espressione genica delle cellule staminali, promuove la proliferazione cellulare delle cellule AML e media la resistenza ai farmaci nella CML [Reither C. et al, 2015]. CD27 solubile, i cui livelli potrebbero riflettere il grado delle interazioni CD70/CD27 in vivo, era significativamente elevato nei sieri di pazienti con AML recentemente diagnosticata ed era un forte predittore negativo indipendente di sopravvivenza globale (OS). Il blocco con anticorpi delle interazioni CD70/CD27 ha indotto divisioni cellulari asimmetriche e differenziazione nei blasti e nelle cellule staminali/progenitrici della AML, ha inibito la crescita cellulare e la formazione di colonie e in modo significativo ha prolungato la sopravvivenza nei xenotrapianti di modelli murini di AML. È interessante notare che i TKI (inibitori tirosin-chinasi) sottoregolano l'espressione del micro-RNA miR-29, che porta alla sovra-espressione di CD70. La combinazione di TKI con il blocco di CD27/CD70 può eliminare in modo efficace le cellule staminali/progenitrici umane CD34⁺ della CML nei xenotrapianti e le cellule staminali leucemiche (LSC) nei modelli murini di CML, suggerendo che le interazioni CD70/CD27 potrebbero essere colpite per superare la resistenza al trattamento nelle LSC della CML [Reither C. et al, 2015]. Va sottolineato che le LSC resistenti ai TKI sono estremamente rare nel midollo osseo di pazienti con CML. Inoltre, le LSC non possono essere isolate selettivamente dalle normali HSC che ricostituiscono il midollo osseo dopo la terapia con TKI.

CD96 (noto anche come: *T cell-activate increased late expression (TACTILE)*) è una glicoproteina transmembrana che media le interazioni adesive delle cellule T e NK attivate durante la fase tardiva della risposta immunitaria. Lo splicing alternativo genera più varianti di trascrizione che codificano distinte isoforme. CD96 è espresso

nella maggior parte delle cellule CD34⁺CD38⁻ della AML in quantità > 60% dei campioni primari, in contrasto con il 5% delle cellule in popolazioni normali arricchite con HSC. Quando trapiantate nei topi neonati Rag2^{-/-}γc^{-/-} irradiati solo le cellule CD96⁺ hanno mostrato livelli significativi di attecchimento nel midollo osseo dei topi riceventi, suggerendo che CD96 può servire come bersaglio terapeutico specifico per le LSC. L'espressione di CD96 è stata rilevata in pazienti affetti da AML con WT1 mutato ed è stata associata a caratteristiche cliniche e biologiche avverse, come un numero maggiore di globuli bianchi e una maggiore percentuale di blasti nel sangue e di FLT3-ITD [Becker H. et al, 2010]. Anticorpi anti-CD96 biotinilati (TH111) che eliminano in modo efficiente le LSC che esprimono CD96 potrebbero essere impiegati per ingegnerizzare i trapianti di HSC tramite separazione magnetica [Staudinger M. et al, 2014].

Interferone (IFN)-γ è la principale citochina effettrice secreta dai linfociti T citotossici. Le cellule staminali leucemiche murine e le cellule progenitrici umane CD34⁺ della CML esprimono i recettori per IFN-γ [Schurch C. et al, 2013]. Sebbene le LSC della CML esprimano molecole di co-stimolazione e molecole MHC ed inducano la proliferazione di cellule T effettrici in vitro, la stimolazione da IFN-γ, e sovra-espressanti PD-L1/PD-L2 hanno dimostrato di accelerare la progressione della CML dopo il trapianto seriale nei topi [Schurch C. et al, 2013]. I linfociti T citotossici trasferiti in modo adottivo hanno migliorato l'espansione delle LSC tramite IFN-γ solo nei topi con alto carico di antigeni leucemici. Quando i topi riceventi furono analizzati 18 ore dopo il trasferimento, in un ambiente sperimentale in cui il carico di antigene leucemico era basso, né il numero delle LSC né i livelli sierici di IFN-γ erano aumentati e i linfociti T citotossici poterono radicare con successo le LSC. Le caratteristiche geniche indicative di risposta all'IFN-γ sono state identificate in linee cellulari umane di AML e LMC [Vadakekolathu J. et al, 2017]. È interessante notare che livelli di espressione più elevati dei geni implicati nella via di segnalazione ("pathway") dell'IFN-γ, tra cui IRF1, MX1, SOCS1, PD-L1 e IFNGR1, possono essere messi in correlazione con un esito clinico peggiore nei pazienti con AML [Vadakekolathu J. et al, 2017], come sostenuto dall'analisi della sopravvivenza dei pazienti utilizzando i dati trascrittomici disponibili nel "The Consorzio Cancer Genome Atlas (TCGA)" (<http://www.oncolnc.org/>, data di accesso: 20 dicembre 2017). IFN-γ è un induttore prototipo della indoleamina 2,3-diossigenasi-1 (IDO1), che catabolizza l'aminoacido essenziale triptofano ad intermedi immunosoppressivi, a cui si fa riferimento collettivamente come CHINURENINE (metabolita del triptofano), ed è sovra-espresso in una varietà di tumori solidi e neoplasie ematologiche, incluso il 50% dei pazienti con AML di recente diagnosi. Allo stesso modo, i livelli di CHINURENINE sono aumentati in circa il 45% dei pazienti con CML non trattata, correlati con carico tumorale e si sono normalizzati durante il trattamento del paziente [Vonka V. et al, 2015]. Un punteggio immuno-istochimico di IDO1 calcolato moltiplicando il grado di intensità della colorazione di IDO1 per la percentuale di cellule mononucleate colorate ha dimostrato di prevedere il fallimento dell'induzione e di correlarsi negativamente con la sopravvivenza globale (OS) in pazienti adulti con AML [Mangaonkar A. et al, 2017]. Il trattamento in vitro delle

linee cellulari della AML con IFN- γ si traduce nella sovra-regolazione (up regulation) di IDO1 funzionale e di altri mediatori pro-infiammatori, tra cui la cicloossigenasi-2. Piccole molecole inibitrici di IDO1, cioè INDOXIMOD (1-metil-D-triptofano) ed EPACADOSTAT (INCB24360), sono stati testati in clinica, con rapporti iniziali che mostrano sicurezza e tollerabilità nei pazienti con tumori solidi avanzati [Beatty G.L., Soliman H. H. et al, 2017, 2014 e 2016]. Gli studi hanno suggerito che IDO1 potrebbe essere selettivamente elevato nelle cellule che iniziano il tumore (TIC) da cancro mammario, cancro alla prostata e linee cellulari del mesotelioma e cellule di glioblastoma umano primario. Il trapianto seriale di TIC era associato alla sovra-espressione di IDO1 nei topi riceventi. Tutti i tipi di TIC hanno espresso anche più alti livelli del meccanismo di uptake del triptofano, compreso il trasportatore eterodimerico di aminoacidi LAT1 (SLC7A5)/CD98 (SLC3A2). Attualmente non è noto se le LSC in AML e CML facciano affidamento sull'espressione di IDO1 come strategia di evasione immunitaria e se i pazienti con neoplasie ematologiche possano trarre beneficio dalla terapia con piccole molecole che inibiscono IDO1.

Una sperimentazione clinica, di fase 1b/ randomizzata di fase 2a, di indoximod in associazione con idarubicina per tre giorni e con citarabina per sette giorni (3 + 7) sta attivamente reclutando pazienti con AML diagnosticata di recente e di età > 18 anni con completamento prefissato nel 2018 (clinicaltrials.gov identifier:NCT02835729). I risultati della fase I della sperimentazione clinica hanno dimostrato che l'incorporazione di indoximod, nell'induzione della remissione convenzionale e nel consolidamento, è ben tollerata senza aggiungere significativa tossicità e può migliorare l'esito clinico [Emadi A. et al, 2017]. A partire dal 1 marzo 2017, cinque su sei (83%) dei pazienti valutabili hanno raggiunto una remissione completa (RC) di malattia minima residua (MRD) negativa dopo l'induzione e sono rimasti negativi alla MRD dopo il primo ciclo di consolidamento con citarabina.

4.2. TARGETING DI ANTIGENI ASSOCIATI A LSC PER SUPERARE LA RESISTENZA TERAPEUTICA

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogenico (HSCT) è una modalità di immunoterapia efficace per pazienti con AML a rischio intermedio e ad alto rischio. Un'analisi dei documenti di 10.632 pazienti in tutto il mondo, che erano vivi ed esenti da malattia 2 anni dopo aver ricevuto un trapianto mielo-ablativo allogenico di cellule staminali ematopoietiche per neoplasie ematologiche prima del 2004, ha mostrato che la probabilità di sopravvivere 10 anni dopo il trapianto (HSCT) è dell'84% per le AML e 80% per le sindromi mielo-displastiche (MDS) [Wingard J.R. et al, 2011]. Tuttavia, l'aspettativa di vita è rimasta inferiore al previsto a causa dei decessi non attribuibili a ricadute ma principalmente alla *graft-versus-host-disease* (GVHD) = "malattia del trapianto contro ospite", infezioni, tossicità d'organo e tumori secondari. C'è urgente necessità di sviluppare approcci più specifici e meno tossici, soprattutto per i pazienti più anziani. L'identificazione di target immunoterapici "attuabili" all'interno del compartimento delle LSC sarebbe di

grande beneficio per implementare approcci innovativi alla traslazione clinica (Figura 6). Le strategie dirette contro le LSC ricadono in due ampie categorie: terapie che eradicano le LSC (definite "specifiche per le LSC") e terapie che eradicano sia la massa della AML che il compartimento delle LSC (definite "attive per le LSC"). La prima proprietà immuno-fenotipica specifica per LSC era l'espressione di CD123 nel compartimento $CD34^+CD38^-$. Alcune molecole diversamente espresse vengono attualmente colpite in modelli pre-clinici di neoplasie ematologiche e in studi clinici, per lo più utilizzando approcci terapeutici basati su anticorpi e cellule (Figura 6). CD123 è stato colpito con anticorpi monoclonali neutralizzanti (ad es. 7G3) in topi NOD/SCID [Jin L. et al, 2009] e in pazienti con leucemia mieloide acuta (AML) recidivante/refrattaria [He S.Z. et al, 2015]. In uno studio, il trattamento con 7G3 ha ridotto il potenziale di attecchimento delle LSC derivate da AML e ha migliorato la sopravvivenza dei topi. 7G3 inibisce anche il segnale intracellulare mediato da IL-3 di cellule $CD34^+CD38^-$ della AML isolate in vitro e riduce la loro sopravvivenza.

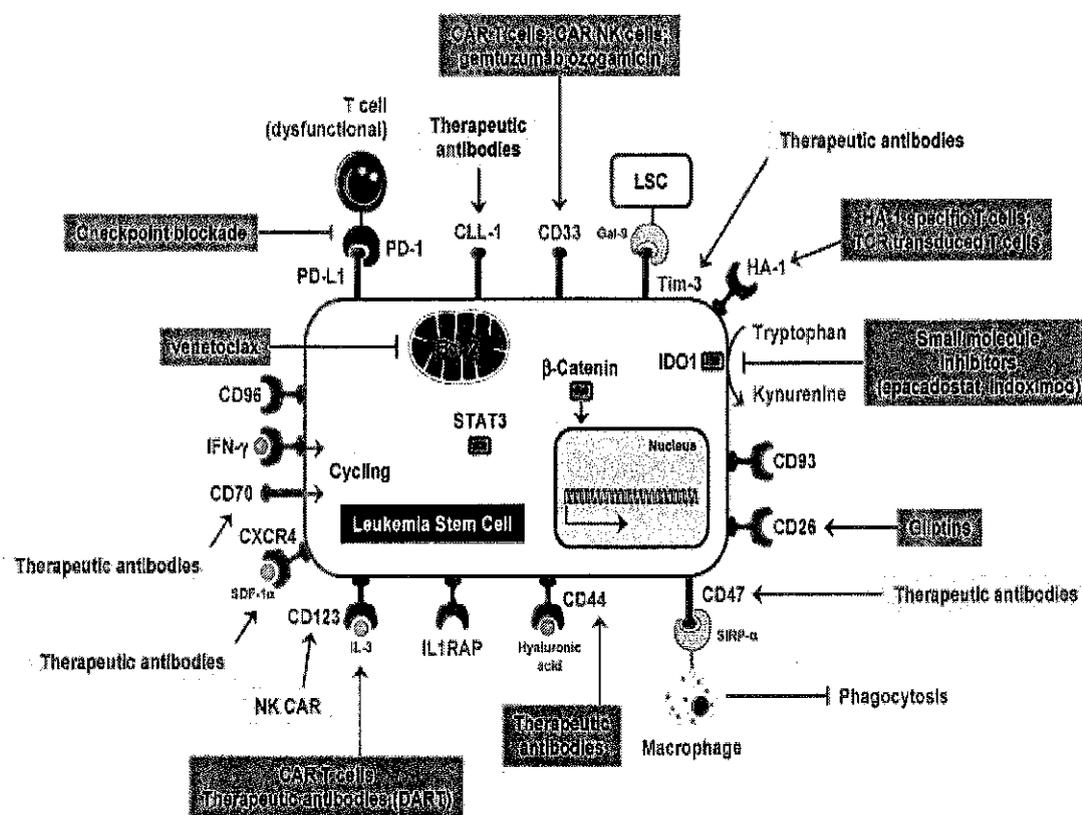


Figura 6. Target attuabili espressi nelle cellule staminali della leucemia) [da Majeti R., 2011]

Strategie terapeutiche attualmente valutate includono l'uso di cellule T modificate con recettore antigene chimerico (CAR)-MODIFIED T CELLS e di anticorpi come le molecole DART (DUAL AFFINITY RE-TARGETING) bi-specifiche per CD123 e per CD3.

caselle verdi = strategie terapeutiche che vengono investigate in studi clinici, come il targeting di CD33 e CD44 e l'antagonismo Bcl-2

caselle gialle indicano approcci terapeutici, come il targeting di CXCR4 e CD47 e il blocco di TIM-3, che sono stati esplorati nei modelli murini di leucemia

PTC-209 è un inibitore del BMI-1 sviluppato recentemente. E' stato dimostrato che il trattamento farmacologico delle cellule CML con PTC-209 attiva l'espressione di ciclina G2 (CCNG2), diminuendo così l'attività clonogenica [Mourgues L. et al, 2015]. Inoltre, i livelli di BMI-1 e CCNG2 si sono evoluti inversamente durante la progressione della CML, suggerendo che BMI-1 potrebbe supportare la trasformazione acuta della CML attraverso il silenziamento di una risposta autofagica (rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati) soppressiva del tumore mediata da CCNG2. Un' altra piccola molecola che inibisce BMI-1, il PTC-596, innesca eventi molecolari corrispondenti con l'induzione dell'apoptosi mitocondriale non dipendente da p53 nelle cellule staminali/progenitrici della AML, come la perdita del potenziale di membrana, cambiamenti in Bax (proteina pro-apoptotica che governa la permeabilità di membrana mitocondriale esterna), scissione della caspasi-3 ed esternalizzazione della fosfatidilserina (funzione segnale: provoca la fagocitosi da parte dei macrofagi). Il PTC-596 ha anche evidenziato attività anti-leucemica in vivo nei topi, risparmiando le normali HSC. La prima fase di uno studio clinico aperto (uno studio clinico in cui sia lo sperimentatore/ medico che i soggetti inclusi sono a conoscenza del trattamento assegnato) sulla sicurezza e sulla farmacocinetica di PTC-596 è attualmente in corso in pazienti con tumori solidi metastatici o non resecabili (non asportabili). (Identificatore ClinicalTrials.gov: NCT02404480). PTC-596 sarà somministrato per via orale, secondo il programma, due volte alla settimana per 4 settimane (un ciclo). Gli obiettivi dello studio saranno quelli di determinare la dose raccomandata per la fase 2 e di stabilire una prova preliminare del meccanismo di azione.

