

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN TERAPIE AVANZATE

MEDICO-CHIRURGICHE – 35° Ciclo

COORDINATORE: Prof. Fabrizio Pane

**IL CONTRIBUTO DELLE CELLULE NKT NELL'IMMUNITA' ANTI-
TUMORALE DELLA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA**

**Relatore
Prof. Francesco Grimaldi**

**Candidata
Dott.ssa Stefania Leone**

INDICE

1. Riassunto	pag. 3
2. Introduzione	pag. 5
2.1 La Leucemia Linfoblastica Acuta	pag. 5
2.2 Patogenesi	pag. 5
2.3 Ruolo del sistema immunitario nella patogenesi della LLA	pag. 7
2.4 Diagnosi e classificazione della LLA	pag. 10
2.5 Trattamento delle LLA pediatriche	pag. 12
2.6 Lo studio AIEOP-BFM LAL 2017	pag. 13
2.7 Le cellule T Natural Killer (NKT)	pag. 15
2.8 Il ruolo delle cellule NKT nell'immunosorveglianza tumorale	pag. 16
2.9 Le cellule NKT nelle neoplasie ematologiche	pag. 18
2.10 Le cellule T _{R3-56}	pag. 20
3. Scopo della tesi	pag. 22
4. Materiali e Metodi	pag. 24
4.1 Metodologia Clinica	pag. 24
4.2 Analisi Citofluorimetrica	pag. 29
4.3 Statistica	pag. 30
5. Risultati	pag. 31
5.1 Arruolamento dei pazienti con LLA-B	pag. 31
5.2 Risposta al trattamento	pag. 33
5.3 La distribuzione delle cellule NKT nei pazienti con LLA-B	pag. 33
5.4 Le caratteristiche delle cellule NKT-like nelle LLA-B	pag. 35
5.5 Gli effettori linfocitari T CD8 e NK nella LLA-B	pag. 39
5.6 Le cellule NKT-like naive e temra sono correlate in modo diverso ai linfociti T CD8.	pag. 42
5.7 Le cellule NKT-like sono aumentate nei pazienti ad alto rischio	pag. 44
6. Discussione	pag. 45
7. Bibliografia	pag. 49

1. RIASSUNTO

Nonostante negli ultimi decenni la prognosi delle Leucemia Linfoblastica Acuta abbia subito dei netti miglioramenti, l'insorgenza di recidive e la loro resistenza ai trattamenti tradizionali rappresentano ad oggi la principale causa di scarsa sopravvivenza. L'introduzione di approcci immunoterapici ha rivoluzionato il trattamento della LLA recidivata/refrattaria, sottolineando come la comprensione dei meccanismi immunologici para-leucemici abbia un risvolto non solo nel delineare la fisiopatologia della malattia ma soprattutto nell'introduzione di innovative strategie terapeutiche. Inoltre, l'individuazione precoce dei pazienti a maggior rischio di recidiva tramite biomarker sempre più precisi, anche di tipo immunologico, permetterebbe l'intensificazione precoce del trattamento in questo gruppo, determinandone un miglioramento dell'outcome.

Le cellule NKT sono una popolazione eterogenea di cellule T che co-esprimono markers tipici delle cellule NK, suddivisibili in due gruppi principali: le cellule NKT "invariant" (iNKT) e le cellule NKT-like. Delle prime è nota l'attività anti-tumorale, mentre delle seconde non è ancora stato definito il contributo nell'immunità tumorale. Inoltre, recentemente è stato scoperto che una popolazione di cellule appartenenti alla classe delle NKT-like, denominate T_{R3-56} , possiede capacità regolatorie nei confronti dei linfociti T CD8. Alcuni studi hanno evidenziato che una parte delle cellule NKT-like ha un'attività anti-leucemica contro linee cellulari di LLA. Ciononostante, la scoperta delle T_{R3-56} pone un interrogativo sulla reale funzione delle cellule NKT-like. Ad oggi nessuno studio ha analizzato il contributo dei diversi subset di cellule NKT nei processi di immune-editing della LLA.

Al fine di colmare questo vuoto, e nel tentativo di individuare nuovi biomarker di risposta, questo studio si è soffermato sull'analisi dei subset di cellule NKT nel midollo osseo (Bone Marrow, BM) dei pazienti con LLA-B al momento della diagnosi e dopo chemioterapia. Prima di tutto, si è verificato che le cellule iNKT e NKT-like, nella nicchia midollare leucemica, presentano un comportamento opposto, con una diminuzione delle prime e un aumento delle seconde. Se la diminuzione delle cellule iNKT è un risultato atteso alla luce della loro nota attività anti-tumorale, l'aumento delle cellule NKT-like rimane un quesito irrisolto. Quindi, ci si è soffermati sulle caratteristiche di queste ultime. Suddividendo le cellule NKT-like in base allo stato di

differenziazione, si è evidenziato che, tra le quattro principali sotto-popolazioni della memoria (naive, effector memory, central memory e terminally differentiated), solamente le cellule NKT-like naive sono aumentate al momento della diagnosi di LLA-B. Inoltre, utilizzando il CD16 come marcatore di citotossicità anticorpo-mediata, si è osservato che solamente le cellule NKT-like temra presentano un'aumentata espressione del CD16, che tende poi a diminuire dopo chemioterapia. Si è quindi ipotizzato che le cellule NKT-like naive possano rappresentare le T_{R3-56} nella LLA-B, mentre le cellule NKT-like temra la controparte citotossica. Per verificare questa ipotesi, si è studiato il rapporto tra le cellule NKT-like naive e temra con i linfociti T CD8 e il loro stato di attivazione espresso tramite il CD69. Si è riscontrata una relazione inversamente proporzionale tra le cellule NKT-like naive e i linfociti CD8, a differenza delle cellule NKT-like temra che risultano direttamente proporzionali, conformemente a quanto aspettato data le capacità inibitorie delle T_{R3-56} nei confronti dei linfociti T CD8. Questi dati sembrerebbero porre le basi per ipotizzare una differente funzione delle cellule NKT-like naive e temra nel microambiente leucemico, che necessitano però di conferme di tipo funzionali.

Successivamente, si è verificato che se il quantitativo di cellule NKT-like al momento della diagnosi avesse una distribuzione differente nei pazienti classificati in base alle classi di rischio. E' stato osservato che la percentuale di NKT-like è maggiore nei pazienti ad alto rischio rispetto a quelli a rischio standard e medio, per quanto l'analisi è limitata dalla scarsa numerosità campionaria. Quindi, per confermare il reale valore predittivo delle cellule NKT-like, questo dato deve essere verificato in una coorte più ampia di pazienti.

2. INTRODUZIONE

2.1 LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA

La Leucemia Linfoblastica acuta (LLA) è una neoplasia ematologica dovuta alla patologica proliferazione di un clone neoplastico della linea linfoide nel midollo osseo (BM), con disseminazione nel sangue periferico (PB) ed eventualmente in organi linfoidi o altri siti. In base alla cellula linfoide da cui deriva il clone leucemico una prima grande classificazione delle LLA prevede la suddivisione in LLA derivante da cellule B (B-ALL) e da cellule T (T-ALL)[3]. Dal punto di vista epidemiologico, la LLA ha un andamento bimodale, con un picco di incidenza nei bambini tra i 2 e i 5 anni e un nuovo aumento dopo i 65 anni[4]. La LLA rappresenta infatti la neoplasia più frequente dell'età pediatrica, con una maggiore prevalenza delle B-ALL, piuttosto che le T-ALL[5]. Negli ultimi decenni, ottimizzazione degli schemi terapeutici e introduzione di sempre nuovi agenti farmacologici ha permesso di migliorare nettamente la sopravvivenza di questi pazienti.

2.2 PATOGENESI

Dal punto di vista patogenetico, è ormai assodato come lo sviluppo del clone neoplastico linfoide derivi dall'acquisizione di alterazioni genetiche a livello della cellula staminale emopoietica pluripotente, che bloccano la fisiologica differenziazione linfoide conferendo un vantaggio al clone leucemico sia in termini di sopravvivenza che proliferativi[6, 7]. Questo porta ad una incontrollata espansione della cellula leucemica nella nicchia midollare che quindi sovrasta i precursori sani. Ad oggi, un numeroso gruppo di lesioni genetiche sono state riscontrate in modo ricorrente nelle cellule leucemiche, sia di tipo citogenetico che mutazionale. Questa varietà biologica riflette infatti l'eterogeneità clinica della LLA, sia in termini di presentazione clinica che di evoluzione. La presenza di una vasta gamma di alterazioni genetiche causative nel processo di leucemogenesi indica proprio come l'eziologia non possa essere semplicemente ricondotta a una sola causa ma a molteplici meccanismi. Storicamente, diverse alterazioni numeriche e strutturali cromosomiche sono risultate ricorrenti nelle LLA e successivamente correlate con la prognosi[8, 9]. Studi successivi di caratterizzazione genetica di queste alterazioni

cromosomiche hanno permesso sia di individuare i geni principalmente coinvolti, sia di rafforzare l'idea che specifiche lesioni genetiche definiscono specifiche leucemie [10-13]. Tali lesioni, da sole, risultano però insufficienti a generare un fenotipo leucemico completo. Un esempio è rappresentato dalla traslocazione t(12;21)TEL-AML1, individuata nei pazienti leucemici anni prima di sviluppare la leucemia[14], ma anche nella popolazione sana, in circa l'1% di bambini[15]. Queste evidenze rafforzano l'idea che lo sviluppo del clone leucemico sia un processo multi-step, generato da un primo evento mutazionale che conferisce arresto differenziativo e resistenza all'apoptosi alla cellula multi-potente emopoietica, e un secondo evento che agisce sull'arresto del ciclo cellulare, il blocco di geni onco-soppressori e modifiche cromatiniche[16]. Studi epidemiologici riguardanti l'incidenza di precedenti infezioni virali in bambini con LLA hanno posto le basi per postulare il coinvolgimento di una risposta immunitaria alterata nella patogenesi della LLA[17]. In particolare, è stato ipotizzato che una risposta non controllata del sistema immunitario a un'infezione determini un transitorio blocco e apoptosi dell'emopoiesi con possibile selezione di un clone pre-leucemico, che invece presenta un vantaggio di sopravvivenza rispetto al resto dell'emopoiesi sana (Figura 1).

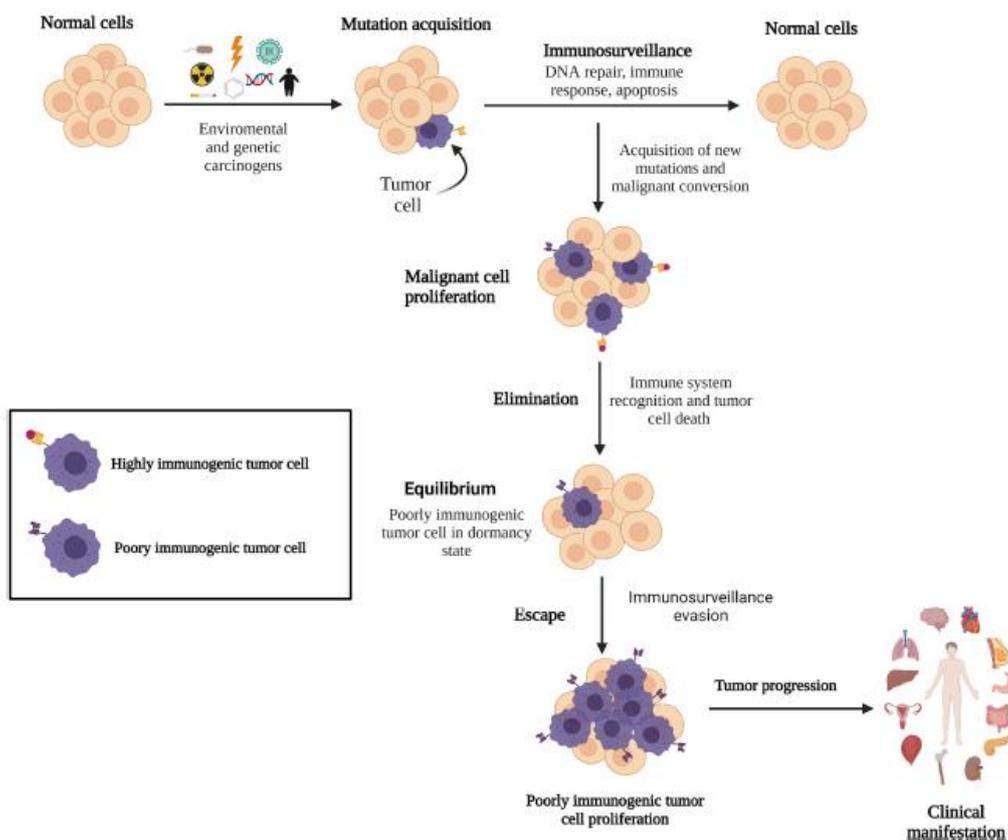


Figura 1. Prima teoria patogenetica della LLA che include il coinvolgimento del sistema immunitario nella selezione indiretta del clone leucemico [1]

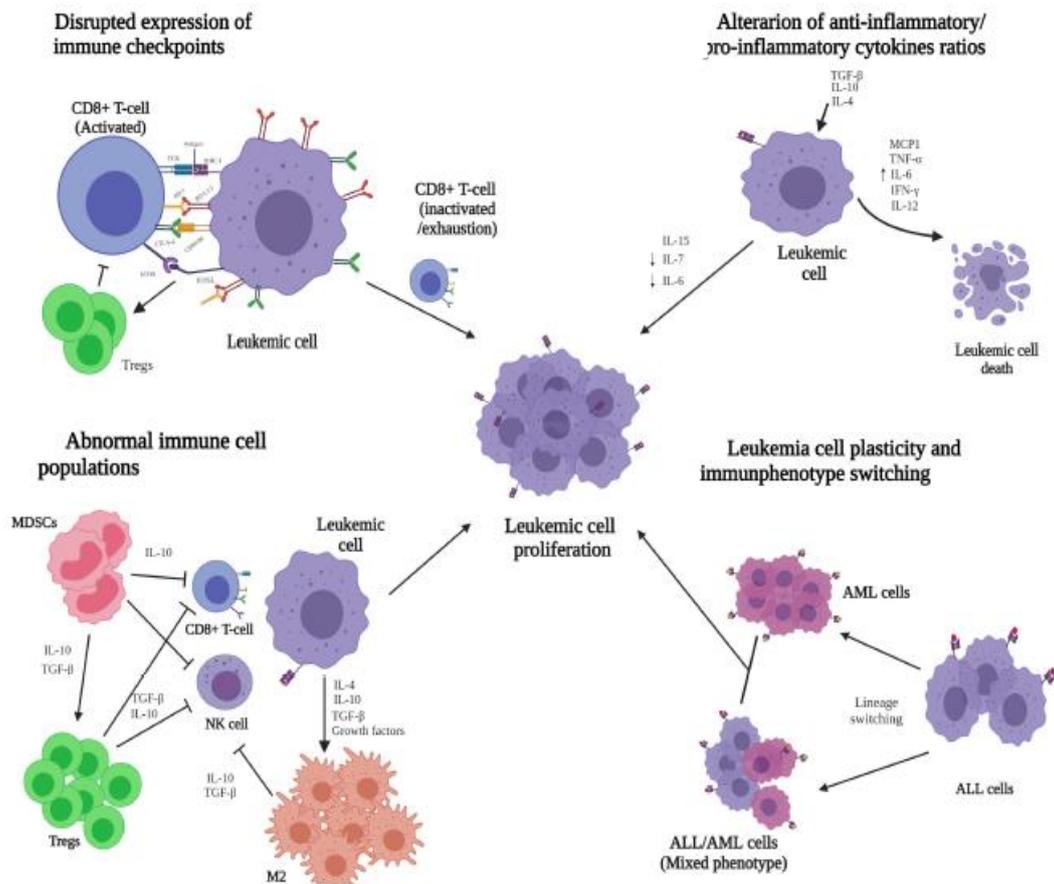
2.3 IL RUOLO DEL SISTEMA IMMUNITARIO NELLA PATOGENESI DELLA LLA

Partendo da queste prime evidenze sul coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi della LLA, numerosi studi successivi hanno approfondito la stretta relazione tra espansione del clone leucemico e disfunzionamento del sistema immunitario. Nella LLA, così come in tutti i tumori, il clone neoplastico riesce a sopravvivere e ad espandersi grazie non solo all'acquisizione di mutazioni ma anche alla capacità di sfuggire al riconoscimento da parte del sistema immunitario. Infatti, fisiologicamente, i linfociti T CD8 citotossici (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL) e i linfociti NK (Natural Killer) sono le cellule del sistema immunitario responsabili del riconoscimento di cellule "non-self" e della loro eliminazione[18]. Nel caso dello sviluppo tumorale, è ormai stabilito che le cellule neoplastiche siano in grado di sfuggire al riconoscimento da parte dei linfociti CD8 e NK, in un processo denominato *immune-evasion*, e che, indirettamente, il sistema immunitario seleziona i cloni neoplastici meno immunogeni

che quindi riescono a sopravvivere e proliferare [19]. La LLA non fa eccezione rispetto a questi meccanismi, presentando diversi meccanismi di *immune-evasion*[1]. Questi complessi meccanismi di interazione tra il clone leucemico e il sistema immunitario sono riassunti in figura 2. Uno studio murino su un modello di LLA[20] ha dimostrato come i blasti leucemici rimangono in uno stato dormiente quando i processi di immunosorveglianza sono efficaci, ma, quando i blasti sviluppano dei meccanismi di *immune-evasion* grazie alla perdita di antigeni immunogeni, il clone riesce a espandersi. Inoltre, la capacità del clone leucemico di sfuggire al riconoscimento immunitario è supportato dalle evidenze di una ridotta espressione di molecole di co-stimolo sul blasto leucemico[21], necessarie all'attivazione dell'immunità T mediata, così come di molecole necessarie al riconoscimento linfocitario, come l'HLA di classe I[22] e i recettori inibitori dell'attivazione NK[23]. Un ulteriore meccanismo di evasione immunitaria proposto è la presenza di un numero totale di mutazioni complessivamente inferiore nella LLA rispetto ad altri tumori. Infatti, questo determina la creazione di un basso numero di neoantigeni per cui diminuisce la possibilità che la cellula tumorale venga riconosciuta dai linfociti T[24].

Fisiologicamente, esistono un complesso di meccanismi nel sistema immunitario incentrati sul mantenimento della tolleranza periferica, in modo da evitare che l'iperattivazione linfocitaria in seguito a uno stimolo determini danni ai tessuti periferici sani[25]. Questi meccanismi comprendono numerosi processi, tra cui la produzione di citochine inibitorie come TGF- β e IL-10, l'espansione di popolazioni cellulari immunosoppressive come le cellule T regolatorie (Treg) e le Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC), e l'espressione di ligandi inibitori l'attivazione linfocitaria T, come PD-L1.

Nell'ambito tumorale, le cellule neoplastiche sfruttano questi meccanismi per bloccare l'attivazione dei CTL e sfuggire quindi all'eliminazione da parte del sistema immunitario[26]. Nella LLA è stato dimostrato che molti di questi meccanismi sono messi in atto dal blasto leucemico per sfuggire all'attacco del sistema immunitario[1, 27].



Le citochine anti-infiammatorie TGF- β e IL-10 contribuiscono a spegnere la risposta immunitaria, e vengono quindi prodotte dalle cellule tumorali per creare un ambiente sfavorevole ai CTL. Infatti, nella LLA, è stato dimostrato che i blasti leucemici producono TGF β e IL-10 nella nicchia midollare[28] ed esprimono IL-4, probabilmente responsabile di diminuire il riconoscimento immunitario tramite la riduzione di espressione dell'HLA di classe II[29].

