

# Imunoterapija akutne mijeloične leukemije

---

Mežnarić, Ljubica

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:257340>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ljubica Mežnarić**

**Imunoterapija akutne mijeloične leukemije**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2023.**

*Ovaj diplomski rad je izrađen u Zavodu za fiziologiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Hrvoja Lalića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.*

## **POPIS KORIŠTENIH KRATICA**

ADCC- stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (eng. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

ALL- akutna limfoblastična leukemija

AML- akutna mijeloična leukemija

APC- antigen-predočne stanice (eng. antigen presenting cells)

BiKEs- eng. bispecific killer-cell engagers

BiTEs- eng. bispecific T-cell engagers

CAR-T- stanica T s kimeričnim antigenskim receptorom (eng. chimeric antigen receptor T cell)

CD- diferencijacijske skupine (eng. clusters of differentiation)

CLL-1 -molekula 1 nalik lektin tipa C (eng. C-type lectin-like molecule 1)

CR- kompletna remisija (eng. complete remission)

CRi- kompletna remisija s nepotpunim oporavkom neutrofila i trombocita (eng. complete remission with incomplete count recovery)

CTLA-4 - antigen citotoksičnih limfocita-4 (eng. cytotoxic T lymphocyte antigen-4)

DARTs- eng. dual-affinity retargeting antibodies

DC- dendritične stanice (eng. dendritic cell)

DKS- diferencijalna krvna slika

DLI- infuzija donorskih limfocita (eng. donor lymphocyte infusion)

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

FAB- eng. French-American-British

FDA- Američka agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration)

FISH- fluorescentna in situ hibridizacija

GO- gemtuzumab ozogamicin

GvHD- bolest presatka protiv primatelja (eng. graft-versus-host disease)

GvL- učinak presatka protiv leukemije (eng. graft-versus-leukemia effect)

HLA- eng. human leukocyte antigene

IFN  $\gamma$ - interferon  $\gamma$

KIR- eng. killer inhibitory receptor

KKS- kompletna krvna slika

KML- kronična mijeloična leukemija

LAA- antigeni povezani s leukemijom (eng. leukemia-associated antigens)

LAG3- limfocitni aktivacijski antigen 3 (eng. lymphocyte activating 3)

LILRB4- inhibitorni leukocitni imunoglobulinu sličan receptor B4 (eng. leukocyte immunoglobulin-like receptor)

LRA- antigeni ograničeni na lozu (eng. lineage-restricted antigens)

LSA- antigeni specifični za leukemiju (eng. leukemia-specific antigens)

MDS- mijelodisplastični sindrom

MDSC- supresorske stanice mijeloidnog podrijetla (eng. myeloid-derived suppressor cells)

MHC- eng. major histocompatibility complex

MiHA - slabi histokompatibilni antigen (eng. minor histocompatibility antigen)

miRNA - eng. micro RNA

MLL- leukemija mješovite linije (eng. mixed lineage leukemia)

MPAL- akutna leukemija mješovitog fenotipa (eng. mixed phenotype acute leukemia)

MPO - mijeloperoksidaza

MRD- minimalna rezidualna bolest

NGS- sekvencioniranje nove generacije (eng. next generation sequencing)

NKG2D- prirodno ubilačka grupa 2D (eng. natural killer group 2D)

NK-stanica - prirodno ubilačka (eng. natural killer) stanica

NOS- drugačije nespecificirane (eng. not not otherwise specified)

PR3- proteinaza-3 (eng. proteinase-3)

PRAME- preferirano izraženi antigen melanoma (eng. preferentially expressed antigen of melanoma)

RHAMM- receptor za pokretljivost posredovanu hijaluronskom kiselinom (eng. receptor for hyaluronic acid mediated motility)

RNK- ribonukleinska kiselina

TandAbs- eng. tandem diabodies

TGF- $\beta$  - transformirajući faktor rasta- $\beta$  (engl. transforming growth factor- $\beta$ )

TIM-3- eng. T-cell immunoglobulin and mucin domain 3

TKMS- transplantacija krvotvornih matičnih stanica

TMB- tumorsko opterećenje mutacijama (eng. tumor mutation burden)

TNF- $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora alfa

Treg- regulacijska stanica T

TriKe- eng. trispecific killer cell engager

WHO- Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organisation)

WT1- Wilmsov tumor 1

## SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA.....	1
UVOD.....	1
EPIDEMIOLOGIJA .....	1
PODJELA .....	2
PATOGENEZA.....	4
KLINIČKA SLIKA .....	6
DIJAGNOZA.....	7
PROGNOZA .....	10
LIJEČENJE .....	11
IMUNOPATOGENEZA AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE .....	13
LEUKEMIJSKE MATIČNE STANICE .....	16
IMUNOTERAPIJA U LIJEČENJU AML-a.....	17
ALOGENIČNA TRANSPLANTACIJA KOŠTANE SRŽI KAO IMUNOTERAPIJA AML-a .....	17
INFUZIJA DONORSKIH LIMFOCITA .....	20
MONOKLONSKA PROTUTIJELA.....	22
NEKONJUGIRANA MONOKLONSKA PROTUTIJELA .....	22
KONJUGIRANA MONOKLONSKA PROTUTIJELA .....	23
BISPECIFIČNA PROTUTIJELA .....	26
BLOKADA KONTROLNIH TOČAKA.....	29
STANIČNA TERAPIJA.....	33
STANICE CAR-T.....	33
STANICE NK.....	35

CJEPIVA U AKUTNOJ MIJELOIČNOJ LEUKEMIJU .....	37
ZAKLJUČAK .....	39
ZAHVALE .....	42
POPIS LITERATURE .....	43
ŽIVOTOPIS .....	60



## **SAŽETAK**

**NASLOV RADA:** Imunoterapija akutne mijeloične leukemije

**AUTOR:** Ljubica Mežnarić

Akutna mijeloična leukemija je maligna bolest karakterizirana klonskom proliferacijom nezrelih aberantnih mijeloidnih stanica (blasta) uz infiltraciju koštane srži koja najčešće prelazi u krv, a ponekad se može proširiti i na druge dijelove tijela, uključujući limfne čvorove, jetru, slezenu, središnji živčani sustava, testise, kožu i sluznice. Svake godine u svijetu oboli 5,4/100 000 ljudi. Klinički se prezentira simptomima pancitopenije s preživljenjem od nekoliko mjeseci nakon postavljanja dijagnoze ukoliko se ne liječi. Jedina terapijska opcija koja omogućuje izliječene je primjena visokih doza citotoksičnih lijekova i susljedna transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) koja zahvaljujući učinku presatka protiv primatelja uništi preostale blaste. Navedena terapija ne može biti primijenjena u svi oboljelih od AML-a najčešće zbog općeg lošeg stanja bolesnika. Leukemijski blasti posjeduju razne mogućnosti prilagodbe pomoću kojih izbjegavaju uništenje od strane imunosnog sustava bolesnika, ali i od donorskih stanica infundiranih bolesniku tijekom TKMS što može dovesti do relapsa bolesti u većine bolesnika. Složena klonska pozadina, mogućnost genske i epigenetske modifikacija te činjenica da je većina antigena izražena na blastima izražena i na zdravim stanicama dovodi do otežanog odabira idealnog ciljnog antigena s kojim bi se moglo djelovati na konačno uništenje malignih stanica. Trenutno se razvijaju brojni terapijski pristupi čiji je temelj imunosna kontrola proliferacije leukemijskih blasta poput primjene monoklonskih protutijela, blokade kontrolnih točaka, stanična terapija stanicama CAR-T i NK te cijepljenje.

**KLJUČNE RIJEČI:** AML, TKMS, protutijela, CAR, cjepivo

## **SUMMARY**

**TITLE:** Immunotherapy in acute myeloid leukaemia

**AUTHOR:** Ljubica Mežnarić

Acute myeloid leukaemia is a malignant disease characterized by clonal proliferation of immature aberrant myeloid cells (blasts) with infiltration of the bone marrow that most often spreads to the blood and sometimes can spread to other parts of the body, including lymph nodes, liver, spleen, central nervous system, testicles, skin, and mucous membranes. The incidence of new AML cases is 5.1/100,000 per year. AML presents with symptoms of pancytopenia and has survival of several months after diagnosis if left untreated. The only therapeutic option that has curative potential is a combination of cytotoxic drugs and the subsequent transplantation of hematopoietic stem cells (HTSC) that destroys the remaining blasts due to graft versus leukaemia effect. Unfortunately, HSCT cannot be used in all patients with AML, most commonly because of the poor general condition of patients. Leukemic blasts possess various adaptation mechanisms that offers them a way to avoid destruction by the patient's immune system, but also by the infused donor cells during HSCT, which leads to relapse in most patients. The complex clonal background, the possibility of genetic and epigenetic modification and the fact that most antigens expressed on blasts are also expressed on healthy cells makes it difficult to choose the ideal target antigen that could be used for the complete destruction of malignant cells. Numerous approaches are currently being developed, the basis of which is immune control of the proliferation of leukemic blasts, such as monoclonal antibodies, checkpoint blockade, CAR-T cells, NK-cells, and vaccination.

**KEY WORDS:** AML, TKMS, antibodies, CAR, vaccination

# AKUTNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA

## UVOD

AML je maligna bolest karakterizirana klonskom proliferacijom prethodničkih stanica mijeloidne loze s ograničenim kapacitetom diferencijacije u zrelije oblike (1). U kliničkoj slici prevladavaju simptomi pancitopenije, a ako se ne liječi, bolest rezultira smrću unutar nekoliko mjeseci (2). Ishod liječenja se tijekom posljednjih godina poboljšao prvenstveno zbog boljih mjera potpornog liječenja koje su omogućile učinkovitiju primjenu agresivne kemoterapije koja može odstraniti detektabilne leukemijske stanice u krvi i koštanoj srži te uspješno uvesti većinu bolesnika u remisiju uz susljednu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica koja zbog učinka presatka protiv leukemije može osigurati dugotrajnu kontrolu bolesti (2,3). Unatoč tome, u većine bolesnika i dalje dolazi do relapsa osnovne bolesti pa je dugotrajno izlječenje još uvijek često neuspješno, a to zahtijeva razvoj novih strategija liječenja AML-a (2). Imunosna kontrola proliferacije leukemijskih blasta temelj je različitih terapijskih pristupa koji se koriste u cilju smanjenja rizika od recidiva. Posljedično, istražuju se daljnje imunosne strategije, uključujući monoklonska protutijela, blokada kontrolnih točaka, stanična terapija poput stanica T s kimeričkim antigenskim receptorom (engl. chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) i stanica NK te cijepljenje (4).

## EPIDEMIOLOGIJA

Dobno-standardizirana stopa incidencije svih oblika leukemije u svijetu je 5,4 na 100 000 stanovnika i one čine 2,5% svih novodijagnosticiranih malignih bolesti u 2020. godini (5). Prema Registru za rak koji u sklopu Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo prati statistiku malignih bolesti na području Republike Hrvatske, stopa incidencije svih oblika isključivo mijeloičnih leukemija u 2019. godine je iznosila 5,4 na 100 000 (6). AML je najčešći oblik akutne leukemije u odraslih. Medijan dobi pri dijagnozi je 68 godina i nešto je češća u muškaraca nego u žena (7).