DT388IL-3 (SL-401) è una proteina di fusione contenente i domini catalitici e di traslocazione della tossina difterica fusa con IL-3 umana. Uno studio di escalation (intensificazione) della dose inter-paziente in pazienti con AML e MDS chemio-refrattari ha documentato una risposta completa e una risposta parziale in 40 pazienti valutabili con AML [Frankel A. et al, 2008]. Di cinque pazienti con MDS, uno ha avuto una risposta parziale. Le tossicità erano minime e gli anticorpi anti-DT388IL-3 si sono sviluppati nella maggior parte dei pazienti tra il 15° e il 30° giorno. Altre terapie mirate indirizzate a CD123 includono SL-401 e SL-501. SL-401 è una proteina di fusione ricombinante composta dai domini catalitici e di traslocazione della tossina difterica fusa tramite un collegamento Met-His a IL-3. SL-401 è stato somministrato a pazienti con neoplasia di cellule dendritiche blastiche plasmacitoidi (BPDCN) esprimenti CD123, inducendo una remissione completa (RC) duratura. Curiosamente, sia SL-401 che SL-501, una terapia di nuova generazione mirata al CD123 con maggiore affinità di legame per IL-3R e migliorata potenza, inibiscono la crescita clonogenica e il potenziale di formare colonie a lungo termine e aumentano l'APOPTOSI indotta da IMATINIB delle cellule primarie della CML, includendo i campioni di CML con mutazione T315I della tirosina chinasi. Al contrario, l'effetto additivo di IMATINIB e di SL-401 o SL-501 su cellule primarie di CML da pazienti con malattia resistente agli inibitori tirosin-chinasici (TKI) era limitato a campioni senza la mutazione T315I. Una sperimentazione clinica multicentrica (studio

condotto seguendo un unico protocollo svolto parallelamente in differenti sedi/cliniche/ospedali/università pertanto condotto da più di un ricercatore ma in conformità agli stessi dettami operativi) non randomizzata di SL-401 come terapia di consolidamento (Tabella 1) è in corso in pazienti con AML a rischio avverso nella prima remissione completa (CR) successiva alla chemioterapia di induzione (clinicaltrial.gov Identifier: NCT02270463). Una quarta fase, di uno studio clinico in aperto non randomizzato, esplorerà l'efficacia e la sicurezza di SL-401 nei pazienti con AML e BPDCN (clinicaltrial.gov Identifier: NCT02113982). SL-501 ha anche mostrato attività antitumorale in vitro contro una varietà di linee cellulari derivanti da pazienti con linfoma Hodgkin e non-Hodgkin, fornendo una base logica per ulteriore sviluppo di questa strategia terapeutica [Chen J. et al, 2014].

SL-101 è un anticorpo coniugato comprendente una singola catena Fv anti-CD123 fusa con l'esotossina-A di *Pseudomonas* [Han L. et al, 2017]. La potenza anti-leucemia di SL-101 è stata inizialmente misurata in studi pre-clinici utilizzando un gruppo di linee cellulari della AML. I test di formazione di colonie hanno indicato che SL-101 selettivamente sopprimeva la funzione dei progenitori leucemici, pur risparmiando le controparti normali. I meccanismi alla base dell'attività citotossica di SL-101 comprendevano l'internalizzazione rapida ed efficiente dell'anticorpo, l'inibizione sostenuta della sintesi proteica, l'induzione dell'APOPTOSI e il blocco della fosforilazione indotta da IL-3 di STAT5 (trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione) e AKT (proteina chinasi B). In un modello PDX di AML umana innestato in topi NSG, il pre-trattamento in vitro delle LSC con SL-101 ha compromesso la loro capacità di ripopolamento.

SGN-CD123A è un coniugato anticorpo-farmaco che utilizza un linker dimerico pirrolobenzodiazepinico e un anticorpo CD123 umanizzato con cisteine ingegnerizzate per coniugazione sito-specifica [Li F et al, 2018]. Da un punto di vista meccanicistico, SGN-CD123A induce l'attivazione di vie di risposta al danno del DNA, cambiamenti del ciclo cellulare e APOPTOSI nelle cellule della AML. In vitro, SGN-CD123A media la citotossicità delle linee cellulari CD123⁺ della AML e campioni di AML, compresi quelli derivanti da pazienti con profili citogenetici sfavorevoli o mutazioni FLT3. In vivo, SGN-CD123A ha eradicato la AML in un modello di malattia disseminata, ha indotto una remissione in un modello di xenotrapianto sottocutaneo e ha ritardato significativamente la crescita in un modello di xenotrapianto con resistenza multipla ai farmaci. Inoltre, SGN-CD123A ha anche portato a risultati durevoli di remissione della leucemia in un modello PDX di AML. Una sperimentazione clinica, in corso, di fase 1, di ricerca della dose sta valutando la sicurezza di SGN-123A nei pazienti con LMA (NCT02848248).

CD123 può anche essere un bersaglio valido per l'immunoterapia con cellule (CAR)-T diretta contro AML. Studi pre-clinici hanno recentemente riportato attività anti-AML delle cellule T trasdotte con costrutti CAR contenenti un frammento variabile a catena singola specifico per CD123 in combinazione con CD28 o domini co-stimolatori 4-1BB e un dominio di segnalazione CD3 ζ . Nel primo studio del gruppo *della città di Hope*, le cellule T reindirizzate da CD123-CAR hanno mediato una potente attività effettrice contro linee cellulari CD123⁺ e campioni di AML senza

eliminare la formazione di colonie di granulociti-macrofagi ed eritroidi in vitro. È importante sottolineare che le cellule CAR T specifiche per CD123 esibivano anche attività anti-leucemia in un modello xenogenico di AML disseminata [Mardiros A. et al, 2013]. Un secondo studio del gruppo *Children's Hospital di Philadelphia e University of Pennsylvania* ha mostrato che l'espressione di CD123 aumenta nel tempo in vivo anche inizialmente nelle popolazioni CD123dim e che le cellule T umane trasdotte con un costrutto anti-CD123-41BB-CD3 ζ (CART123) potrebbero eradicare le cellule primarie della AML innestate in topi immunodeficienti, indipendentemente dall'espressione dei livelli basali di CD123 [Tasian S.K. et al, 2017]. Tuttavia, una singola somministrazione di CART123 asporta anche le normali HSC umane, come previsto dall'espressione di CD123 sulle normali cellule B circolanti, cellule mieloidi e megacariociti. Inoltre, le cellule staminali/progenitrici umane fenotipicamente definite non erano rilevabili in animali trattati con CART123 a un mese dopo il trattamento, in correlazione con l'espressione nota di CD123 sulle cellule progenitrici.

Una grave tossicità ematologica delle CAR T cells reindirizzate contro CD123 potrebbe essere ovviata dalla deplezione delle CAR-T con tempismo ottimale dopo l'eradicazione della AML [Tasian S.K. et al, 2017]. Tre strategie di terminazione delle CAR-T sono state recentemente valutate in uno studio di follow-up, includendo l'uso di un anti-CD123 mRNA CART transitoriamente attivo (RNA-CART123), l'ablazione delle cellule T con ALEMTUZUMAB dopo il trattamento con anti-CD123-41BB-CD3 ζ T cells (CART123) e l'ablazione delle cellule T con RITUXIMAB dopo il trattamento con CART123 che co-esprime CD20 (CART123-CD20) [Tasian S.K. et al, 2017]. L'eliminazione rapida e duratura della leucemia in modelli di xenotrapianto murino di AML umana potrebbe essere rilevata in modo coerente e richiedere la persistenza di CAR-T per 4 settimane prima dell'ablazione. È importante sottolineare che la conseguente deplezione mediata da anticorpi di CART123 o CART123-CD20 non ha compromesso la remissione della leucemia. Questi studi faciliteranno l'implementazione clinica delle strategie di deplezione delle cellule T per aumentare la fattibilità delle terapie con CAR-T per i pazienti con AML. Le cellule primarie umane NK possono essere isolate, espanse e trasdotte per esprimere CAR contro CD123 utilizzando il dispositivo Prodigy™ conforme alle norme di buona pratica di fabbricazione (GMP) (Miltenyi Biotech, Germania) [Kloss S. et al, 2017].

Flotetuzumab (MGD006/S80880), un anticorpo DART (*dual antigen re-targeting*) bi-specifico (riconosce sia CD123 che CD3) per ridirigere le cellule T, è stato testato negli adulti con AML e MDS recidivanti/refrattarie tramite uno studio di fase 1 (NCT01766375) [Uy G.L. et al, 2017]. In un rapporto preliminare di dati derivanti da 45 pazienti, la tossicità con eventi avversi correlati al farmaco \geq G3 (principalmente reazioni correlate all'infusione/ sindrome da rilascio di citochine) è stata osservata nel 44% dei pazienti, ma erano gestibili con cure di supporto. L'attività anti-leucemica di flotetuzumab è stata documentata nel 57% dei pazienti e il tasso di risposta globale è stato 43% con risposte maggiori osservate in pazienti trattati con dosaggio di 500 ng/kg/giorno. Marcatori dell'attivazione delle cellule T, tra cui CD25, CD69 e PD1,

sono stati rilevati nel sangue periferico dei pazienti dopo trattamento [Rettig M.P., Godwin C.D. et al, 2017].

L'antigene di differenziazione mieloide CD33 è espresso su blasti leucemici nell' 85-90% dei pazienti affetti da AML. Gemtuzumab ozogamicin (GO) utilizza un anticorpo anti-CD33 coniugato all'antibiotico anti-tumorale CALICHEAMICINA. GO ha una potente citotossicità in vitro contro linee cellulari umane di AML [146-149] e ha dimostrato attività clinica sia negli adulti che nei bambini con AML [131,133,150,151]. Sulla base di queste risposte favorevoli, GO è stato approvato nel 2017 dal FDA statunitense per l'uso negli adulti con AML CD33⁺ di nuova diagnosi e nei pazienti di età pari o superiore a 2 anni con AML CD33⁺ recidivante/refrattaria. I livelli di espressione di CD33 possono anche essere correlati alle risposte cliniche a GO [Pollard J.A. et al, 2016] e uno studio recente dimostra anche l'importanza potenziale delle varianti di splicing di CD33 per la risposta a GO [Lamba J.K. et al, 2017]. È interessante notare che il polimorfismo di CD33a singolo nucleotide rs12459419 C>T nella regione *enhancer di splicing* elimina il dominio variabile CD33 dell'immunoglobulina, che è il sito che lega gli anticorpi per GO. Risultati di una recente studio clinico randomizzato del CHILDREN'S ONCOLOGY GROUP su GO nei bambini con AML di nuova diagnosi suggerisce che i pazienti con genotipo CC per rs12459419 hanno una risposta sostanziale a GO, un'osservazione che indica i polimorfismi di CD33 come potenziali bio-marcatori per la selezione dei pazienti con maggiore probabilità di risposta significativa a immunoterapia con GO [Lamba J.K. et al, 2017]. Gli studi fino ad oggi non hanno determinato se GO, oltre ad agire sulla progenie CD33⁺ più matura, può uccidere direttamente le LSC CD33⁺ in vivo e se i vantaggi a lungo termine derivanti da GO sono legati al *targeting* delle LSC, inclusi i casi di AML che ospitano LSC CD33⁻. È stato proposto che le LSC CD33⁻ che rimangono dopo la riduzione della massa tumorale indotta dalla chemioterapia possono entrare nel ciclo cellulare, acquisire CD33 ed eventualmente diventare suscettibili ai farmaci che hanno come bersaglio CD33. Le cellule CAR-T specifiche per CD33 (CART33) sono attivamente sviluppate con un frammento variabile a singola catena anti-CD33 utilizzato in gemtuzumab ozogamicina (clone My96) [Kenderian S.S. et al, 2015]. CART33 ha esibito funzioni effettrici in vitro, ha eradicato la leucemia e ha prolungato la sopravvivenza negli xenotrapianti di AML. È importante sottolineare che, CART33 ha anche indotto citopenia e ridotto i progenitori mieloidi nei modelli di xenotrapianto di tossicità ematopoietica, suggerendo che cellule CART specifiche per CD33 espresse in modo permanente potrebbero avere una tossicità inaccettabile se iniettate (infused) in pazienti con AML [Kenderian S.S. et al, 2015]. Quando fu progettato un mRNA CAR anti-CD33 espresso in modo transitorio, fu rilevata un'attività potente ma autolimitata, indicando che questa modifica potrebbe essere ulteriormente perseguita per evitare la mielo-soppressione a lungo termine nei pazienti con AML. Un altro approccio si concentra sull'uso di CAR anti-CD33 di seconda generazione che incorporano un segnale di coda 4-1BB-CD3 ζ precedentemente dimostrato di essere efficace negli studi clinici sulla leucemia linfocitica sia cronica che acuta [155]. Le cellule CAR-T

anti-CD33 hanno mostrato effetti anti-leucemia nei topi NSG e ucciso cellule primarie di AML esprimenti CD33.

C-type lectin-like molecole 1 (CLL-1) è stata identificata da un gruppo olandese di ricercatori come molecola di superficie specifica per le LSC della AML [Van Rhenen A. et al, 2007]. L'espressione di CLL-1 è prevalente nella AML, sia al momento della diagnosi sia in caso di recidiva, e non è espressa su HSC in campioni di midollo osseo normali e rigeneranti [Van Rhenen A. et al, 2007]. La popolazione CD34⁺CLL-1⁺, contenente le cellule CD34⁺ CD38⁻ CLL-1⁺, si innesta nei topi NOD/SCID con crescita di blasti CLL-1⁺. Una frazione elevata di CLL-1⁺ era associata a una rapida recidiva. Anticorpi bi-specifici che reindirizzano l'attività citotossica delle cellule T effettrici legandosi a CD3, la componente di segnalazione del Recettore delle cellule T, e un bersaglio tumorale come CD19 mostrano risultati clinici incoraggianti [Batlevi C.L. et al, 2016]. Recentemente è stata segnalata la sicurezza e la potenza di deplezione sulle cellule bersaglio di un anticorpo interamente umano terapeutico IgG1, bi-specifico e dipendente dalle cellule CD3-T, che ha come bersaglio CLL-1 [Leong S.R. et al, 2017]. Le cellule CAR-T CLL-1 sono state anche progettate per esprimere la caspasi-9 inducibile, un "interruttore suicida" di sicurezza che potrebbe accelerare lo sviluppo clinico di questa strategia di immunoterapia, permettendo il controllo della reattività indesiderata delle cellule T contro le cellule mieloidi normali [Tashiro H. et al, 2017].