Le Treg sono una popolazione linfocitaria T coinvolta nei processi di immune-escape tumorali in quanto in grado di spegnere l'attività linfocitaria T contro il tumore, tramite dei meccanismi sia di contatto diretto che di produzione citochimica[30]. E' stato ampiamente dimostrato come nella LLA le Treg siano presenti in elevato numero nel midollo osseo[31] e come questo correli in modo sfavorevole con la prognosi[32]. Inoltre, recentemente, il numero elevato di Treg è risultato predittivo di risposta alla terapia con anticorpi monoclonali bi specifici e CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T Cells)[33]. Le MDSC sono invece una popolazione mieloide eterogenea con forti

capacità immunosoppressive nei confronti dei linfociti T e negli ultimi anni sono state ampiamente caratterizzate nell'ambito dell'immunità tumorale[34]. Riguardo la LLA, le MDSC risultano incrementate nei pazienti e una loro riduzione dopo terapia di induzione correla con la risposta alla terapia[35]. I recettori inibitori dell'attivazione dei linfociti T, o anche denominati "immune checkpoint", sono fisiologicamente espressi sulla superficie dei linfociti T in seguito all'esposizione protratta a uno stimolo antigenico, come un'infezione, in modo da impedire l'iperattivazione dei CTL ed evitare così danni ai tessuti sani[36]. I CTL che esprimono questi recettori sono quindi meno citotossici e hanno minori capacità effettrici. Nell'ambito tumorale, e così anche nella LLA, le cellule neoplastiche inducono un fenotipo "exhausted" nei CD8 aumentando l'espressione dei recettori inibitori, come CTLA-4, PD-1, TIM-3 e LAG-3, così come il clone tumorale stesso aumenta l'espressione di PD-L1[37]. In particolare nella LLA, è stato verificato che queste molecole risultano iper-esprese sulla superficie dei linfociti T nei pazienti a diagnosi[38], così come nei pazienti non responsivi a immunoterapia con anticorpi monoclonali bi-specifici[39]. L'impatto sulla storia naturale della malattia di queste alterazioni immunitarie è stata recentemente dimostrata da come alterazioni degli effettori immunitari nel midollo osseo dei pazienti con LLA abbiano un impatto sulla prognosi[40]. In considerazione del ruolo determinante del sistema immunitario nella patogenesi della LLA, sempre più strategie terapeutiche sono attualmente volte al suo sfruttamento, sia in termini di effettori anti-leucemici che di eventuali target da inibire.

2.3 DIAGNOSI E CLASSIFICAZIONE DELLE LLA

Negli ultimi anni notevoli sforzi scientifici si sono direzionati verso il perfezionamento nella classificazione delle LLA, in modo da migliorarne la gestione clinica. Nel 1995[41] veniva per la prima volta stabilito in una classificazione il concetto di cellula di origine della leucemia, ovvero della provenienza dalla linea linfocitaria B o T. Inoltre venivano introdotti alcuni marker immunologici che permettevano di differenziare da quale precursore linfoide derivava il clone leucemico (classificazione EGIL, European Group for Immunological classification of Leukemias) (Tabella 1).

B-cell lineage	T-cell lineage
B-I (pro-B) ALL TdT + , CD19 / CD 22 / CD 79a + CD 10 - , cμ - , sIg -	T-I (pro-T) ALLpro -T TdT+ , cy CD 3 + , CD 7 +
B-II (common) ALL TdT + , CD19 / CD 22 / CD 79a + CD 10 + (CALLA), cμ - , sIg - , cy Ig -	T-II (pre-T) ALL TdT+ , CD 2 + si / sau CD 5+
B-III (pre - B) ALL TdT + , CD19 / CD 22 / CD 79a + CD 10 + , cμ + , sIg - , cy Ig +	T-III (cortical) ALL TdT+ , cy CD 3 + , CD 2 / 5 / 7 + CD 1a + , CD 4 + / CD 8+
B-IV (mature) ALL TdT - , CD19 / CD 22 / CD 79a + CD 10 + , sIg + , cy Ig +	T-IV (mature) ALL T TdT+ / - , s CD 3 + , CD 2 / 5 / 7 + CD 1a - , CD 4 + sau CD 8+

Tabella 1. Classificazione EGIL

Con l'introduzione della WHO (World Health Organization) 2008[42] veniva stabilito il concetto per cui alcune alterazioni genetiche ricorrenti siano in grado di caratterizzare la storia naturale della malattia e possano quindi definire delle categorie a sé stanti di LLA. Nel 2022 è stata pubblicata la quinta e ultima classificazione WHO[43], nella quale la B-LLA viene classificata in base alle lesioni genetiche caratterizzanti, enfatizzando l'alterazione molecolare scatenante, e non eventualmente quella citogenetica a monte. Rimane però la categoria delle LLA NOS (Not Otherwise Specified), per le LLA in cui non è stata rilevata l'alterazione genetica caratterizzante.

Le T-ALL vengono invece classificate nella WHO 2022 in sole due categorie, le T-ALL NOS e le "early T-precursor ALL" (ETP-ALL), per l'attuale assenza di evidenze sufficienti a definire delle sotto-categorie di T-ALL separate. La ETP-ALL rappresenta invece una categoria a sé stante per la presenza di un pattern di espressione genica caratteristico degli stadi precoci dei precursori cellulari T e per un immunofenotipo caratterizzato dall'espressione di marker tipici di cellule staminali e/o della linea mieloide.

2.4 TRATTAMENTO DELLE LLA PEDIATRICHE

Il trattamento della LLA pediatrica ha raggiunto importanti miglioramenti nelle ultime decadi, arrivando attualmente a dei tassi di sopravvivenza media a 5 anni (Overall Survival, OS) intorno al 90%[44]. Questi successi terapeutici sono principalmente dovuti all'ottimizzazione degli schemi di poli-chemioterapia e al perfezionamento della stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio, che ha permesso un approccio più personalizzato del trattamento[45]. Gli attuali schemi di poli-chemioterapia prevedono quattro fasi di trattamento: induzione, consolidamento, re-induzione e mantenimento. La combinazione di farmaci utilizzata in questi schemi prevede diverse categorie farmacologiche: i classici agenti alchilanti e anti metaboliti, le antracicline, ma anche farmaci che diminuiscono la disponibilità aminoacidica come l'Asparaginasi e, infine, i Glucocorticoidi. Il successo di questi schemi chemioterapici nella popolazione pediatrica è dovuto non solo all'introduzione di combinazioni sempre più efficaci ma anche all'individuazione della massima dose tollerata. Questo ha portato l'utilizzo dei chemioterapici convenzionali al limite massimo di intensificazione tollerato, per cui ulteriori miglioramenti dell'outcome possono ad oggi essere dovuti solo all'introduzione di nuovi approcci terapeutici. Il rischio di recidive, e quindi di scarsa sopravvivenza, dipende sia da fattori intrinseci genetici della malattia, sia da fattori estrinseci, principalmente basati sulla risposta alla terapia[46]. Quindi la suddivisione dei pazienti in classi di rischio, e il conseguente differente approccio terapeutico, dipendono dallo studio della genetica della malattia a diagnosi, sia in termini citogenetici che molecolari, così come dal monitoraggio della risposta al trattamento tramite quantificazione dell'MRD (Minimal Residual Disease)[47]. Infatti, diversi trial clinici hanno dimostrato la fattibilità del monitoraggio dell'MRD con una combinazione di tecniche, principalmente citofluorimetrica e di biologia molecolare, in ampie coorti di pazienti[48, 49], e hanno verificato che il mancato raggiungimento della negatività dell'MRD al termine della terapia di consolidamento è un importante fattore prognostico negativo[50]. La valutazione dell'MRD molecolare consiste nel valutare tramite PCR i riarrangiamenti delle catene pesanti delle immunoglobuline nelle B-ALL, mentre nelle T-ALL viene individuato il TCR (T Cell Receptor) clonale[51]. Ad oggi, la valutazione dell'MRD rappresenta quindi il fattore prognostico indipendente di maggior impatto per la

sopravvivenza dei pazienti e guida quindi la scelta di intensificazione del trattamento per i pazienti a maggior rischio di recidiva, insieme alla valutazione della genetica[48].

2.5 LO STUDIO AIEOP-BFM ALL 2017

Le recidive di LLA rappresentano però ancor oggi il principale motivo di bassa sopravvivenza, data la resistenza di questa categoria agli approcci terapeutici standard di salvataggio con chemioterapia[52]. La strategia quindi, ad oggi, più efficace sembra essere quella di tentare di limitare l'insorgenza di recidive, individuando precocemente i pazienti a maggior rischio ed intensificandone la terapia, anche con farmaci non chemioterapici standard. Risulta quindi di fondamentale importanza, al fine di individuare i soggetti a maggior rischio di recidiva, l'ottimizzazione della stratificazione, in modo da intensificarne il trattamento con nuovi approcci terapeutici, come anticorpi monoclonali, inibitori del proteasoma ed eventualmente CAR-T. In questo contesto si posiziona lo studio AIEOP-BFM ALL 2017. Esso è uno studio multicentrico prospettico randomizzato, che si prefigge di applicare non solo un approccio integrato per la stratificazione prognostica dei pazienti, ma anche di riorientare qualitativamente la terapia in base ad essi. In questo studio vengono infatti applicati i metodi di valutazione del rischio di malattia validati nei precedenti studi AIEOP-BFM ALL 2000[53] e 2009[54], che consistono in: valutazione della genetica di malattia a diagnosi e valutazione dell'MRD, sia con metodo PCR in due timepoint specifici (TP1 al giorno +33 dopo terapia di induzione; TP2 al giorno +78 dopo terapia di consolidamento) sia tramite citofluorimetria multi parametrica in giornata +15 dall'inizio della terapia di induzione. Le alterazioni genetiche considerate ad alto rischio di scarsa sopravvivenza sono: KMT2A-AFF1 (MLL-AF4; TCF3-HLF (E2A-HLF); cariotipo ipodiploide con meno di 45 cromosomi; IKZF1plus, unicamente se non hanno l'MRD negativa al TP1 e non presentano nessuna di queste alterazioni genetiche: ETV6-RUNX1 (TEL-AML1), TCF3-PBX1 (E2A-PBX1) or KMT2A (MLL). Oltre a questo aspetto classificativo prognostico, l'AIEOP-BFM ALL 2017 intende verificare se l'intensificazione della terapia con agenti non chemioterapici in pazienti con caratteristiche di alto rischio, possa migliorarne la prognosi. I farmaci non chemioterapici standard testati in questo studio sono due: il Bortezomib e il Blinatumumab. Il Bortezomib è un farmaco inibitore del proteasoma che ha dimostrato di avere un'attività anti-tumorale in diverse neoplasie ematologiche, prima di tutto il mieloma multiplo, ma recentemente anche nella LLA, per

quanto il meccanismo d'azione non sia completamente chiarito. Inizialmente testato in ionoterapia, il Bortezomib ha dimostrato scarsi risultati in pazienti pediatrici[55]. Invece, in considerazione dell'azione sinergica in vitro del Bortezomib con asparaginasi, vincristina, citarabina e doxorubicina[56], la sua aggiunta in schemi di poli-chemioterapia in pazienti con LLA recidivata ha determinato dei buoni risultati in termini di risposta e una tossicità accettabile[57, 58]. Alla luce di questi risultati, nell' AIEOP-BFM ALL 2017, la prima domanda che viene posta è se l'aggiunta del Bortezomib nella fase di Consolidamento nei pazienti con B-ALL definiti Early High Risk (early HR), per genetica sfavorevole o inadeguata risposta al trattamento, possa migliorare la probabilità di sopravvivenza libera da leucemia (Event Free Survival, EFS).

Il Blinatumumab è un anticorpo monoclonale bispecifico in grado di riconoscere da un lato il CD19 presente sulle cellule leucemiche, dall'altro il CD3 presente sui linfociti T, in modo da creare un ponte tra le due cellule e favorire così l'eliminazione dei blasti leucemici da parte dei linfociti T[59]. Approvato negli Stati Uniti e in Europa dal 2017 per i pazienti con B-ALL recidivati/refrattari, il Blinatumumab ha dimostrato di essere un farmaco molto efficace e sicuro[60]. E' noto che i pazienti con MRD positiva alla fine del consolidamento abbiano un maggiore rischio di recidive[61] e che approcci terapeutici intensivi come chemioterapia ad alte dosi o il trapianto allogenico di cellule staminali non sono in grado di migliorare la sopravvivenza[62], presentando, inoltre, un elevato rischio di complicanze. In questo contesto, l'AIEOP-BFM ALL 2017 si pone la domanda se la sostituzione di due cicli di chemioterapia ad alte dosi post consolidamento con due cicli di Blinatumumab in pazienti ad alto rischio (High Risk, HR) possa migliorarne l'EFS. Inoltre, poiché la maggior parte delle recidive si verifica nel gruppo di pazienti a rischio intermedio (Standard Risk, SR), il Blinatumumab viene investigato nell'AIEOP-BFM ALL 2017 anche in questi pazienti, chiedendosi se la probabilità di sopravvivenza libera da malattia (Disease Free Survival, DFS) possa essere incrementata con l'aggiunta di un ciclo di Blinatumumab al termine della re-induzione. L'AIEOP-BFM ALL 2017 è quindi il primo studio nel quale viene valutata l'aggiunta del Blinatumumab front-line nel setting pediatrico.

2.6 LE CELLULE T NATURAL KILLER (NKT)

Le cellule T Natural Killer (NKT) sono un gruppo eterogeneo di linfociti che presentano delle caratteristiche proprie sia dell'immunità innata che adattativa. Storicamente furono inizialmente identificate nel 1995 nel topo come cellule T che co-esprimevano il marker di superficie NK1.1 (CD161c), tipico delle cellule NK[63]. Queste cellule presentavano un'espressione intermedia del TCR, con un restringimento preferenziale per il V β 8.2, ed erano forti produttrici di citochine[64]. Studi successivi hanno dimostrato che queste cellule NKT rispondono in modo antigene-specifico via TCR, per quanto quest'ultimo, diversamente dalle cellule T, non riconosce un solo epitopo, ma diversi, sia self, che non self[65, 66]. Inoltre, queste cellule presentano una catena α del TCR specifica, definito quindi "invariant", che nel topo è la V α 14-J α 281, mentre nell'uomo V α 24-J α 18[67]. Soprattutto, le cellule NKT non riconoscono tramite il loro TCR antigeni presentati dall'MHC di classe I o II, ma interagiscono con antigeni lipidici presentati da una molecola della famiglia dell'MHC di classe I, denominata CD1d[68]. Evidenze successive hanno dimostrato che le NKT reagiscono con un'importante attivazione e risposta pro-infiammatoria quando al CD1d sono legati alcuni sfingolipidi, come l' α -galactosyl-ceramide (α -GalCer)[69]. Questo confermerebbe il ruolo delle NKT nell'ambito dell'immunità antibatterica, data la loro capacità di riconoscere degli epitopi normalmente non identificati dai comuni recettori Toll Like Receptor (TLR)[70]. Data la stretta relazione tra il riconoscimento CD1d mediato e le capacità funzionali delle NKT "invariant"(iNKT), è stato proposto che il restringimento per il CD1d rappresenti la caratteristica principale di questo subset cellulare[71]. Inoltre, è stato anche proposto che queste cellule vengano suddivise a loro volta in due sotto tipi: le iNKT "classiche" che riconoscono il CD1d tramite il TCR V α 24, e le iNKT "non classiche" che invece riconoscono il CD1d tramite altre catene α del TCR.

Studi successivi hanno però verificato che non tutte le cellule NKT, definite come cellule T co-esprimenti marcatori delle cellule NK, hanno un tipo di risposta CD1d ristretta, presentando invece un fenotipo e capacità funzionali differenti rispetto alle iNKT. Questa sotto-popolazione infatti è costituita da linfociti T differenziati, con un TCR di tipo α/β , che esprime alcune molecole di superficie tipiche delle cellule NK (CD16, CD56, CD57, CD161, CD94, NKG2A). Per questa caratteristica, queste cellule NKT vengono comunemente indicate come "NKT-like". Studi recenti hanno inoltre evidenziato come le cellule NKT-like risultano differenti rispetto alle iNKT, alle NK e alle T CD56-, da un punto di vista sia trascrittomico che fenotipico di molecole di superficie[72]. Infatti, Chan W. K et al hanno

dimostrato che le cellule NKT-like, dal punto di vista funzionale, in condizioni basali e negli individui sani, non hanno attività citotossica. Ma se esse vengono sottoposte a stimoli pro-infiammatori tendono a differenziare in due sottopopolazioni, caratterizzate da due profili di espressione di KIR differenti e attività funzionale diversificata. Le cellule NKT-like KIR+ risultano avere un'attività citotossica nettamente maggiore delle KIR- verso diverse linee di cellulari di LLA, e presentano a livello genico un profilo di espressione più simile a cellule della memoria, soprattutto per il profilo metabolico cellulare utilizzato.

Nonostante ciò, dal punto di vista funzionale ad oggi non è ancora definito il ruolo fisiologico delle cellule NKT-like, per quanto esse risultano aumentate di numero in diverse condizioni di attivazione cronica dell'immunità come infezioni croniche, tumori e malattie autoimmuni[73-75]. Inoltre, sia le iNKT e che le NKT-like presentano una differente distribuzione in base all'età, con una diminuzione nel numero delle iNKT negli individui più anziani, a differenza delle NKT-like che invece tendono a diminuire con l'età avanzata[76].

	iNKT	NKT-like
CD1d dependent	Yes	No
α -GalCer reactive	Yes	No
TCR α chain	V α 24-J α 18	Diverse
TCR β chain	V β 11	Diverse
NK associated markers	CD161	CD56, CD94
Subset	CD4, DN, CD8	CD8, DN, CD4
IL-4 production	Yes	No
INF γ production	Yes	Yes

Tabella 2. Le principali differenze tra cellule iNKT e NKT-like. Adattato da: Godfrey D. A. et al Nature 2004

2.7 IL RUOLE DELLE CELLULE NKT NELL'IMMUNOSORVEGLIANZA TUMORALE

Nell'ambito della sorveglianza immunitaria anti-tumorale, differenti funzioni sono attribuite alle diverse sotto-popolazioni di cellule NKT. Le cellule iNKT di tipo 1 hanno un'attività di tipo anti-tumorale grazie sia alla citotossicità diretta verso le cellule neoplastiche, che all'attivazione di altre cellule effettrici anti-tumorali, come i linfociti T CD8 e NK[77]. Inoltre, l'attività di citotossicità diretta delle iNKT dipende dal

riconoscimento delle cellule tumorali tramite il CD1d, così come dimostrato dai saggi *in vitro*[78] e dalle osservazioni *in vivo*[79, 80]. Infatti, la diminuzione nell'espressione del CD1d rappresenta uno dei meccanismi di escape delle cellule tumorali dal riconoscimento delle iNKT, come dimostrato da alcuni modelli tumorali. Tutto ciò, è confermato dalla presenza di un ridotto numero e/o funzionalità delle iNKT di tipo I in pazienti con diversi tipi di tumori[81, 82]. Le cellule iNKT di tipo II invece hanno un'attività principalmente di tipo soppressorio nell'immunità anti-tumorale, bloccando l'azione dei linfociti T effettori e favorendo invece quella di altre popolazioni soppressive, come le MDSC. Questa attività immuno-modulante delle iNKT di tipo II è principalmente svolta tramite la produzione di citochine anti-infiammatorie come IL-4, IL-13 e TGF β . Limitati sono invece i dati sul ruolo delle cellule NKT-like nell'immunosorveglianza tumorale. E' infatti attualmente noto che queste cellule risultano aumentate di numero nel sangue periferico di individui con vari tipi di tumori solidi[83] ma non è attualmente nota la loro specifica funzione.