U djece akutne leukemije čine najčešća maligna oboljenja. Godišnje se dijagnosticira 35-50/ 1 000 000 novih slučajeva u pacijenata mlađih od 18 godina, pri čemu je bitno naglasiti da mali bolesnici s navršениh 2 do 3 godine života najčešće obole od ALL, dok je kod dojenčadi i starije djece češća AML (8).

## PODJELA

Dvije klasifikacije AML-a koje postoje su poznatija i češće korištena klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (eng. World Health Organization, WHO) i starija, danas u kliničkoj praksi rjeđe korištena FAB (French-American-British) klasifikacija.

WHO klasifikacija se temelji na kliničkim, molekularnim, genskim i patološkim značajkama AML-a, a prvi put je definirana 2008. godine od kada se dopunjavala i poboljšavala u nekoliko navrata sukladno novim znanstvenim spoznajama. Trenutno je aktualno peto izdanje iz 2022. godine. Najvažnija promjena s obzirom na dosadašnja izdanja se ogleda u tome što se prilikom definicije AML-a ne zahtjeva prisutnost više od 20 posto leukemijskih blasta u uzorku koštane srži kod definiranih genskih abnormalnosti, već su one same po sebi dovoljne za dijagnozu, osim kod AML s BCR::ABL1 fuzijom i AML s mutacijom CEBPA kod kojih je i dalje potrebno više od 20% blasta radi izbjegavanja preklapanja s kroničnom mijeloičnom leukemijom (KML). Također, tipovi AML-a kod kojih nisu otkrivene genske abnormalnosti su u prijašnjoj klasifikaciji činili skupinu drugačije nespecificiranih AML (eng. not otherwise specified, NOS), a u novoj klasifikaciji su isti tipovi definirani prema stupnju diferencijacije (9).

Tablica 1. Klasifikacija AML-a prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji<sup>9</sup>

<b>Akutna mijeloična leukemija s definiranim genskim abnormalnostima</b>	<b>Akutna mijeloična leukemija, definicija prema stupnju diferencijacije</b>
APL s fuzijom PML::RARA	AML s minimalnom diferencijacijom
AML s fuzijom RUNX1::RUNX1T1	AML bez sazrijevanja
AML s fuzijom CBFβ::MYH11	AML sa sazrijevanjem
AML s fuzijom DEK::NUP214	Akutna bazofilna leukemija
AML s fuzijom RBM15::MRTFA	Akutna mijelomonocitna leukemija
AML s fuzijom BCR::ABL1	Akutna monocitna leukemija
AML s preslagivanjem KMT2A	Akutna eritroidna leukemija
AML s preslagivanjem MECOM	Akutna megakarioblastna leukemija
AML s preslagivanjem NUP98	
AML s mutacijom NPM1	
AML s mutacijom CEBPA	
AML povezana s mijelodisplazijom	
AML s ostalim definiranim genskim promjenama	

FAB (French-American-British) dijeli AML u 8 skupina na temelju morfologije i citokemijskih osobitosti blasta, no ima mali utjecaj na odabir terapijskog režima i predviđanje ishoda zbog nedostatka informacija o kariotipu i genetskim značajkama. FAB-klasifikacija zahtjeva prisutnost 30% blasta u koštanoj srži. Prema FAB-u postoji 8 skupina AML: AML s minimalnom diferencijacijom (M0), AML bez sazrijevanja (M1), AML sa sazrijevanjem (M2), akutna promijelocitna leukemija (M3), akutna mijelomonocitna leukemija (M4), akutna mijelomonocitna leukemija s abnormalnim eozinofilima (M4eo), akutna monoblastična leukemija (M5A), akutna monocitna leukemija (M5B), eritroleukemija (M6) i akutna megakarioblastna leukemija (M7) (10).

## PATOGENEZA

Nastanak AML-a potiču unutrašnji leukemogeni mehanizmi koji uključuju niz kromosomskih, genetskih i epigenetskih promjena koji vode do izražaja patogenih onkogenih i maligne transformacije hematopoetskih stanica te vanjski mehanizmi koji se odnose na stromalne komponente leukemijskog mikrookruženja koji potiču proliferaciju i samnoobnavljanje preleukemijskih i leukemijskih klonova (11).

Na temelju anamneze AML se može podijeliti u tri skupine: de novo AML, sekundarna AML nastala iz prethodnog mijelodisplastičnog sindroma (MDS) i AML povezana s terapijom koja nastaje zbog prethodne izloženosti kemoterapiji (11).

U većini slučajeva AML-a odraslih, razlog nastanka mutacija nije jasan. Izloženost kemikalijama, zračenju, cigaretama, kemoterapiji i retrovirusima se povezuje s povećanom učestalošću razvoja AML-a, a mutacija se može dogoditi na bilo kojem stupnju stanične diferencijacije. Somatske mutacije povezane s nastankom AML-a mogu zahvatiti gene koji kodiraju signalne i kinazne puteve (npr. FLT3, NF1, KIT, KRAS, NRAS i PTPN11), transkripcijske faktore (npr. GATA2, RUNX1 i CEBPA), epigenetske modifikatore (npr. DNMT3A, EZH2, ASXL1, TET2, IDH1 i IDH2), RNA-„splicing“ faktore (za izrezivanje RNA, kao npr. ZRSR2, SRSF2, U2AF1 i SF3B1), tumor-supresorske gene (TP53), nukleofosmin (NPM1) i kohezin (SMC3, RAD21, SMC1A, STAG1 i STAG2) (11).

Rjeđe, AML u odraslih povezana je s naslijeđenim genetskim abnormalnostima, uključujući mutacije ili gubitak tumor-supresorskih gena i/ili gena za popravak oštećenja DNK, kao što je npr. slučaj u Li-Fraumenijevom sindromu ili Fanconijevoj anemiji (11).

Kromosomske abnormalnosti povezane s AML-om su rekurentne (nisu nasumične), stečene (nisu naslijeđene) i karakteristične su samo za mijeloidne novotvorine (11). Bolesnici koji boluju od AML-a najčešće imaju normalan kariotip, a od abnormalnih su najčešće kromosomske translokacije, osobito fuzije gena poput RUNX1-ETO, PML-RARA, CBFβ-MYH11 i fuzija KMT2A (poznatog i kao MLL) s brojnim drugim genima (11). Philadelphia-kromosom koji nastaje recipročnom translokacijom kromosoma 9 i 22, odnosno fuzijom BCR-ABL1 gena, karakteristično je obilježje kronične mijeloidne leukemije, a pojavljuje se u manje od 3% oboljelih od AML-a (12). Djeca s trisomijom 21. kromosoma, odnosno Downovim sindromom, imaju veću vjerojatnost da će razviti leukemiju nego djeca s urednim kariogramom,

unatoč činjenici da odrasli s Downovim sindromom imaju manju učestalost maligniteta nego ljudi bez Downova sindroma te je za njih karakteristična mutacija u genu GATA1 (13).

Epigenetski mehanizmi koji imaju leukemogeno djelovanje uključuju promjene u histonima, metilaciju DNK i post-transkripcijsku regulaciju mRNK nekodirajućim RNK kao što je miRNK (11).

Mikrookruženje krvotvornih matičnih stanica usko surađuje s krvotvornim matičnim stanicama u kontroli njihove proliferacije i ispunjenju njihove funkcije, a promjene u okolišu na genskoj, ali i molekularnoj razini dovode do deregulacije tog složenog procesa te poticanje nastanka preleukemijskih i leukemijskih klonova. Isto tako, leukemijske stanice mijenjaju svoj okoliš u svrhu poticanja vlastitog preživljenja što zajedno čini začarani krug potenciranja nastanka AML-a (11).

AML općenito karakterizira nisko opterećenje mutacijama (eng. tumor mutation burden, TMB), a više vrijednosti su povezane s boljim odgovorom na imunoterapiju (14). TMB označava ukupan broj mutacija po megabazi DNK u tumorskoj stanici, a određuje se pomoću sekvencioniranja nove generacije (eng. next generation sequencing, NGS).

## KLINIČKA SLIKA

Potiskivanje normalne hematopoeze u koštanoj srži i posljedično smanjivanje broja zdravih i zrelih eritrocita, leukocita i trombocita u perifernoj krvi razlog je pojavi karakterističnih znakova i simptoma za AML: anemije, infekcija i sklonosti krvarenju.

Znakovi anemije mogu biti nespecifični, poput umora i malaksalosti koji često prethode dijagnozi mjesecima, no i nešto jasniji poput bljedila kože i sluznica. Dispneja, odnosno subjektivan osjećaj nedostatka zraka također može biti prisutan. Na koži se mogu pojaviti ekhimoze i purpure kao znak trombocitopenije uz krvarenja iz gingive, epistakse, produljene i obilne mjesečnice i slično.

Pojava vrućice gotovo uvijek upućuje na infekciju koja može biti različitog intenziteta, a može se pojaviti kao posljedica granulocitopenije zbog same bolesti ili febrilne neutropenije kao posljedica terapije. Unatoč napretku u antimikrobnoj terapiji, bolesnici s AML-om zbog teške imunosupresije ostaju u opasnosti od infekcija opasnih po život (15). Pregledom usne šupljine može se naći hipertrofija gingive uz gingivitis i znakovi oralne kandidioze ili herpetične lezije.

Leukemia cutis je rijetka pojava koja označava zahvaćanje kože malignim stanicama s vrlo različitom prezentacijom poput papula, nodula, plakova i ulkusa koji se mogu pojavljivati lokalizirano ili diseminirano zahvaćajući kožu bez predilekcijske lokacije. U pravilu označava uznapredovali stadij bolesti (16).

Bol u kostima je rjeđa pojava koja se javlja zbog nagrizanja koštanog tkiva malignim procesom, češće u dugim kostima ekstremiteta (17).

Rijetko, bolesnici se mogu prezentirati s ekstramedularnom bolešću koja se može pojaviti prije zahvaćanja koštane srži, zajedno sa zahvaćanjem ili u relapsu. Pritom, zahvaćeni mogu biti kosti, meko tkivo, limfni čvorovi, orbita i slično. Mijeloidni sarkom označava ekstramedularnu proliferaciju blasta koji remeti normalnu arhitekturu tkiva u kojem nastaje (18).