CD47 è una proteina trans-membrana ampiamente espressa che funge da ligando per la *signal regulatory protein-α* (SIRPα), che è espressa in fagociti inclusi macrofagi e cellule dendritiche (DC). Quando attivata, SIRPα avvia una cascata di trasduzione del segnale con conseguente inibizione della fagocitosi. CD47 è preferenzialmente espressa su cellule LSC derivate dalla AML rispetto alla loro normale controparte e inibisce la loro fagocitosi attraverso l'interazione con un recettore inibitorio sui fagociti [Majeti R. et al, 2009]. Livelli di espressione di CD47 più bassi sono stati riportati nei pazienti con AML con t (8; 21) rispetto ai pazienti con caratteristiche citogenetiche sfavorevoli come FLT3-ITD. Inoltre, l'espressione di CD47 prevedeva una sopravvivenza globale (OS) peggiore in tre studi coorte indipendenti di pazienti adulti con AML stratificati in modo dicotomico in gruppi di espressione CD47^{low} e CD47^{high}. Il trattamento di topi innestati con LSC umane con anticorpi terapeutici anti-CD47 ha portato alla deplezione di AML e al targeting delle LSC. Studi che hanno usato la proteina di fusione SIRPα-Fc per rompere l'interazione SIRPα-CD47 hanno suggerito che la fagocitosi mediata dai macrofagi e la clearance delle cellule staminali della AML dipende dall'assenza di segnalazione di SIRPα [Theocharides A.P. et al, 2012]. Soprattutto, il trattamento con SIRPα-Fc non ha migliorato significativamente la fagocitosi dei normali bersagli ematopoietici tramite attivazione dei macrofagi umani. Teoricamente, il potenziale di CD47 per servire come bersaglio di anticorpi potrebbe essere ostacolato/impedito dal suo basso livello di espressione in molti tessuti. Tuttavia, anticorpi di ratto anti-topo CD47 hanno mostrato sicurezza e mancanza di tossicità significativa quando somministrati ai topi, con la sola eccezione di neutropenia severa [Majeti R. et al, 2009]. Diversi anticorpi

monoclonali diretti contro CD47 sono stati testati nei pazienti con AML e MDS avanzate (clinicaltrials.gov Identificatori: NCT02678338, NCT02367196).

CD44 è una proteina trans-membrana di tipo I e funziona come principale molecola di adesione cellulare per l'acido ialuronico, un componente della matrice extracellulare. CD44 è espresso nella maggior parte dei tipi di cellule umane ed è stato implicato nella patogenesi della leucemia mieloide. Una variante leucemogena di splicing di t (8; 21), che si verifica naturalmente, AML1-ETO9a, aumenta significativamente l'espressione di CD44 sia come RNA che come proteina. Inoltre, il promotore CD44 è legato da AML1-ETO9 e AML1-ETO a livello della cromatina, indicando che l'espressione di CD44 collega la traslocazione 8; 21 alla regolazione di una molecola di adesione cellulare che controlla la crescita di AML. Il legame di CD44 con anticorpi attivanti (H90) eradica le LSC della AML nei topi NOD-SCID bloccando il traffico delle LSC in microambienti favorevoli e alterando il loro destino di cellule staminali [Jin L. et al, 2006]. Il trattamento con H90 (anticorpo) in vitro ha portato a molteplici cambiamenti indicativi della differenziazione terminale, come l'aumento dell'espressione degli antigeni di linea, capacità di ridurre il nitroblu tetrazolio e l'acquisizione di morfologia matura. Il numero di cellule CD34⁺CD38⁻ nel trapianto AML sia nel midollo osseo che nel sangue periferico è stato considerevolmente ridotto nei topi trattati con H90 rispetto ai topi di controllo [Jin L. et al, 2006]. RG7356, un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD44 IgG1 ricombinante, è stato somministrato a 44 pazienti con AML refrattaria/recidivante o a pazienti non idonei per la chemioterapia intensiva in uno studio di dose-escalation di fase I [Vey N. et al, 2016]. Due pazienti hanno raggiunto una risposta completa con recupero piastrinico incompleto o risposta parziale, rispettivamente. Un paziente ha avuto una malattia stabile con miglioramento ematologico. Complessivamente, RG7356 era sicuro e ben tollerato con una tossicità dose-limitante (esacerbazione di emolisi di grado 3) che si verifica dopo una dose di 1200 mg. Considerando che la maggior parte degli eventi avversi sono stati lievi o moderati, le reazioni correlate all'infusione si sono verificate in circa il 60% dei pazienti affetti da AML, principalmente durante il ciclo 1. Due pazienti hanno manifestato meningite asettica di grado 3 indotta da farmaci. Sulla base dei risultati di questo studio, la dose raccomandata per le future valutazioni di AML sarà 2400 mg a settimane alterne. Altri approcci mirati a colpire le LSC che esprimono CD44 includono la produzione di cellule CAR-T reindirizzate contro la variante 6 dell' isoforma CD44 (CD44v6) e contenenti un dominio di segnalazione CD28 [Casucci M. et al, 2013]. Le cellule CD44v6 CAR-T richiedevano l'attivazione in vitro con citochine, come IL-7 e IL-15, per l'efficacia antitumorale in vivo e risparmiavano le HSC normali e i cheratinociti normali che esprimono CD44v6 quando somministrate ai topi portatori di AML. La co-espressione di un gene suicida ha permesso un'ablazione rapida ed efficiente delle cellule CD44v6 CAR-T dopo l'ablazione farmacologica e il salvataggio dei topi dalla malattia acuta del trapianto contro l'ospite (*acute graft-versus-host disease*).

TIM-3 è una glicoproteina di superficie cellulare di tipo 1 originariamente identificata nelle cellule CD4⁺ Th1 di topo. Negli uomini, TIM-3 è anche espressa in una frazione di cellule T, cellule NK, monociti e cellule dendritiche. TIM-3 è ampiamente espresso nella leucemia mieloide acuta (AML) umana, con la sola eccezione della leucemia promielocitica acuta e non è rilevabile nelle normali HSC [Kikushige Y. et al, 2010]. Le cellule della leucemia mieloide acuta TIM-3⁺, ma non TIM-3⁻, ricostituiscono AML umana nei topi immunodeficienti, suggerendo che la popolazione leucemica TIM-3⁺ contiene la maggior parte delle LSC funzionali. Inoltre anticorpi IgG2a di topo anti-TIM-3 umano con attività citotossiche cellulari dipendenti dal complemento e da anticorpi inibiscono l'attecchimento di AML dopo il xenotrapianto e quando somministrati direttamente ai topi innestati con AML umana hanno eliminato la capacità delle LSC di ricostituire AML in riceventi secondari [Kikushige Y. et al, 2010]. Anticorpi monoclonali anti-TIM-3 (TSR-022, MBG453 e LY3321367) sono stati testati in pazienti con tumori solidi in fase avanzata sia come monoterapia (clinicaltrial.gov Identifier: NCT02817633) che in combinazione con il blocco di PD1, (clinicaltrial.gov Identifier: NCT02608268) o il blocco di PD-L1, "*PD-L1 blockade*" (proteina che si lega al recettore PD1 dei linfociti T Natural Killer. Un legame del genere impedisce sia l'attivazione di questi linfociti, distruzione di cellule cancerose, che la proliferazione di cellule immunitarie contro le cellule tumorali) (clinicaltrial.gov Identifier: NCT03099109).

5. STRATEGIA DI DELIVERY DI FARMACI AL MIDOLLO OSSEO

La disponibilità dei farmaci è spesso piuttosto bassa quando gli agenti terapeutici sono somministrati per via sistemica per il trattamento delle neoplasie maligne nel midollo osseo, come la leucemia e le metastasi ossee, a causa del loro rapido metabolismo e clearance, a volte anche prima che siano in grado di influenzare i siti target nel midollo osseo. La maggior parte dei farmaci iniettati o sono eliminati tramite il sistema metabolico/escretore del corpo, o si accumulano in altri tessuti/organi altamente perfusi prima di raggiungere il midollo osseo. Pertanto, i farmaci vengono sempre somministrati in dosi elevate e/o frequentemente per raggiungere l'intensità terapeutica efficace all'interno del midollo osseo, fatto che può portare a inevitabili effetti collaterali sistemici. Per superare questa sfida, la base logica della progettazione richiede una considerazione attenta dei coniugati/trasportatori dei farmaci assicurando soprattutto che il farmaco raggiunga selettivamente la lesione o il sito tumorale all'interno del midollo osseo. Attualmente, ci sono principalmente cinque diverse strategie di delivery del farmaco applicate alla terapia di tumori residenti nel midollo osseo (figura 7).

Bone marrow drug delivery strategy

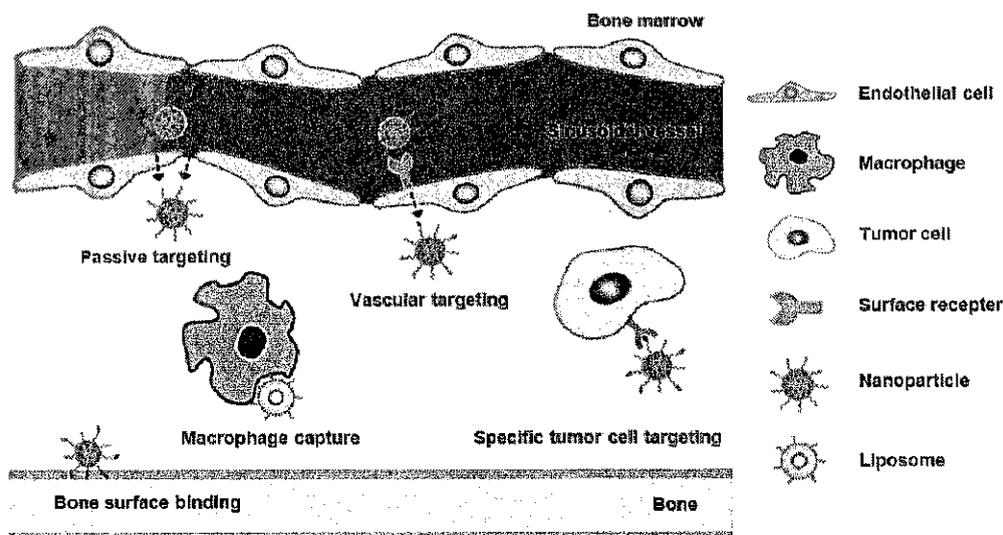


Figura 7. Illustrazione schematica delle strategie di delivery del farmaco mirate al midollo osseo

Un riepilogo del razionale e delle applicazioni dei sistemi di delivery mirati al midollo osseo è presentato nella Tabella 2.

Tabella 2 : Razionalità e applicazioni dei sistemi di delivery mirati al midollo osseo.

Trasportatore	Razionale del targeting	Farmaco	Applicazione
nanoparticelle di PLGA	Targeting passivo tramite carica neutra e dimensioni ridotte (circa 150 nm)	PACLITAXEL	Rallenta la metastasi dell'osso e inibisce la perdita ossea in topi metastatici ossea da cancro alla prostata
liposomi	SA aumenta la cattura dei liposomi da parte dei macrofagi nel midollo osseo	-	L' imaging con ^{99m} Tc in conigli e scimmie indica la sua efficienza di targeting del midollo osseo
liposomi	Liposomi anionici a basso contenuto di colesterolo promuovono l'accumulo nel midollo osseo	CITARABINA: DAUNORUBICINA	Aumenta l'accumulo dei farmaci nelle cellule leucemiche all'interno del midollo osseo e migliora l'efficacia nei topi con AML
liposomi	(AspSerSer) ₆ si lega al fosfato di calcio sulla superficie di formazione dell'osso	Plekho1 siRNA	Esaurisce Plekho1 nelle cellule osteogeniche e aumenta la massa ossea sia nei ratti sani che in quelli osteoporotici
nanoparticelle di PEG-PLGA	Legame alendronato-HA nella matrice ossea	BORTEZOMIB	Il pre-trattamento inibisce la crescita del mieloma in modo maggiore rispetto al farmaco libero nel modello murino di mieloma
micelle di PEG-PLA	Legame alendronato-HA nella matrice ossea	PONATINIB, SAR302503	Aumenta il tempo di sopravvivenza di cellule BaF3 /T315I inoculate in topi con CML
nanoparticelle di PLGA	L'acido poli aspartico si lega a HA	-	Legame specifico al tessuto osseo senza citotossicità a carico degli osteoblasti
coniugato polimerico HPMA	Legame alendronato-HA nella matrice ossea	PACLITAXEL	Inibisce la crescita del tumore mammario in un modello murino di cellule 4T1 iniettate intra-tibia
Immuno-citochine	anticorpi F8, F16 riconoscono la fibronectina e la tenascina C nel sito di angiogenesi della AML nel midollo osseo	INTERLEUCHINA 2	Promuove l'eradicazione completa del tumore in combinazione con citarabina in un modello murino di xenotrapianto di AML
Particelle di silicio poroso	E-selectina tioaptamero si lega alla E-selectina	STAT3 siRNA	Prolunga il tempo di sopravvivenza dei topi con metastasi ossea mediante l'inibizione dell'espressione di STAT3 nel tumore
Particelle di silicio poroso	Tioaptamero specifico di E-selectina	PARTENOLIDE	Danneggiamento delle LSC in topi con trapianto secondario di AML

liposomi	I folati si legano a FR- β	DOXORUBICINA	I liposomi modificati con folati aumentano i tempi di sopravvivenza media dei topi con AML
trasportatore lipidico nano-strutturato	Doppio targeting tramite i legami Alendronato-HA e folati-FR- β	MITOXANTRONE	Farmaci rilasciati alle LSC nel midollo osseo per la terapia della leucemia refrattaria

5.1. TARGETING PASSIVO

Il targeting passivo si riferisce all'accumulo di trasportatori contenenti farmaci o coniugati di farmaci in uno sito specifico attraverso vasi molto permeabili tipici dei tumori e delle zone con infiammazione e che possono evitare l'eliminazione dovuta a meccanismi di difesa del corpo. Le dimensioni e le proprietà superficiali dei trasportatori dei farmaci devono essere controllate in particolare per evitare l'uptake da parte del sistema dei fagociti mononucleati (MPS) al fine di massimizzare il tempo di circolazione e la capacità di targeting della malattia. La bio-distribuzione dei particolati dipende in larga misura dalle loro proprietà come dimensioni, carica superficiale, forma e altre caratteristiche della superficie [Peer D. et al, 2007].