Ad oggi, ha quindi destato notevole interesse l'attività anti-tumorale delle cellule iNKT di tipo I, favorendo la creazione di strategie terapeutiche anti-neoplastiche che cercano di sfruttare l'attività citotossica di queste cellule. Attualmente numerosi approcci terapeutici sono stati indagati, sia in ambito pre-clinico che clinico[84]. La somministrazione di α -GalCer per attivare le iNKT è stato inizialmente indagato, portando a scarsi risultato in uno studio clinico di fase I[85]. Invece la somministrazione di cellule dendritiche che presentano α -GalCer porta a una forte attivazione delle iNKT e attività tumorale, come dimostrato dagli studi clinici di fase I/II[86]. Questo approccio risulta però limitato dal numero iniziale di iNKT del paziente. Dato il basso numero di iNKT nei pazienti neoplastici, si è quindi indagata la somministrazione di iNKT attivate ed espanse *in vitro*. Da sole le iNKT non sembrano in grado di avere una sufficiente attività citotossica da indurre remissione tumorale, anche se i risultati sembrano migliorare con la co-somministrazione di cellule dendritiche presentanti l' α -GalCer[87]. Recentemente, l'immunoterapia adottiva è stata drasticamente cambiata dall'introduzione delle CAR-T, cellule T ingegnerizzate con un recettore in grado di riconoscere la cellula tumorale e ucciderla specificamente. Questa terapia risulta però limitata da una serie di complicanze come la Sindrome da Rilascio Citochinico (CRS) e dal limitato numero di cellule T da cui generare le CAR-T presenti nei pazienti dopo chemioterapia. Tali problematiche, hanno indotto a ipotizzare l'utilizzo delle iNKT ingegnerizzate con un CAR, data la possibilità di espandere queste cellule da donatori sani, non essendo legate al

riconoscimento MHC mediato, a differenza delle cellule T. Diversi studi pre-clinici hanno dimostrato l'efficacia in vivo e in vitro di questo approccio, determinando l'inizio di studi clinici di fase I, principalmente focalizzati sul GD2 e il CD19 come target tumorali[88-90].

Dato invece il ruolo delle iNKT di tipo II nel favorire la formazione di un microambiente immunosoppressorio pro-tumorale, sarebbe utile individuare un metodo per inibirne la sopravvivenza e ristabilire così l'immunità anti-tumorale[91].

2.9 LE CELLULE NKT NELLE NEOPLASIE EMATOLOGICHE

Nell'ambito delle neoplasie ematologiche, negli ultimi anni, numerosi studi hanno cercato di rispondere alla domanda del ruolo delle cellule NKT nella sorveglianza immunologica tumorale, così come un loro eventuale utilizzo nell'immunoterapia. La maggior parte degli sforzi è stato concentrato sulle cellule iNKT, mentre poco è noto riguardo le NKT-like.

Le iNKT hanno un'attività citotossica anti-tumorale diretta verso diverse neoplasie ematologiche[92] (Figura 2), principalmente tramite la produzione di granuli citotossici e l'interazione con recettori che inducono apoptosi, come Fas e TRAIL[93]. Questa attività citotossica dipende dall'interazione con il tetramero CD1d presente sulle cellule tumorali ematologiche. Quindi, uno dei meccanismi di evasione del riconoscimento da parte delle iNKT messo in atto dalle cellule neoplastiche è la diminuzione dell'espressione del CD1d. Infatti, in diversi tumori ematologici bassi livelli di CD1d sono associati a una scarsa prognosi e a progressione di malattia, sia in modelli murini che umani[79, 94-96]. Nell'ambito delle LLA, la bassa espressione del CD1d sui blasti leucemici correla con una scarsa prognosi[94]. Dal punto di vista quantitativo e funzionale, le iNKT risultano generalmente ridotte di numero e disfunzionanti in diverse neoplasie ematologiche[82, 97] e il loro numero influisce sulla prognosi nel Mieloma Multiplo (MM)[80] e nella Leucemia Linfatica Cronica (LLC)[95]. Recentemente, uno studio ha descritto le frequenze di iNKT e CIK (Cytokine Induced Killer cells) nel sangue periferico di pazienti con LLA e Leucemia Mieloide Acuta (LMA), rivelando una diminuzione di frequenza di queste cellule e una loro correlazione con noti fattori prognostici[98]. Riguardo le cellule NKT-like, pochi studi le hanno caratterizzate nelle neoplasie ematologiche. Tra questi, Almeida et al.[99] hanno dimostrato che le NKT-like risultano aumentate a diagnosi nella Leucemia Mieloide Cronica (LMA), e diminuiscono di

numero dopo terapia con TKI (Thirosin Kinasi Inhibitor). Anche nei Linfomi Non Hodgkin (LNH) le cellule NKT-like risultano aumentate nel sangue periferico e il loro numero correla con l'aggressività della malattia valutata in base alla stadi azione Ann-Harbour. Nell'ambito invece delle LLA, solo uno studio[100] ha tentato di affrontare l'argomento, individuando, anche in questo caso, un numero di cellule CD3+CD56+ aumentati nel sangue periferico dei pazienti. In quest'ultimo lavoro manca però una corretta distinzione delle sottopopolazioni di cellule NKT, in quanto non vengono chiaramente differenziate le iNKT dalle NKT-like. Inoltre, gli autori attribuiscono alle cellule CD3+CD56+ una presunta attività citotossica, senza dimostrarla funzionalmente. Rimane infatti irrisolto il dubbio, in tutte le neoplasie ematologiche studiate fino ad ora, della causa dell'aumento di numero delle cellule NKT-like e della conseguente implicazione fisiopatologica. Se infatti questa popolazione avesse un'attività citotossica antitumorale, come proposto da diversi autori, il loro numero dovrebbe essere soppresso nel microambiente tumorale, così come accade per gli altri effettori del sistema immunitario (CTL e NK). Ne deriva che ancor oggi non è elucidata la funzione delle cellule NKT-like nell'ambito dell'immunosorveglianza delle neoplasie ematologiche.

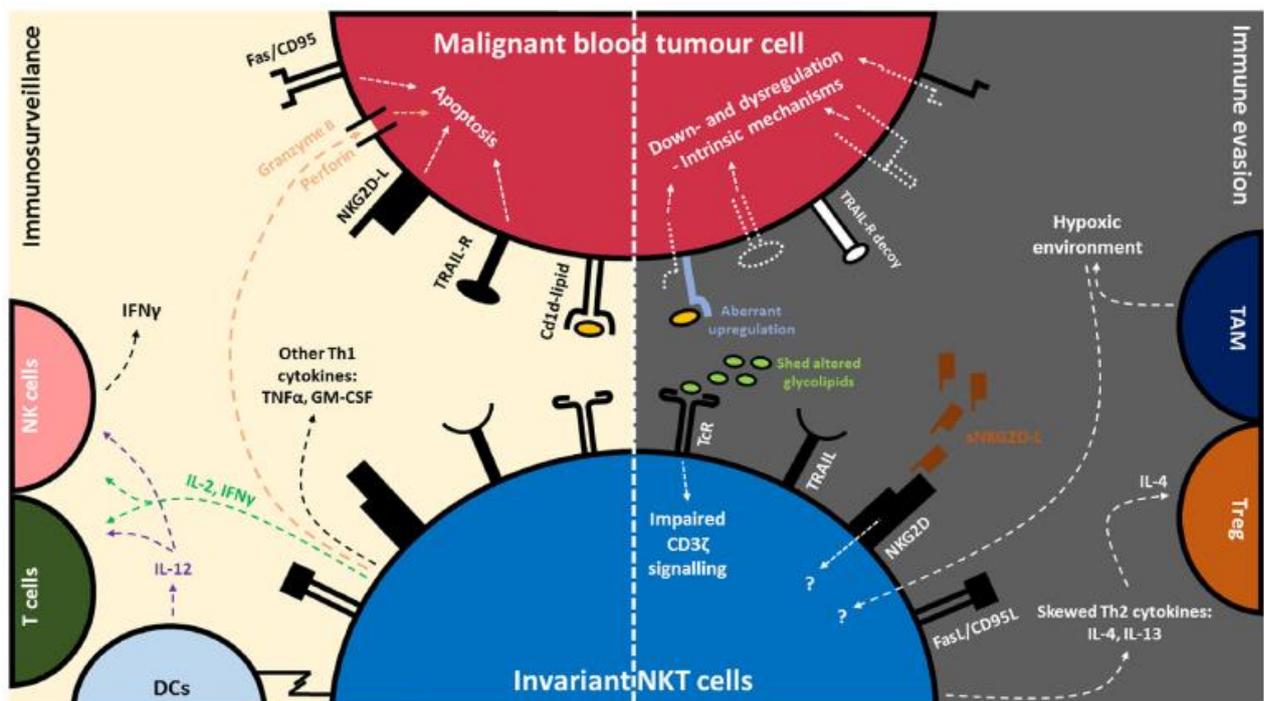


Figura 2. Il rapporto tra le cellule iNKT e le cellule neoplastiche ematologiche. [2]

2.10 LE CELLULE T_{R3-56}

Recentemente, Terrazzano et al.[101] hanno evidenziato per la prima volta come una popolazione di linfociti che co-esprimono il CD3 e il CD56 (T_{R3-56}), ma non sono iNKT perché non ristrette per CD1d e $V\alpha 24$, abbiano una funzione regolatrice. In particolare, gli autori dimostrano che le T_{R3-56} siano in grado di inibire la proliferazione, la citotossicità e la produzione di INF γ dei CTL tramite contatto diretto. Inoltre, anche dal punto di vista trascrittomico le T_{R3-56} presentano un pattern di espressione genica differente rispetto alle cellule T e NK. Quindi, dato che le T_{R3-56} sono una popolazione linfocitaria T che esprime sia il CD56 che un repertorio TCR che le T_{R3-56} sono una popolazione linfocitaria T che esprime sia il CD56 che un repertorio TCR setting, le T_{R3-56} nel midollo osseo risultano aumentare dai pazienti a basso rischio di evoluzione leucemica a quelli ad alto rischio. Inoltre, esse sono direttamente proporzionali alla percentuale di blasti midollari e inversamente proporzionali all'attivazione dei linfociti T CD8. Questi dati aggiungono quindi le T_{R3-56} al gruppo di cellule regolatrici dell'immunosorveglianza del clone displastico e pongono le basi per un'investigazione più dettagliata del loro ruolo nella

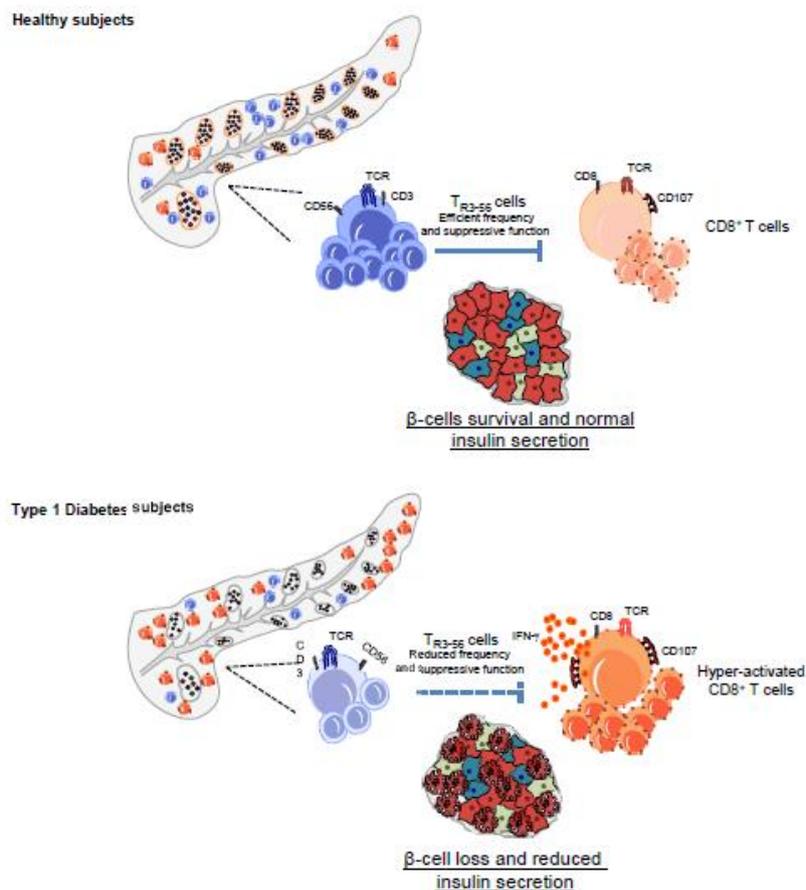


Figura 3. Il coinvolgimento delle T_{R3-56} nella fisiopatologia del Diabete di tipo I. Il diminuito numero delle T_{R3-56} favorisce l'attivazione dei linfociti T CD8 che quindi attaccano le cellule β pancreatiche determinando la diminuzione di produzione di insulina.

fisiopatologia delle MDS. Ad oggi, il coinvolgimento delle T_{R3-56} nell'immunità antitumorale risulta un ambito non investigato ed aperto a nuove scoperte.

Ad oggi quindi risultano estremamente frammentate le informazioni riguardanti il ruolo delle cellule NKT-like nell'immunità tumorale e il loro coinvolgimento nella fisiopatologia leucemica. E' attualmente noto che in condizioni di stress una parte di queste cellule (identificate in base all'espressione dei KIR) abbia un'attività citotossica verso linee cellulari di LLA[72]. Inoltre, è noto che una popolazione eterogenea di cellule $CD3+CD56+$ risulta aumentata nei pazienti con LLA[100], per quanto non siano differenziate le sotto popolazioni di cellule NKT. Se però le cellule NKT avessero come unica attività quella citotossica nei confronti dei blasti leucemici, allora il loro numero e/o attività dovrebbe essere soppressa, così come quella degli altri effettori immunitari CD8 e NK nell'ambito dei meccanismi di immune escape. La scoperta dell'attività regolatrice delle T_{R3-56} , cellule probabilmente appartenenti alla categoria delle NKT-like, pone nuovi interrogativi sulla natura e funzionalità delle cellule NKT-like nella LLA.

3.0 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo dello studio è di caratterizzare il ruolo delle cellule NKT, e delle sue sottopopolazioni, nello sviluppo della LLA, e come queste cellule influiscano sulla risposta alla chemioterapia. La comprensione dei meccanismi immunologici dell'ambito della fisiopatologia delle LLA pone le basi per lo sviluppo di nuovi agenti immunoterapici, attualmente fondamentali per il trattamento delle LLA recidivate/refrattarie. Inoltre, l'analisi del rapporto tra le cellule NKT e la risposta alla terapia permetterà di verificare se queste cellule abbiano un ruolo predittivo come biomarker di risposta, e possano quindi contribuire al miglioramento della stratificazione del rischio dei pazienti.

Risulta quindi inizialmente determinante individuare la frequenza delle sottopopolazioni di cellule NKT, iNKT e NKT-like, nei pazienti con LLA a diagnosi. Tale studio dovrà essere eseguito sia sul sangue midollare che sul sangue periferico per studiare l'attività delle cellule NKT non solo in periferia ma soprattutto nell'ambito della nicchia midollare, sede originaria della leuchemogenesi. Infatti il midollo osseo non rappresenta semplicemente un reservoir di cellule effettrici, ma un organo dinamico e attivo nella modulazione del reclutamento e attivazione degli effettori immunitari. Inoltre, è ormai evidente come il processo di leuchemogenesi sia micro-sito specifico, e necessita quindi di essere studiato nella sua nicchia di origine.

Sarà inoltre necessario caratterizzare le cellule NKT con diversi marcatori di superficie che permetteranno di comprendere il loro stato di attivazione e la loro differenziazione.

Per indagare se queste cellule abbiano un valore predittivo sulla risposta alla terapia, bisognerà studiare in modo prospettico i subset di cellule NKT nei pazienti con LLA sottoposti a chemioterapia. In considerazione del valore prognostico ormai riconosciuto dell'MRD ai due timepoints denominati TP1 e TP2, le cellule NKT dovranno essere valutate in queste stesse tempistiche. Successivamente, sarà necessario il confronto tra i valori delle sotto-popolazioni di NKT e l'MRD, per poter validare queste cellule come biomarker di risposta applicabili alla pratica clinica.

Visti inoltre i dati in letteratura contrastanti riguardo la funzione delle cellule NKT-like nell'immunità tumorale, è da verificare se queste cellule, nell'ambito della LLA, hanno

un'attività citotossica nei confronti dei blasti leucemici oppure un'attività regolatrice verso i linfociti T CD8, come suggerito dalla scoperta delle TR3-56.

4.0 MATERIALI E METODI

4.1 METODOLOGIA CLINICA

Lo studio è stato condotto presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG) di Roma, Dipartimento di Onco-Ematologia Pediatrica e Terapia Genica. Tutti i pazienti con diagnosi di LLA-B secondo classificazione WHO 2022 afferenti all'OPBG sono stati arruolati da Febbraio 2022 a Ottobre 2022. Tutti i pazienti hanno partecipato allo studio previo firma di consenso informato da parte degli stessi, se maggiorenni, o, altrimenti, da parte del tutore legale. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale ed è stato condotto secondo i principi della Good Clinical Practice (GCC) e i criteri della dichiarazione di Helsinki. Di tutti i pazienti sono stati raccolti campioni di sangue periferico e midollare nell'ambito di procedure diagnostiche già previste nel normale iter diagnostico-terapeutico, in particolare alle seguenti tempistiche: diagnosi (T0), rivalutazione post induzione alla giornata +33 (T1), post consolidamento alla giornata +78 (T2). I pazienti con diagnosi di LLA-T sono stati esclusi dallo studio per interferenza dei marcatori di superficie della popolazione blastica con quelli delle cellule NKT. I criteri di esclusione al collezionamento dei campioni sono: terapia con agenti immunomodulanti, come corticosteroidi, infezioni documentate attive in atto, concomitanti malattie autoimmuni. Tutti i pazienti sono stati trattati secondo il protocollo AIEOP-BFM 2017. Come controlli sani sono stati utilizzati i campioni di sangue midollare e periferico di donatori di midollo osseo, afferenti all'OPBG nell'ambito di procedure diagnostico-terapeutico di routine per la procedura stessa di donazione. I controlli sani risultano uniformi per età e sesso ai pazienti arruolati.

Per la valutazione dell'MRD citofluorimetrica e molecolare tutti i campioni dello studio sono stati centralizzati presso il laboratorio di Padova di riferimento.

La flow chart dello studio AIEOP-BFM ALL 2017 è indicata nella figura 4. Tutti i pazienti con B-ALL arruolati nello studio AIEOP-BFM ALL 2017 sono stati sottoposti a una pre-fase di trattamento steroidea citoriduttiva con prednisone 60 mg/mq/day per sette giorni, al termine dei quali viene valutata la risposta quantificando il numero di blasti sul sangue periferico tramite citofluorimetria. In caso di numero assoluto di blasti maggiore a 1000/ μ l, il paziente è stato definito Prednisone Poor Response (PPR), altrimenti Prednisone Good Response (PGR).

Attualmente la valutazione della risposta cortisonica viene utilizzata per indirizzare la prognosi solo per le T-ALL e l'indicazione a trapianto allogenico nelle B-ALL sotto l'anno di vita e mutazione di KMT2A.