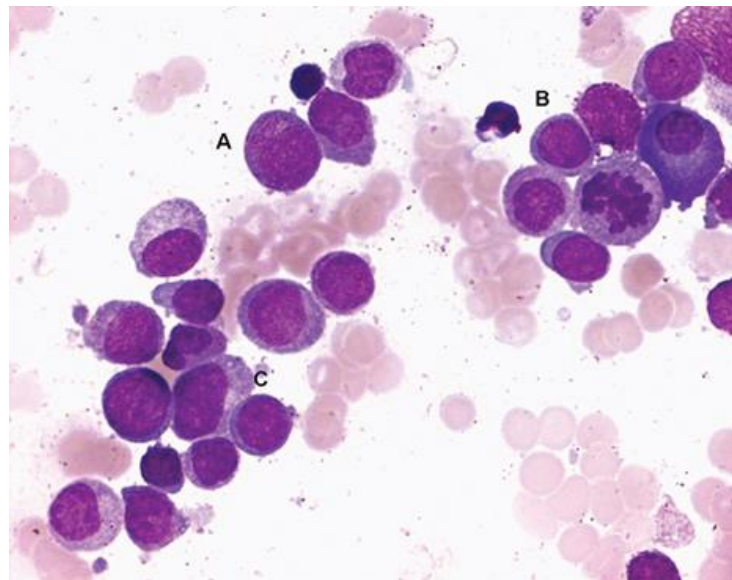
Bolesnici s AML-om mogu imati širok raspon metaboličkih i elektrolitskih abnormalnosti. Hiperfosfatemija, hipokalcemija, hiperuricemija i/ili hiperkalemija su znakovi sindroma lize tumora što je hitno onkološko stanje. Razvija se spontano ili nakon primjene terapije kada tjelesni homeostatski procesi ne mogu podnijeti količinu kalija, fosfata, nukleinskih kiselina i citokina proizvedenih tijekom stanične lize i gotovo uvijek se razvija nefropatija (19).



## DIJAGNOZA

Anamneza s detaljnom obiteljskom i osobnom povijesti bolesti, analiza komorbiditeta i pregled bolesnika uz osnovne laboratorijske nalaze čine početak dijagnostičkog slijeda. U kompletnoj i diferencijalnoj krvnoj slici najčešće se utvrđuje normocitna anemija s normalnim ili sniženim brojem retikulocita i trombocitopenija, dok je broj leukocita najčešće povećan, no može biti normalan pa i snižen.

Ključni koraci u dijagnozi AML-a su biopsija kosti i aspiracija koštane srži. Uzorak se u pravilu uzima s gornjeg stražnjeg grebena zdjelične kosti (crista iliaca posterior superior) ili iz prsne kosti. Biopsija nam daje uvid i u specifične procese poput fibroze, dok aspiracija omogućava određivanje postotka blasta u srži koji se određuje na 500 stanica s jezgrom u koštanoj srži (20). Blast je općenit pojam za nezrele stanice pod kojim se podrazumijevaju mijeloblasti, monoblasti, megakarioblasti, dok se kod kod AML s monocitnom i mijelomonocitnom diferencijacijom u izračun uzimaju i promonociti (20). Na krvnom razmazu u bolesnika se mogu uočiti blasti kao nezrele stanice s velikom jezgrom i različitim omjerima između citoplazme i jezgre. Auerovi štapići, odnosno crvenkasto-ružičaste spojene granule u citoplazmi su patognomične za leukemijske blaste (21).



Slika 1. AML sa sazrijevanjem. Slovom označeni granularni blasti (A), agranularni blasti (B) i promijelocit (C). Preuzeto iz Ries, 2011.

Reakcija s mijeloperoksidazom (MPO) je citokemijska pretraga u kojoj pozitivna reakcija, granularno i najviše oko Golgijeva aparata, označava mijeloblaste. Bojanje sa Sudan black i

reakcija na nespecifičnu esterazu su citokemijski testovi koji također mogu poslužiti u identifikaciji blasta mijeloidne loze, no kompliciranije su za izvesti od reakcije s mijeloperoksidazom (21). Identifikacija blasta u perifernoj krvi ili uzorku koštane srži izvodi se i protočnom citometrijom zbog izražaja određenih antigena – leukocitnih diferencijacijskih antigena - koji su svrstani u tzv. diferencijacijske skupine (eng. clusters of differentiation, CD), poput biljega CD13, CD14, CD33, CD34, CD117 i drugih. Ponekad imunofenotip leukemijskih stanica pokazuje dvosmislen obrazac izražaja antigena (tj. odražava biljege više od jedne hematopoetske loze), pa se takve leukemije nazivaju akutne leukemije mješovitog fenotipa (engl. mixed phenotype acute leukemia, MPAL).

Citogenetska analiza, konkretno konvencionalna citogenetika ili fluorescentna *in situ* hibridizacija i molekularna dijagnostika su nužne u dijagnostici AML-a jer daju ključne informacije o postojećim mutacijama gena i strukturnim promjenama kromosoma važnim za klasifikaciju AML-a i za koje postoje moguće specifične terapijske opcije.

Tablica 2. Dijagnostički postupak u dijagnozi AML-a<sup>20</sup>

<b>DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK U DIJAGNOZI AML-A</b>
<b>KOMPLETNA KRVNA SLIKA (KKS), DIFERENCIJALNA KRVNA SLIKA (DKS)</b>
<b>ASPIRACIJA KOŠTANE SRŽI</b>
<b>BIOPSIJA KOSTI</b>
<b>IMUNOFENOTIPIZACIJA PROTOČNOM CITOMETRIJOM</b>
<b>DIJAGNOZA AML-A:</b>
PREKURSORSKI ANTIGENI: CD34, CD117, HLA-DR
MIJELOIDNI ANTIGENI: citoplazmatski MPO, CD33, CD13
ANTIGENI MIJELOIDNOG SAZRIJEVANJA: CD11b, CD15, CD64, CD65
MONOCITNI ANTIGENI: CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c
MEGAKARIOCITNI ANTIGENI: CD41 (glikoprotein IIb/IIIa), CD61 (glikoprotein IIIa), CD36
ERITROIDNI ANTIGENI: CD235a (glikoforin A), CD71, CD36
<b>DIJAGNOZA MPAL-A:</b>
MIJELOIDNA LINIJA: MPO (dokazan protočnom citometrijom, imunohistokemijom ili citokemijom) ili monocitna diferencijacija (zadovoljena minimalno 2 kriterija od slijedećih: nespecifična esteraza dokazana citokemijom, CD11c, CD14, CD64 ili lizozim) ili minimalno 2 mijeloidna markera poput CD177, CD33, CD13)
T LINIJA: izrazito izražen citoplazmatski CD3 (s protutijelom na CD3 ε lanac) ili površinski CD3 antigen
B LINIJA: izrazito izražen CD19 sa izrazito izraženim još barem jednim od slijedećih antigena: citoplazmatski CD79a, cCD22 ili CD10; ili slabo izražen CD19 sa izrazito izraženim barem dva od slijedećih antigena: CD79a, cCD22 ili CD10

<p><b>CD-MARKERI OKOSNICE PANELA ZA PRAĆENJE MRD-a:</b>  CD34, CD117, CD45, CD33, CD13, CD56, CD7, HLA-R; monocitni još i: CD64, CD11b, CD4</p>
<p><b>GENETIČKE ANALIZE :</b></p>
<p><b>KLASIČNA CITOGENETIKA</b> (metafazni kromosomi)</p>
<p><b>PRETRAŽIVANJE NA PREUREDBE GENA FLUORESCENTNOM IN SITU HIBRIDIZACIJOM (FISH):</b></p> <p>BCR::ABL1, PML::RARA, CBFβ::MYH11, RUNX1::RUNX1T1, preuredbe KMT2A i drugih fuzijskih gena (ako je moguće)</p> <p>Radi se u slučaju potrebe za brzom informacijom za preporuku odgovarajuće terapije (npr. PML::RARA), ako je morfologija kromosoma loše kvalitete ili ako postoji tipična morfologija, ali nije prisutna sumnja na citogenetičku abnormalnost)</p>
<p><b>PRETRAŽIVANJE MUTACIJA GENA ZA DIJAGNOZU I KAO POTENCIJALNE TERAPIJSKE METODE</b> (PCR i/ili sekvenciranjem):</p> <p>FLT3, IDH1, IDH2, NPM1, CEBPA, DDX41, TP53, ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2</p>
<p><b>DODATNI GENI PRI DIJAGNOZI</b> (geni koje nije nužno testirati prilikom definiranja dijagnoze i preporučene terapije, no mogu poslužiti u naknadnom praćenju bolesti)</p> <p>ANKRD26, BCORL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, ETV6, GATA2, JAK2, KIT, KRAS, NRAS, NF1, PHF6, PPM1D, PTPN11, RAD21, SETBP1, TET2, WT1</p>
<p><b>DODATNI TESTOVI I POSTUPCI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• kompletan fizički pregled</li> <li>• zdravstveni status (ECOG/WHO bodovi)</li> <li>• biokemijske analize: glukoza, natrij, kalij, kalcij, kreatinin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin-aminotransferaza (ALT), alkalna fosfataza, laktat dehidrogenaza (LDH), bilirubin, urea, ukupni protein, mokraćna kiselina, ukupni kolesterol, ukupni trigliceridi , kreatinin fosfokinaza (CPK)</li> <li>• testovi koagulacije: protrombinsko vrijeme (PTT), međunarodni normalizirani omjer (INR) gdje je indicirano, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTT)</li> <li>• testiranje na HIV-1, CMV, EBV, HSV, VZV, hepatitis A, B i C</li> <li>• serumski test trudnoću</li> <li>• procjena podobnosti za alogeničnu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (HLA-tipizacija)</li> <li>• rendgen prsnog koša, 12-kanalni elektrokardiogram, ehokardiografija, MUGA, CT prsnog koša, lumbalna punkcija (ovisno o indikaciji)</li> <li>• pružiti informacije o krioprezervaciji jajnih stanica i spermija</li> </ul>

## PROGNOZA

Klinički su definirani pokazatelji koji su u korelaciji s postizanjem kompletne remisije i boljom prognozom. Mlađi bolesnici imaju više preživljenje od starijih, za koje je u pravilu karakteristično narušeno opće stanje što je samo po sebi loš prognostički faktor uz brojne komorbiditete koji ograničavaju odabir najpogodnije terapije. Određene genske promjene, izloženost citotoksičnim agensima, prethodna mijelodisplazija, druge mijeloproliferativne i ostale neoplazme u anamnezi indikativne su za lošiju prognozu. Zanimljivo, od svih rasa dramatično najveći broj oboljelih od AML-a su bijelci (22).