Il fegato, la milza e il midollo osseo hanno capillari con larghi pori o aperture in circostanze normali. Per il delivery dei farmaci nel midollo osseo, le quantità di accumulo dei farmaci nell'osso sono attribuibili all'uptake dei particolati da parte dei fagociti reticolo-endoteliali dei vasi sinusoidi del midollo osseo [Beloqui A. et al, 2013]. L'endotelio dei sinusoidi raccoglie i particolati dalla circolazione sanguigna attraverso vie sia trans-cellulari che intercellulari. Il modo trans-cellulare avviene attraverso le fenestrature tra le cellule endoteliali sinusoidali, e dipende molto dalla grandezza della particella [Sou K. Et al, 2011]. I capillari sinusoidali hanno aperture relativamente grandi (30-40 microm) che consentono ai globuli rossi maturi (7,5-25 microm) e a varie proteine del siero di passare. Tuttavia, Moghimi et al. hanno riportato che la dimensione dei pori nella parete endoteliale è solo di 85 -150 nm. Diventa più difficile passare attraverso i sinusoidi quando la dimensione delle particelle è superiore a 150 nm [Moghimi S.M. et al, 1995]. Può essere ipotizzato che le fenestrature siano dinamiche così come il loro numero e diametro vari facilmente. Possono completamente sparire o apparire in grandi numeri, fatto che dipende dalla interazione tra i particolati e l'endotelio sinusoidale. D'altra parte, per migliorare l'efficienza del delivery nel midollo osseo, le particelle iniettate per via endovenosa devono prima circolare nel sangue abbastanza a lungo da passare attraverso i capillari sinusoidali. Per aumentare il tempo di circolazione del sangue, la modifica di poli (etilen glicole) sulla superficie dei particolati può ridurre il loro uptake da parte dei macrofagi nel fegato e nella milza. Inoltre, le nano-particelle neutre di PLGA hanno una possibilità relativamente bassa di essere opsonizzate dagli organi del MPS rispetto alle nano-particelle di PLGA anioniche e cationiche. Pertanto, le nano-particelle neutre sono più efficaci da accumulare nel midollo osseo. Le nano-particelle di PLGA (circa 150 nm) contenenti paclitaxel hanno rallentato lo sviluppo

di metastasi ossee da tumore della prostata ed inibito la perdita di osso in un modello murino con ridotti effetti collaterali rispetto alla sua formulazione Cremophor EL [Adjei I.M. et al, 2016].

5.2. TARGETING DEL MIDOLLO OSSEO MEDIATO DALLA CATTURA DEI MACROFAGI

I macrofagi sono distribuiti in quasi tutti i tessuti e vengono prodotti quando i monociti circolanti migrano e si differenziano in specifici tessuti. Le cellule di Kupffer e i macrofagi splenici sono responsabili dell'uptake delle vescicole circolanti negli organi del MPS (sistema fagocitario mononucleare) [Epelman S. et al, 2014]. Tuttavia, macrofagi con accesso al midollo osseo come parte degli MPS ricevono poca attenzione rispetto al fegato e alla milza. In effetti, è un potenziale obiettivo per il delivery selettivo di farmaci al midollo osseo usando nano-trasportatori. I macrofagi esprimono diversi tipi di recettori superficiali per la fagocitosi di particolati modificati in modo specifico sulla superficie inclusi liposomi e nanoparticelle polimeriche ecc. I recettori disponibili per il targeting dei macrofagi con nano-trasportatori (*nano-carriers*) sono il recettore del mannosio, il recettore del galattosio, il recettore scavenger e il recettore nicotinico dell'acetilcolina ecc. Tuttavia, è difficile prendere di mira i macrofagi nel midollo osseo perché questi recettori sono comunemente espressi sui macrofagi in quasi tutti i tessuti. Studi recenti hanno dimostrato che alcuni tipi di liposomi modificati superficialmente sono in grado di accumularsi nel midollo osseo tramite fagocitosi specifica [Sou K. et al, 2011]. Si è ipotizzato che questo fenomeno sia risultato dai lipidi rilasciati dai macrofagi per la domanda energetica e la biosintesi della membrana nel midollo osseo. Si è scoperto che i liposomi che avevano la superficie modificata con il 10% di un acido anionico L- glutammico, N-(3-carbossi-1-ossopropil)-1,5-diesadecil estere (SA) sono stati in modo specifico distribuiti nel midollo osseo tramite uptake selettivo da parte dei macrofagi del midollo osseo di coniglio. Al contrario, la distribuzione di liposomi nel fegato e nella milza è diminuita notevolmente dopo modifica con SA (Fig. 8) [Sou K. et al 2007]. Una formulazione liposomiale con basso colesterolo contenente il 20% di 1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoglicerolo (DSPG) ha raggiunto un alto livello di accumulo nel midollo osseo che è in gran parte attribuito alla carica anionica dei liposomi che hanno un'affinità relativamente elevata con il recettore scavenger sui macrofagi del midollo osseo [Tardi P. et al, 2016]. In particolare, la capacità di targeting del midollo osseo da parte dei liposomi modificati superficialmente è dose-dipendente. L'uptake lipidico da parte dei macrofagi del midollo osseo potrebbe essere saturato con un'alta dose lipidica iniettata, che può eliminare la selettività d'organo [Sou K. et al, 2011]. Inoltre, la maggior parte dei liposomi iniettati sono sufficientemente internalizzati dai macrofagi e dai precursori osteoclastici precoci invece che dagli osteoclasti maturi nel midollo osseo [Hofkens W. et al, 2011].

Questi risultati suggeriscono che alcuni liposomi con carica fortemente negativa contenenti derivati lipidici anionici hanno il potenziale per essere usati come nano-

trasportatori mirati al midollo osseo tramite cattura da parte dei macrofagi. Tuttavia, l'esatto meccanismo selettivo dei liposomi catturati dai macrofagi del midollo osseo non è ancora chiaro. La delucidazione del meccanismo offrirà un fondamento logico per la progettazione di nuovi nano-trasportatori con la stessa modalità di targeting. Inoltre, i liposomi come trasportatori di farmaci sono in grado di incapsulare piccoli agenti terapeutici molecolari, macromolecolari, o multipli con proprietà superficiali regolabili e biocompatibilità. Attualmente, la produzione su scala di liposomi con buona riproducibilità e controllo del processo è stata già realizzata [Kraft J.C. et al, 2014], fatto che aumenterà notevolmente il potenziale traslazionale di questa strategia di targeting.

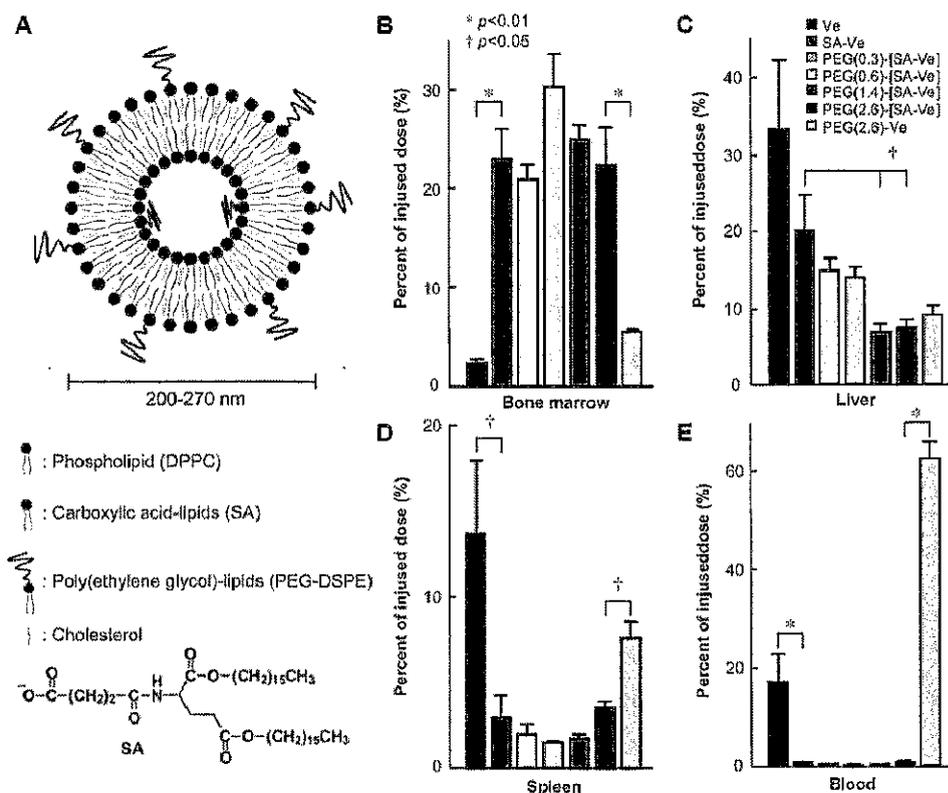


Figure 8. Macrophage capture mediated bone marrow targeted liposomes. (A) The

Figura 8. Liposomi mirati al midollo osseo mediati dalla cattura dei macrofagi
 (A) I costituenti lipidici della formulazione liposomiale. SA, acido L-glutammico, N-(3-carbossi-1-ossopropil)-,1,5-diesadecilestere(B-E). Distribuzione di liposomi modificati con 10% SA (SA-Ve) marcati con tecnezio 99m e liposomi di controllo contenenti diverse quantità di PEG-DSPE nel midollo osseo (B), fegato (C), milza (D) e sangue (E) a 24 ore dall'iniezione endovenosa nei conigli (*, $p < 0,01$; +, $p < 0,05$). [da Sou K. et al, 2007]

5.3. TARGETING DEL MIDOLLO OSSEO MEDIATO DAL LEGAME ALLA SUPERFICIE OSSEA

L'osso è costituito da una matrice di collagene complessa, proteine non collagenose e cristalli di idrossi-apatite (HA). La sialo-proteina ossea (BSP) e l'osteopontina (OPN) come le fosfoproteine extracellulari sono coinvolte nell'elaborata regolazione del legame degli osteoclasti e della mineralizzazione dell'osso. Ci sono molte sequenze di acido glutammico o di acido aspartico in queste fosfoproteine extracellulari, che sono responsabili della loro elevata affinità per i cristalli di HA. Numerosi oligo-peptidi come quelli con una sequenza di otto residui di acido aspartico (Asp)₈ hanno dimostrato la loro particolare interazione con il tessuto osseo. L'alta affinità tra gli oligo-peptidi e HA può essere attribuita all'interazione ionica tra la carica negativa dei peptidi corti e la carica positiva degli ioni calcio all'interno di cristalli di HA a pH fisiologico. È stato riferito che (Asp)₈ si lega in modo preferenziale alle superfici di riassorbimento osseo. Le superfici di riassorbimento osseo prevalentemente occupate da osteoclasti sono costituite da HA altamente cristallizzato. È stato dimostrato in vitro che (Asp)₈ principalmente si lega ad HA altamente cristallizzato anziché ad HA poco cristallizzato. Al contrario, un altro tipo di oligo-peptidi (AspSerSer)₆ si lega preferenzialmente alla dentina, che è composta da piccoli cristalli di fosfato di calcio amorfo invece di HA ben orientati [Yarbrough D.K. et al, 2010]. Un liposoma cationico a base di 1,2-Dioleoil-3-trimetilammonio-propano (DOTAP) collegato con (AspSerSer)₆ è stato progettato per il delivery di siRNA osteogenico il cui bersaglio è la caseina chinasi-2 che interagisce con la proteina-1 (Plekho1) in modo specifico sulle superfici di formazione ossea. Il siRNA di Plekho1 è stato selettivamente arricchito in cellule osteogeniche per la successiva deplezione di Plekho1 nei ratti. I liposomi caricati con siRNA di Plekho1 hanno notevolmente promosso la formazione ossea e migliorato la microarchitettura dell'osso nei ratti sani e osteoporotici [Zhang G. et al, 2012].

I bifosfonati come altro tipo di molecole stabili che hanno come bersaglio l'osso, mostrano un'affinità elevata esclusivamente per HA. Rispetto agli oligopeptidi con (Asp)₈ e (AspSerSer)₆, i bifosfonati si legano sia alla superficie di formazione delle ossa e che alle superfici di riassorbimento osseo. Le caratteristiche eccezionali dei bifosfonati fanno di essi una parte altamente efficiente del targeting dell'osso per il delivery di composti antineoplastici e radio-nucleotidi nel midollo osseo [Shi Y. et al, 2013]. Vale la pena notare che il legame di polimeri/nano-particelle con le sezioni ossee ex vivo non riflette le loro interazioni con superfici ossee in vivo. Diversi fattori determinano l'efficienza di targeting osseo di polimeri/nano-particelle nella circolazione sistemica, includendo le loro proprietà superficiali e la stabilità in acqua, la densità dei bisfosfonati sulla superficie, la disposizione da parte del Sistema Fagocitario Mononucleare (MPS), e l'accessibilità della superficie ossea. È stato dimostrato che le nano-particelle di albumina di siero bovino rivestite con PEI-PEG-tiolo-bifosfonati non raggiungevano il bersaglio osseo dopo la somministrazione sistemica *in vivo*, nonostante la loro elevata affinità con HA in vitro [Wang G. et al, 2010]. L'Alendronato, uno dei tipici bisfosfati che hanno come bersaglio l'osso, è

stato usato come frazione di targeting da coniugare con un copolimero solubile in acqua: N-(2-idrossipropil)-metacrilammide (HPMA). L'alendronato-HPMA è accumulato esclusivamente nel tessuto osseo. Il basso contenuto di alendronato per copolimero di HPMA (1,5% in moli) è sufficiente per una buona efficacia di deposizione dell'osso. Il peso molecolare ha determinato il tempo di circolazione e la bio-distribuzione dei coniugati del copolimero HPMA. L'alendronato-HPMA con peso molecolare tra 50 e 100 kDa era adatto come trasportatore di farmaci per il delivery selettivo all'osso. Swami et al. hanno sviluppato nano-particelle di PEG-PLGA coniugate con alendronato che incapsulavano bortezomib per la terapia del mieloma multiplo (Figura 9A). Le nano-particelle ottimizzate con modifica della superficie con alendronato al 20% legavano in modo efficace HA in vitro e hanno aumentato marcatamente la distribuzione di nano-particelle all'interno del tessuto osseo in vivo (Fig. 9B e 9C). Nanoparticelle di alendronato caricate con bortezomib avevano la capacità di alterare il microambiente del midollo osseo per prevenire lo sviluppo del mieloma in topi (Fig. 9D) [Swami A. et al, 2014]. Le micelle alendronato-PEG-PLA sono state impiegate come nano-trasportatori attivi per l'intrappolamento di PONATINIB e SAR302503. L'effetto di targeting osseo è stato raggiunto quando il rapporto di alendronato sulla superficie delle micelle è aumentato al 40%. Una piccola quantità di modifica con alendronato (inferiore al 10%) sulla superficie delle micelle non ha aumentato il loro accumulo nel tessuto osseo [Mu C.F. et al, 2017]. In particolare, alcuni studi hanno riportato che i bifosfonati possono rallentare lo sviluppo di metastasi ossee e ridurre il rischio di eventi connessi allo scheletro prevenendo la differenziazione degli osteoclasti e il riassorbimento osseo [Santini D. et al, 2006]. Tuttavia, il tempo di sopravvivenza dei pazienti trattati con bifosfonati non è stato esteso rispetto a quelli trattati con placebo in diversi studi clinici. Le HSC sono localizzate preferenzialmente nell'osso spugnoso. Questa posizione include sia l'endostio vicino agli osteoblasti (nicchia endostale) che i vasi sinusoidali associati ad altre cellule stromali (nicchia vascolare). Gli osteoblasti che sono responsabili per la formazione dell'osso, hanno un ruolo diretto nella regolazione della funzione delle HSC. Le LSC hanno caratteristiche simili alle HSC, ma partecipano all'iniziazione e al mantenimento della leucemia piuttosto che regolare l'emopoiesi [Williams D.A. et al, 2006]. Pertanto, molecole di targeting osseo come i bisfosfati e $(AspSerSer)_6$ che sono in grado di legarsi alle superfici di formazione ossea possono fornire in modo preciso agenti terapeutici alla nicchia delle cellule staminali endostali e contribuiscono a eradicare le LSC nel microambiente del midollo osseo per la terapia della leucemia refrattaria.