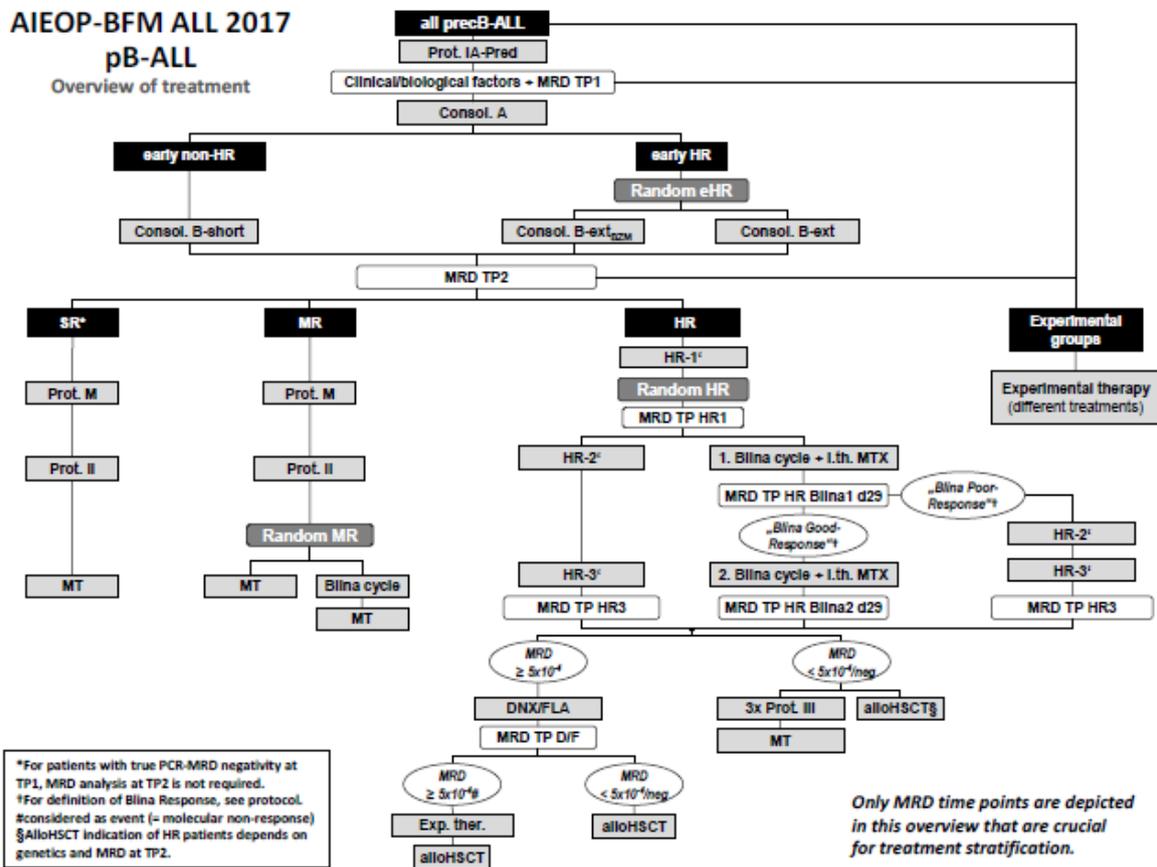


Figura 4. Flow chart del protocollo AIEOP-BFM ALL 2017

Il protocollo di induzione, denominato fase Ia, risulta comune per tutte le B-ALL, a prescindere dalla risposta alla fase steroidea e dalle alterazioni genetiche. Esso prevede: Prednisone 60 mg/mq/day per 21 giorni e poi scalo del dosaggio; Vincristina somministrata intra-vena a 1,5 mg/mq (massimo 2 mg) nei giorni 8, 15, 22 e 29; Daunorubicina 30 mg/mq nei giorni 8, 15, 22 e 29; Peg-LAsparaginasi (Oncaspar) 2500 UI/mq (massima dose 3750 UI) nei giorni 12 e 26; Metotexate intra-tecale nei giorni 12 e 23 (in caso di localizzazione di malattia cerebrale valutata tramite puntura lombare e/o risonanza magnetica cerebrale, denominata CNS3, vengono somministrate ulteriori dosi di methotrexate intra-tecale nei giorni 19 e 23). Nel Corso della terapia di induzione Ia, al giorno +15, è stata effettuata la prima valutazione dell'MRD tramite citofluorimetria, quantificando il numero di blasti midollari. In caso di percentuale di blasti

midollari inferiori allo 0,1 % il paziente viene definito a basso rischio (FCM-MRD LR), in caso di blasti compresi tra lo 0.1% e 10% viene definito a rischio intermedio (FCM-MRD MR), mentre per blasti maggiori del 10% viene definito ad alto rischio (FCM-MRD HR). Al termine del blocco di induzione viene effettuato un'altra valutazione midollare, denominata TP1 al giorno +33, nella quale viene indagato lo stato di malattia tramite cito-morfologia, citofluorimetria e MRD tramite PCR. La remissione completa viene definita tale quando il numero di blasti è inferiore al 5% alla cito-morfologia (la citofluorimetria e l'MRD tramite PCR non sono decisive nel definire lo stato di remissione completa). Le caratteristiche genetiche e di risposta alla terapia di induzione al TP1 permettono di effettuare una prima stratificazione dei pazienti in due gruppi: early-high risk e early non high risk (Figura 5). I criteri che definiscono

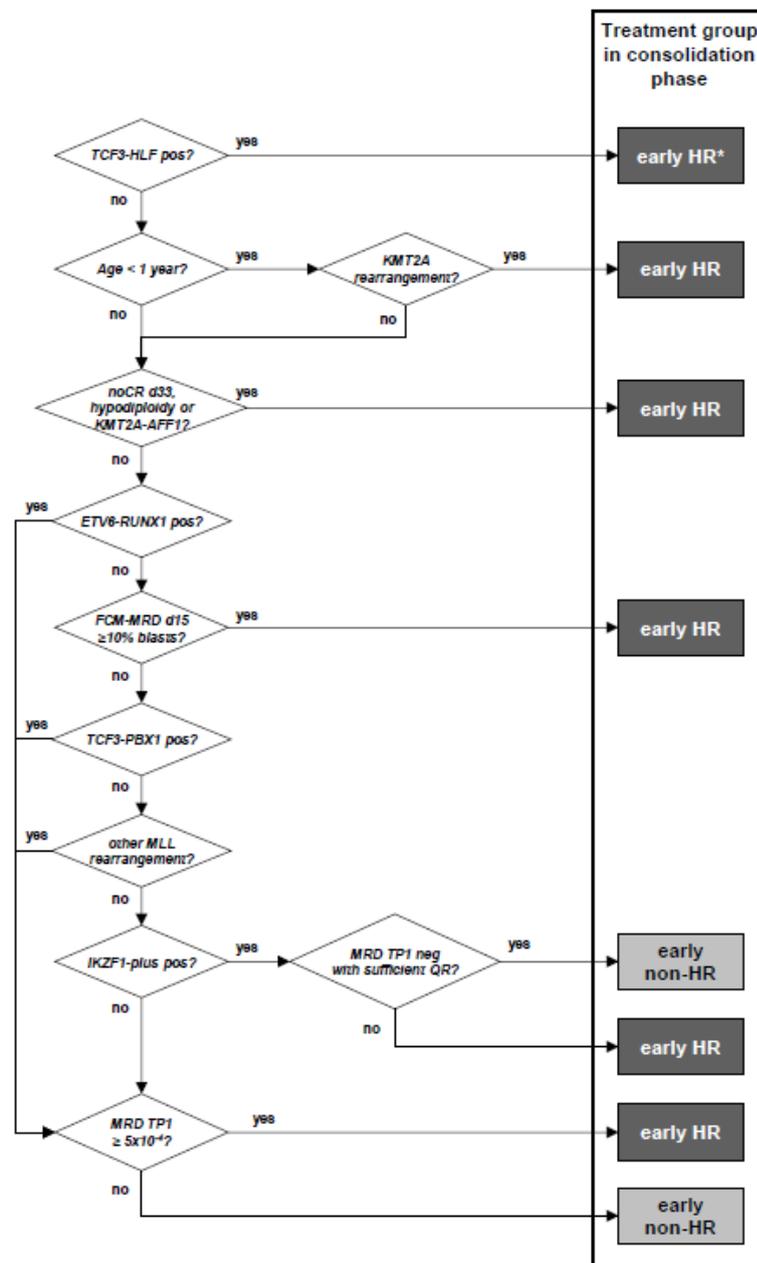


Figura 5. Flow chart della stratificazione dei pazienti nei gruppi Early High Risk e Early non High Risk

un paziente in due gruppi, definiti ad alto e basso rischio (early High Risk e early non-High Risk). I criteri che definiscono un paziente Early High Risk sono i seguenti: assenza di remissione completa al TP1; positività per KMT2A-AFF1 (MLL-AF4) oppure TCF3-HLF (E2A-HLF); ipodiploidia con meno di 45 cromosomi; la FCM-MRD al day 15 maggiore del 10% e assenza di ETV6-RUNX1 (TEL-AML1); IKZF1plus e PCR-MRD at TP1 positiva or in conclusiva e non positiva per ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1 or KMT2A; età minore di 1 anno e positività per qualsiasi riarrangiamento di KMT2A; MRD molecolare al TP1 $\geq 5 \times 10^{-4}$. Entrambi i gruppi eseguiranno un primo blocco di consolidamento A contenente: 6-Mercaptopurina a 60 mg/mq/day per os per 14 giorni; Citarabina 75 mg/mq ev, 2 blocchi da 4 giorni; Metotrexate intra-tecale al giorno 45 ai seguenti dosaggi in base all'età (< 1 year: 6 mg; 1 to < 2 years: 8 mg; 2 to < 3 years: 10 mg; ≥ 3 years: 12 mg). Successivamente i pazienti del gruppo early non high risk effettueranno un blocco di trattamento denominato Consolidamento B-short, comprendente i seguenti farmaci: Cyclofosfamide 1000 mg/m²/dose ev nei giorni 50 e 64; Citarabine 75 mg/m² per 4 giorni in due blocchetti; 6-Mercaptopurina 60 mg/m² per 14 giorni; Metotrexate intra-tecale al giorno 57. Invece il gruppo early high risk verrà sottoposto a una randomizzazione per l'assegnazione a uno dei due bracci sperimentali di trattamento denominati Consolidamento B esteso e Consolidamento B esteso con Bortezomib.

Il consolidamento B esteso prevede i seguenti farmaci: Desametasone 10 mg/mq/day diviso in tre dosi al giorno per 7 giorni; Vincristina 1,5 mg/mq per due somministrazioni; PEG-L Asparaginasi 2500 UI/mq (dose massima totale 3750 mg); Ciclofosfamide 1000 mg/mq/dose ev nei giorni 64 e 78; Citarabine 75 mg/m² per 4 giorni in due blocchetti; 6-Mercaptopurina 60 mg/m² per 14 giorni; Metotrexate intra-tecale al giorno 64. Il Bortezomib viene somministrato unicamente al braccio sperimentale al dosaggio di 1,3 mg/mq per 4 somministrazioni. Al termine dei blocchi di consolidamento B viene effettuata un'altra rivalutazione midollare, denominata TP2, il cui risultato dell'MRD molecolare risulta fondamentale per la successiva stratificazione dei pazienti. Infatti al TP2, in base alle caratteristiche genetiche e ai valori di MRD del TP1 e TP2, i pazienti vengono stratificati in 3 gruppi prognosticamente differenti (Standard Risk, Medium Risk, High Risk) (Figura 6), che effettueranno successivamente schemi terapeutici diversi.

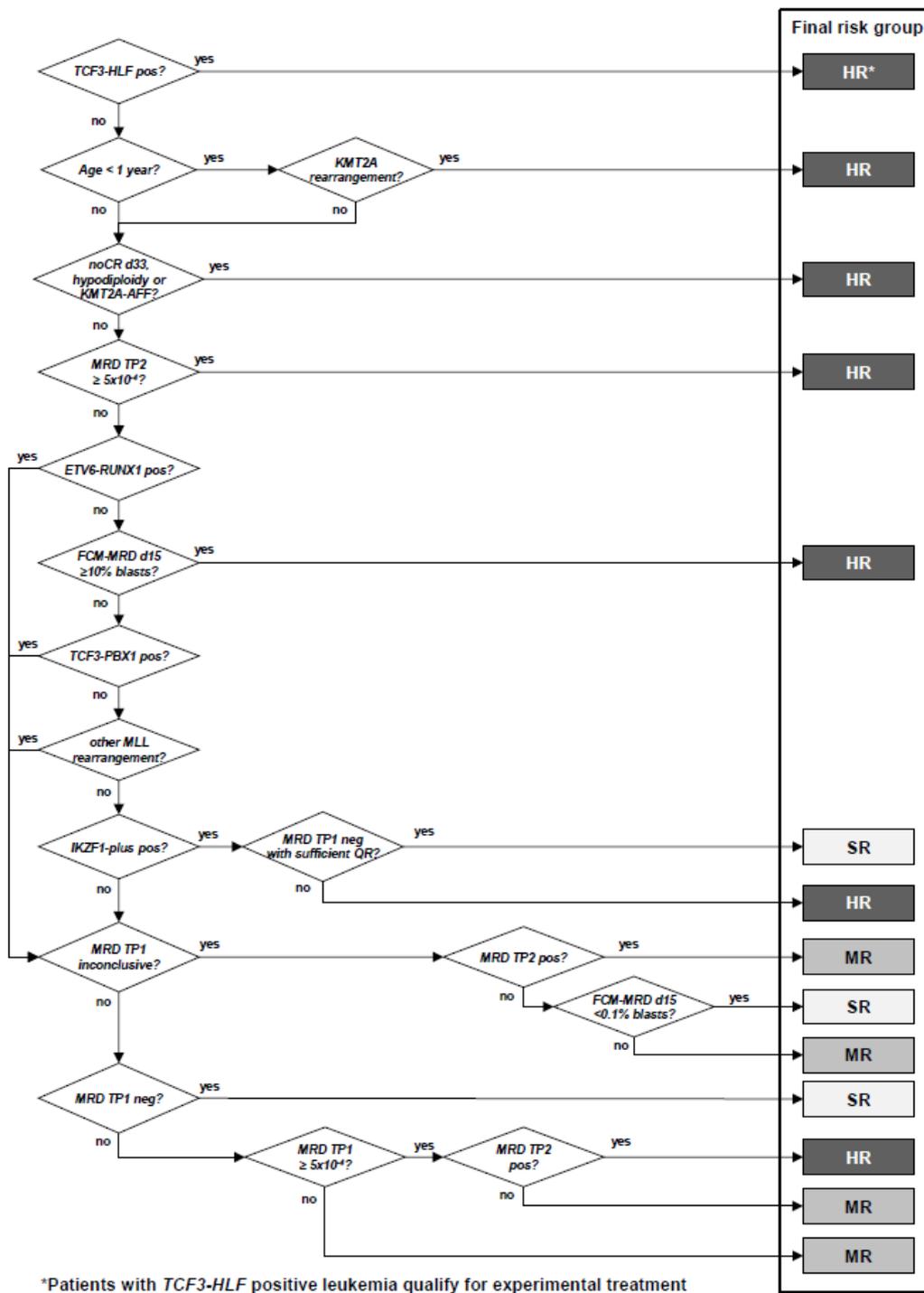


Figura 6. La stratificazione finale dei pazienti al TP2 nei tre gruppi di rischio Standard Risk (SR), Medium Risk (MR) e High Risk (HR)

4.2 ANALISI CITOFLUORIMETRICA

I campioni di sangue midollare e periferico dei pazienti ai tre timepoints indicati (T0, T1, T2) e dei donatori sani di midollo osseo sono stati tutti analizzati a fresco. Per l'analisi citofluorimetrica, inizialmente, il sangue midollare o periferico è stato sottoposto a lisi dei globuli rossi con BD Pharm Lyse™ lysing solution secondo il protocollo fornito. In seguito al processo di lisi, sono stati effettuati due lavaggi con PBS 1% e centrifuga a 1200 rpi per 5 minuti. Una volta ottenuto un pellet di cellule per ciascun campione è stato aggiunto il cocktail di anticorpi monoclonali legati a fluorocromi specifici per un volume totale di 20 l per campione. Per ogni analisi è stato utilizzato anche un campione di sangue periferico di un controllo sano, per il corretto setting del FACS. La lista degli anticorpi per l'analisi fenotipica è la seguente: CD56 APC, V α 24 FITC, CD3 APC-H7, CD45 V500-C, CD45RA BV711, CD8 BV421, CD16 BUV805, CD4 PECy7, CD27 BUV395, CD69 BV786, CCR7 PE-CF594, CD1d PE.. L'acquisizione dei campioni è avvenuta presso la FACS facility dell'OPBG tramite un citofluorimetro BD LRSFortessa X20. L'analisi dei dati citofluorimetrica a 12 colori è stata effettuata con il software Diva 9.0. Un minimo di 200000 eventi sono stati acquisiti nel gate dei linfociti CD45+ per ogni campione.

Le cellule iNKT sono identificate come linfociti CD3+ con il TCR ristretto per la catena V α 24 e ristrette per il tetramero di CD1d legato all' α -Galactosyl Ceramide (α -GalCer)[69]. Le cellule NKT-like invece sono state individuate come linfociti CD3+ CD56+ ma negativi sia per la catena V α 24 del TCR che per il tetramero di CD1d coniugato all' α -GalCer. Un esempio delle strategie di gating utilizzate è in figura 7. Al fine di ottenere una migliore caratterizzazione delle cellule NKT, sono stati analizzati ulteriori molecole di superficie. In particolare, il CD16 è stato utilizzato per valutare la citotossicità anticorpo mediata; il CD27 per valutare se è avvenuto l'incontro con l'antigene; il CD69 per valutare lo stato di attivazione. Le sotto-popolazioni linfocitarie T sono state identificate secondo quanto stabilito dallo Human Immunophenotyping Consortium[102] tramite i marcatori di superficie CD45RA e CCR7 come segue: linfociti T naive CD45RA+ e CCR7+, linfociti T central memory CCR7+ CD45RA-, linfociti T effector memory CD45RA- e CCR7-, linfociti T terminally differentiated effector memory (temra) CD45RA+ e CCR7-.

4.3 STATISTICA

La statistica descrittiva ed inferenziale è stata effettuata con Graphpad Prism 8.4.3. Tutti i dati presentati sono la media \pm Errore Standard (SEM) delle percentuali delle popolazioni studiate. Prima dell'analisi statistica, è stata verificata la distribuzione non normale delle variabili studiate tramite il test di Shapiro-Wilk. Per il confronto tra due variabili con distribuzione non normale è stato utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney. La correlazione tra due variabili è stata verificata con il test della correlazione di Spearman. Le differenze tra i gruppi sono state considerate statisticamente significative quando la $p < 0,05$.

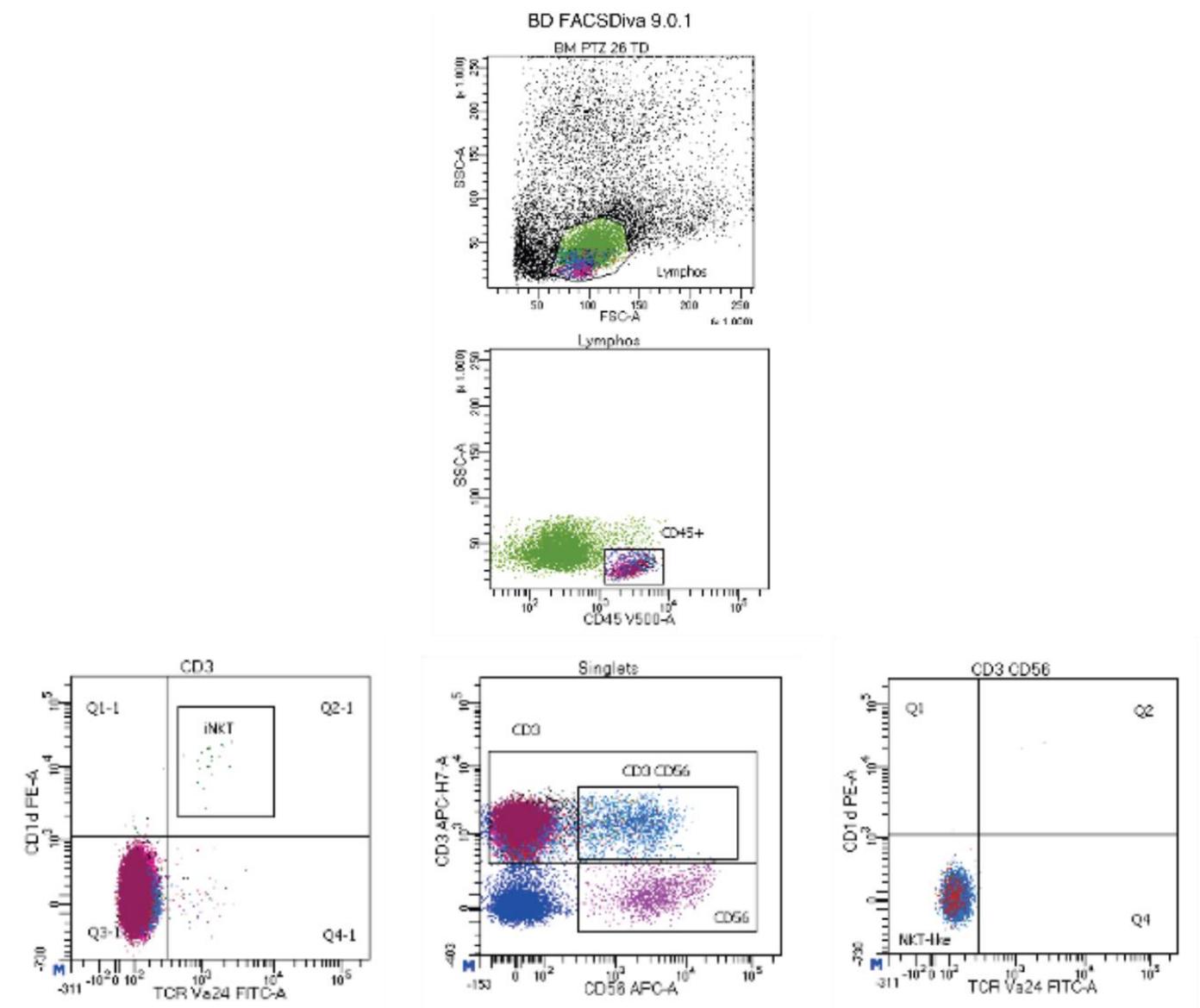


Figura 7. Esempio della strategia di gating utilizzata per individuare le cellule iNKT e NKT-like

5.0 RISULTATI

5.1 ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI CON LLA-B

31 pazienti sono stati arruolati al momento della diagnosi di LLA-B nello studio da Marzo 2022 a Ottobre 2022, di cui i campioni adeguati per l'analisi citofluorimetrica sono risultati 26, dato che 5 pazienti al momento dell'afferenza all'OPBG avevano effettuato terapia con corticosteroidi. Le caratteristiche cliniche dei pazienti a diagnosi sono riassunte nella tabella 3. Dal punto di vista epidemiologico, questa coorte risulta bilanciata per genere (15 maschi, 16 femmine) e presenta un'età mediana di 5 anni, con range abbastanza ampio da 1 a 18 anni. Riguardo le caratteristiche di malattia, le alterazioni genetiche più frequentemente riscontrate sono la traslocazione t(12;21) in sei pazienti, la traslocazione t(1;19) in tre pazienti, e un cariotipo iperdiploide in 3 pazienti. In 15 pazienti non è stata invece individuata nessuna mutazione determinante. Secondo la classificazione EGIL[41], 26 pazienti presentavano delle caratteristiche del II tipo, un solo paziente del I tipo, e 4 pazienti del III tipo. Applicando invece la classificazione WHO 2022[43], 15 pazienti risultano appartenere alla categoria LAL-B NOS (Not Otherwise Specified), 3 pazienti alla categoria LAL-B con iperdiploidia, 1 paziente con LAL-B e riarrangiamento di *KMT2A*, 6 pazienti con LAL-B e il gene di fusione *ETV6::RUNX1*, 3 pazienti con LAL-B e il gene di fusione *TCF3::PBX1*, 3 pazienti con LAL-B e altre anomalie genetiche. Tutti i pazienti sono stati arruolati nel protocollo sperimentale AIEOP-BFM-2017 e hanno effettuato il trattamento presso l'OPBG. Ad Ottobre 2022 nessuno dei pazienti è uscito dallo studio. Dei 31 pazienti arruolati sono risultati disponibili per l'analisi citofluorimetrica al TP1 22 campioni di altrettanti pazienti, mentre al TP2, 16 campioni di altrettanti pazienti.