Tablica 3. Prognoze specifičnih mutacija u AML-u<sup>20</sup>

<b>Povoljna prognoza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1::RUNX1T1</li> <li>• inv(16)(p13.1;q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ::MYH11</li> <li>• mutirani NPM1 bez FLT3::ITD</li> <li>• monoalelno/bialelno mutirana u okviru bZIP regija CEBPA</li> </ul>
<b>Srednja prognoza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mutiran NPM1 s FLT3::ITD</li> <li>• divlji tip NPM1 s FLT3::ITD (bez genetičkih abnormalnosti nepovoljnog rizika)</li> <li>• t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3::KMT2A</li> <li>• citogenetičke abnormalnosti ne klasificirane kao povoljne ili nepovoljne</li> </ul>
<b>Nepovoljna prognoza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t(6;9)(p23;q34.1); DEK::NUP214</li> <li>• t(v;11q23.3); KMT2A promijenjen</li> <li>• t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR::ABL1</li> <li>• t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP</li> <li>• inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM (EVI1)</li> <li>• t(3q26.2;v)/MECOM(EVII) promijenjen</li> <li>• monosomija 5 ili del(5q); monosomija 7; monosomija 17/abn(17p)</li> <li>• kompleksan kariotip*, monosomalni kariotip**</li> <li>• mutirani <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i> i/ili <i>ZRSR2</i>***</li> <li>• mutirani TP53</li> </ul>

\*kompleksan kariotip: više od 3 nepovezane kromosomske abnormalnosti isključujući hiperploidiju sa tri ili više trisomija ili polisomija bez strukturnih abnormalnosti;

\*\*monosomalni kariotip: prisutnost dvije ili više monosomija izuzev gubitka X ili Y kromosoma; jedna autosomalna monosomija u kombinaciji s barem jednom strukturnom kromosomskom abnormalnosti

\*\*\*trenutno se navedene mutacije ne smatraju nepovoljnom prognozom ako se pojave s podtipom AML koji nosi povoljnu prognozu

## LIJEČENJE

Klasična shema liječenja AML-a se sastoji od indukcijske terapije, konsolidacijske terapije i terapije održavanja. Cilj indukcijske terapije je iskorijeniti leukemijske blaste i postići remisiju. Izbor konkretne terapije ovisi o dobi, općem stanju i komorbiditetima bolesnika. U odraslih koji imaju dobro opće stanje ona se najčešće sastoji od kombinacije citarabina i antraciklina u 7+3 režimu (kontinuirana infuzija citarabina u trajanju od 7 dana i antraciklina u trajanju od 3 dana) (23).

Bolesnici koji nisu kandidati za intenzivnu indukcijsku kemoterapiju mogu dobivati onu nižeg intenziteta, no ona neće dovesti do dugoročnog izlječenja nego će produljiti preživljenje i olakšati postojeće simptome uz dodatnu potpurnu terapiju. Ona se sastoji od hipometilirajućih lijekova poput azacitidina često u kombinaciji s venetoklaksom (selektivnim inhibitorom anti-apoptotskog proteina Bcl-2) i lijekova koji ciljaju određenu mutaciju, poput ivosideniba ili enasideniba u bolesnika s dokazanom mutacijom gena IDH1 i IDH2 (23).

U kontekstu TKMS, postupak kondicioniranja označava indukcijsku terapiju kojoj je cilj uništiti primateljevu koštanu srž i posljedično omogućiti dovoljnu razinu imunosupresije koja će podržati usađivanje infundiranih krvotvornih matičnih stanica, a ovisno o dobi i kondiciji primatelja, kondicioniranje može biti mijeloablativno (puni intenzitet, potpuno uništenje koštane srži) ili nemijeloablativno (niži intenzitet, nepotpuno uništenje koštane srži) (24).

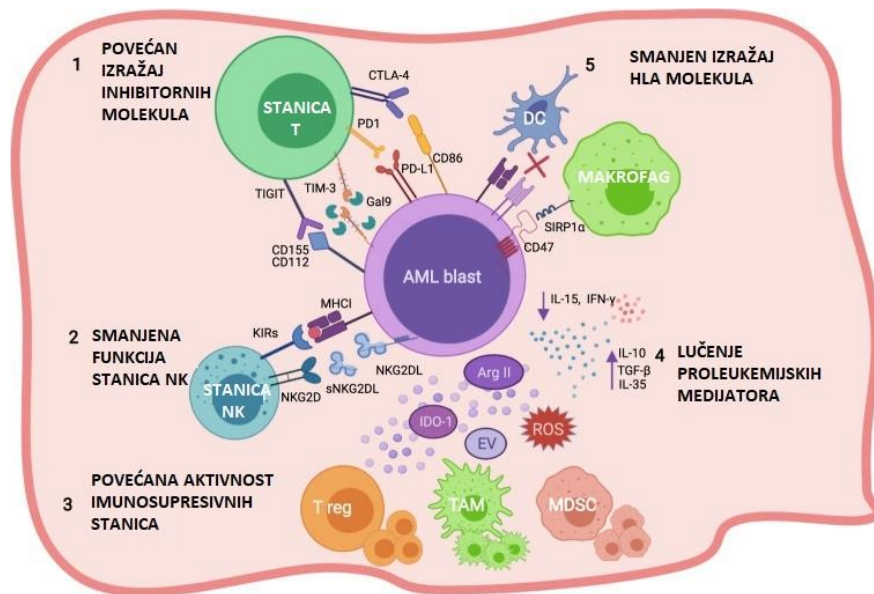
Morfologiju koštane srži potrebno je evaluirati nakon završetka indukcijske terapije kako bi se ustanovio stupanj eliminacije leukemijskih stanica. Sukladno odgovoru na terapiju, bolesnik može postići kompletnu remisiju, kompletnu remisiju s nepotpunim oporavkom neutrofila i trombocita, djelomičnu remisiju ili imati rezistentnu bolest. Cilj liječenja AML-a je postizanje kompletne remisije koja se definira nalazom manje od 5 posto blasta u aspiratu koštane srži uz odsutnost blasta u perifernoj krvi, odsustnost ekstramedularne bolesti, apsolutni broj neutrofila veći od  $1,0 \times 10^9/L$  i broj trombocita veći od  $100 \times 10^9/L$  (20).

Minimalna rezidualna bolest (MRD) označava mali broj malignih stanica koji se prilikom indukcije ne iskorijene, a njegova procjena se koristi za precizno utvrđivanje remisije, procjenu rizika od relapsa i ranu intervenciju ako dođe do relapsa (20). Ukoliko se nakon remisije ne primijeni daljnje liječenje, u gotovo svih bolesnika koji inicijalno postignu remisiju dolazi do recidiva osnovne bolesti, stoga je indicirano daljnje liječenje u obliku postremisijske terapije koja se sastoji od konsolidacijske terapije i terapije održavanja kojima je glavni cilj uklanjanje prisutne nedetektabilne bolesti i postizanje dugoročne kontrole.

Preduvjet za primjenu imunoterapije u indukciji ili održavanju remisije je odabir idealnog antigena koji nije izražen u zdravoj koštanoj srži ili ekstramedularnim stanicama, a izražen je na površini blasta i leukemijskih matičnih stanica (eng. leukemia stem cell, LSC) u većine bolesnika. Složena klonska pozadina, tendencija prilagođavanja leukemijskih stanica i posljedični bijeg od uništenja kako bolest napreduje znatno otežava izbor mete. Potencijalni antigeni se dijele u tri velike skupine: antigeni ograničeni na lozu (eng. lineage-restricted antigens, LRA), antigeni povezani s leukemijom (eng. leukemia-associated antigens, LAA) i antigeni specifični za leukemiju (eng. leukemia-specific antigens, LSA) (25). LRA, poput CD33 i CD123, su antigeni izraženi na površini leukemijskih blasta no nalaze se i na površini zdravih krvotvornih i nekrvotvornih stanica. Nalaze se ekstracelularno pa su dobra meta za terapiju temeljenu na protutijelima i stanicama CAR-T, no uz velik rizik od ozljede zdravog tkiva (25). S druge strane, LAA i LSA se često nalaze intracelularno pa su im za prezentaciju potrebne HLA (eng. human leukocyte antigene) molekule što u nekim slučajevima leukemijske stanice uspiju zaobići. WT1 je predstavnik LAA koji se vrlo intenzivno istražuje. LSA nastaju kao proteinski produkti mutiranih gena, poput NPM1 ili IDH1, u leukemijskim stanicama što ih, u teoriji, čini idealnim ciljnim antigenima specifičnim za AML (25).

## IMUNOPATOGENEZA AKUTNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE

AML stanice putem različitih mehanizama izbjegavaju i potiskuju imunosti sustav, a i obrnuto, osobito dugotrajna i intenzivna supresija imunostnog sustava vodi do povećanog rizika od razvoja AML-a što upućuje na to da aktivna bolest nastaje tek u onom trenutku kad je probijena imunostna obrana (26).



Slika 2. Promjene u imunostnom sustavu oboljelih od AML-a. Prevedeno i preuzeto iz Tettamanti i sur., 2022.

Leukemijski blasti pokazuju smanjen membranski izražaj molekula HLA regulacijom na genetskoj ili epigenetskoj razini čime je onemogućeno prepoznavanje leukemijskih klonova od strane CD4+ i CD8+ stanica T, što se negativno odražava na uspjeh TKMS (27).

Klinička istraživanja su utvrdila da u oboljelih od AML-a postoji niz abnormalnosti u populaciji stanica T, uključujući povećanje broja regulacijskih stanica T (Treg) (28), smanjenje broja pomagačkih stanica T (29) i općenito smanjenu aktivnost efektorskih stanica T. U kliničkoj studiji koja je uspoređivala razine stanica Treg u novooboljelih bolesnika s AML i dobno prilagođene zdrave kontrole utvrđeno je da je postotak stanica Treg u bolesnika viši nego u zdravih osoba i to značajno viši u koštanoj srži nego u perifernoj krvi (28). CD200 je membranski glikoprotein prekomjerno izražen na površini AML blasta, a njegovim vezanjem s receptorom na stanicama T povećava se broj regulacijskih, a smanjuje broj memorijskih stanica T (30).

Imunosne kontrolne točke su molekule izražene na površini stanica T, a uloga im je spriječiti prekomjernu aktivnost imunskog sustava i dokinuti upalni odgovor. Broj stanica T koje izražavaju inhibitorne molekule je viši u oboljelih od AML i povećava se s progresijom bolesti (31). Bolesnici koji uđu u relaps bolesti pokazuju drastično veći izražaj inhibitornih molekula, poput PDL-1 (eng. programmed cell death 1) od osoba kojima je tek dijagnosticirana AML u kojih se ovaj fenomen ne događa pa se može zaključiti da bi razlog navedenom mogao biti dugotrajna stimulacija imunskog sustava leukemijskim stanicama (32).

Izražaj površinskih receptora na AML blastima koji stupaju u interakciju sa stanicama T odgovoran je za supresiju stanica T. Tako je, na primjer, inhibitorni leukocitni imunoglobulinu sličan receptor B4 (eng. leukocyte immunoglobulin-like receptor B4, LILRB4) snažno negativno povezan s preživljenjem oboljelih. Taj je receptor izražen na monocitima i monocitnim blastima AML-a te potiče oslobađanje arginaze koja smanjuje proliferaciju efektorskih stanica T (33).

Blasti imaju sposobnost sekrecije faktora poput IL-10, IL-35, transformirajućeg faktora rasta- $\beta$  (engl. transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) i indolaminske 2,3-dioksidogene koji dovode do proliferacije i promocije stanica Treg. Citokinska neravnoteža dovodi do smanjene produkcije proupalnih interleukina, poput interleukina 15 i interferona- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), čime se dodatno smanjuje aktivnost efektorskih stanica T (27).

Blasti negativno utječu i na stvaranje imunskih sinapsi. Stanice T u osoba s AML-om pokazuju abnormalan obrazac aktivacije. Regulacija gena koji reguliraju polarizaciju stanice i aktinski citoskelet je različita u odnosu na zdrave osobe, pa unatoč tome što su zdrave stanice T sposobne stvoriti konjugate s blastima, poremećeno je i onemogućeno stvaranje imunskih sinapsi i daljnja unutarstanična signalizacija (34).