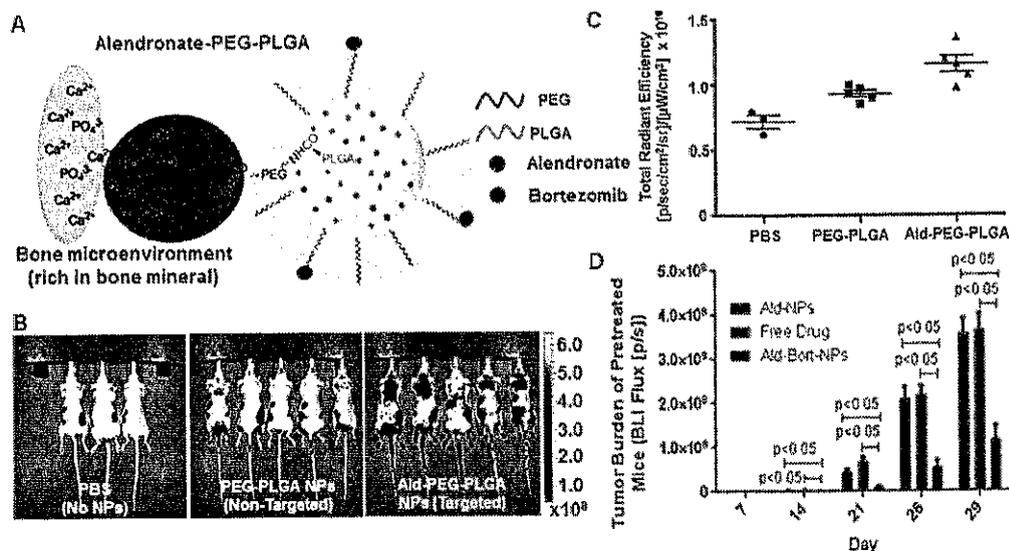


Figura 9 Nanoparticelle (Ald-NPs) di Alendronato-PEG-PLGA che hanno come bersaglio il midollo osseo caricate con BORTEZOMIB (Bort) per la terapia del mieloma multiplo

(A) Illustrazione schematica dell'interazione tra Ald-NPs e matrice ossea.

(B) Immagini di fluorescenza di topo intero iniettato con nano-particelle (NPs) marcate con Alexa647 tramite IVIS (acquisite 24 h dopo iniezione i.p. (intraperitoneale))

(C) Analisi dell'intensità totale di fluorescenza delle immagini da B.

(D) I segnali di bioluminescenza da topi trattati con BORTEZOMIB caricato in Ald-NPs (Ald-Bort-NPs) erano notevolmente più bassi comparati con quelli delle nano-particelle di Alendronato (Ald-NPs) vuote o con gruppi di farmaci liberi nel giorno dell'analisi. I topi erano pre-trattati con nano-particelle di Alendronato (Ald-NPs) vuote, farmaci liberi o nano-particelle di Alendronato caricate con Bortezomib (Ald-Bort-NPs) per 3 settimane e poi inoculati con cellule MM1S GFP⁺Luc⁺. [da Swami A. et al, 2014]

5.4. TARGETING VASCOLARE

La micro-vascolatura del midollo osseo è composta da capillari e sinusoidi specializzati a parete sottile [Ewalt M.D. et al, 2016]. Inoltre, l'angiogenesi come processo di formazione di nuovi vasi sanguigni, svolge un ruolo essenziale sia nella metastasi dei tumori solidi che nello sviluppo della leucemia. Un alto grado di neovascolarizzazione, che è sempre associato a prognosi infausta, è stato scoperto nel midollo osseo di pazienti con AML, mieloma multiplo, leucemia linfatica acuta, leucemia linfatica cronica (LLC) o linfomi non-Hodgkin rispetto a volontari sani. Vi è un ampio spettro di recettori di superficie endoteliali altamente espressi sul rivestimento interno dei vasi sanguigni normali o neo-angiogenici che include VEGFR, E-selectina, $\alpha_v\beta_3$ -integrina, Amino-peptidasi N/CD13, molecola di adesione cellulare intercellulare (ICAM) e molecola di adesione cellulare vascolare 1 (VCAM-1) ecc. Sono facilmente disponibili come molecole di legame per trasportatori di farmaci a lunga circolazione e utilizzati per il targeting della vascolarizzazione del tumore [Jubeli E., Shamay Y. et al, 2012 e 2016].

Il targeting vascolare è avvantaggiato dalle caratteristiche uniche dei vasi sanguigni tumorali per il delivery selettivo di agenti terapeutici come farmaci chemioterapici,

citochine, oligonucleotidi, radionuclidi e foto-sensibilizzatori ai siti tumorali. Diversi recettori dell'angiogenesi sono selettivamente molto espressi in alcuni tipi di leucemia e possono essere mirati in modo efficiente utilizzando specifici ligandi in vivo. Una strategia è quella di sviluppare immunocitochinine *tumor-homing*. Il targeting vascolare anticorpo-coniugato con IL-2 ha mostrato una migliore attività antitumorale rispetto a IL-2 non mirato [Pasche N., Gutbrodt K.I. et al, 2012 e 2013]. Le immunocitochine sono state valutate nella fase 2 di studi clinici per il trattamento di pazienti con tumori solidi e leucemia [Eigentler T.K. et al, 2011]. Gli anticorpi F8, F16 si legano in modo selettivo ai domini (extra-dominio A ed extra dominio B) di fibronectina e al dominio A1 della tenascina-C, rispettivamente, nel sito di angiogenesi della AML nel midollo osseo. Nell'analisi immuno-istochimica gli anticorpi F8 e F16 hanno colorato una grande frazione di biopsie midollari di AML e di leucemia linfoblastica acuta (ALL) dimostrando la forte e selettiva espressione antigenica nella leucemia acuta [Gutbrodt K.I. et al, 2013]. Gli effetti collaterali delle immunocitochine coniugate con IL-2 sono relativamente bassi. Queste immunocitochine hanno mostrato una promettente efficacia terapeutica e profili di sicurezza nei pazienti oncologici [Johannsen M. et al, 2010].

L' E-selectina è una molecola di adesione cellulare espressa sulle cellule endoteliali nei siti di infiammazione attivata da citochine infiammatorie, che sempre esistono nel sistema vascolare di siti infiammatori e tumorali. Essa aiuta l'HOMING e l'adesione delle cellule tumorali metastatiche alle cellule endoteliali all'interno del midollo osseo. Un tio-aptamero specifico per E-selectina (ESTA), che si lega ad E-selectina con alta affinità di legame e minima reattività crociata rispetto alle altre selectine è stato scoperto usando da una libreria combinatoria [Mann A.P. et al, 2010]. Le microparticelle di silicio poroso (1 microm di diametro e 400 nm di altezza, ESTA-MSVs) (Fig. 10A e 10B) coniugate con il tio-aptamero specifico per E-selectina sono state sviluppate come siRNA e trasportatori di PARTENOLIDE per il trattamento del carcinoma mammario metastatico osseo e AML [Mai J., Zong H. et al, 2014 e 2016]. I poliplessi PEG-PEI / STAT3-siRNA sono stati intrappolati in nano-pori (40-80 nm) di ESTA-MSV tramite sonicazione. Gli ESTA-MSV hanno mostrato specifica efficacia di targeting dell'endotelio del midollo osseo in vivo. ESTA-MSV marcati con un cromoforo rosso fluorescente co-localizzavano con le cellule endoteliali E-selectine positive rispetto a Cy5-MSV non mirati all'interno dei femori dopo iniezione endovenosa di ESTA-MSV in topi con cancro mammario metastatico. La maggior parte degli ESTA-MSV ha abbandonato i vasi sinusoidali ed è penetrata nell'area peri-vascolare tramite associazione a E-selectina nel midollo osseo (Fig. 10C). Nel frattempo, il trattamento ESTA-MSV/STAT3-siRNA ha prolungato sorprendentemente la sopravvivenza nei topi con carcinoma mammario metastatico osseo (Fig. 10D). L'ESTA-MSV è stato anche utilizzato per caricare le micelle di partenolide per il rilascio di farmaco nella nicchia midollare. Due dosi di ESTA-MSV-partenolide somministrate a 2 settimane di distanza erano in grado di ridurre in modo significativo il carico di AML e compromettere la funzione delle LSC in un modello murino di AML derivante dal paziente (Fig. 10E e 10F) [Zong H. et al, 2016].

Nel microambiente del midollo osseo, le cellule leucemiche aderiscono e interagiscono con i neovasi per proteggersi dalla chemioterapia. Anche se le risposte terapeutiche alla mono-terapia anti angiogenetica sono modeste, è stato scoperto che l'antiangiogenesi nel midollo osseo può favorire la terapia della leucemia negli studi clinici [Rodriguez-Ariza et al, 2011]. L'approccio di carico doppio/multiplo di farmaci può essere usato per intrappolare gli agenti anti-angiogenici e chemioterapici contemporaneamente. I nano-trasportatori decorati con ligandi di homing vascolare non solo possono dirigere l'agente anti-angiogenico ai neo-vasi per sopprimere l'angiogenesi e distruggere l'interazione delle cellule leucemiche con le cellule endoteliali, ma possono anche contribuire al rilascio di farmaci chemioterapici per inibire la proliferazione delle cellule leucemiche vicine ai neo-vasi nel midollo osseo. Ad esempio la strategia di co-rilascio a targeting vascolare può massimizzare l'efficacia terapeutica di combinazioni per il trattamento delle neoplasie ematologiche.

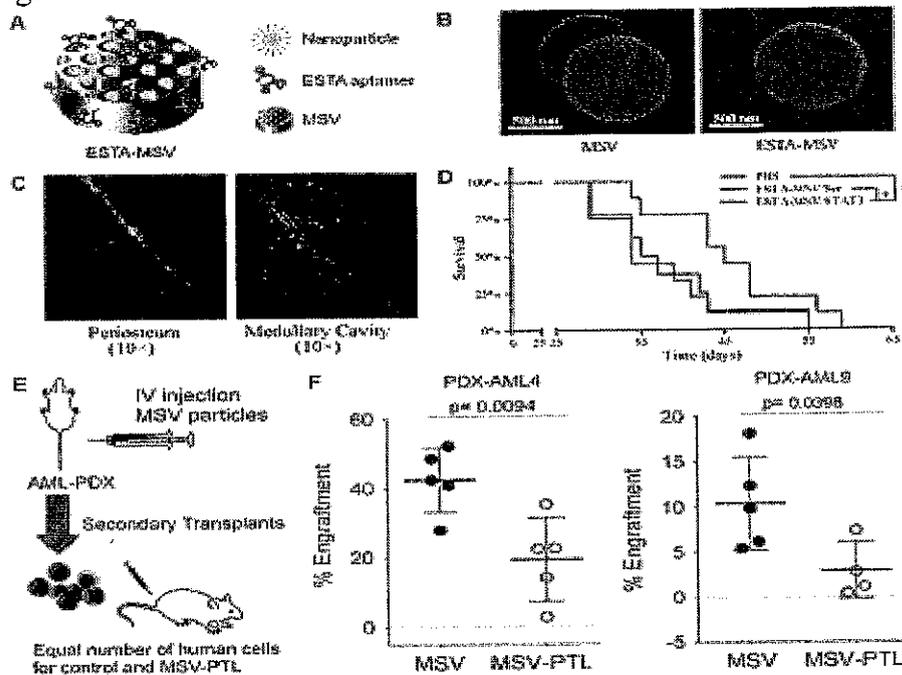


Figura 10. Particelle di silicio poroso mirate all'endotelio vascolare del midollo osseo per la terapia del tumore mammario metastatico osseo e della AML

(A) Nano-particelle contenenti farmaci (poliplessi o micelle) esistono all'interno dei nano-pori di ESTA-MSV.
 (B) Immagini al microscopio elettronico a scansione di MSV e ESTA-MSV (particelle di silicio poroso, 1 microm di diametro e 400 nm di altezza).
 (C) Immagini a fluorescenza di ESTA-MSV distribuito nel midollo osseo (verde: cellule endoteliali, blu: nuclei, rosso: Cy5-ESTAMSV).
 (D) La sopravvivenza dei topi portatori di tumore osseo metastatico MDA-MB-231 trattati con ESTA-MSV /STAT3 siRNA (n = 8 - 9).
 (E) Illustrazione schematica del disegno sperimentale del trapianto secondario di AML (PDX, xenotrapianti derivati dal paziente).
 (F) ESTA-MSV (MSV-PTL) caricati con Partenolide danneggiano le LSC all'interno del midollo osseo in vivo. La percentuale di cellule leucemiche umane nel midollo osseo di topo provenienti da trapianti secondari nei diversi gruppi di trattamento. Ogni cerchio rappresenta un singolo topo. Le barre di errore rappresentano S.E.M. [da Zong H., 2016]

5.5. TARGETING SPECIFICO DELLE CELLULE TUMORALI SPECIFICHE ALL'INTERNO DEL MIDOLLO OSSEO

Lo sviluppo e l'applicazione sicura di un'elaborata terapia che ha come bersaglio il midollo osseo dipende dalla capacità di rilasciare specifici agenti terapeutici alle cellule tumorali leucemiche o metastatiche e di limitare la cattura da parte delle cellule sane del midollo osseo dopo iniezione sistemica. Il recettore per il folato-b (FR-b) era sovra-regolato nelle cellule della AML dopo trattamento con acido trans-retinoico (ATRA). Nel frattempo, l'espressione di FR-b era straordinariamente elevata nel midollo osseo innestato con cellule di AML umane FR-b (+) in topi NOD/SCID [Ratnam M. et al, 2003]. La doxorubicina liposomiale, che ha come target FR-b, combinata con l'induzione del recettore usando ATRA ha aumentato il tempo di sopravvivenza medio di topi L1210JF/KG-1 carichi di AML rispetto alla doxorubicina liposomiale non mirata [Pan X.Q. et al, 2002]. Un sistema di delivery mirato multi-step (a più stadi) mediato dalle porzioni di targeting del folato e di alendronato può precisamente essere indirizzato alla regione della malattia minima residua della CML e alle LSC localizzate nel microambiente del midollo osseo per la terapia della leucemia mieloide cronica refrattaria [Shi Y. et al, 2013]. Un aumento del rilascio di entrambi i farmaci intrappolati (citarabina e daunorubicina, 5:1M ratio) attraverso liposomi contenenti (CPX-351) fosfatidilglicerolo (PG) a basso contenuto di colesterolo alle cellule leucemiche nel midollo osseo ha mostrato un processo di acquisizione selettiva verificatosi tra liposomi e cellule leucemiche. Si è ipotizzato che i liposomi molto carichi negativamente possono aumentare il loro legame ai recettori (i recettori delle lipoproteine a bassa densità o scavenger di classe B ecc.) sovra-espressi in cellule leucemiche da pazienti con AML. Recentemente, CPX-351 (Vyxeos) è stato approvato per il trattamento di due tipi di AML ad alto rischio: AML di nuova diagnosi e AML con cambiamenti correlati alla mielodisplasia [FDA, 2017].