Numero Totale di pazienti B-ALL	31
Età	
Anni, mediana (range)	5 (1-18)
Sesso, n (%)	
Maschi	15 (48)
Femmine	16 (52)
Citogenetica, n (%)	
Normale	9 (30)
t(12;21)	5 (16)
t(1;19)	3 (9)
Cariotipo Iperdiploide	3 (9)
Cariotipo Complesso	1(3)
t(4;11)	1(3)
Non diagnostica	9 (30)
Alterazioni Molecolari, n (%)	
ETV6-RUNX1	6 (19)
TCF3::PBX1	3 (9)
KMT2A/AFF1	1(3)
NG2	1(3)
MEF2D: HNRNPUL1	1 (3)
IKAROS plus	1(3)
Non riscontrate	18(60)
Classificazione WHO 2022, n (%)	
B-LLA, NOS	15 (48)
B-LLA with high hyperdiploidy	3 (9)
B-ALL with <i>KMT2A</i> rearrangement	1 (3)
B-ALL with <i>ETV6::RUNX1</i> fusion	6 (19)
B-ALL with <i>TCF3::PBX1</i> fusion	3 (10)
B-ALL with other defined genetic abnormalities	3 (10)
Classificazione EGIL, n (%)	
I	1 (3)
II	26 (84)
III	4 (13)
Blasti Midollari, n (%)	
Mediana (range)	78 (22-90)
LDH	
Mediana (range)	559 (169-6032)
Iperleucocitosi (WBC>50000)	
Si, numero (%)	4 (13)
No, numero (%)	27(87)

Tabella 3. Le caratteristiche cliniche e diagnostiche dei pazienti con LLA-B arruolati.

5.2 RISPOSTA AL TRATTAMENTO

Dei 31 pazienti arruolati tutti hanno effettuato il trattamento secondo il protocollo AIEOP-BFM ALL 2017. Tutti i pazienti hanno avuto una buona risposta ai corticosteroidi, definendoli Good Prednisone Responder (GPR). Alla valutazione midollare del giorno +15 13 pazienti sono risultati FCM-MRD LR, 15 pazienti FCM-MRD MR, 3 pazienti FCM-MRD HR, secondo definizione del protocollo, come spiegato in Materiali e Metodi. Dei 31 pazienti arruolati, 28 sono stati disponibili per la valutazione del T1, al momento dell'analisi dei dati. Di questi 28 pazienti tutti hanno ottenuto la remissione ematologica di malattia, mentre solamente una non ha ottenuto la remissione citofluorimetrica, con lo 0,8% di blasti. La MRD molecolare al T1 invece è stata disponibile per 23 pazienti, di cui 4 non valutabili per scarsità di materiale biologico, 9 pazienti hanno raggiunto l'MRD negativa, 5 hanno presentato uno dei due marker positivo ma inferiore a 10^{-4} , 4 pazienti hanno presentato entrambi i markers positivi ma inferiori a 10^{-4} , 1 paziente ha presentato entrambi i markers positivi ma maggiori di 10^{-4} . In seguito quindi all'insieme delle valutazioni genetica a diagnosi e di risposta al primo blocco di trattamento i pazienti sono stati stratificati nei due gruppi: early high risk e early non-high risk. Dei 28 pazienti valutabili, 5 sono risultati early high risk e sono quindi stati randomizzati a ricevere, dopo il blocco di consolidamento A, il blocco di condizionamento B extended con e senza Bortezomib. 3 pazienti hanno effettuato il blocco B extended senza Bortezomib, mentre 2 con il Bortezomib. Invece gli altri 23 pazienti sono risultati nel gruppo early-non high risk e hanno effettuato il consolidamento con il blocco B short. Alla rivalutazione del T2, giornata +78, 20 pazienti sono stati disponibili al momento dell'analisi dei dati. Di questi tutti hanno presentato una risposta ematologica e citofluorimetrica completa, mentre l'MRD molecolare è risultata positiva in 3 pazienti. Si è quindi effettuata la classificazione dei pazienti nelle tre classi di rischio (Standard Risk, Medium Risk e High Risk), indirizzando così i pazienti al proseguimento del protocollo AIEOP-BFM ALL 2017. Dei 20 pazienti valutabili nella coorte, 6 pazienti risultano avere un rischio standard (SR), 10 pazienti presentano un rischio medio (MR), mentre 4 pazienti hanno un alto rischio (HR).

5.3 LA DISTRIBUZIONE DELLE CELLULE NKT NEI PAZIENTI CON LLA-B

Al fine di comprendere il ruolo delle cellule NKT nella fisiopatologia della LLA e il loro ruolo nella ricostruzione dell'immunità antitumorale dopo chemioterapia, la frequenza delle due principali sotto-popolazioni di cellule NKT, NKT-like e iNKT, è stata determinata nei pazienti

con LLA a diagnosi (T0), dopo il primo blocco di induzione al giorno +33 (T1) e dopo il consolidamento al giorno +78 (T2) nel sangue periferico e midollare. I pazienti con LLA-B al momento della diagnosi, a livello midollare, presentano un quantitativo di cellule NKT-like

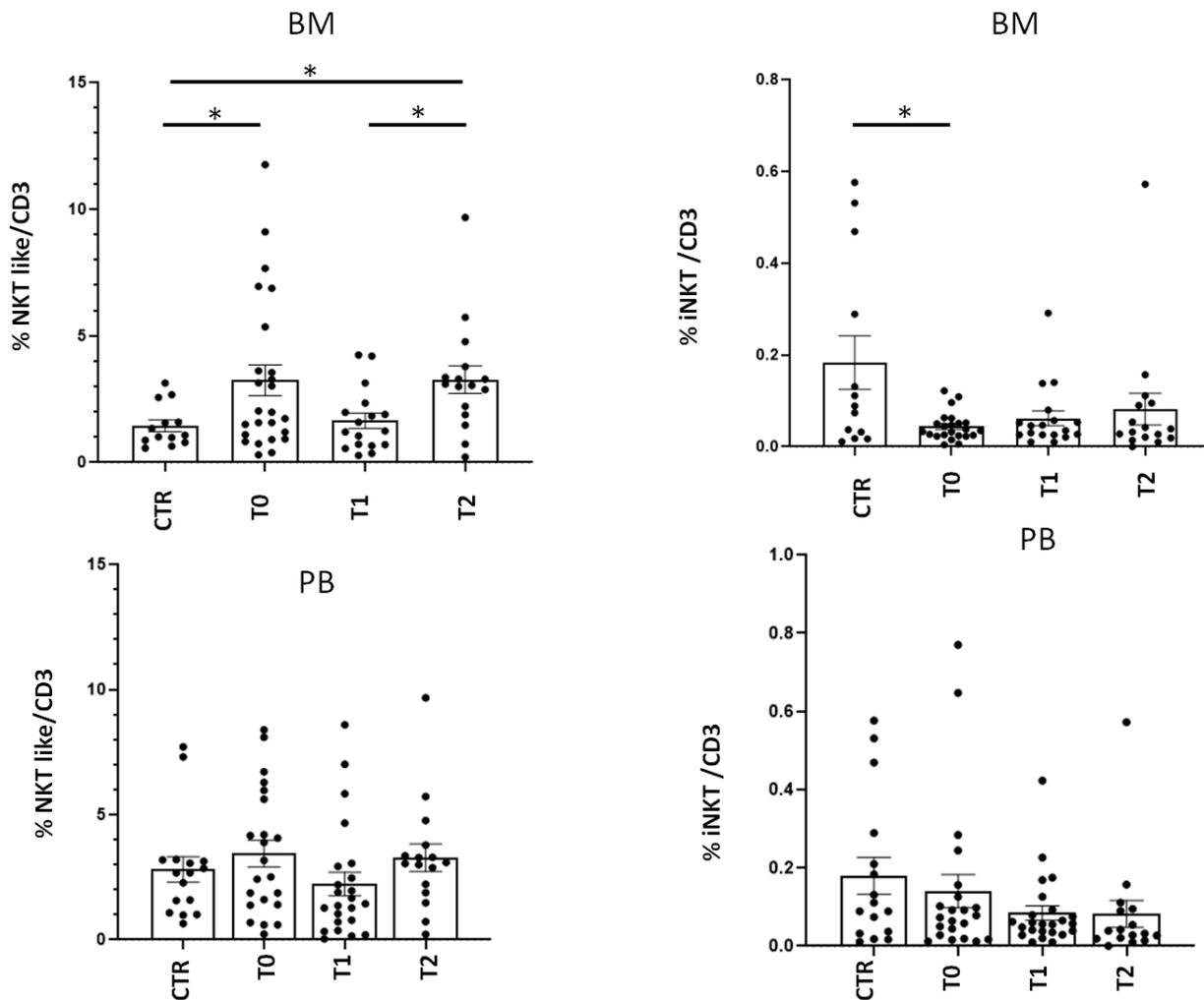


Figura 8. La distribuzione delle cellule NKT like e iNKT nei pazienti con LLA-B a diagnosi (T0), in 33 giornata (T1) e in 78 giornata (T2), rispetto ai controlli (CTR), nel sangue periferico (PB) e nel Midollo Osseo (BM).

significativamente superiore rispetto ai controlli ($3,24 \pm 0,6$; $p < 0,05$), mentre le cellule iNKT sono significativamente diminuite ($0,043 \pm 0,006$; $p < 0,05$) (Figura 8). Inoltre, le cellule NKT-like diminuiscono al TP1 ($1,64 \pm 0,29$), mentre aumentano nuovamente al TP2 ($3,274 \pm 0,5474$), in modo significativo rispetto al TP1 e ai controlli. Le cellule iNKT invece tendono a rimanere basse al TP1 ($0,061 \pm 0,016$) e al TP2 ($0,081 \pm 0,034$), per quanto non in modo significativo. L'analisi di queste popolazioni negli stessi timepoints a livello del sangue periferico non mostra le stesse differenze, indicando come questi risultati siano specifici del microambiente midollare,

nicchia di origine della LLA-B. Per tale motivo tutte le analisi successive sono stati effettuate a livello midollare, anche quando non specificato. In considerazione della bassa frequenza delle cellule iNKT e della loro già nota attività anti tumorale[77], così come dei bassi livelli del target CD1d nella LLA[94], lo studio si è concentrato sulle cellule NKT-like. Infatti, oltre a non essere delineato il loro ruolo nell'immunità antitumorale, nessuno studio fino ad ora si è concentrato in modo specifico sul loro impatto nella LLA. Inoltre, la letteratura ad oggi nota non è concorde sulla funzione di queste cellule, se abbiano un'attività citotossica antileucemica, oppure un'attività regolatrice, come suggerito dalla scoperta delle T_{R3-56} .

5.4 LE CARATTERISTICHE DELLE CELLULE NKT-LIKE NELLA LLA

Si è quindi verificato se le cellule NKT-like presentino una diversa distribuzione in termini di espressione del CD4 e CD8 nei pazienti a diagnosi e dopo chemioterapia rispetto ai controlli. Come mostrato in figura 9, e come dimostrato anche da Terrazzano et al.[101], le cellule NKT-like negli individui sani risultano in prevalenza CD8+ (48,87±4,301), seguite dalle doppie negative per CD4 e CD8 (39,23±4,037), e poi dalle CD4 (8,362±1,757). Nei pazienti al momento della diagnosi di LLA-B, così come dopo chemioterapia, tale distribuzione non subisce sostanziali modifiche (rispettivamente T0: CD8 50,09±3,381; CD4-CD8- 37,92±2,576; CD4 9,975±1,962; T1: CD8 49,66±3,517; CD4-CD8- 40,13±4,043; CD4 7,41±2,099; T2: CD8 56,38±1,726; CD4-CD8- 32,82±2,239; CD4 7,833±1,321).

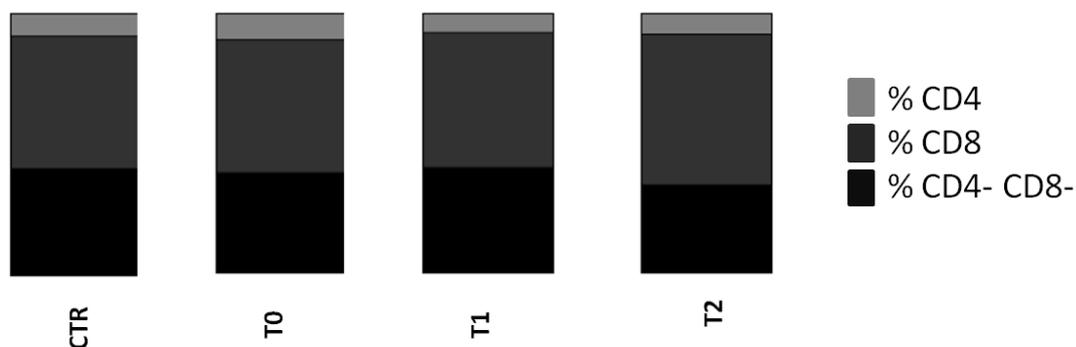


Figura 9. La distribuzione delle sotto-popolazioni CD4, CD8 e Doppio Negativo (CD4-CD8-) nelle cellule NKT-like nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi (T0), in 33 giornata (T1), in 78 giornata (T2) rispetto ai controlli (CTR)

Per comprendere la funzionalità e l'attività di queste cellule sono state analizzate l'espressione delle molecole di superficie CD16 e CD69, rispettivamente marker di citotossicità anticorpo mediata e stato di attivazione precoce. Come mostrato in figura 10, le cellule NKT-like nei pazienti a diagnosi presentano dei livelli di CD16 statisticamente più elevati dei controlli, sia in termini di percentuale che di MFI (rispettivamente: $3,07 \pm 0,59$; $11,00 \pm 1,54$). Tali valori tendono a diminuire al T2, in modo statisticamente significativo per l'MFI ($5,18 \pm 1,11$). Invece l'espressione del CD69 sulle cellule NKT-like non sembra cambiare tra i pazienti a diagnosi e i controlli, per quanto tenda ad aumentare in modo significativo al TP1 ($13,71 \pm 2,645$). Data la presenza di livelli di CD16 aumentati nelle NKT-like, si è verificato se questo sotto-gruppo di cellule fossero non solo aumentate di numero ma anche più attivate, valutando espressione del CD69 solo nelle cellule NKTlike CD16+. Come mostrato in figura 11, le cellule NKT-like CD16+ dei pazienti, al momento della diagnosi, esprimono livelli di CD69 statisticamente maggiori ($29,15 \pm 6,045$) rispetto ai controlli sani ($10,23 \pm 1,922$). Inoltre, tali livelli aumentano ulteriormente al T1 ($62,29 \pm 19,03$) in modo significativo, per poi diminuire nuovamente al T2 ($33,60 \pm 10,32$). Invece non sono presenti differenze di espressione del CD69 nelle cellule NKT-like CD16-.

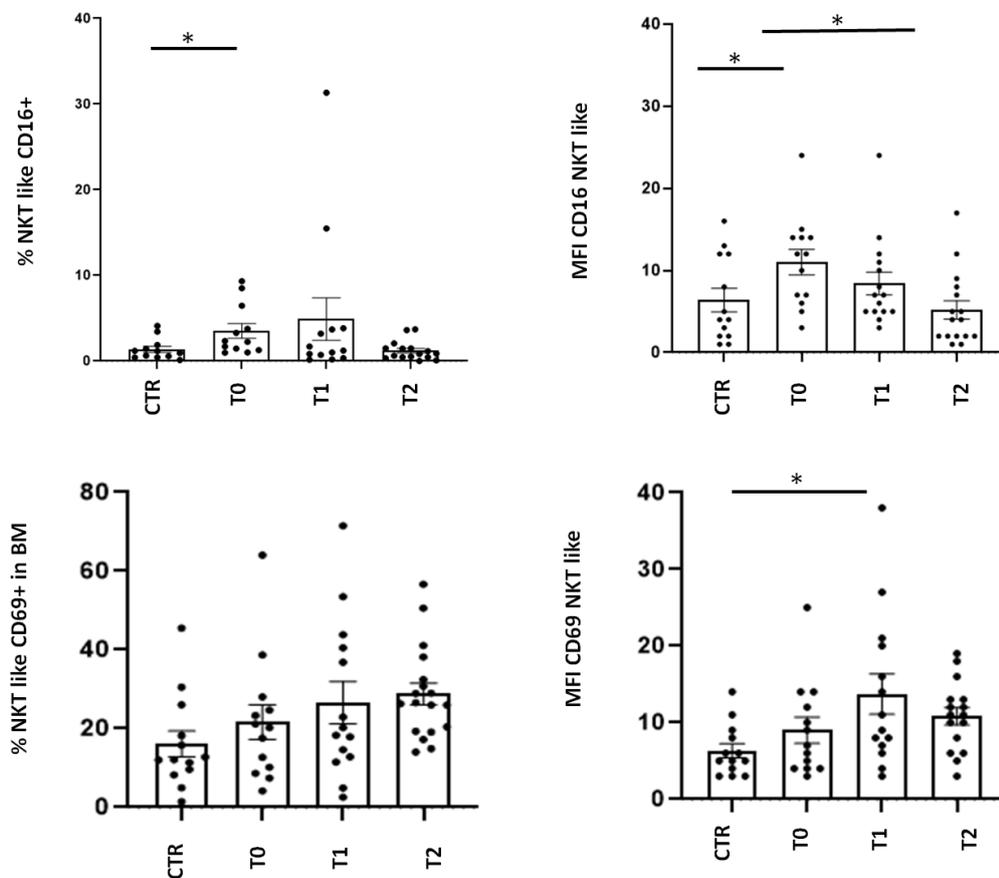


Figura 10. L'espressione del CD16 e del CD69 sulle cellule NKT-like in termini di % e di MFI nel BM dei pazienti con LLA a diagnosi (T0) e dopo chemioterapia (T1 e T2), rispetto ai controlli (CTR).