Bitnu ulogu u inhibiciji imunskog sustava od strane malignih tumora, ali i AML-a imaju nezrele mijeloidne prethodničke stanice poznate kao supresorske stanice mijeloidnog podrijetla (eng. myeloid-derived suppressor cells, MDSC) koje se novače iz koštane srži i potom nakupljaju u limfnim tkivima, krvi ili tumorima, a potiskuju urođeni stanicama T posredovan protutumorski odgovor. MDSC na svojoj površini izražavaju biljeg CD33, a dalje ovisno o redu kojem pripadaju i biljeg CD14 (monocitna linija) ili CD15 (neutrofilna linija) (27).

Mikrookruženje hematopoetskih matičnih stanica u koštanoj srži u zdravih ljudi regulira proliferaciju, samoobnavljanje, diferencijaciju i migraciju hematopoetskih stanica u svrhu održavanja homeostaze, dok u oboljelih od AML-a različitim mehanizmima potiče otpornost

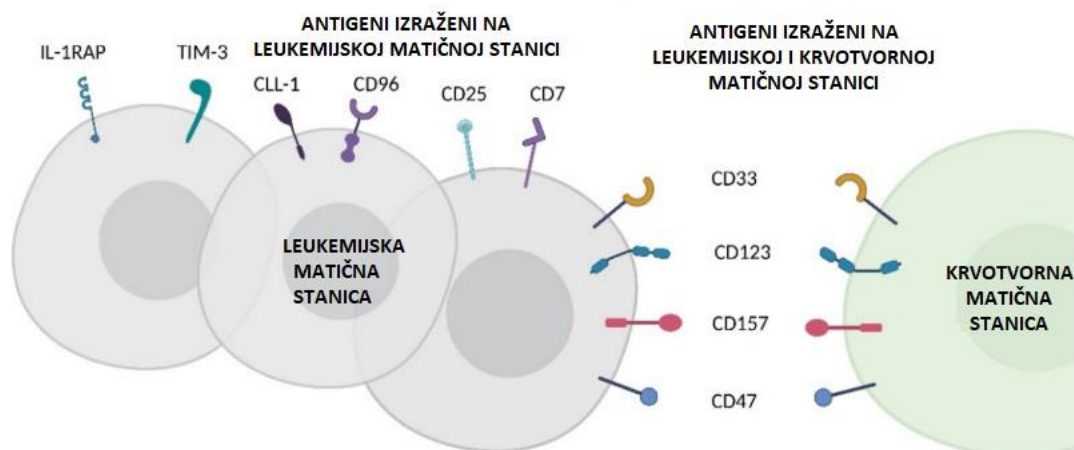


na kemoterapiju i protutumorski odgovor (27). Slično solidnim tumorima, u koštanoj srži oboljelih od AML-a postoji povećan broj malih krvnih žila i proangiogenih čimbenika, a smanjena količina antiangiogenih čimbenika što pogoduje rezistenciji na kemoterapiju (35). Mezenhimske stromalne stanice igraju ulogu u inhibiciji imunskog sustava u oboljelih od AML-a na više načina, a neki od njih su zaštita blasta od ubijanja putem stanica NK, indukcija stanica Treg i smanjena sekrecija proinflammatoryh citokina (27). Također i leukemijske stanice utječu na mikrookruženje u koštanoj srži uzrokujući promjene u energetske metabolizmu i otpuštajući štetne metabolite poput reaktivnih kisikovih radikala koji mijenjaju okoliš AML-a i omogućavaju napredovanje bolesti (27).

Zaključno, bitno je istaknuti kako leukemijske stanice utječu negativno na imunski okoliš modificirajući ga čime se potencira novačenje novih leukemijskih stanica te na taj način leukemijske stanice i sam okoliš blisko surađuju potičući jedan drugog u daljnjem razvijanju aktivne bolesti i stvaranju rezistentnijih oblika AML-a.

## LEUKEMIJSKE MATIČNE STANICE

Matične stanice su temeljna stepenica u hijerarhijskom sustavu stvaranja diferenciranih krvnih stanica - eritrocita, trombocita, neutrofila, eozinofila, bazofila, monocita, stanica T i stanica B, stanica NK i dendritičnih stanica. Tri osnovne značajke koje matičnim stanicama omogućuju održavanje hematopoeze su samoobnavljanje, zaustavljanje staničnog ciklusa i stvaranje usmjerenih prethodničkih stanica. Faktori transkripcije koji aktiviraju specifične genetske obrasce i čimbenici rasta koji potiču staničnu proliferaciju rade zajedno kako bi kontrolirali dinamičan, vrlo reguliran proces normalne hematopoeze, što dovodi do usmjernosti k određenoj liniji i terminalnoj diferencijaciji (36). LSC nastaje od zdrave hematopoetske matične stanice nizom genetskih promjena, a može se razviti na dva osnovna načina. U prvom slučaju krvotvorna matična stanica se mutacijom promijeni u LSC s visokim proliferacijskim potencijalom, a druga mogućnost nastaje kada usmjerena prethodnička stanica razvije sposobnost samoobnove (37). LSC pokazuju drugačija biološka svojstva i manju osjetljivost na terapiju od ostalih leukemijskih stanica. U stanju mirovanja su ključne za otpornost na citotoksične kemoterapeutike, a na taj proces utječu genetska podloga, epigenetske modifikacije, stanična signalizacija i izražaj ciklina u stanici. Izvor su rezidualne bolesti i njihova eliminacija je ključna kako bi se spriječio relaps i postiglo trajno izlječenje (38). Identificirani su antigeni izraženi na njihovoj površini čija bi blokada mogla značajno unaprijediti ishod liječenja oboljelih od AML-a. CD123 ( $\alpha$ -lanac receptora za interleukin 3), CD32 (receptor za Fc-ulomak protutijela IgG), CD45RA (receptor za tirozinsku fosfatazu), CD25 ( $\alpha$ -lanac receptora za interleukin 2), CLL-1, TIM3, CD33 i CD70 su neki od antigena izraženi na površini LSC-a koji se trenutno razmatraju u kliničkim istraživanjima s ciljem njezinog iskorjenjivanja (38).



Slike 3. Prikaz terapijski najznačajnijih antigena izraženih na leukemijskoj i krvotvornoj matičnoj stanici. Prevedeno i preuzeto iz Gurney i sur., 2021.

## IMUNOTERAPIJA U LIJEČENJU AML-a

### ALOGENIČNA TRANSPLANTACIJA KOŠTANE SRŽI KAO IMUNOTERAPIJA AML-a

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) je postupak u kojem se stanice koštane srži oboljele osobe zamijene zdravim stanicama darivatelja i jedina je terapijska opcija koja može dovesti do izlječenja bolesnika oboljelih od AML zahvaljujući učinku presatka protiv leukemije (engl. graft-versus-leukemia effect, GvL).

Ocem transplantacije krvotvornih matičnih stanica smatra se E. Donall Thomas koji je 1957. u *The New England Journal of Medicine* objavio rezultate istraživanja u kojem je šest bolesnika presadio koštanu srž, no samo je u dvoje došlo do prihvatanja presatka (39). Prvu TKMS u Hrvatskoj izveli su prof.dr.sc. Boris Labar i prim. dr. Vinko Bogdanić 1983. godine u Kliničkom bolničkom centru Zagreb (40).

Krvotvorne matične stanice mogu biti prikupljene na tri načina: iz koštane srži punkcijom i aspiracijom stražnjeg grebena zdjelične kosti, leukaferozom periferne krvi nakon primjene faktora stimulacije rasta granulocita ili iz krvi pupkovine prikupljene neposredno nakon rođenja. Provodila su se brojna klinička istraživanja koja su uspoređivala učinkovitost navedenih izvora krvotvornih stanica s oprečnim rezultatima (41). U kliničkim studijama je ustanovljeno da transplantat prikupljen iz periferne krvi ima brži hematološki oporavak, veći broj stanica T i veću incidenciju bolesti presatka protiv primatelja (eng. graft-versus-host disease, GvHD) (42,43). Danas se periferna krv češće koristi prilikom transplantacije krvotvornih matičnih stanica radi tehnički jednostavnije izvedbe i potencijalnog jačeg GvL učinka zbog većeg broja stanica T, dok se nasuprot tome aspiracija koštane srži općenito preferira u liječenju nemalignih bolesti (41).

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica provodi se intravenski kroz centralni venski kateter nakon kondicioniranja i primljene profilakse protiv niza infektivnih i neinfektivnih komplikacija. Potom se provjerava krvna slika na dnevnoj bazi te se utvrđuje prihvatanje nakon što u tri susljedna dana broj neutrofila iznosi  $0,5 \times 10^9 /L$ , a to u pravilu zahvaća raspon od 10 do 21 dan. Nakon presađivanja i ako zdravstveno stanje to dopušta, primatelj se otpušta i prati ambulantno. Bolesnici moraju ponovno primiti glavna cjepiva 6 do 12 mjeseci nakon TKMS (24).

Mjerenje kimerizma nakon transplantacije omogućuje definiranje udjela donorskih krvotvornih stanica u koštanoj srži primatelja, a izražava se kao omjer donorskih i primateljevih stanica u koštanoj srži. U idealnom slučaju postignut je stopostotni donorski kimerizam što znači da sve stanice potječu od donora. Razlikujemo još prolazni mješoviti kimerizam koji većinom prelazi u potpuni donorski kimerizam, stabilni mješoviti kimerizam kod kojeg udio primateljevih stanica ostaje konstantan i progresivni mješoviti kod kojeg se postotak primateljevih stanica povećava s vremenom. Na kimerizam značajno utječe odabir kemoterapije prilikom kondicioniranja, pa će kod manje intenzivnih oblika kemoterapije kimerizam biti manji (44).

Ovisno o donoru razlikujemo autolognu i alogeničnu transplantaciju. Autologna transplantacija se temelji na prikupljanju i krioprezervaciji vlastitih matičnih stanica te ponovnom infundiranju istih nakon liječenja kemoterapijom sa ili bez radioterapije. Glavna svrha autologne transplantacije je sprječavanje trajne aplazije koštane srži koja nastaje kao nuspojava kemoterapije dok glavni antitumorski učinak potječe od kemoterapije, te općenito nije valjani terapijski postupak za AML, no može se koristiti u slučaju prve kompletne remisije u bolesnika s niskim rizikom od relapsa i dokazanim izostankom MRD-a (45).