Gli aptameri sono stati ampiamente utilizzati come ligandi per la terapia mirata al tumore a causa della loro alta selettività e affinità a specifiche molecole bersaglio incluse proteine e peptidi nei siti tumorali. Sono stati sviluppati diversi aptameri che hanno come target le cellule leucemiche attraverso le tecnologie SELEX (evoluzione sistematica di ligandi mediante arricchimento esponenziale) basate su proteine e/o cellule per la diagnosi e/o il trattamento delle neoplasie ematologiche compresa la leucemia e il linfoma [Shum K.T. et al, 2013]. Gli aptameri Sgam8 sono stati sottoposti a screening per il riconoscimento molecolare specifico delle cellule ALL. Spiegelmer NOX-A12 come immagine speculare di aptamero antagonizza in modo specifico la chemochina CXCL12 (CXCL12) /SDF-1 (noto anche come fattore 1 derivato da cellule stromali) per la migrazione delle LSC nel midollo osseo, che è in sperimentazione clinica per indicazioni nel linfoma non Hodgkin, CLL (leucemia linfocitaria cronica) e mieloma multiplo [Duda D.G. et al, 2011]. Neutralizza in modo specifico CXCL12/SDF-1 e sensibilizza le cellule CLL alla bendamustina e fludarabina in co-culture (colture di cellule diverse coltivate nello stesso recipiente) di cellule stromali del midollo osseo [Hoellenriegel J. et al, 2014].

Nucleolina è un'abbondante proteina del nucleolo, la sua espressione è correlata al livello di proliferazione cellulare e sempre sovra-regolata in cellule che si dividono attivamente includendo AML e CLL/linfoma linfocitico a piccole cellule. L'aptamero AS1411 come aptamero della nucleolina, può legarsi alla nucleolina e mediare il rilascio di agenti terapeutici intrappolati in nano-particelle modificate con AS1411 direttamente all'interno delle cellule leucemiche [Shum K.T. et al, 2013].

Per eradicare i tumori residenti nel midollo osseo, l'approccio più ideale è quello di uccidere selettivamente le cellule tumorali e risparmiare le normali cellule del midollo osseo. Pertanto, è fondamentale identificare marcatori specifici delle cellule tumorali e selettivamente mirare alla distruzione delle cellule tumorali. L'immunoglobulina mucin-3 delle cellule T viene espressa in molti tipi di LSC della AML ma non in HSC normali, fatto che la rende un promettente marcatore di superficie cellulare per colpire in modo specifico le LSC di AML [Kikushige Y., Jan M. et al, 2010 e 2011]. In secondo luogo, ligandi, quali corti peptici sintetici e aptameri, identificati tramite screening ad alto rendimento possono essere coniugati a farmaci terapeutici direttamente o attaccati sulla superficie di nano-trasportatori contenenti farmaci terapeutici. Per mezzo dell'alta affinità e specificità delle porzioni targeting, l'approccio di targeting del midollo osseo a doppio ligando può essere progettato e utilizzato per aumentare la capacità di *homing* nel midollo osseo dei trasportatori di farmaci e simultaneamente accrescere la quantità di farmaci intrappolati in specifiche cellule leucemiche o tumorali metastatiche all'interno del midollo osseo.

CONCLUSIONI

Negli ultimi due decenni, la funzione e il fenotipo delle LSC sono stati continuamente definiti. Inoltre, numerosi studi forniscono prove cumulative che esistono CSC in una varietà di tumori solidi. Le LSC infatti risiedono in più di una popolazione, e la loro funzionale eterogeneità e notevole plasticità sono state sempre più riconosciute. Citochine infiammatorie come IFN- γ e la segnalazione tramite CD27 potrebbero indurre l'espansione delle LSC. Una più profonda comprensione della nicchia immunitaria del midollo osseo supporterà ulteriormente lo sviluppo di immunoterapie mirate alle LSC. Anticorpi monoclonali e approcci basati su cellule T che colpiscono molecole specifiche delle LSC sono in via di sviluppo in clinica con risultati incoraggianti. È concepibile che le terapie dirette contro LSC saranno offerte in combinazione con i trattamenti convenzionali, sia prima che concomitanti con la chemioterapia, al fine di evitare l'evoluzione indotta dalla chemioterapia e le aumentate complessità della popolazione LSC. Studi recenti hanno mostrato un aumento da 10 a 100 volte della frequenza delle LSC alla ricaduta utilizzando campioni accoppiati derivanti da pazienti con AML al momento della diagnosi e alla conseguente ricaduta dopo chemioterapia convenzionale. Il potenziale terapeutico delle terapie dirette contro le LSC è stato anche esplorato nel trapianto post-allogenico HSCT per pazienti affetti da AML con alto rischio di ricaduta. Ad esempio, la somministrazione di PF-04449913, una piccola molecola inibitrice della via di segnalazione HEDGEHOG, è stata effettuata in pazienti affetti da AML a partire dal giorno 80 post-trapianto con l'obiettivo di inibire la segnalazione aberrante di HEDGEHOG e la sopravvivenza e l'espansione delle LSC nella AML. Qui, sono state riassunte le attuali conoscenze sulle LSC negli aspetti sia intrinseci che estrinseci e le promettenti terapie che si stanno testando negli studi clinici. Sebbene l'identificazione e la caratterizzazione delle LSC ha rinnovato la ricerca sulla leucemia e ha contribuito a sviluppare diverse strategie cliniche terapeutiche, alcune sfide difficili per la terapia della leucemia basata sulle LSC rimangono ancora. Una delle più grandi è l'identificazione tempestiva ed efficiente delle LSC nei diversi pazienti affetti da leucemia. Inoltre, una migliore comprensione dello sviluppo e della differenziazione delle LSC è richiesto per le implicazioni cliniche delle strategie che prendono di mira tali popolazioni cellulari. Restano da determinare anche i precisi meccanismi tramite i quali molecole extracellulari e intracellulari e le loro vie di segnale regolano le LSC. Pertanto, sono necessari ulteriori sforzi per identificare bio-marcatori più specifici delle LSC, determinare specifici target e sviluppare quindi un trattamento efficiente della leucemia basato sulle LSC. La migliore comprensione della biologia delle LSC consentirà di avere un targeting più specifico della popolazione delle LSC con intento curativo. I problemi che devono essere affrontati includono lo sviluppo di strumenti analitici per identificare e quantificare le LSC nei campioni dei pazienti, prima e dopo il trattamento, includendo tecniche e reagenti immuno-fenotipici. Nuovi endpoint per valutare la risposta sono probabilmente necessari per valutare le terapie dirette a LSC, cioè la sopravvivenza del paziente piuttosto che i tassi di risposta, che potrebbero non essere

aumentati da terapie che colpiscono una piccola percentuale della massa tumorale. Sebbene l'identificazione e il perseguimento di obiettivi antigenici per eradicare le LSC siano un'area di ricerca attiva, l'efficacia di questo approccio è ancora sconosciuta e potrebbe essere limitata dalla plasticità relativa dei fenotipi delle LSC. Molte cose rimangono sconosciute, ma gli studi pre-clinici e clinici finora suggeriscono che le terapie mirate alle LSC potrebbero in definitiva essere una promessa terapeutica per i pazienti con neoplasie ematologiche. Il delivery mirato di agenti terapeutici gioca un ruolo fondamentale nel trattamento efficace e sicuro delle neoplasie nel midollo osseo. Un ulteriore chiarimento della correlazione tra la modifica dei trasportatori di farmaci con ligandi e l'efficienza del targeting del midollo osseo in vivo dirigerà le terapie verso approcci più ampi e più robusti e progetterà trasportatori che hanno la capacità di superare le molteplici barriere biologiche che si frappongono tra i siti malati del midollo osseo. D'altra parte, prendere di mira le neoplasie all'interno del midollo osseo è ancora un problema biologico a causa dell'esistenza di cellule staminali/che iniziano il tumore e il microambiente del midollo osseo che induce resistenza. La terapia di associazione con due o più agenti terapeutici che agiscono su più bersagli biologici ha mostrato un promettente potenziale nel superare la resistenza terapeutica. In particolar modo, l'interruzione delle interazioni di ancoraggio tra cellule tumorali e il microambiente del midollo osseo attraverso più inibitori può raggiungere grandi risposte cliniche per aumentare la sensibilizzazione delle cellule tumorali alla chemioterapia. Il co-incapsulamento stabile di più farmaci all'interno di un singolo trasportatore che ha come bersaglio il midollo osseo potrebbe alterare i profili farmacocinetici dei farmaci combinati per raggiungere un effetto sinergico per la terapia del tumore all'interno del midollo osseo in vivo. Inoltre, l'accumulo di agenti terapeutici all'interno del midollo osseo potrebbe portare a tossicità cumulativa per la normale emopoiesi. Lo sviluppo di elaborati sistemi mirati al midollo osseo è essenziale per il rilascio specifico di agenti terapeutici alle cellule tumorali. Nel complesso, i risultati attuali sono promettenti per lo sviluppo di formulazioni efficaci e sicure che hanno come bersaglio il midollo osseo, dalle quali ci si aspetta nel prossimo futuro un beneficio di trattamento per i pazienti con neoplasie del midollo osseo.

BIBLIOGRAFIA

Adjei I.M., Sharma B., Peetla C., Labhasetwar V., Inhibition of bone loss with surface-modulated, drug-loaded nanoparticles in an intrasosseous model of prostate cancer. *J.Control Release* 2016; 232:83-92.

Ara T., Declerck Y.A., Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur. J. Cancer* 2010; 46:1223-1231.

Batlevi C.L., Matsuki E., Brentjens, R.J., Younes A., Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016; 13:25–40.

Beatty G.L. et al., First-in-human phase I study of the oral inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase-1 epacadostat (INCB024360) in patients with advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23: 3269–3276.

Becker H., Marcucci G., Maharry K., Radmacher M.D., Mrozek K., Margeson D., Whitman S.P., Paschka P., Holland K.B., Schwind S., et al., Mutations of the Wilms tumor 1 gene (WT1) in older patients with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 2010; 116:788–792.

Beloqui A. et al., Biodistribution of Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) after intravenous administration to rats: influence of technological factors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013; 84:309-314.

Bhatia M., Wang J.C., Kapp U. et al., Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:5320–5.

Bonnet D., Dick J.E., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3:730–7.

Bouchie A., First microRNA mimic enters clinic. *Nat Biotechnol.* 2013; 31:577.

Bross P.F., Beitz J., Chen G. et al., Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:1490–6.

Busfield S.J., Biondo M., Wong M. et al., Targeting of acute myeloid leukemia in vitro and in vivo with an anti-CD123 mAb engineered for optimal ADCC. *Leukemia.* 2014; 28:2213–21.

Cai X., Cullen B.R., The imprinted H19 non coding RNA is a primary micro-RNA precursor. *RNA.* 2007; 13:313–6.

Cancer Genome Atlas, Research N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 368:2059–74.

Casucci M., Nicolis di Robilant B., Falcone L., Camisa B., Norelli M., Genovese P., Gentner B., Gullotta F., Ponzoni M., Bernardi M., et al., CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Blood* 2013; 122: 3461–3472.

Chao-Feng Mu, Jianliang Shen, Jing Liang, Hang-Sheng Zheng, Yang Xiong, Ying-Hui Wei, Fanzhu Li, Targeted drug delivery for tumor therapy inside the bone marrow. *Biomaterials.* 2018; 155:191-202

Chen J., Macri V., Herrera P., Brooks C., Rowinsky E., SL-501, a next-generation targeted therapy directed to the IL-3 receptor (IL-3R), possesses preclinical anti-tumor activity against Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 2014; 124:4500.

Chen K., Yang J., Li J. et al., eIF4B is a convergent target and critical effector of oncogenic Pim and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in Abl transformants. *Oncotarget.* 2016; 7:10073–89.

Chevrier S., Genton C., Kallies A., Karnowski A., Otten L.A., Malissen B., Malissen M., Botto M., Corcoran L.M., Nutt S.L. et al., CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 3895–3900.

Chu S., McDonald T., Lin A., Chakraborty S., Huang Q., Snyder D.S., Bhatia R., Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood* 2011; 118:565-5572

Cobas M., Wilson A., Ernst B. et al., Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med.* 2004; 199:221–9.

Cohen E.N. et al., Inflammation mediated metastasis: immune induced epithelial-to-mesenchymal transition in inflammatory breast cancer cells, *PLoS One* 10 (2015), e0132710.

Colmone A., Amorim M., Pontier A.L. et al., Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science.* 2008; 322:1861–5.

Coombs C.C., Tallman M.S., Levine R.L., Molecular therapy for acute myeloid leukaemia, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016; 13:305-318.

Corbin A.S., Agarwal A., Loriaux M., Cortes J., Deininger M.W., Druker B.J., Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity, *J. Clin. Invest.* 2011; 121:396-409

Corces-Zimmerman M.R., Hong W.J., Weissman I.L. et al., Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:2548–53.

Croucher P.I., McDonald M.M., Martin T.J., Bone metastasis: the importance of the neighbourhood, *Nat. Rev. Cancer* 2016; 16:373-386.

Culen M. et al., Quantitative assessment of the CD26+ leukemic stem cell compartment in chronic myeloid leukemia: Patient-subgroups, prognostic impact, and technical aspects. *Oncotarget* 2016, 7:33016–33024.

Daley G.Q., Van Etten R.A., Baltimore D., Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome, *Science* 1990; 247:824-830.

Darwish N.H., Sudha T., Godugu K., Elbaz O., Abdelghaffar H.A., Hassan E.E., Mousa S.A., Acute myeloid leukemia stem cell markers in prognosis and targeted therapy: Potential impact of BMI-1, TIM-3 and CLL-1. *Oncotarget.* 2016; 7:57811–57820.

Ding L., Ley T.J., Larson D.E. et al., Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2012; 481:506–10.

Dorrance A.M., Neviani P., Ferenchak G.J. et al., Targeting leukemia stem cells in vivo with antagomiR-126 nanoparticles in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2015; 29:2143–53.

Duchartre Y., Kim Y.M., Kahn M., The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016; 99:141–9.

Duda D.G., Kozin S.V., Kirkpatrick N.D., Xu L., Fukumura D., Jain R.K., CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res.* 2011; 17:2074-2080.

Eigentler T.K. et al., A dose-escalation and signal-generating study of the immunocytokine L19-IL2 in combination with dacarbazine for the therapy of patients with metastatic melanoma, *Clin. Cancer Res.* 2011; 17:7732-7742.