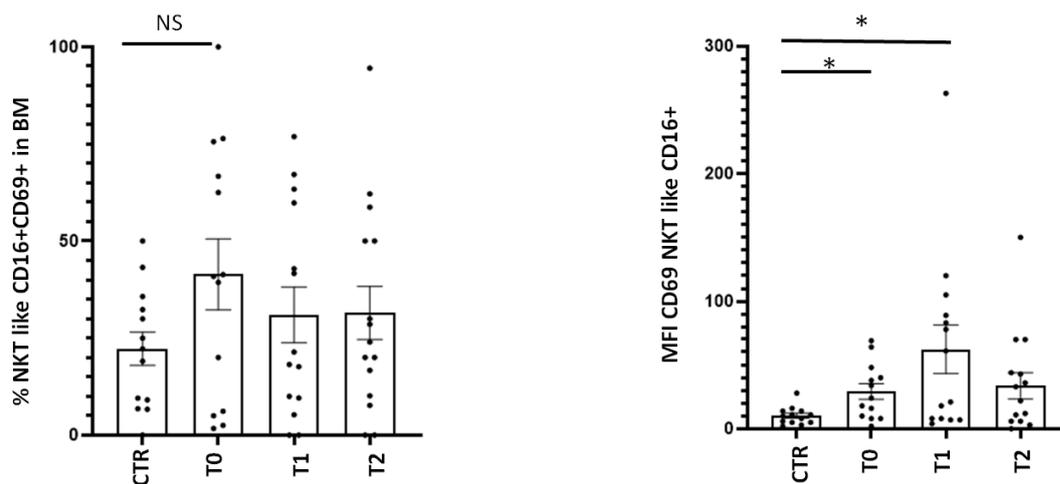


Figura 11. L'espressione del CD69 sulle cellule NKT-like CD16+ in termini di % e di MFI nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi, T0, e dopo chemioterapia, T1 e T2, rispetto ai controlli (CTR).

Successivamente, applicando la definizione di subset linfocitari T della memoria, si è verificata la composizione delle sotto-popolazioni NKT-like in termini di differenziazione, sia nei soggetti sani che nei pazienti con LLA, pre e post chemioterapia. La maggior parte delle cellule NKT-like, sia nei soggetti sani che nei pazienti, sono linfociti che hanno già incontrato l'antigene presso un centro germinativo, dato che risultano per la maggior parte CCR7 negative. Infatti la quota di cellule NKT-like naive nei controlli sani risulta estremamente bassa ($3,688 \pm 0,8626$). Quando invece si confrontano i livelli delle sotto-popolazioni memory delle NKT-like (NKT-like naive, NKT-like central memory, NKT-like effector memory e NKT-like terminally differentiated memory) nei pazienti rispetto ai sani (Figura 12), si nota che al momento della diagnosi le NKT-like naive sono significativamente aumentate ($12,54 \pm 3,736$), mentre gli altri subset non presentano modifiche quantitative né a diagnosi né dopo chemioterapia. Inoltre, le cellule NKT-like naive tendono a diminuire al T1 ($7,920 \pm 2,656$) e al T2 ($4,072 \pm 1,397$), per quanto non in modo significativo.

Data l'aumentata espressione del CD16 su tutta la popolazione di cellule NKT-like e il maggiore stato di attivazione di queste, si è verificato se l'espressione del CD16 potesse essere specifica di una delle sottopopolazioni memory di NKT-like. Effettivamente, solo la sotto-popolazione di NKT-like temra presenta dei livelli di CD16 aumentati sia in termini percentuali ($10,67 \pm 4,577$) che di MFI ($11,54 \pm 1,973$) (Figura 13), mentre le altre sotto-popolazioni non presentano differenze. Inoltre, dopo chemioterapia, al T2, i livelli di CD16 sulle NKT-like temra diminuiscono in modo significativo, sia in percentuale ($2,173 \pm 0,4053$) che in MFI

(5,188±1,017), tornando a essere pari a quelli dei controlli (rispettivamente: 1,779±0,3810; 6,538±1,551).

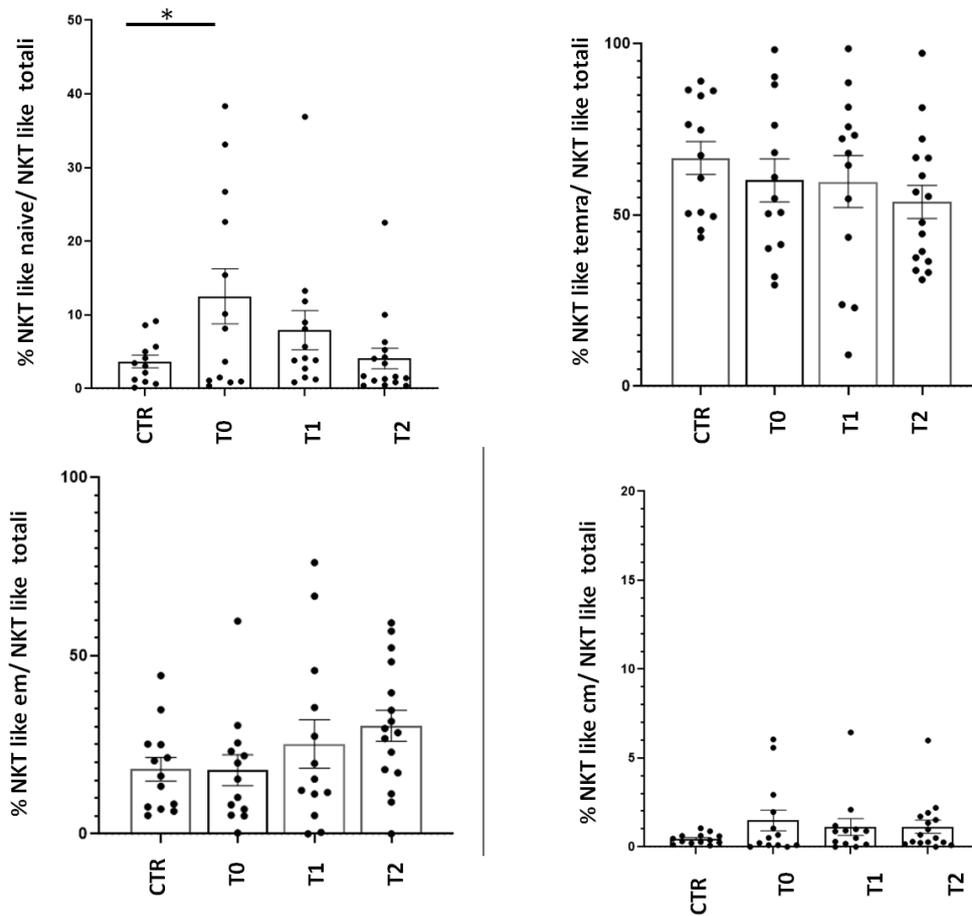


Figura 12. La frequenza delle sottopopolazioni memory delle NKT-like (NKT-like naive, NKTlike temra, NKT like effector memory, NKT-like central memory) nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi, T0, e dopo chemioterapia, T1 e T2, rispetto ai controlli (CTR).

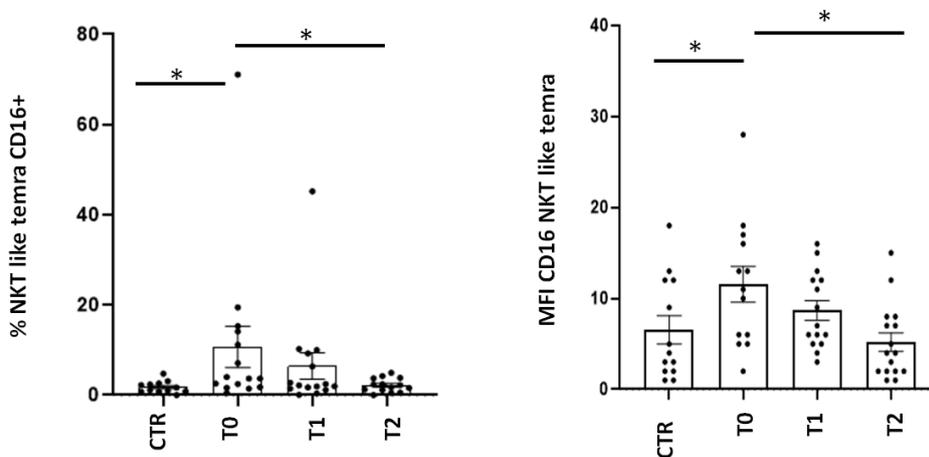


Figura 13. L'espressione del CD16 sulle cellule NKTlike temra in termini di % e MFI nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi, T0, e dopo chemioterapia, al T1 e T2, rispetto ai controlli (CTR).

Per quel che riguarda lo stato di attivazione delle sotto-popolazioni memory delle cellule NKT-like, a diagnosi non ci sono differenze rispetto ai controlli sani, mentre sia le NKT-like naive che le NKT-like temra sono più attivate dopo chemioterapia al T1 (MFI rispettivamente: $12,47 \pm 5,061$; $14,27 \pm 3,784$) (Figura 14).

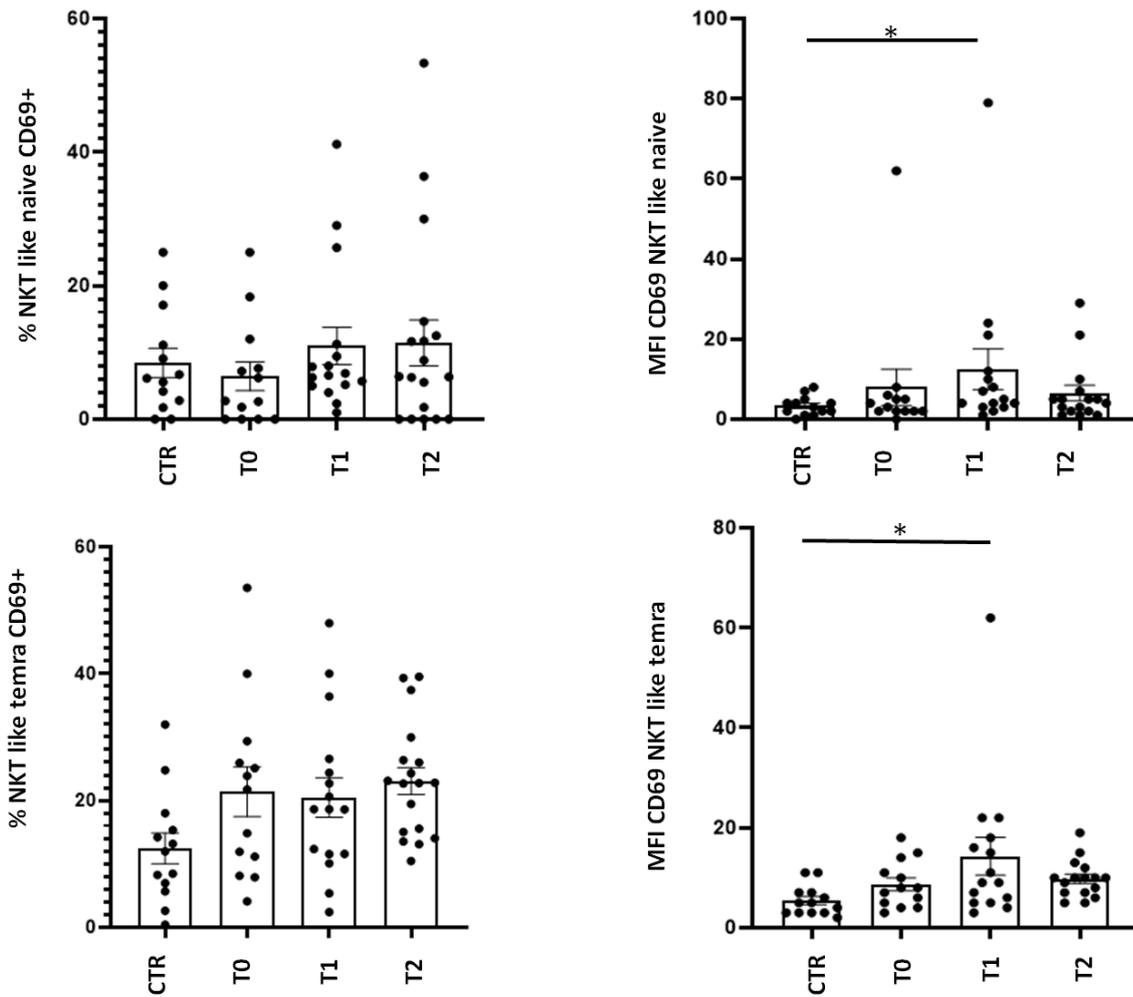


Figura 14. L'espressione del CD69 sulle cellule NKTlike naive e temra, sia in termini di % che di MFI, nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi, T0, e dopo chemioterapia, al T1 e T2, rispetto ai controlli (CTR).

5.5 GLI EFFETTORI LINFOCITARI T CD8 E NK NELLA LLA

In considerazione del ruolo determinante di tutti gli effettori linfocitari, quindi non solo delle NKT ma anche dei linfociti CD8 e NK, si è studiata la frequenza e le caratteristiche anche di queste due popolazioni, in modo da poter effettuare successivamente un confronto con le cellule NKT. Sia le cellule CD8 che NK non presentano una frequenza diversa nei pazienti a diagnosi rispetto ai controlli, così come dopo chemioterapia (Figura 15).

Dato che le cellule NK possono essere suddivise in tre sotto-popolazioni con diverse capacità citotossiche e secernenti[103, 104], sono stati valutati i livelli di espressione del CD56 e del CD16 su tutte le cellule NK. Le cellule NK CD56dimCD16+ sono le più citotossiche, le cellule CD56 bright hanno invece maggiori capacità regolatrici e di secrezione citochimica, mentre le cellule NK CD56 dimCD16- sono una popolazione più immatura. Sono state quindi analizzate le frequenze di queste sotto-popolazioni di cellule NK nella popolazione in studio (Figura 16). A diagnosi nessuna delle sotto-popolazioni di cellule NK ha una distribuzione diversa rispetto ai controlli; ma dopo chemioterapia, sia al T1 che al T2, le cellule NK CD56dimCD16+ diminuiscono in modo significativo (rispettivamente: $44,00\pm 6,467$; $24,03\pm 4,108$), mentre le cellule NK CD56 dimCD16- aumentano significativamente (rispettivamente: $41,55\pm 5,380$; $61,05\pm 4,956$). Verificando invece le sottopopolazioni di CD8 della memoria, non sono presenti differenze significative tra i pazienti a diagnosi e i controlli sani (Figura 17); invece, al T1 le CD8 naive sono significativamente aumentate ($73,74\pm 3,124$) rispetto ai controlli e al T0, mentre le CD8 temra ed effector memory sono significativamente diminuite (rispettivamente: $16,58\pm 2,446$; $6,466\pm 1,989$). Al contrario, al T2, le CD8 naive diminuiscono in modo significativo ($37,43\pm 5,774$), mentre le CD8 temra e le CD8 effector memory aumentano in modo significativo rispetto al T1 (rispettivamente: $35,61\pm 4,141$; $18,75\pm 3,311$).

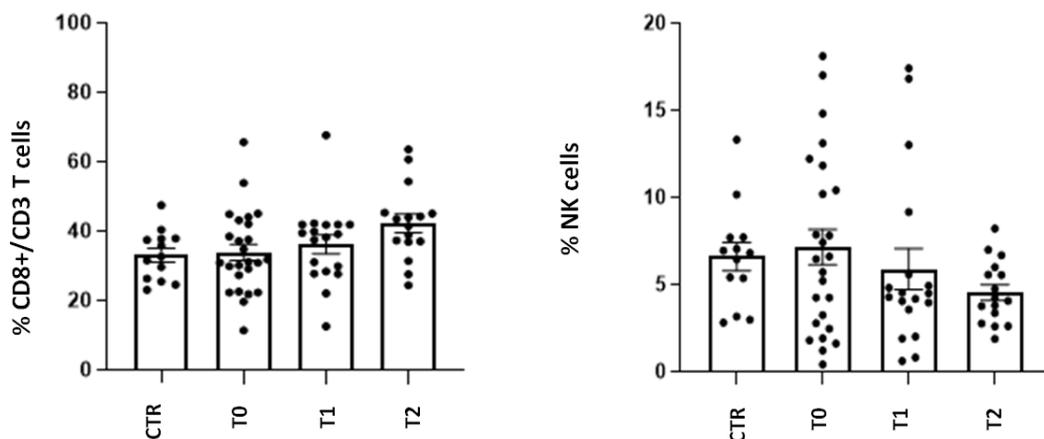


Figura 15. La frequenza delle cellule effettrici CD8 e NK nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi, T0, e dopo chemioterapia, al T1 e T2, rispetto ai controlli (CTR).

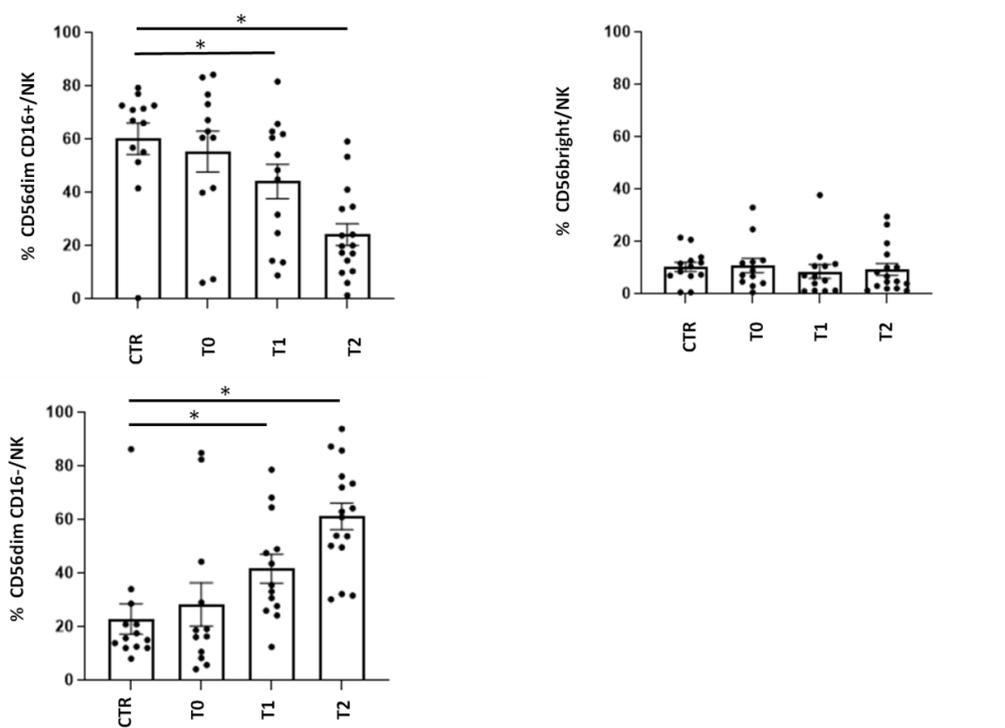


Figura 16. La frequenza delle sottopopolazioni di cellule NK (NK CD56dimCD16+, NK CD56 bright, NK CD56 dim CD16-) nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi, T0, e dopo chemioterapia, al T1 e T2, rispetto ai controlli (CTR).