Alogenična transplantacija označava prikupljanje krvotvornih matičnih stanica podudarajućeg donora i njihovo infundiranje u cirkulaciju domaćina s krajnjim ciljem nastanjivanja u koštanoj srži. Odabir odgovarajućeg darivatelja je izuzetno bitan korak u predtransplantacijskoj obradi. MHC (eng. major histocompatibility complex) je segment ljudskog genoma koji se nalazi na kratkom kraku kromosoma 6 i lokacija je gena koji u ljudi kodiraju izrazito polimorfne molekule/antigene HLA (46). Svaka osoba posjeduje 2 seta pojedinih HLA molekula od kojih svaki set, odnosno haplotip, nasljeđuje od jednog roditelja, a HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR i HLA-DQ su najznačajniji lokusi (47). Identični blizanci posjeduju identične setove HLA molekula što ih čini idealnim donorima, dok je u slučaju njihova nedostatka HLA identičan sestra ili brat najbolji izbor. U slučaju da ne postoji identičan srodnik, u obzir se uzima HLA haploidentičan srodnik čija je prednost dostupnost jer velika većina primatelja ima potencijalnog haploidentičnog brata ili sestru. U slučaju da ništa od navedenog nije moguće, tada se traži nesrodan HLA podudaran darivatelj (47). Slabi histokompatibilni antigeni (eng. minor histocompatibility antigen, MiHA) su za HLA vezane molekule koje se razlikuju u aminokiselinskom slijedu između donora i primatelja zbog genetskih polimorfizama izvan lokusa HLA na kromosomu 6 (48). Većina slabih H-antigena je izražena na različitim stanicama čime dodatno utječu na pojavu GvHD-a. Međutim, postoje slabi H-antigeni izraženi pretežno

na malignim stanicama primatelja, a koje mogu prepoznati donorove stanice T u sklopu TKMS i posredovati reakciju GvL bez štetnog GvHD-a (48).

GvHD je patološko stanje koje nastaje kada transplantirane stanice darivatelja prepoznaju stanice domaćina kao strane i pokrenu imunosnu reakciju koja dovodi do oštećenja brojnih organskih sustava. Nasuprot, GvL u oboljelih od AML nastaje kada transplantirane stanice darivatelja prepoznaju maligne stanice te pokrenu imunosnu reakciju koja ih u konačnici uništi. U suštini radi se o dva ista događaja sa suprotnim krajnjim ciljevima, jednim kojeg želimo maksimalno izbjeći, a drugog kojeg želimo maksimalno potaknuti. Razne imunosne stanice igraju ulogu u oba događaja, poput stanica T, stanica B i stanica NK, no najsnažniji i klinički najrelevantniji antileukemijski učinak imaju stanice T koje prepoznaju maligne stanice primatelja, no nije poznato koji AML-antigeni pokreću i održavaju zaštitni GvL-odgovor donorskih stanica T (41).

Bolesnici koji su primili transplantat osiromašen stanicama T imaju višu incidenciju relapsa što pokazuje značaj donorskih stanica T u borbi protiv leukemijskih stanica. Manja incidencija relapsa je dokazana u bolesnika koji razviju akutni, kronični ili akutni i kronični GvHD u odnosu na bolesnike koji uopće ne razviju GvHD, što ukazuje na antileukemijski učinak GvHD-a i njegovu usku povezanost sa GvL-om (49).

Retrospektivna studija izvedena iz odraslih bolesnika koja je pokušavala utvrditi korelaciju između GvHD i GvL učinka u cijelom nizu hematoloških zloćudnih bolesti pokazala je snažnu povezanost GvHD-a s učinkom GvL-a u KML-u i ALL-u, a slabije u AML-u i MDS-u. To sugerira da se neki mehanizmi GvL-a razlikuju od GvHD-a, što pruža teoretsku mogućnost razdvajanja ova dva procesa (50).

Zaključno, prilikom primjene TKMS-a kao oblika imunoterapije u liječenju AML-a, nepodudarnost u lokusu HLA između davatelja i primatelja dovodi do tri glavna rezultata. Prvo, do odbacivanja presatka može doći kao rezultat imunosnog odgovora domaćina, što je ključno izbjeći jer je prihvaćanje nužno za razvitak GvL učinka. Drugo, imunosno kompetentne stanice u presatku mogu negativno reagirati na antigene u zdravim tkivima domaćina, što dovodi do GvHD-a i može biti fatalno neovisno o pojavi relapsa. Treće, razvoj GvHD-a i GvL-a snažno su povezani. Potrebne su strategije za odvajanje tih dvaju učinaka ako se GvHD želi minimizirati, a utjecaj GvL-a maksimalizirati (49).

## INFUZIJA DONORSKIH LIMFOCITA

Infuzija donorskih limfocita (eng. donor lymphocyte infusion, DLI) je postupak kojim se bolesniku infundiraju donorske imunokompetentne stanice koje prepoznaju promijenjene stanice primatelja i pokreću imunosni odgovor s ciljem eliminacije malignih stanica. Glavni medijatori DLI-a su donorske antigen-predočne stanice (eng. antigen presenting cells, APC), CD4+ pomagačke stanice T, CD8+ citotoksične stanice T, Treg i prirodnoubilačke (NK) koje uzrokuju GvL učinak i negativno djeluju na leukemijske stanice. Terapijska je opcija indicirana nakon provedene transplantacije matičnih stanica. Prvi put je primijenjena 1990. u troje bolesnika u relapsu kronične mijeloične leukemije nakon transplantacije pri čemu su svi postigli kompletnu hematološku i citogenetsku remisiju (51).

Postupak primjene DLI-a započinje leukaferozom periferne krvi donora i prikupljanjem limfocita, nakon čega se oni infundiraju bolesniku. U tijeku su klinička istraživanja koja ispituju modifikaciju cijelog DLI-a u smislu uklanjanja pojedinih tipova stanica ili genetsku modifikaciju pojedinačnih stanica, poput stanica CAR-T ili stanica CAR-NK koja bi omogućavala veću efikasnost uz manji rizik od nuspojava poput GvHD-a. Klinička istraživanja su pokazala da izuzimanje limfocita T  $\alpha\beta$  ili CD45RA+ limfocita dovodi do manje učestalost GvHD-a (52, 53).

DLI se ne bi trebao primjenjivati u prvih šest mjeseci od TKMS-a zbog visokog rizika od indukcije GvHD-a, pri čemu moguću ulogu imaju domaćinove APC koje se postupno zamjenjuju donorskim, no u slučaju leukemije s vrlo visokim rizikom od relapsa može se razmotriti opcija primjene DLI-a ubrzo nakon transplantacije (54). Također, DLI se ne bi trebala primjenjivati ako je došlo do ranog relapsa, aktivnog GvHD-a ili preboljenog teškog oblika GvHD-a u anamnezi, izražene citopenije i aktivne infekcije (54).

DLI se koristi za tri različite namjene: terapijski, profilaktički i preemtivno.

Terapijski se koristi u bolesnika u kojih je dokazan relaps ili progresija osnovne bolesti. Analizom periferne krvi bolesnika u relapsu nakon TKMS-a pokazala se iscrpljenost CD4+ i CD8+ stanica T s visokim razinama inhibitornih molekula PD-1 i antigena citotoksičnih limfocita-4 (eng. cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4). Zbog toga imunosne stanice imaju smanjenu sposobnost proliferacije i produkcije citokina, a bolesnici koji odgovore na DLI pokazuju obrat (smanjenje) iscrpljenosti limfocita i oporavak njihove funkcionalne sposobnosti (54). Bolesnici koji nakon dokazanog relapsa prime kemoterapiju i DLI imaju duže preživljenje,

manju incidenciju relapsa i višu stopu kompletne remisije nego oni koju su primili samo kemoterapiju (55).

Profilaktička upotreba DLI-a je indicirana u bolesnika koji imaju visoki rizik od relapsa bolesti nakon transplantacije, kao što su bolesnici s aktivnom bolesti za vrijeme transplantacije, nepovoljnom citogenetikom i molekularnim profilom ili bolesnici koji su primili transplantat osiromašen stanicama T (54). Provedena je retrospektivna analiza ishoda profilaktičke primjene infuzije limfocita u bolesnika s dijagnozom visokorizične AML i rezultati su uspoređeni sa ishodima kontrolne grupe koju su sačinjavali bolesnici sličnih karakteristika, no bez primitka DLI nakon TKMS te je primijećeno duže preživljenje u onih koji su primili DLI (56).

Preemptivno se DLI koristi u slučaju prisutnosti mješovitog kimerizma i postojanja rezidualne bolesti (54). Retrospektivno su analizirani bolesnici s AML-om od kojih je dio primio DLI preemptivno zbog dokazanog MRD-a, drugi dio terapijski zbog dokazanog relapsa, dok ostatak nije primio DLI nego su uključeni u studiju radi usporedbe. Pokazalo se kako su svi bolesnici koji su preemptivno dobili DLI odgovorili na terapiju i to s visokim jednogodišnjim preživljenjem, za razliku od ostale dvije skupine bolesnika čime se zaključilo da je preemptivni oblik DLI-a superiornija opcija liječenja (57).

Zaključno, DLI je terapijska opcija indicirana u bolesnika nakon TKMS-a, a može se primijeniti za tri namjene: profilaktički u slučaju visokog rizika od relapsa, preemptivno u slučaju nepostignutog potpunog kimerizma i postojanja rezidualne bolesti te terapijski u bolesnika u kojih je dokazan relaps ili progresija osnovne bolesti, a svoje djelovanje ostvaruje prvenstveno preko GvL učinka posredovanog stanicama T. Unatoč čestoj primjeni DLI-a, njezin potpuni potencijal još uvijek nije postignut te su brojna klinička istraživanja u tijeku s ciljem optimizacije doze i učinka.

## MONOKLONSKA PROTUTIJELA

Monoklonska protutijela su glikozilirane bjelančevine koje pripadaju obitelji imunoglobulina (Ig). Primjenjeni u svrhu imunoterapije, njihova uloga jest poticanje eliminacije tumorskih stanica nakon vezanja na ciljani antigen, inhibicija signalnih puteva ključnih za njihovu proliferaciju, privlačenje imunosnih efektorskih stanica ili isporuka kemoterapeutskih lijekova malignim stanicama (58). Američka agencija za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration, FDA) je 1997. odobrila Rituximab, prvo monoklonsko protutijelo korišteno u terapiji B-staničnih neoplazmi koje cilja biljeg CD20 izražen na većini normalnih i neoplastičnih stanica B, dok se danas koristi i za niz drugih indikacija od kojih većinu čine autoimune bolesti (59). Nepostojanje idealne antigenske mete koja bi mogla potpuno eliminirati leukemijske stanice, posebice one rezistentne na kemoterapiju, kao i ekstramedularne nuspojave monoklonskih antitijela zbog izražaja ciljanih antigena na zdravom tkivu dva su glavna problema u terapiji monoklonskim protutijelima (60). Do danas su sintetizirani brojni različiti oblici monoklonskih protutijela od kojih je većina u tijeku kliničkih ispitivanja. Osnovnu podjelu čine nekonjugirana, konjugirana s toksinima ili radioaktivnom česticom i višestruka bispecifična protutijela (60).

## NEKONJUGIRANA MONOKLONSKA PROTUTIJELA

Nekonjugirana monoklonska protutijela svoj antileukemijski učinak ostvaruju potenciranjem djelovanja adaptivne imunosti putem fagocitoze ovisnoj o protutijelima, stanične citotoksičnosti posredovane komplementom ili stanične citotoksičnosti ovisnoj o protutijelima (eng. antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (58).