Emadi A. et al., Phase I indoximod plus idarubicin and cytarabine for newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2017; 102: 1–882.

Epelman S., Lavine K.J., Randolph G.J., Origin and functions of tissue macrophages, *Immunity* 2014; 41:21-35.

Eppert K., Takenaka K., Lechman E.R. et al., Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med.* 2011; 17:1086–93.

Ewalt M.D., Gratzinger D., Selective quantitation of micro-vessel density reveals sinusoidal expansion in myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma* 2016; 57:2923-2926.

Feurerer M., Beckhove P., Garbi N., Mahnke Y., Limmer A., Hommel M., Hammerling G.J., Kyewski B., Hamann, A., Umansky V. et al., Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat. Med.* 2003, 9:1151–1157.

Frankel A., Liu J.S., Rizzieri D., Hogge D., Phase I clinical study of diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Leuk. Lymphoma* 2008; 49:543–553.

Fruman D.A., Rommel C., PI3Kdelta inhibitors in cancer: rationale and serendipity merge in the clinic. *Cancer Discov.* 2011; 1:562–72.

Gal H., Amariglio N., Trakhtenbrot L., Jacob-Hirsh J., Margalit O., Avigdor A., Nagler A., Tavor S., Ein-Dor L., Lapidot T. et al., Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2006; 20:2147–2154.

Gerber J.M., Gucwa J.L., Esopi D., et al. Genome-wide comparison of the transcriptomes of highly enriched normal and chronic myeloid leukemia stem and progenitor cell populations. *Oncotarget.* 2013; 4:715–28.

Gill S. et al., Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* 2014; 123:2343–2354.

Giustacchini A., Thongjuea S., Barkas N., Woll P.S., Povinelli B.J., Booth C.A.G., Sopp P., Norfo R., Rodriguez-Meira A., Ashley N. et al., Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia. *Nat. Med.* 2017, 23:692–702.

Goardon N., Marchi E., Atzberger A., Quek L., Schuh A., Soneji S., Woll P., Mead A., Alford K.A., Rout R., et al., Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2011; 19:138–152.

Godwin C.D., Bates O.M., Laszlo G.S., Gottschalk R., Comeau M.R., Hoyos G.H., Walter R.B., Bispecific anti-CD123 x anti-CD3 Adaptir™ molecules APVO436 and APVO437 have broad activity against primary human AML cells in vitro. *Blood* 2017, 130:2639.

Greenberg P., Cox C., LeBeau M.M., Fenaux P., Morel P., Sanz G., Sanz M., Vallespi T., Hamblin T., Oscier D. et al., International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997; 89: 2079–2088.

Guo G, Kang Q, Zhu X et al., A long noncoding RNA critically regulates Bcr- Abl-mediated cellular transformation by acting as a competitive endogenous RNA. *Oncogene*. 2015; 34:1768–79.

Gupta D. et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications, *Leukemia* 2001; 15:1950-1961

Gutbrodt K.L., Schliemann C., Giovannoni L., Frey K., Pabst T., Klapper W., Berdel W.E., Neri D., Antibody-based delivery of interleukin-2 to neo-vasculature has potent activity against acute myeloid leukemia, *Sci. Transl. Med.* 5 (2013), 201ra118.

Gutierrez A., Sanda T., Grebliunaite R. et al., High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2009; 114:647–50.

Hamilton A., Helgason G.V., Schemionek M., Zhang B., Myssina S., Allan E.K., Nicolini F.E., Muller-Tidow C., Bhatia R., Brunton V.G. et al., Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood* 2012, 119: 1501–1510.

Hantschel O., Warsch W., Eckelhart E., Kaupe I., Grebien F., Wagner K.U., Superti-Furga G., Sexl V., BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia, *Nat. Chem. Biol.* 2012; 8:285-293.

Han L., Jorgensen J.L., Brooks C., Shi C., Zhang Q., Noguera Gonzalez G.M., Cavazos A., Pan R., Mu H., Wang S.A. et al., Antileukemia efficacy and mechanisms of action of SL-101, a novel anti-CD123 antibody conjugate, in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23:3385–3395.

Han Y.C., Park C.Y., Bhagat G. et al., microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *J Exp Med.* 2010; 207:475–89.

He S.Z., Busfield S., Ritchie D.S., Hertzberg M.S., Durrant S., Lewis I.D., Marlton P., McLachlan A.J., Kerridge I., Bradstock K.F. et al., A Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics and anti-leukemic activity of the anti-CD123 monoclonal antibody CSL360 in relapsed, refractory or high-risk acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2015; 56:1406–1415.

Ho T.C et al., Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. *Blood* 2016, 128:1671–1678.

Hoellenriegel J. et al., The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* 2014; 123:1032-1039.

Hofkens W. et al., Intravenously delivered gluco-corticoid liposomes inhibit osteoclast activity and bone erosion in murine antigen-induced arthritis. *J. Control Release* 2011; 152:363-369.

Holyoake T.L.; Vetrie D., The chronic myeloid leukemia stem cell: Stemming the tide of persistence. *Blood* 2017; 129:1595–1606.

Hope K.J., Jin L., Dick J.E., Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol.* 2004; 5:738–43.

Hosen N., Park C.Y., Tatsumi N., et al., CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:11008–13.

Hu Y., Chen Y., Douglas L. et al., Beta-Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL- induced chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009; 23:109–16.

Jan M. et al., Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108:5009-5014.

Jin L., Hope K.J., Zhai Q., Smadja-Joffe F., Dick J.E., Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* 2006; 12:1167–1174.

Jin L., Lee E.M., Ramshaw H.S. et al., Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009; 5:31–42.

Johannsen M. et al., The tumour-targeting human L19-IL2 immunocytokine: preclinical safety studies, phase I clinical trial in patients with solid tumours and expansion into patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 2010; 46:2926-2935.

Jubeli E., Moine L., Vergnaud-Gauduchon J., Barratt G., E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J. Control Release* 2012; 158:194-206.

Kaplan R.N. et al., VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438:820-827.

Kenderian S.S., Ruella M., Shestova O., Klichinsky M., Aikawa V., Morrissette J.J., Scholler J., Song D., Porter D.L., Carroll M. et al., CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2015, 29:1637–1647.

Kiel M.J., Morrison S.J., Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8:290-301.

Kikushige Y., Shima T., Takayanagi S. et al., TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:708–17.

Kloss S., Oberschmidt O., Morgan M., Dahlke J., Arseniev L., Huppert V., Granzin M., Gardlowski T., Matthies N., Soltenborn S. et al., Optimization of human NK cell manufacturing: Fully automated separation, improved ex vivo expansion using IL-21 with autologous feeder cells, and generation of anti-CD123-CAR-expressing effector cells. *Hum. Gene Ther.* 2017; 28:897–913.

Konopleva M.Y., Jordan C.T., Leukemia stem cells and microenvironment: Biology and therapeutic targeting. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29:591–599.

Kraft J.C., Freeling J.P., Wang Z., Ho R.J., Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 2014; 103: 29-52.

Lamba J.K., Chauhan L., Shin M., Loken M.R., Pollard J.A., Wang Y.C., Ries R.E., Aplenc R., Hirsch B.A., Raimondi S.C. et al., CD33 splicing polymorphism determines gemtuzumab ozogamicin response in de novo acute myeloid leukemia: Report from randomized phase III Children's Oncology Group trial AAML0531. *J. Clin. Oncol.* 2017, 35:2674–2682.

Lane S.W., Scadden D.T., Gilliland D.G., The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* 2009; 114:1150-1157.

- Lapidot T., Sirard C., Vormoor J. et al., A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367:645–8.
- Lechman E.R., Gentner B., Ng S.W. et al., miR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Cell*. 2016; 29:214–28.
- Leong S.R., Sukumaran S., Hristopoulos M., Totpal K., Stainton S., Lu E., Wong A., Tam L., Newman R., Vuilleminot B.R. et al., An anti-CD3/anti-CLL-1 bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood* 2017; 129:609–618.
- Lessard J., Sauvageau G., Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. 2003; 423:255–60.
- Ley T.J., Mardis E.R., Ding L. et al., DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. 2008; 456:66–72.
- Li F., Sutherland M.K., Yu C., Walter R.B., Westendorf L., Valliere-Douglass J., Pan L., Cronkite A., Sussman D., Klussman K. et al., Characterization of SGN-CD123A, a potent CD123-directed antibody-drug conjugate for acute myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* 2018; 17:554–564.
- Mai J. et al., Bone marrow endothelium-targeted therapeutics for metastatic breast cancer. *J. Control Release* 2014; 187:22-29.
- Majeti R., Chao M.P., Alizadeh A.A., Pang W.W., Jaiswal S., Gibbs K.D. Jr., van Rooijen N.; Weissman I.L., CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009; 138:286–299.
- Mangaonkar A. et al., A novel immunohistochemical score to predict early mortality in acute myeloid leukemia patients based on indoleamine 2,3 dioxygenase expression. *Sci. Rep.* 2017; 7:12892.
- Mann A.P. et al., Identification of thioaptamer ligand against E-selectin: potential application for inflamed vasculature targeting. *PLoS One* 5 (2010), e13050.
- Marcondes A.M., Mhyre A.J., Stirewalt D.L., Kim S.H., Dinarello C.A., Deeg H.J., Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105:2865–2870.

Mardiros A., Dos Santos C., McDonald T., Brown C.E., Wang X., Budde L.E., Hoffman L., Aguilar B., Chang W.C., Bretzlaff W. et al., T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 122: 3138–3148.

Mazo I.B., Honczarenko M., Leung H., Cavanagh L.L., Bonasio R., Weninger W., Engelke K., Xia L., McEver R.P., Koni P.A. et al., Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. *Immunity* 2005; 22:259–270.

Mercer T.R., Mattick J.S., Structure and function of long non coding RNAs in epigenetic regulation. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20:300–7.

Moghimi S.M., Exploiting bone marrow microvascular structure for drug delivery and future therapies. *Adv. Drug Deliv.* 1995; 17:61-73.

Mohle R., Bautz F., Rafii S., Moore M.A., Brugger W., Kanz L., The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 1998; 91:4523–4530.

Mohle R., Schittenhelm M., Failenschmid C., Bautz F., Kratz-Albers K., Serve H., Brugger W., Kanz L., Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2000; 110:563–572.

Mohseni Nodehi S., Repp R., Kellner C. et al., Enhanced ADCC activity of affinity matured and Fc-engineered mini-antibodies directed against the AML stem cell antigen CD96. *PLoS One.* 2012; 7:e42426.

Mohty M., Szydlo R.M., Yong A.S., Apperley J.F., Goldman J.M., Melo J.V., Association between BMI-1 expression, acute graft-versus-host disease, and outcome following allogeneic stem cell transplantation from HLA-identical siblings in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2008; 112:2163–2166.

Mohty M., Duarte R.F., Croockewit S. et al., The role of plerixafor in optimizing peripheral blood stem cell mobilization for autologous stem cell transplantation. *Leukemia.* 2011; 25:1–6.

Molldrem J.J., Lee P.P., Wang C., Felio K., Kantarjian H.M., Champlin R.E., Davis M.M., Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* 2000; 6:1018–1023.

Morgan G.J., Walker B.A., Davies F.E., The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat. Rev. Cancer* 2012; 12:335-348.

Moslehi J.J., Deininger M., Tyrosine kinase inhibitor-associated cardiovascular toxicity in chronic myeloid leukemia, *J. Clin. Oncol.* 2015; 33:4210-4218.

Mourgues L., Imbert V., Nebout M., Colosetti P., Neffati Z., Lagadec P., Verhoeyen E., Peng C., Duprez E., Legros L. et al., The BMI1 polycomb protein represses cyclin G2-induced autophagy to support proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2015, 29:1993–2002.

Mu C.F., Xiong Y., Bai X., Sheng Y.J., Cui J., Codelivery of ponatinib and SAR302503 by active bone-targeted polymeric micelles for the treatment of therapy-resistant chronic myeloid leukemia. *Mol. Pharm.* 2017; 14:274-283.

Nie Y., Waite J., Brewer F., Sunshine M.J., Littman D.R., Zou Y.R., The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J. Exp. Med.* 2004; 200:1145–1156.

Ng S.W., Mitchell A., Kennedy J.A., Chen W.C., McLeod J., Ibrahimova N., Arruda A., Popescu A., Gupta V., Schimmer A.D. et al., A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature* 2016; 540:433–437.

Ng S.W., Mitchell A., Zandstra P.W., Minden M.D., Dick J.E., Wang J.C.Y., Simultaneous identification and stratification of low molecular risk AML patients using a single LSC17-based Nanostring assay at diagnosis. *Blood* 2017; 130:28.

Nombela-Arrieta C., Pivarnik G., Winkel B., Canty K.J., Harley B., Mahoney J.E., Park S.Y., Lu J., Protopopov A., Silberstein L.E., Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15:533-543.

Omatsu Y., Sugiyama T., Kohara H., Kondoh G., Fujii N., Kohno K., Nagasawa T., The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 2010; 33:387–399.

O'Hare T., Eide C.A., Deininger M.W., Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110:2242–2249.

Pan X.Q., Zheng X., Shi G., Wang H., Ratnam M., Lee R.J., Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor beta-targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid. *Blood* 2002; 100:594-602.

Park I.K., Qian D., Kiel M. et al., Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003; 423:302–5.

Pasche N., Neri D., Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies. *Drug Discov. Today* 2012; 17:583-590.

Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R., Nano-carriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2007; 2:751-760.

Podar K., Chauhan D., Anderson K.C., Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009; 23:10-24.

Pollard J.A., Loken M., Gerbing R.B., Raimondi S.C., Hirsch B.A., Aplenc R., Bernstein I.D., Gamis A.S., Alonzo T.A., Meshinchi S., CD33 expression and its association with gemtuzumab ozogamicin response: Results from the randomized phase III Children's Oncology Group trial AAML0531. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34:747–755.

Qiu X., Guo G., Chen K. et al., A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis. *Neoplasia*. 2012; 14:547–58.

Raaijmakers M.H., ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2007; 21:2094–102.

Rajkumar S.V., Treatment of multiple myeloma. *Nat. Rev. Clin.Oncol.* 2011; 8:479-491.

Rashidi A., Uy G.L., Targeting the microenvironment in acute myeloid leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2015; 10:126-131.

Ratnam M., Hao H., Zheng X., Wang H., Qi H., Lee R., Pan X., Receptor induction and targeted drug delivery: a new anti-leukaemia strategy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2003; 3:563-574.

Reagan M.R., Rosen C.J., Navigating the bone marrow niche: Translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016; 12:154–168.

Rettig M.P., Godwin J., Vey N., Fox B., Ballesteros-Merino C., Bifulco C.B., Li D., Primo D., Ballesteros J., Sun J. et al., Preliminary translational results from an ongoing phase 1 study of Flotetuzumab, a CD123 × CD3 Dart®, in AML/MDS: Rationale for combining flotetuzumab and anti-PD-1/PD-L1 immunotherapies. *Blood* 2017; 130:1365.

Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F. et al., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105–11.