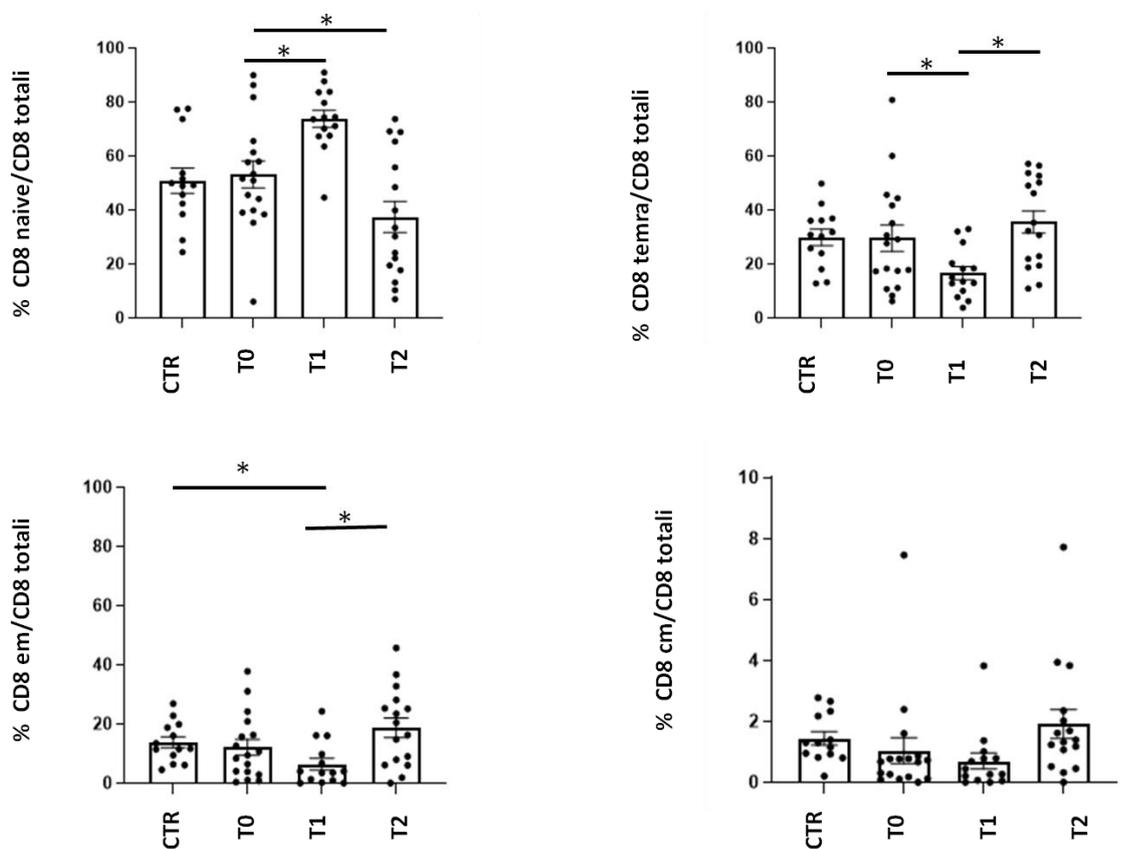


Figura 17. La frequenza delle sottopopolazioni di cellule T CD8 (CD8 naive, CD8 temra, CD8 effector memory, CD8 central memory) nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi, T0, e dopo chemioterapia, al T1 e T2, rispetto ai controlli (CTR).

5.6 LE CELLULE NKT-LIKE NAIVE E TEMRA SONO CORRELATE IN MODO DIVERSO AI LINFOCITI CD8

In considerazione della correlazione inversa delle T_{R3-56} con lo stato di attivazione dei linfociti T CD8 nelle MDS e della probabile appartenenza delle T_{R3-56} alla categoria delle NKT-like, si è verificato se le cellule NKT-like avessero lo stesso tipo di correlazione con i linfociti T CD8 nella LLA-B. La percentuale di NKT-like non risulta avere una relazione lineare, né diretta né inversa, sia con la percentuale di CD8 midollari sia con l'espressione del CD69 sulle CD8, come marker surrogato del loro stato di attivazione. Quindi, si è ipotizzato che probabilmente le cellule NKT-like potessero avere un tipo relazione differente con le diverse sotto-popolazioni di cellule T CD8, che sono note per avere funzioni differenti[105]. Infatti le T_{R3-56} hanno dimostrato di avere un'attività inibitoria sulle CD8 attivate in CTL[101]. Come ipotizzato, le cellule NKT-like hanno una correlazione diretta significativa con le CD8 temra ($r= 0,8357$; $p<0,05$), mentre una correlazione inversa con le CD8 naive ($r=-0,6$; $p<0,05$) (Figura 18). Inoltre, data l'attività delle T_{R3-56} di inibire soprattutto le CD8 effettrici, ma anche la dimostrazione che alcune cellule NKT-like sono in grado di effettuare citotossicità verso i blasti linfoidi[106], si è ipotizzato che all'interno delle cellule NKT-like ci siano diverse sotto-popolazioni che, nella LLA, hanno funzioni differenti. Dato che, a diagnosi, le cellule NKT-like che preferenzialmente presentano livelli più alti di CD16 sono le NKT-temra, si è ipotizzato che questo subset possa avere attività citotossica. Invece, dato che le popolazioni regolatrici come le Treg tendono ad aumentare nel microambiente leucemico[31] e la recente scoperta dell'attività regolatoria delle T_{R3-56} , si è ipotizzato che le cellule NKT-like naive, che sono aumentate nella LLA, rappresentino le T_{R3-56} nella LLA. Verificando quindi la relazione tra le cellule NKT-like naive e le NKT-like temra con le cellule CD8 temra, rispettivamente, si è riscontrata una correlazione statisticamente inversa delle prime ($r= -0,5607$; $p<0,05$) e una correlazione statisticamente diretta delle seconde

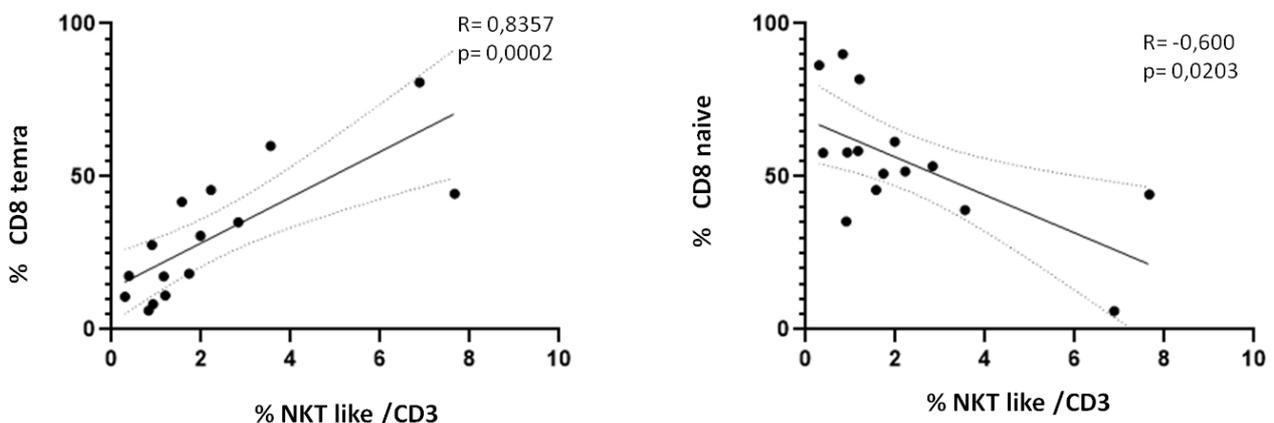


Figura 18. La correlazione tra le cellule NKT-like e i linfociti CD8 naive (inversa) e temra (diretta) nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi.

($r=0,7179$; $p<0,05$) (Figura 19. A e B). Inoltre, le cellule NKT-like naive hanno una correlazione inversa anche con l'espressione del CD69 sulle CD8 ($r=-0,502$; $p<0,05$) (Figura 19. D), implicando un rapporto inversamente proporzionale allo stato di attivazione dei CD8. Considerando l'LDH come un marcatore della massa leucemica a diagnosi, si è studiata la relazione delle cellule NKT-like con questo parametro. Una relazione lineare diretta statisticamente significativa è stata individuata ($r= 0,504$; $p<0,05$) (Figura 19. C), segno che quando aumenta la massa leucemica ci saranno anche alti livelli di NKT-like naive.

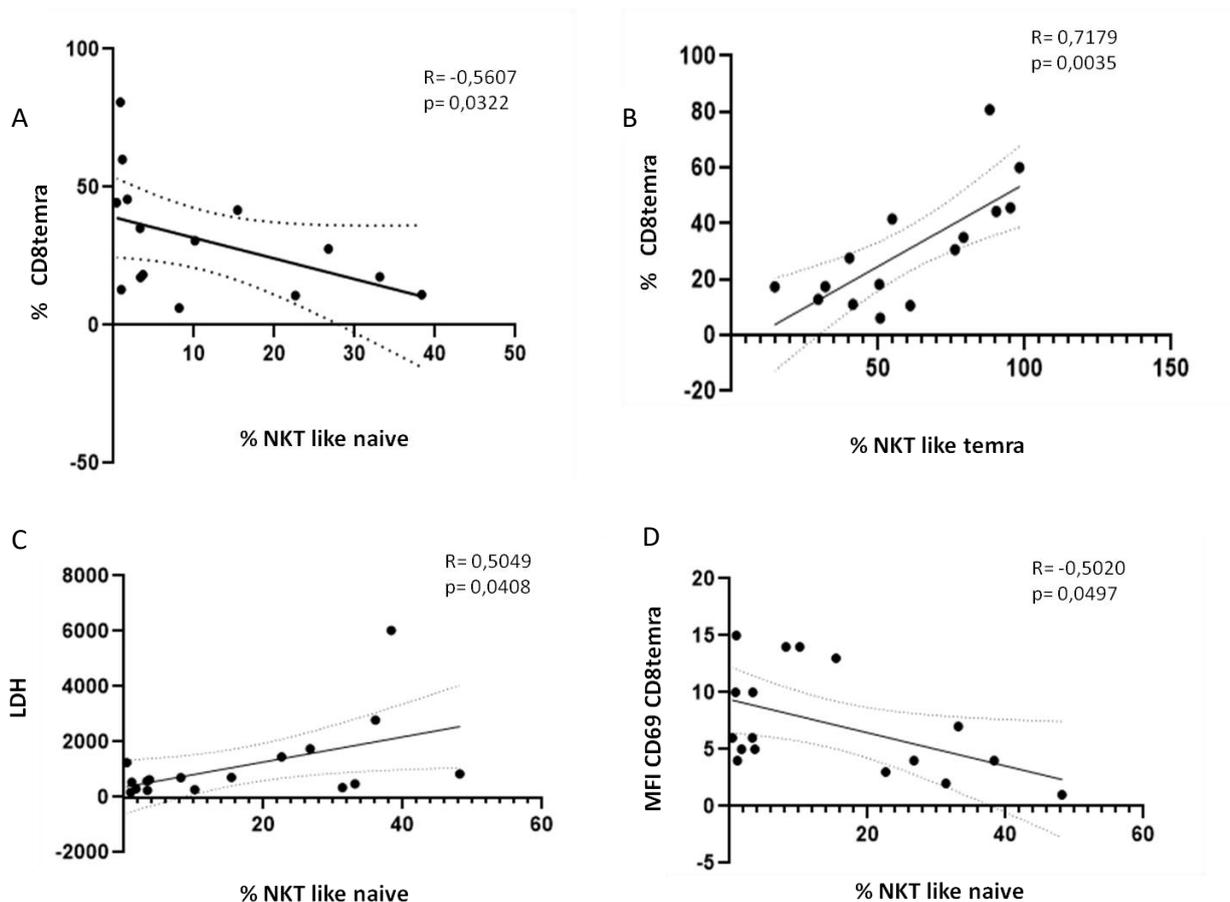


Figura 19. La correlazione tra i linfociti T CD8 temra e le cellule NKT like naive (A) e le cellule NKTlike temra (B) nel BM dei pazienti con LLA-B a diagnosi. Correlazione diretta tra le cellule NKT like naive e l'LDH (C) e inversa tra le cellule NKT like naive e lo stato di attivazione dei linfociti CD8 temra espresso con il CD69 (D).

5.7 LE CELLULE NKT-LIKE SONO AUMENTATE NEI PAZIENTI AD ALTO RISCHIO

Per verificare la capacità delle cellule NKT di fungere da biomarker di risposta e/o prognosi, si è verificato se nei pazienti di cui è disponibile la valutazione dell'MRD molecolare e la stratificazione del rischio, vi fosse una distribuzione diversa delle popolazioni studiate. Riguardo la positività dell'MRD molecolare al T1, non sono state individuate differenze nella distribuzione delle iNKT e NKT-like nei pazienti con e senza MRD positiva. Mentre, in considerazione della suddivisione in classi di rischio al T2, secondo protocollo AIEOP-BFM ALL 2017, si sono confrontati i livelli di NKT-like a diagnosi tra i pazienti a rischio standard e medio (SR e MR) rispetto ai pazienti ad alto rischio (HR). In quest'ultimo gruppo, le cellule NKT-like risultano statisticamente maggiori rispetto al gruppo SR e MR (Figura 19). E' evidente che l'analisi è limitata dalla scarsa numerosità campionaria e risulta essere solamente un'indagine preliminare.

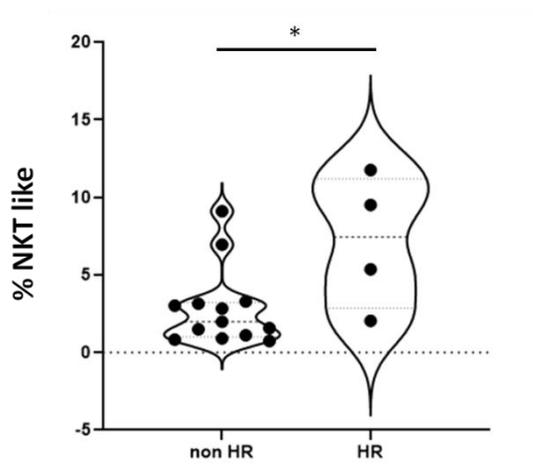


Figura 19. I livelli di cellule NKT like valutate a diagnosi nel BM dei pazienti con LLA-B suddivisi in due classi di rischio (non HR comprende SR e MR, e HR).

6.0 DISCUSSIONE

Nonostante i netti miglioramenti nel trattamento della LLA raggiunti negli ultimi decenni, la recidiva è ancor oggi gravata da un alto tasso di mortalità[52]. E' ormai chiaro come l'utilizzo attuale della chemioterapia tradizionale abbia raggiunto il suo massimo potenziale terapeutico, e che quindi il miglioramento dell'outcome dei pazienti con una malattia resistente risieda principalmente nell'immunoterapia. Questa, nelle sue varie forme di anticorpi monoclonali, CAR-T, vaccini e virus oncolitici, ha infatti ampiamente dimostrato di essere efficace e sicura[107], per quanto ancora gravata da un tasso di insuccessi consistente. Inoltre, data la difficoltà ancora oggettiva del trattamento dei pazienti recidivati, individuare precocemente i soggetti a maggior rischio permetterebbe un'intensificazione delle cure che potrebbe limitare il rischio di ricadute future. E' chiaro che ad oggi sembra estremamente promettente l'utilizzo dell'immunoterapia in questo setting, così come investigato nel protocollo AIEOP-BFM ALL 2017. Risulta quindi evidente come una maggiore comprensione del ruolo del sistema immunitario nella LLA rivesta un ruolo determinante per l'individuazione di nuovi target e di nuove strategie terapeutiche. Infatti il rapporto tra le cellule del sistema immunitario, principalmente cellule effettrici e regolatorie, e i blasti leucemici è estremamente complesso e intricato[1], e ad oggi, ancora molti sono i meccanismi non completamente compresi.

Le cellule NKT sono una popolazione linfocitaria non omogenea, i cui studi recenti ne hanno evidenziato diverse sotto-popolazioni, principalmente iNKT e NKT-like, con caratteristiche e funzioni differenti[71]. E' ormai nota l'attività anti-tumorale delle iNKT[77], mentre poco si sa riguardo il contributo delle cellule NKT-like nell'immunoediting. Inoltre, la recente scoperta dell'attività regolatoria delle T_{R3-56} [101], e la loro probabile appartenenza alla categoria delle NKT-like, pone ulteriori domande sulle funzioni di queste ultime cellule nell'ambito dei processi di immune evasion. Nell'ambito della LLA, nessuno studio ha investigato sulla funzione delle cellule NKT nel microambiente leucemico. Unicamente, Guo W. et al.[100] hanno tentato di analizzare l'andamento delle cellule NKT nella LLA, ma senza distinguere tra le sotto-popolazioni di cellule NKT e, di conseguenza, senza riuscire a comprendere il ruolo di queste cellule nell'immunità anti-leucemica. Inoltre questo studio ha analizzato le cellule NKT nel sangue periferico e non nella nicchia midollare, sede preferenziale del microambiente leucemico.

Il presente studio è quindi il primo che si è concentrato sulla valutazione delle cellule NKT, e delle sue sotto-popolazioni, nella nicchia midollare leucemica. I risultati infatti ottenuti sono

ristretti al microambiente tumorale, dato che è stato dimostrato che lo studio del sangue periferico non ricalca le medesime alterazioni individuate nel midollo osseo.

Le cellule iNKT, come atteso, risultano significativamente diminuite nel BM dei pazienti con LLA-B. Data la nota attività anti-leucemica delle iNKT, questo dato sembra essere in linea con la soppressione delle cellule effettrici messa in atto dal clone leucemico per sopravvivere ed espandersi, nei processi denominati immune-evasion[108]. Inoltre, il meccanismo alla base di questa soppressione da parte dei blasti leucemici potrebbe essere la diminuzione dell'espressione del CD1d sulla loro superficie[94], noto target delle iNKT.

Le cellule NKT-like, invece, al contrario delle iNKT, sono significativamente aumentate nel BM dei pazienti con LLA. Questo dato sembrerebbe indicare che questa popolazione non abbia solo un'attività effettrice anti-leucemica, altrimenti sarebbe soppressa come le altre popolazioni effettrici.

In letteratura sono presenti dati discordanti riguardo le funzioni delle NKT-like. Da un lato alcuni studi hanno riscontrato una capacità citotossica anti-leucemica di queste cellule[106], probabilmente ristretto al sotto gruppo delle NKT-like KIR+[72]. Da un altro, le cellule TR3-56 hanno un'attività regolatoria nei confronti della proliferazione e citotossicità delle cellule CD8 nei soggetti sani e in una malattia autoimmune come il diabete di tipo I[101]. E' quindi probabile che nell'ambito della LLA, all'interno delle cellule NKT-like, vi siano più sotto-popolazioni con attività differenti. Per questo motivo si è verificata la distribuzione delle sotto-popolazioni di cellule NKT-like nei pazienti con LLA in base all'espressione sia dei classici markers linfocitari T CD4 e CD8, sia dei markers indicativi dei processi di differenziazione linfocitaria T come il CCR7 e il CD45RA. Non sono state individuate differenze nei subset di NKT-like CD4+, CD8+ e DN tra i controlli e i pazienti leucemici, mentre le cellule NKT-like naive risultano significativamente aumentate. Inoltre, utilizzando il CD16 come marker di citotossicità anticorpo mediata, si nota come la sua aumentata espressione sia limitata al subset delle NKT-like temra, che infatti risultano anche più attivate data la maggiore espressione del CD69. In considerazione della nota maggiore capacità citotossica delle cellule T temra rispetto alle naive[105], e alla luce del dato del CD16, è ipotizzabile che siano le cellule NKT-like temra ad avere un'attività citotossica. Infatti, Chan W. K. et al.[72] hanno dimostrato che le cellule NKT-like KIR+ presentano una maggiore espressione del CD16, insieme a una maggiore attività antileucemica rispetto alle NKT-like KIR-. Inoltre, gli stessi autori dimostravano che le cellule NKT-like KIR+ hanno un profilo di espressione genica non solo con un'iper attivazione dei pathways citotossici ma anche di un metabolismo quiescente, tipico delle cellule della memoria. Si potrebbe quindi

ipotizzare che le cellule NKT-like temra qui individuate nei pazienti LLA siano proprio le cellule descritte da Chan W. K. et al. come NKT-like KIR+. Ulteriori indagini sono necessarie per verificare questa ipotesi.

Considerando invece che delle sottopopolazioni di cellule della memoria, solo le cellule NKT-like naive sono aumentate e considerando la scarsa capacità citotossica delle cellule T naive fisiologicamente, è ipotizzabile che questo subset possa rappresentare le T_{R3-56} nella LLA.