Većina dosadašnjih istraživanja usmjerena pronalasku idealnog protutijela u terapiji bolesnika s AML-om temelji se na razvoju **anti-CD33** molekule zbog izražaja biljega CD33 na površini leukemijskih blasta u većine pedijatrijskih i odraslih bolesnika s AML-om. Nekonjugirana anti-CD33 protutijela se, do sada, nisu pokazala uspješnima u kliničkim istraživanjima. Lintuzumab je nekonjugirano monoklonsko IgG protutijelo usmjereno na CD33 molekulu. U kliničkoj studiji provedenoj 2005. godine na bolesnicima koji su bili u relapsu ili bolovali od primarno rezistentnog oblika AML-a nije zabilježeno duže preživljenje ili bolji odgovor na terapiju od onih koji su primali kemoterapiju koja se sastojala od etopozida, citarabina, mitoxantrona i lintuzumaba te onih koji su primali samo lintuzumab (61). Skoro 10 godina kasnije, isto



protutijelo ponovno u kliničkom ispitivanju koje su činili stariji ispitanici s neliječenim AML-om nije pokazalo bolje rezultate. Pri tome su svi bolesnici dobivali citarabin, dio i lintuzumab, a ostatak placebo. Medijan preživljenja bio je čak neznatno viši u skupini koja je dobivala placebo, a nuspojave povezane s infuzijom bile su značajno više u skupini koja je dobivala i lintuzumab (62). **BI836858** je nekonjugirano monoklonsko protutijelo humanog podrijetla kod kojeg su zamijenjene dvije aminokiseline u Fc-regiji što omogućuje vezanje većim afinitetom za Fc $\gamma$ RIIIa receptor na stanicama NK, a time i sporiju internalizaciju i dulje izraženu ADCC-reakciju usmjerenu prema CD33 pozitivnim blastima. Analози nukleozida, poput decitabina, pojačavaju anitumorska svojstva BI836858 *in vitro* povećanjem izražaja liganda na blastim za aktivirajući receptor prirodno ubilačke grupe 2D (eng. natural killer group 2D, NKG2D) i time pozitivno djeluje na ADCC posredovanu stanicama NK (63).

**Cusatuzumab** je monoklonsko protutijelo usmjereno na CD70, ligand čimbenika tumorske nekroze, a sprječava njegovo vezanje za CD27 receptor što bi izazvalo samoobnovu LSC-a. Pokusi *in vitro* i na životinjskim modelima smanjio je broj LSC-a potaknuvši njihovu proliferaciju. Također, hipometilirajući agensi pojačavaju izražaj CD70 na površini LSC čime djeluju sinergistički s cusatuzumabom kada se primjenjuju zajedno (64).

**Talacotuzumab** je protutijelo usmjereno na biljeg CD123, odnosno  $\alpha$ -lanac receptora za interleukin-3 koji je prekomjerno izražen na LSC i na leukemijskim blastima. U kliničkoj studiji koja je uključila starije bolesnike s AML-om neprikladne za intenzivnu kemoterapiju pokazalo se da skupina koja je dobivala kombinaciju decitabina i talacotuzumaba ima neznatno veći postotak postizanja kompletne remisije, dok je medijan preživljenja bio veći u skupini onih koji su primali samo decitabin (65).

## KONJUGIRANA MONOKLONSKA PROTUTIJELA

Konjugirana monoklonska protutijela su dizajnirana terapija sastavljena od specifičnog protutijela kombiniranog sa kemoterapeutskom ili radioaktivnom tvari koje se internaliziraju nakon vezanja za ciljni antigen te se potom u lizosomima odvajaju od konjugata oslobađajući citotoksičnu tvar odgovornu za staničnu smrt. Posebno su djelotvorni budući da povećavaju protutumorsku učinkovitost citotoksičnih lijekova ciljajući specifične tumorske mete, dok istovremeno smanjuju sistemsku izloženost i toksičnost (66).

**Gemtuzumab ozogamicin** (GO) je humanizirano mišje monoklonsko protutijelo kombinirano s derivatom citotoksičnog antibiotika kaliheamicina. Usmjereno je na molekulu CD33 izraženu

na blastima i na zdravim mijeloidnim stanicama zbog čega njegova primjena dovodi u bolesnika do duboke i produljene neutropenije i trombocitopenije. Stoga u bolesnika postoji visoki rizik za nastanak infekcija pa je stoga indicirana profilaksa protiv raznih infektivnih bolesti (15). FDA ga je odobrila 2000. godine za primjenu u bolesnika starijih od 60 godina koji nisu kandidati za intenzivnu kemoterapiju (67). Loš sigurnosni profil uz brojne nuspojave i slaba učinkovitost doveli su do povlačenja lijeka s tržišta. Od tada se provode brojne studije s ciljem optimizacije doze i postizanja povoljnog kliničkog učinka. Ključnom se pokazala studija koja je dokazala da dodatak nižih frakcioniranih doza GO standardnoj kemoterapiji bolesnicima s prethodno neliječenom *de novo* AML-om dovodi do boljeg ishoda liječenja bez povećanog rizika od nuspojava, zbog čega je 2017. godine vraćen na tržište (68). U tablici 4 dan je pregled nekolicine provedenih istraživanja primjene GO u kliničkoj praksi.

Tablica 4. Dio provedenih klinička ispitivanja s GO

LIJEK	DIJAGNOZA	DOB BOLESNIKA (GOD.)	BROJ BOLESNIKA	ODGOVOR	REFERENCA
GO + azacitidin	• AML relaps	> 18	50	CR+CRi: 24%	(69)
GO + kladribin + citarabin + mitoksantron hidroklorid + G-CSF	• <i>de novo</i> AML	19-80	66	CR+CRi: 87%	(70)
GO vs. suportivna terapija	• <i>de novo</i> AML	> 61	118	superiorniji rezultati liječenja s GO	(71)
GO + standardna kemoterapija	• <i>de novo</i> AML	0-29	532	CR: 88%	(72)

GO + standardna kemoterapija	<ul style="list-style-type: none"> <li>• de novo AML</li> <li>• AML povezan s terapijom</li> <li>• AML povezan s mijelodisplazijom</li> <li>• MLL</li> </ul>	djeca	232	smanjenje MRD-a	(73)
GO + standardna kemoterapija	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AML s preuredbom KMT2A</li> </ul>	djeca	215	značajno produljeno vrijeme bez relapsa	(74)

**Vadastuximab talirin** je kimerično (miš/čovjek) anti-CD33 protutijelo konjugirano s pirolobenzodiazepinskim dimerima. Pokazalo je kliničku aktivnost kao monoterapija i u kombinaciji s hipometilirajućim lijekovima, no sa značajnom hematološkom toksičnošću (75,76). Daljnja klinička ispitivanja su prekinuta zbog produljenog vremena potrebnog za oporavak neutrofila i povećanog smrtnog ishoda od infekcija (66).

**IMGN632** je konjugat anti-CD123 protutijela i DNK-alkilirajućeg citotoksičnog spoja. Kao monoterapija pokazao je odgovor u obliku kompletne i djelomične remisije u trećini ispitivanih bolesnika u kliničkoj studiji koja je uključila bolesnike u relapsu ili oboljele od refraktorne AML bez značajnijih nuspojava, ali i u drugoj kliničkoj studiji u kombinaciji s azacitidinom i venetoklaksom kao dio trojne terapije u starijih bolesnika i onih koji nisu kandidati za intenzivnu kemoterapiju (77,78).

**Tagraxofusp (SL-401)** je spoj humanog interleukina 3 i dijelova difterijskog toksina s citotoksičnim djelovanjem, a meta su mu stanice koje izražavaju biljeg CD123 koji je podjedinica receptora za interleukin 3. Radi se dakle, o fuzijskoj bjelančevini (nije protutijelo) koju je FDA odobrila za liječenje neoplazmi plazmacitodnih dendritičnih stanica. Pokazao se učinkovitim u liječenju AML-a, *de novo* i relapsa, ali i MDS-a u kombinaciji s azacitidinom, sa ili bez venetoklaksa (79).

**SGN-123A** je monoklonsko protutijelo konjugirano sa pirolobenzodiazepinom, molekulom koja svoje protutumorsko djelovanje temelji na umetanju u utore dvostruke uzvojnice DNK što aktivira odgovor stanice na oštećenje DNK, uzrokuje promjene u staničnom ciklusu i konačno

vodi u apoptozu malignu stanicu. *In vitro* i *in vivo* je pokazao snažnu antileukemijsku aktivnost, čak i prema blastima s nepovoljnim citogenetskim profilom (80).

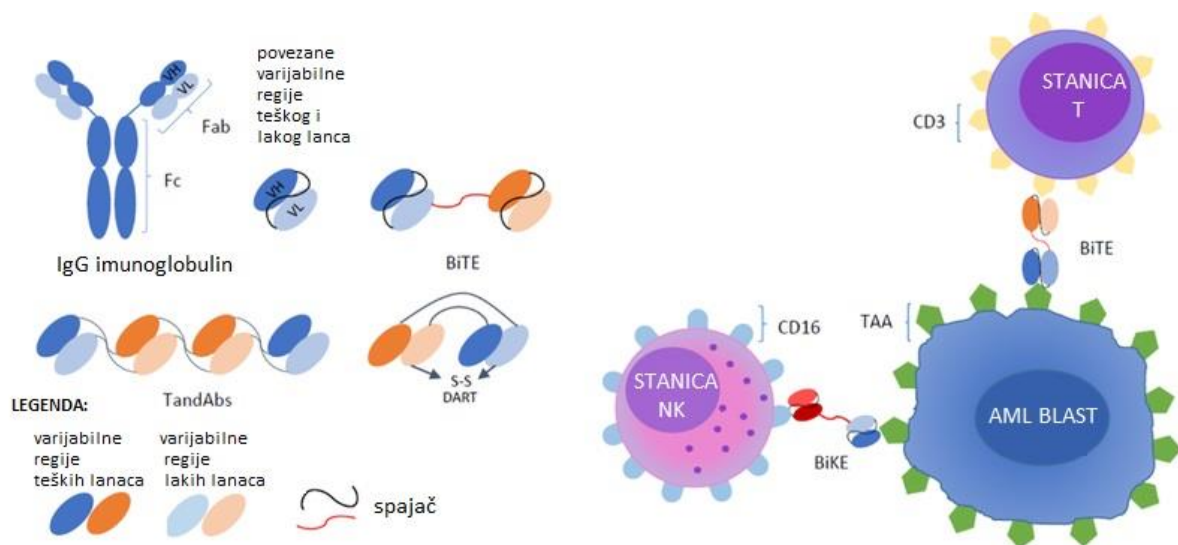
**CLT030** je protutijelo usmjereno na molekulu nalik lektinu tipa C (eng. C-type lectin-like molecule 1, CLL-1) koja je izražena na brojnim LSC i blastima, ali ne i na zdravim krvotvornim stanicama što omogućuje antileukemijski učinak bez oštećenja zdravog tkiva. Protutijelo je kovalentno vezano za supstancu toksičnu za DNK (D211, izokinolidin-benzodiazepine, IQB) koju otpušta tek nakon internalizacije i razgradnje u lizosomima blasta. *In vitro* inhibira stvaranje LSC, a *in vivo* pokazuje supresiju proliferacije malignih stanica (81).