Riether C., Gschwend T., Huguenin A.L., Schurch C.M., Ochsenbein A.F., Blocking programmed cell death 1 in combination with adoptive cytotoxic T-cell transfer eradicates chronic myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2015; 29:1781–1785.

Riether C., Schurch C.M., Ochsenbein A.F., Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ.* 2015; 22:187–198.

Riether C., Schurch C.M., Flury C., Hinterbrandner M., Druck L., Huguenin A.L., Baerlocher G.M., Radpour R., Ochsenbein A.F., Tyrosine kinase inhibitor-induced CD70 expression mediates drug resistance in leukemia stem cells by activating Wnt signaling. *Sci. Transl. Med.* 2015; 7: 298ra119.

Riether C., Schurch C.M., Buhner E.D., Hinterbrandner M., Huguenin A.L., Hoepner S., Zlobec I., Pabst T., Radpour R., Ochsenbein A.F., CD70/CD27 signaling promotes blast stemness and is a viable therapeutic target in acute myeloid leukemia. *J. Exp. Med.* 2017; 214:359–380.

Rizo A.; Horton S.J.; Olthof S.; Dontje B.; Ausema A.; van Os R., van den Boom V., Vellenga E., de Haan G., Schuringa J.J., BMI1 collaborates with BCR-ABL in leukemic transformation of human CD34+ cells. *Blood* 2010; 116:4621–4630.

Rodriguez-Ariza A., Lopez-Pedrerera C., Aranda E., Barbarroja N., VEGF targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2011; 80:241-256.

Rodriguez-Barrueco R. et al. Inhibition of the autocrine IL-6-JAK2-STAT3-calprotectin axis as targeted therapy for HR-/HER2 breast cancers. *Gene. Dev.* 2015; 29:1631-1648.

Rombouts E.J., Pavic B., Lowenberg B., Ploemacher R.E., Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2004; 104:550–557.

Rowe, J.M.; Tallman, M.S. How I treat acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 116:3147–3156.

Saito Y., Kitamura H., Hijikata, A., Tomizawa-Murasawa M., Tanaka S., Takagi S., Uchida N., Suzuki N., Sone A., Najima Y. et al., Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci. Transl. Med.* 2010; 2:17ra19.

Santini D., Caraglia M., Vincenzi B., Holen I., Scarpa S., Budillon A., Tonini G., Mechanisms of disease: preclinical reports of antineoplastic synergistic action of bisphosphonates. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006; 3:325-338.

Sapozhnikov A., Pewzner-Jung Y., Kalchenko V., Krauthgamer R., Shachar I., Jung S., Perivascular clusters of dendritic cells provide critical survival signals to B cells in bone marrow niches. *Nat. Immunol.* 2008; 9:388–395.

Sarry J.E., Murphy K., Perry R. et al., Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R γ deficient mice. *J Clin Invest.* 2011; 121:384–95.

Satpathy A.T., Chang H.Y., Long noncoding RNA in hematopoiesis and immunity. *Immunity.* 2015; 42:792–804.

Schepers K., Pietras E.M., Reynaud D. et al., Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell.* 2013; 13:285–99.

Schliemann C. et al., Targeting interleukin-2 to the bone marrow stroma for therapy of acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3:547-556.

Schurch C., Riether C., Amrein M.A., Ochsenbein A.F., Cytotoxic T cells induce proliferation of chronic myeloid leukemia stem cells by secreting interferon-gamma. *J. Exp. Med.* 2013; 210:605–621.

Schuringa J.J., Vellenga E., Role of the polycomb group gene BMI1 in normal and leukemic hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17:294–9.

Shaham L., Binder V., Gefen N. et al., MiR-125 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia.* 2012; 26:2011–8.

Shamay Y., Golan M., Tyomkin D., David A., Assessing the therapeutic efficacy of VEGFR-1-targeted polymer drug conjugates in mouse tumor models. *J. Control Release* 2016; 229:192-199.

Shi Y., Su Z., Li S., Chen Y., Chen X., Xiao Y., Sun M., Ping Q., Zong L., Multistep targeted nano-drug delivery system aiming at leukemic stem cells and minimal residual disease. *Mol. Pharm.* 2013; 10:2479-2489.

Shlush L.I., Mitchell A., Heisler L., Abelson S., Ng S.W.K., Trotman-Grant A., Medeiros J.J.F., Rao-Bhatia A., Jaciw-Zurakowsky I., Marke R. et al., Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* 2017; 547:104–108.

Shum K.T., Zhou J., Rossi J.J., Nucleic acid aptamers as potential therapeutic and diagnostic agents for lymphoma, *J. Cancer Ther.* 2013; 4:872-890.

Smith J.L., Ries R.E., Kolb A., Alonzo T.A., Gerbing R.B., Ma Y., Marra M.A., Bolouri H., Meshinchi S., The LSC17 leukemic stem cell signature predicts outcome in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* 2017; 130:24.

Soliman H.H., Minton S.E., Han H.S., Ismail-Khan R., Neuger A., Khambati F., Noyes D., Lush R., Chiappori A.A., Roberts J.D. et al., A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. *Oncotarget* 2016; 7:22928–22938.

Soliman H.H., Jackson E., Neuger T., Dees E.C., Harvey R.D., Han H., Ismail-Khan R., Minton S., Vahanian N.N., Link C. et al., A first in man phase I trial of the oral immunomodulator, indoximod, combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget* 2014; 5:8136–8146.

Sou K., Goins B., Takeoka S., Tsuchida E., Phillips W.T., Selective uptake of surface-modified phospholipid vesicles by bone marrow macrophages in vivo. *Biomaterials* 2007; 28:2655-2666.

Sou K., Goins B., Oyajobi B.O., Travi B.L., Phillips W.T., Bone marrow-targeted liposomal carriers, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011; 8:317-328.

Spoor A.C., Lubbert M., Wierda W.G. et al., CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2007; 109:786–91.

Stasi R., Amadori S., The role of angiogenesis in hematologic malignancies, *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2002; 11:49-68.

Staudinger M., Kellner C., Peipp M., Schub N., Humpe A., Gramatzki M., CD96 antibody TH-111 for detection of AML leukemic stem cells, and purging of autografts for stem cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32:7090.

Sugiyama T., Kohara H., Noda M., Nagasawa T., Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25:977–988.

Swami A., Reagan M.R., Basto P., Mishima Y., Kamaly N., Glavey S., Zhang S., Moschetta M., Seevaratnam D., Zhang Y., Liu J., Memarzadeh M., Wu J., S. Manier, Shi J., Bertrand N., Lu Z.N., Nagano K., Baron R., Sacco A., Roccaro A.M., Farokhzad O.C., Ghobrial I.M., Engineered nanomedicine for myeloma and bone microenvironment targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014; 111:10287-10292.

Tarasov V., Jung P., Verdoodt B. et al., Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle.* 2007; 6:1586–93.

Tardi P., Wan C.P., Mayer L., Passive and semi-active targeting of bone marrow and leukemia cells using anionic low cholesterol liposomes. *J. Drug Target* 2016; 24:797-804.

Tashiro H., Sauer T., Shum T., Parikh K., Mamonkin M., Omer B., Rouce R.H., Lulla P., Rooney C.M., Gottschalk S. 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; 25:2202–2213.

Tasian K. Sarah, Bornhäuser Martin e Rutella Sergio, Targeting Leukemia Stem Cells in the Bone Marrow Niche. *Biomedicines.* 2018; 6,22

Tasian S.K., Kenderian S.S., Shen F., Ruella M., Shestova O., Kozlowski M., Li Y., Schrank-Hacker A., Morrissette J.J.D., Carroll M. et al., Optimized depletion of chimeric antigen receptor T cells in murine xenograft models of human acute myeloid leukemia. *Blood* 2017; 129:2395–2407.

Taussig D.C., Vargaftig J., Miraki-Moud F., Griessinger E., Sharrock K., Luke T., Lillington D., Oakervee H., Cavenagh J., Agrawal S.G. et al., Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* 2010; 115:1976–1984.

Tavor S., Petit I., Porozov S., Avigdor A., Dar A., Leider-Trejo L., Shemtov N., Deutsch V., Naparstek E., Nagler A. et al., CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res.* 2004; 64:2817–2824.

Testa U., Leukemia stem cells. *Ann. Hematol.* 2011; 90:245–271.

Theocharides A.P., Jin L., Cheng P.Y., Prasolava T.K., Malko A.V., Ho J.M., Poepl A.G., van Rooijen N., Minden M.D., Danska J.S. et al., Disruption of SIRP-alpha signaling in macrophages eliminates human acute myeloid leukemia stem cells in xenografts. *J. Exp. Med.* 2012; 209:1883–1899.

Thomas D., Majeti R., Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2017; 129:1577–1585.

Tokoyoda K., Egawa T., Sugiyama T., Choi B.I., Nagasawa T., Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004; 20:707–718.

Tsang W.P., Ng E.K., Ng S.S. et al., Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31:350–8.

U.S. Food & Drug Administration, FDA Approves First Treatment for Certain Types of Poor-prognosis Acute Myeloid Leukemia, 2017 August. Available from: URL, <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm569883.htm>.

Uy G.L., Rettig M.P., Motabi I.H. et al., A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012; 119:3917–24.

Uy G.L., Godwin J., Rettig M.P., Vey N., Foster M., Arellano M.L., Rizzieri D.A., Topp M.S., Huls G., Lowenberg B. et al., Preliminary results of a phase 1 study of flotetuzumab, a CD123 × CD3 bispecific DART® protein, in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2017; 130:637.

Vadakekolathu J., Meredith R., Ross P.M., Wagner S., Reeder S., Demirkan G., Kuhar J.R., Ball G.R., Pockley A.G., Rutella S., Interferon- γ induces distinct mRNA and protein profiles in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 2017; 130:3945.
Valent P., Hadzijusufovic E., Scherthaner G.H., Wolf D., Rea D., Coutre P.le, Vascular safety issues in CML patients treated with BCR/ABL1 kinase inhibitors. *Blood* 2015; 125:901-906.

Vergez F., Green A.S., Tamburini J., Sarry J.E., Gaillard B., Cornillet-Lefebvre P., Pannetier M., Neyret A., Chapuis N., Ifrah N. et al., High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: A Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica* 2011; 96:1792–1798.

Vey N., Delaunay J., Martinelli G., Fiedler W., Raffoux E., Prebet T., Gomez-Roca C., Papayannidis C., Kebenko M., Paschka P. et al., Phase I clinical study of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 2016; 7:32532–32542.

- Vonka V., Humlova Z., Klamova H., Kujovska-Krcmova L., Petrackova M., Hamsikova E., Krmencikova-Fliegl M., Duskova M., Roth Z. Kynurenine and uric acid levels in chronic myeloid leukemia patients. *Onco-immunology* 2015; 4:e992646.
- Wang G., Kucharski C., Lin X., Uludag H., Bisphosphonate-coated BSA nanoparticles lack bone targeting after systemic administration. *J. Drug Target* 2010; 18:611-626.
- Wang Xuefei, Huang Shile e Chen Ji-Long, Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Molecular cancer* 2017; 16:2
- Wang Y., Krivtsov A.V., Sinha A.U. et al., The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*. 2010; 327:1650–3.
- Wang Y., He L., Du Y. et al., The long non coding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling. *Cell Stem Cell*. 2015; 16:413–25.
- Weiskopf K., Ring A.M., Ho C.C. et al., Engineered SIRP-alpha variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. *Science*. 2013; 341:88–91.
- Welch J.S., Ley T.J., Link D.C. et al., The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012; 150:264–78.
- Will B., Zhou L., Vogler T.O., Ben-Neriah S., Schinke C., Tamari R., Yu Y., Bhagat T.D., Bhattacharyya S., Barreyro L. et al., Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood* 2012; 120:2076–2086.
- Williams D.A., Cancelas J.A., Leukaemia: niche retreats for stem cells, *Nature* 2006; 444:827-828.
- Wingard J.R., Majhail N.S., Brazauskas R., Wang Z., Sobocinski K.A., Jacobsohn D., Sorror M.L., Horowitz M.M., Bolwell B., Rizzo J.D. et al., Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29:2230–2239.
- Yang J., Wang J., Chen K. et al., eIF4B phosphorylation by pim kinases plays a critical role in cellular transformation by Abl oncogenes. *Cancer Res*. 2013; 73:4898–908.

Yarbrough D.K. et al., Specific binding and mineralization of calcified surfaces by small peptides. *Calcif. Tissue Int.* (2010); 86:58-66.

Yong A.S., Stephens N., Weber G., Li Y., Savani B.N., Eniafe R., Keyvanfar K., Kurlander R., Rezvani K., Barrett A.J., Improved outcome following allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia is associated with higher expression of BMI-1 and immune responses to BMI-1 protein. *Leukemia* 2011; 25:629–637.

Zhang G. et al., A delivery system targeting bone formation surfaces to facilitate RNAi-based anabolic therapy. *Nat. Med.* 2012; 18:307-314.

Zhao X., Singh S., Pardoux C. et al., Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2010; 95:71–8.

Zong H. et al., In vivo targeting of leukemia stem cells by directing parthenolide-loaded nano-particles to the bone marrow niche. *Leukemia* 2016; 30:1582-1586.

SITOGRAFIA

www.eurostemcell.org/le-cellule-staminali-mesenchimali-le-altre-cellule-del-midollo-osseo

www.scienceforpassion.com/2012/12/le-cellule-staminali.html?m=1

www.cliccascienze.it/citologia-ed-istologia/osteoclastogenesi

www.wikipedia.org/wiki/leucemia

www.google.com/amp/slideplayer.it/amp/12003854/?source=images

RINGRAZIAMENTI

Un sincero grazie alla Professoressa Conconi che con la sua cortesia e disponibilità ha alleviato un po' la fatica di quest'ultima fase del mio percorso di studi.

Un grazie a mamma, pilastro importante della mia vita, che con il suo ottimismo e la sua forza di volontà mi ha sempre spronata a lottare. Per lei il mio benessere e lo studio sono sempre stati prioritari e la ringrazio per il suo sostegno.

Un pensiero va anche a papà che, anche se non è più tra noi, avrà sempre un posto speciale nel mio cuore.

Un grazie ai nonni e a tutti gli zii e i cugini.

Un grazie al Dott. Simone Negro della farmacia Comunale di Chiampo per aver creduto in me, per avermi incoraggiata a vincere le mie timidezze e per avermi insegnato ad "essere sempre sul pezzo" anche nei giorni meno sereni.

Un grazie alla Dott.ssa Alessandra Baessato per le sue preziose lezioni sui fito-preparati, sulle capsule e sull'analisi del capello.

Non posso assolutamente dimenticare chi mi ha aiutato ad arrivare fin qui oggi per cui un grazie doveroso alle Dott.sse in Farmacia Lisa e Luana, le mie più care compagne di corso.

Un grazie alla mia cara amica Giorgia. La nostra amicizia dura da anni e continua a rimanere forte nonostante la distanza. Grazie per esserci sempre stata.

Infine un grazie ai miei amici e compagni dell'Azione Cattolica di Chiampo con i quali ho condiviso momenti allegri ed indimenticabili che mi hanno aiutato a crescere e ad essere una persona migliore.