Per verificare queste due ipotesi di differente funzionalità nell'immunità anti-leucemica dei due subset di NKT-like naive e temra, si è indagato il loro rapporto con le cellule T CD8. Come ipotizzato, le cellule NKT-like naive hanno una relazione inversa con le cellule T CD8, mentre le cellule NKT-like temra hanno una relazione proporzionale diretta con le cellule T CD8. Inoltre le cellule NKT-like naive hanno anche una relazione inversa con lo stato di attivazione dei linfociti T CD8, indicando quindi che quante più cellule NKT-like naive ci sono nel midollo meno linfociti T CD8 sono presenti e con una minore attivazione. Questo rapporto sembra ricalcare quanto scoperto per le T_{R3-56} nelle MDS[109]. Inoltre, considerando che, nell'ambito dei meccanismi di immune escape leucemici, quante più cellule regolatorie si sono, come Treg e MDSC, tanto più il clone leucemico sfugge al riconoscimento da parte degli effettori linfocitari e si espande[31], si è ipotizzato che ci potesse essere una relazione tra la massa di malattia leucemica espressa tramite l'LDH e le cellule NKT-like naive, dalla ipotizzata attività regolatrice. Come atteso, l'LDH è direttamente proporzionale al quantitativo di cellule NKT-like, indicando che quante più di queste cellule ci sono nel BM, tanto più i blasti leucemici riescono ad espandersi e proliferare, creando masse di malattia leucemica più consistenti. Questo dato si aggiunge ai precedenti, suggerendo che le cellule NKT-like naive potrebbero avere un'attività regolatrice nell'ambito delle LLA.

Questo studio ha però indagato non solo lo stato delle cellule NKT al momento della diagnosi di LLA, ma anche le loro modifiche in seguito a chemioterapia, e se i loro valori potessero avere un valore predittivo sulla risposta e/o prognosi dei pazienti.

Per quanto non in modo significativo, le cellule NKT-like tendono a diminuire dopo il blocco di induzione mentre le iNKT tendono ad aumentare, anche se non raggiungono livelli pari a quelli dei soggetti sani. Questo potrebbe essere rappresentativo della ricostituzione di un normale sistema immunitario antileucemico dopo chemioterapia. Inoltre, le cellule NKT-like, ed in modo particolare le temra, hanno valori di CD16 statisticamente inferiori sia al T1 che al T2, indicando un ritorno a normali livelli di cellule NKT-like citotossiche dopo chemioterapia, data l'assenza

dei blasti leucemici. Riguardo le cellule NKT-like naive, dopo i blocchi di induzione e consolidamento tornano a livelli pari rispetto a quelli dei soggetti sani, dato che può rappresentare la ricostituzione di una normale tolleranza immunologica dopo l'eradicazione tumorale.

Riguardo le altre cellule effettrici anti-leucemiche, nella coorte qui studiata non sono state individuate differenze quantitative né nei linfociti T CD8 che nei linfociti NK, diversamente da quanto noto in letteratura[110]. E' probabile che questo sia dovuto alla limitata numerosità campionaria dello studio rispetto ai dati già pubblicati. In modo interessante, però, le cellule NK CD56brightCD16+, dalle maggiori capacità citotossiche[104], sia anti leucemiche che anti-microbiche, diminuiscono dopo chemioterapia, mentre aumentano le cellule NKCD56brightCD16-. Questo dato potrebbe spiegare la maggiore suscettibilità dei pazienti post chemioterapia alle infezioni[111].

Per verificare se la determinazione delle cellule NKT possa avere un valore predittivo sulla risposta alla terapia, è stato verificato se nei soggetti individuati come ad alto rischio di recidiva, secondo i criteri del protocollo AIEOP-BFM ALL 2017, ci fosse una diversa distribuzione delle cellule NKT. Si è riscontrato che le cellule NKT-like sono significativamente aumentate al momento della diagnosi in questo gruppo di pazienti. Per quanto tale analisi sia fortemente limitata dalla scarsa numerosità campionaria dei gruppi studiati, essa pone le basi per verificare in una coorte più ampia la reale capacità predittiva delle cellule NKT-like nel selezionare gli individui ad alto rischio. Infatti, l'individuazione di nuovi marker prognostici permetterà una migliore stratificazione dei pazienti con un indirizzamento più mirato delle terapie più intensive sui soggetti a maggior rischio di recidiva.

In conclusione, i dati presentati in questo studio evidenziano per la prima volta come diverse sotto-popolazioni di cellule NKT abbiano una distribuzione differente nella LLA-B e come cambiano dopo chemioterapia, specchio probabilmente di un diverso coinvolgimento di questi subset nell'immunità antileucemica. L'ipotesi formulata di una diversa funzione espletata dalle cellule NKT-like naive e tempra necessita di ulteriori conferme di tipo funzionale. Così come il valore predittivo delle cellule NKT-like necessita di un'analisi su una coorte più ampia.

7.0 BIBLIOGRAFIA

1. Jimenez-Morales, S., et al., *Mechanisms of Immunosuppressive Tumor Evasion: Focus on Acute Lymphoblastic Leukemia*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 737340.
2. Lam, P.Y., M.D. Nissen, and S.R. Mattarollo, *Invariant Natural Killer T Cells in Immune Regulation of Blood Cancers: Harnessing Their Potential in Immunotherapies*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1355.
3. Malard, F. and M. Mohty, *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2020. **395**(10230): p. 1146-1162.
4. Redaelli, A., et al., *A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL)*. Eur J Cancer Care (Engl), 2005. **14**(1): p. 53-62.
5. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.
6. Huang, F.L., et al., *Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments*. Oncol Lett, 2020. **20**(1): p. 448-454.
7. Zuckerman, T. and J.M. Rowe, *Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 59.
8. Paulsson, K., et al., *The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia*. Nat Genet, 2015. **47**(6): p. 672-6.
9. Lazaryan, A., et al., *Impact of cytogenetic abnormalities on outcomes of adult Philadelphia-negative acute lymphoblastic leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a study by the Acute Leukemia Working Committee of the Center for International Blood and Marrow Transplant Research*. Haematologica, 2021. **106**(8): p. 2295-2296.
10. Yeoh, E.J., et al., *Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling*. Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 133-43.

11. Haferlach, T., et al., *Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling*. Blood, 2005. **106**(4): p. 1189-98.
12. Chiaretti, S., et al., *Gene expression profile of adult T-cell acute lymphocytic leukemia identifies distinct subsets of patients with different response to therapy and survival*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2771-8.
13. Haferlach, T., et al., *Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group*. J Clin Oncol, 2010. **28**(15): p. 2529-37.
14. Ma, Y., et al., *Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. 7429-33.
15. Wiemels, J., *Perspectives on the causes of childhood leukemia*. Chem Biol Interact, 2012. **196**(3): p. 59-67.
16. Lo Nigro, L., *Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Pediatr Hematol Oncol, 2013. **35**(4): p. 245-52.
17. Greaves, M., *Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(3): p. 193-203.
18. Van Kaer, L., et al., *Innate and Innate-like Effector Lymphocytes in Health and Disease*. J Immunol, 2022. **209**(2): p. 199-207.
19. Kim, S.K. and S.W. Cho, *The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 868695.
20. Jo, S., et al., *Generation of a multi-antigen-directed immune response for durable control of acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2018. **32**(2): p. 574.
21. Luczynski, W., et al., *Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children?* Neoplasma, 2006. **53**(4): p. 301-4.
22. Brouwer, R.E., et al., *Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon*. Hum Immunol, 2002. **63**(3): p. 200-10.
23. Babor, F., et al., *KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse*. Blood, 2014. **124**(14): p. 2248-51.
24. Feng, Y.Y., O.L. Griffith, and M. Griffith, *Clinical implications of neoepitope landscapes for adult and pediatric cancers*. Genome Med, 2017. **9**(1): p. 77.
25. Singh, N.J. and R.H. Schwartz, *Primer: mechanisms of immunologic tolerance*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(1): p. 44-52.
26. Mapara, M.Y. and M. Sykes, *Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance*. J Clin Oncol, 2004. **22**(6): p. 1136-51.
27. Pastorczak, A., et al., *Mechanisms of Immune Evasion in Acute Lymphoblastic Leukemia*. Cancers (Basel), 2021. **13**(7).

28. Wu, S., et al., *Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: correlation of expression and clinical outcome at first disease recurrence*. *Cancer*, 2005. **103**(5): p. 1054-63.
29. Park, H.H., et al., *Intracellular IL-4, IL-10, and IFN-gamma levels of leukemic cells and bone marrow T cells in acute leukemia*. *Ann Clin Lab Sci*, 2006. **36**(1): p. 7-15.
30. Ohue, Y. and H. Nishikawa, *Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target?* *Cancer Sci*, 2019. **110**(7): p. 2080-2089.
31. Idris, S.Z., et al., *Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukaemia patients*. *Hematology*, 2016. **21**(4): p. 206-12.
32. Bhattacharya, K., S. Chandra, and C. Mandal, *Critical stoichiometric ratio of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells and CD4(+) CD25(-) responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia*. *Immunology*, 2014. **142**(1): p. 124-39.
33. Duell, J., et al., *Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL*. *Leukemia*, 2017. **31**(10): p. 2181-2190.
34. Dysthe, M. and R. Parihar, *Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment*. *Adv Exp Med Biol*, 2020. **1224**: p. 117-140.
35. Zahran, A.M., et al., *Increase in polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and regulatory T-cells in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 15039.
36. He, X. and C. Xu, *Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy*. *Cell Res*, 2020. **30**(8): p. 660-669.
37. Liu, X., G.D. Hogg, and D.G. DeNardo, *Rethinking immune checkpoint blockade: 'Beyond the T cell'*. *J Immunother Cancer*, 2021. **9**(1).
38. Kang, S.H., et al., *Expression of Immune Checkpoint Receptors on T-Cells and Their Ligands on Leukemia Blasts in Childhood Acute Leukemia*. *Anticancer Res*, 2019. **39**(10): p. 5531-5539.
39. Feucht, J., et al., *T-cell responses against CD19+ pediatric acute lymphoblastic leukemia mediated by bispecific T-cell engager (BiTE) are regulated contrarily by PD-L1 and CD80/CD86 on leukemic blasts*. *Oncotarget*, 2016. **7**(47): p. 76902-76919.
40. Hohtari, H., et al., *Immune cell constitution in bone marrow microenvironment predicts outcome in adult ALL*. *Leukemia*, 2019. **33**(7): p. 1570-1582.
41. Bene, M.C., et al., *Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)*. *Leukemia*, 1995. **9**(10): p. 1783-6.
42. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes*. *Blood*, 2009. **114**(5): p. 937-51.

43. Alaggio, R., et al., *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms*. *Leukemia*, 2022. **36**(7): p. 1720-1748.
44. Hunger, S.P., et al., *Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(14): p. 1663-9.
45. Pui, C.H., *Precision medicine in acute lymphoblastic leukemia*. *Front Med*, 2020. **14**(6): p. 689-700.
46. Ceppi, F., et al., *Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention*. *Expert Rev Hematol*, 2015. **8**(1): p. 57-70.
47. Conter, V., et al., *Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study*. *Blood*, 2010. **115**(16): p. 3206-14.
48. Hein, K., et al., *Clinical Value of Measurable Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia*. *Blood Lymphat Cancer*, 2022. **12**: p. 7-16.
49. Bassan, R., et al., *A systematic literature review and meta-analysis of minimal residual disease as a prognostic indicator in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Haematologica*, 2019. **104**(10): p. 2028-2039.
50. Gokbuget, N., et al., *Minimal residual disease level predicts outcome in adults with Ph-negative B-precursor acute lymphoblastic leukemia*. *Hematology*, 2019. **24**(1): p. 337-348.
51. van der Velden, V.H., et al., *Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data*. *Leukemia*, 2007. **21**(4): p. 604-11.
52. Fielding, A.K., et al., *Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study*. *Blood*, 2007. **109**(3): p. 944-50.
53. Attarbaschi, A., et al., *Randomized post-induction and delayed intensification therapy in high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia: long-term results of the international AIEOP-BFM ALL 2000 trial*. *Leukemia*, 2020. **34**(6): p. 1694-1700.
54. Rizzari, C., et al., *Asparagine levels in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia treated with pegylated-asparaginase in the induction phase of the AIEOP-BFM ALL 2009 study*. *Haematologica*, 2019. **104**(9): p. 1812-1821.
55. Horton, T.M., et al., *A phase I study of the proteasome inhibitor bortezomib in pediatric patients with refractory leukemia: a Children's Oncology Group study*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(5): p. 1516-22.
56. Horton, T.M., et al., *Bortezomib interactions with chemotherapy agents in acute leukemia in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006. **58**(1): p. 13-23.
57. Messinger, Y.H., et al., *Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study*. *Blood*, 2012. **120**(2): p. 285-90.

58. Bertaina, A., et al., *The combination of bortezomib with chemotherapy to treat relapsed/refractory acute lymphoblastic leukaemia of childhood*. Br J Haematol, 2017. **176**(4): p. 629-636.
59. Kantarjian, H., et al., *Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia*. N Engl J Med, 2017. **376**(9): p. 836-847.
60. Halford, Z., et al., *A Systematic Review of Blinatumomab in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: Engaging an Old Problem With New Solutions*. Ann Pharmacother, 2021. **55**(10): p. 1236-1253.
61. Borowitz, M.J., et al., *Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232*. Blood, 2015. **126**(8): p. 964-71.
62. Bader, P., et al., *Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group*. J Clin Oncol, 2009. **27**(3): p. 377-84.
63. Makino, Y., et al., *Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations*. Int Immunol, 1995. **7**(7): p. 1157-61.
64. Matsuda, J.L., et al., *Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 741-54.
65. Sykes, M., *Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells*. J Immunol, 1990. **145**(10): p. 3209-15.
66. Yoshimoto, T. and W.E. Paul, *CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1285-95.
67. Lantz, O. and A. Bendelac, *An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1097-106.
68. Bendelac, A., et al., *CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes*. Science, 1995. **268**(5212): p. 863-5.
69. Kawano, T., et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1626-9.
70. Mattner, J., et al., *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 525-9.
71. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: what's in a name?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 231-7.
72. Chan, W.K., et al., *Multiplex and genome-wide analyses reveal distinctive properties of KIR+ and CD56+ T cells in human blood*. J Immunol, 2013. **191**(4): p. 1625-36.
73. Galiani, M.D., et al., *Expression of killer inhibitory receptors on cytotoxic cells from HIV-1-infected individuals*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(3): p. 472-6.
74. Michel, J.J., et al., *CD56-expressing T cells that have features of senescence are expanded in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(1): p. 43-57.

75. Casado, J.G., et al., *CD8 T cells expressing NK associated receptors are increased in melanoma patients and display an effector phenotype*. *Cancer Immunol Immunother*, 2005. **54**(12): p. 1162-71.
76. Peralbo, E., C. Alonso, and R. Solana, *Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing*. *Exp Gerontol*, 2007. **42**(8): p. 703-8.
77. Robertson, F.C., J.A. Berzofsky, and M. Terabe, *NKT cell networks in the regulation of tumor immunity*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 543.
78. Hix, L.M., et al., *CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e20702.
79. Renukaradhya, G.J., et al., *Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma*. *Blood*, 2008. **111**(12): p. 5637-45.
80. Dhodapkar, M.V., et al., *A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma*. *J Exp Med*, 2003. **197**(12): p. 1667-76.
81. Molling, J.W., et al., *Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(1): p. 87-93.
82. Yoneda, K., et al., *The peripheral blood Valpha24+ NKT cell numbers decrease in patients with haematopoietic malignancy*. *Leuk Res*, 2005. **29**(2): p. 147-52.
83. Zdrzilova-Dubská, L., et al., *NKT-like cells are expanded in solid tumour patients*. *Klin Onkol*, 2012. **25 Suppl 2**: p. 2S21-5.
84. Nelson, A., J.D. Lukacs, and B. Johnston, *The Current Landscape of NKT Cell Immunotherapy and the Hills Ahead*. *Cancers (Basel)*, 2021. **13**(20).
85. Giaccone, G., et al., *A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(12): p. 3702-9.
86. Motohashi, S., et al., *A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer*. *J Immunol*, 2009. **182**(4): p. 2492-501.
87. Kunii, N., et al., *Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(6): p. 1092-8.
88. Heczey, A., et al., *Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy*. *Blood*, 2014. **124**(18): p. 2824-33.
89. Yu, J., et al., *Anti-GD2/4-1BB chimeric antigen receptor T cell therapy for the treatment of Chinese melanoma patients*. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 1.

90. Rotolo, A., et al., *Enhanced Anti-lymphoma Activity of CAR19-iNKT Cells Underpinned by Dual CD19 and CD1d Targeting*. *Cancer Cell*, 2018. **34**(4): p. 596-610 e11.
91. Kato, S., J.A. Berzofsky, and M. Terabe, *Possible Therapeutic Application of Targeting Type II Natural Killer T Cell-Mediated Suppression of Tumor Immunity*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 314.
92. Metelitsa, L.S., et al., *Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells*. *Leukemia*, 2003. **17**(6): p. 1068-77.
93. Nieda, M., et al., *TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells*. *Blood*, 2001. **97**(7): p. 2067-74.
94. Guo, W., et al., *CD1d levels in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia*. *Oncol Lett*, 2014. **8**(2): p. 825-830.
95. Gorini, F., et al., *Invariant NKT cells contribute to chronic lymphocytic leukemia surveillance and prognosis*. *Blood*, 2017. **129**(26): p. 3440-3451.
96. Spanoudakis, E., et al., *Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d*. *Blood*, 2009. **113**(11): p. 2498-507.
97. Gibson, S.E., S.H. Swerdlow, and R.E. Felgar, *Natural killer cell subsets and natural killer-like T-cell populations in benign and neoplastic B-cell proliferations vary based on clinicopathologic features*. *Hum Pathol*, 2011. **42**(5): p. 679-87.
98. Boeck, C.L., et al., *Significance of Frequencies, Compositions, and/or Antileukemic Activity of (DC-stimulated) Invariant NKT, NK and CIK Cells on the Outcome of Patients With AML, ALL and CLL*. *J Immunother*, 2017. **40**(6): p. 224-248.
99. Almeida, J.S., et al., *NKT-Like (CD3+CD56+) Cells in Chronic Myeloid Leukemia Patients Treated With Tyrosine Kinase Inhibitors*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2493.
100. Guo, W., et al., *Numbers and cytotoxicities of CD3+CD56+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia and acute lymphocytic leukemia*. *Cancer Biol Ther*, 2013. **14**(10): p. 916-21.
101. Terrazzano, G., et al., *T1D progression is associated with loss of CD3(+)CD56(+) regulatory T cells that control CD8(+) T cell effector functions*. *Nat Metab*, 2020. **2**(2): p. 142-152.
102. Finak, G., et al., *Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 20686.
103. Castriconi, R., et al., *Molecular Mechanisms Directing Migration and Retention of Natural Killer Cells in Human Tissues*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2324.
104. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
105. Martin, M.D. and V.P. Badovinac, *Defining Memory CD8 T Cell*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2692.

106. Sheng, L., et al., *Unusual expansion of CD3+CD56+ natural killer T-like cells in peripheral blood after anticytokine treatment for graft-versus-host disease: A case report.* *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(38): p. e12429.
107. Shang, Y. and F. Zhou, *Current Advances in Immunotherapy for Acute Leukemia: An Overview of Antibody, Chimeric Antigen Receptor, Immune Checkpoint, and Natural Killer.* *Front Oncol*, 2019. 9: p. 917.
108. Teng, M.W., et al., From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest*, 2015. 125(9): p. 3338-46.
109. Leone, S., et al., Bone marrow CD3(+) CD56(+) regulatory T lymphocytes (T(R3) (-56) cells) are inversely associated with activation and expansion of bone marrow cytotoxic T cells in IPSS-R very-low/low risk MDS patients. *Eur J Haematol*, 2022. 109(4): p. 398-405.
110. Rouce, R.H., et al., The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2016. 30(4): p. 800-11.
111. Inaba, H., et al., Infection-related complications during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Oncol*, 2017. 28(2): p. 386-392.