CD45 je glikoprotein s djelovanjem tirozin-fosfataze izražen na površini svih hematopoetskih stanica s jezgrom i njihovih prekursora te ima regulatornu ulogu u proliferaciji, mitozu i diferencijaciji stanice (82). **131I-anti-CD45** protutijelo je testirano u kliničkoj studiji u starijih bolesnika s uznapredovalim AML-om zajedno s kondicioniranjem sniženog intenziteta fludarabinom i zračenjem prije transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Svi su bolesnici postigli kompletnu remisiju prije transplantacije (83). Slična studija je koristila anti-CD45 protutijelo konjugirano s radioaktivnim itrijem (<sup>90</sup>Y), kondicioniranje niskog intenziteta i zračenje cijelog tijela u starijih bolesnika. Većina bolesnika je postigla kompletnu remisiju, no u polovine bolesnika se za manje od dva mjeseca razvio relaps bolesti (84). Primjena <sup>131</sup>I zahtjeva izolaciju bolesnika za razliku od primjene <sup>90</sup>Y što značajno narušava kvalitetu života bolesnika liječenih radioaktivnim jodom (82).

## BISPECIFIČNA PROTUTIJELA

Bispecifična protutijela se simultano jednim svojim dijelom vežu za tumorsku stanicu, a drugim za signalnu molekulu CD3 karakterističnu za stanice T dovodeći do privlačenja tumorske stanice i stanice T s posljedičnom aktivacijom i razaranjem ciljne stanice. Na taj se način potiču bolesnikove stanice T na imunosnu reakciju bez potrebe za njihovom izolacijom i genskom modifikacijom za razliku od terapije stanicama CAR-T i stanicama NK (60). Bispecifična protutijela imaju niz prednosti u odnosu na nekonjugirana monoklonska protutijela i konjugate protutijela i lijeka. Osim što mogu prepoznavati i vezati se istovremeno na dva različita antigena, ne zahtijevaju internalizaciju za razliku od konjugata lijeka i protutijela što im omogućuje ciljanje raznolikijih antigena.

Sintetizirani su različiti sklopovi bispecifičnih protutijela, a u kliničkim istraživanjima koriste se BiTEs (eng. bispecific T-cell engagers), BiKEs (eng. bispecific killer-cell engagers), TriKe (eng. trispecific killer cell engager), DARTs (eng. dual-affinity retargeting antibodies) i TandAbs (eng. tandem diabodies) (60). Protutijelo BiTE sastoji se od dva jednolančana varijabilna fragmenta protutijela specifičnih za određene antigene povezana polipeptidnom vezom, a razlikuje se od protutijela BiKE po vezanju za ciljnu efektorsku stanicu koja nije stanica T kao u prvom slučaju, već CD16 stanica NK. Protutijela DART i TandAbs su vrlo slični protutijelima BiTE, s razlikom u načinu vezanja varijabilnih fragmenata (60).



Slika 4. Vrste bispecifičnih protutijela i način njihovog djelovanja. Prevedeno i preuzeto iz Guy i sur., 2018.

Postoji nekoliko bispecifičnih protutijela koja su jednim svojim krajem specifična za CD33, a drugim za CD3. **AMG330** je protutijelo BiTE koje je *in vitro* na uzorcima prikupljenih od bolesnika s AML-om i *in vivo* na životinjskim modelima pokazalo značajnu inhibiciju tumorskog rasta, dok je u kliničkom ispitivanju pokazao slabiji uspjeh zbog čega su sva klinička istraživanja zaustavljena (86,87). **AMV564** je protutijelo tipa TandAbs koje se zbog svoje molekularne mase teže izlučuje bubrezima i posljedično se dulje zadržava u tijelu te mu je poluvijek dulji. Pokazao je aktivnost u kombinaciji sa anti-PD1 inhibitorima u pretkliničkim istraživanjima na mišjem modelu AML-a, ali i u kliničkom istraživanju u bolesnika u relapsu i s refraktornom AML (88,89).

**Flotetuzumab** je protutijelo tipa DART specifično za CD3 i CD123, a pokazalo je poseban uspjeh u kliničkoj studiji koja je obuhvaćala bolesnike s p53 mutacijom koja je prediktor loše

prognoze (90). **Vibecotamab** i **APVO436**, koji se također vežu na CD3 i CD123, pokazali su uspješan odgovor u bolesnika u relapsu i s refraktornom AML (91,92). **SPM-2** je protutijelo koje ima vezno mjesto za tri mete: CD33, CD123 i CD16. Blasti skoro svih bolesnika s AML-om izražavaju barem jednu od CD33 ili CD123 molekula na svojoj površini, što znači da je SPM-2 protutijelo primjenjivo u skoro svih bolesnika s AML-om. Vezanjem SPM-2 protutijela na svoju treću metu, Fc-receptor CD16 izražen na stanicama NK potiče se ADCC. *In vitro* istraživanje na uzorcima oboljelih od AML-a pokazalo je obećavajuće rezultate u eliminaciji blasta, ali i LSC-a (93).

Od ostalih bispecifičnih protutijela koji se jednim svojim krajem vežu na CD3 molekulu razvijaju se i **MCLA-117** koji cilja CLEC12A, **HMBD004** koji se veže na CD47 i protutijela koja ciljaju WB1. CLEC12A antigen je izražen na blastima i LSC-u u visokom postotku oboljelih od AML, ali ne i na zdravim prethodničkim krvotvornim stanicama. MCLA-117 se pokazao uspješnim u pretkliničkim *in vitro* studijama na uzorcima koštane srži oboljelih od AML u usmjerivanju stanica T k ubijanju tumorskih stanica i LSC-a štedeći pri tome zdravu koštanu srž i njezin potencijal obnove (94). **AMG 427** je BiTE specifičan za FLT3 i CD3. Pokazao je dobre rezultate u pretkliničkim ispitivanjima *in vitro* te na majmunskim i mišjim modelima *in vivo*, posebice uz blokadu PD-1 receptora jer se primijetio njihov pojačani izražaj nakon početka terapije (95). U pretkliničkom istraživanju dokazana je i učinkovitost *in vitro* i na mišjim modelima BiTE protutijela usmjerenog protiv unutarstaničnog WB-1 izraženog u sklopu HLA molekula na površini AML blasta (96).

Zaključno, trenutno su u tijeku klinička ispitivanja velikog broja različitih monoklonskih protutijela u liječenju AML-a. Pripravci kojima se utvrđuje učinkovitost su nekonjugirana monoklonska protutijela, monoklonska protutijela konjugirana s citotoksičnim lijekovima i bispecifična protutijela. Idealni antigen i savršeno konstruirano protutijelo koje bi u kombinaciji osiguravalo dugotrajnu remisiju i samim time izlječenje još uvijek nije identificirano. GO je najčešće istraživano monoklonsko protutijelo koje se najviše približilo navedenom cilju te se danas redovito koristi, no potrebna su daljnja istraživanja radi unaprijeđenja ishoda liječenja oboljelih od AML.

## **BLOKADA KONTROLNIH TOČAKA**

Imunosne kontrolne točke su negativni regulatori imunskog sustava, suprimiraju aktivnost stanica T i time dokidaju aktivnost imunskog sustava što ih čini bitnim sudionikom fizioloških mehanizama koji sprječavaju autoreaktivnost, ali i uništenje tumorskih stanica. Inhibitori kontrolnih točaka (eng. checkpoint inhibitors) inhibiraju inhibični signal čime se postiže aktivacija imunskog sustava i, u teoriji, predstavljaju učinkovitu terapijsku opciju u liječenju AML-a.

Kontakt stanica T s antigenima u sklopu MHC kompleksa na APC osigurava specifičnost njihovog odgovora, no njihova potpuna aktivacija zahtjeva više od jednog stimulacijskog signala. Potreban je dodatni poticaj (kostimulacija) u obliku vezanja B7-1 (CD80) i B7-2 (CD86) na APC s CD28 molekulama na stanicama T, a taj tzv. drugi signal omogućuje njihovu proliferaciju, povećanje energetskeg metabolizma i povećanu proizvodnju čimbenika rasta poput interleukina-2 (97).

Hipometilirajući lijekovi, poput azacitidina i decitabina, standard su u liječenju brojnih hematoloških neoplazmi. Dokazan je veći izražaj CTLA-4, PD-1, PDL-1 i PDL-2 na CD34 stanicama izoliranih iz oboljelih od MDS-a, AML-a i mijelomonocitne leukemije te liječenih hipometilirajućim lijekovima što bi mogao biti jedan od načina pomoću kojeg se leukemijske stanice održavaju u organizmu unatoč intenzivnom liječenju. Stoga se može zaključiti da bi kombinirana primjena hipometilirajućih lijekova i inhibitora imunskih točaka mogla biti posebno korisna (98).

CTLA-4, odnosno CD152, proteinski je receptor koji se nalazi na površini CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica T. On je homolog molekule CD28, ali s potpuno suprotnom ulogom. Njegova uloga je prvenstveno inhibična, budući da suprimira aktivnost stanica T i smanjuje imunski odgovor vezanjem na ligand B7. Njegov izražaj je reguliran stupnjem aktivnosti stanica T i citokinima kao što su IL-2 i IFN- $\gamma$  (97). Izražaj molekula CTLA-4 na površini stanica T u stanju mirovanja je vrlo niska, a povećava se nakon njihove aktivacije (99). Pokazalo se da B7-1 ima veći afinitet za vezanje CTLA-4 u odnosu na CD28, dok B7-2 ne pokazuje toliku razliku (100). U naivnim stanicama T CTLA-4 se uglavnom nalazi intracelularno. Nakon poticaja dolazi do porasta unutarstanične koncentracije kalcija i egzocitoze vezikula koje sadržavaju CTLA-4 te njihov smještaj na površini stanica T (101). Za razliku od efektorskih stanica T, na površini

regulacijskih stanica T postoji konstitutivni izražaj CTLA-4 čije vezanje za ligand potiče aktivnost regulacijskih stanica T, a to je ključno za toleranciju na vlastito i sprječavanje raznih autoimunih bolesti (102). Monoklonsko protutijelo **ipilimumab**, predstavnik CTLA-4 inhibitora, pokazao je slabu kliničku aktivnost u bolesnika u relapsu i s refraktornom AML (103). S druge strane, dodatak decitabina ipilimumabu daje bolje rezultate u postizanju remisije u tih bolesnika, kao i bolesnika s refraktornim MDS-om. Zanimljivo, uspoređujući dvije skupine bolesnika uočeno je da bolji klinički odgovor na kombiniranu terapiju decitabinom i ipilimumabom postoji i u onih koji nisu primili TKMS, što upućujući na moguće nepostojanje potrebe za TKMS prije korištenja navedene kombinacije (104).

PD-1 je inhibitorni protein izražen na stanicama imunskog sustava poput stanica T, stanica B i stanica NK. Veže se na PD-L1 (poznat i kao B7-H1), ligand koji je izražen na stanicama brojnih tkiva, i na PD-L2 (također poznat kao B7-H2) koji je više ograničen na krvotvorne stanice. Regulacijom aktivnosti stanica T, odnosno pokretanjem apoptoze specifičnih stanica T i inhibicijom apoptoze regulacijskih stanica T, PD-1 je neophodan za utišavanje imunosne reakcije i poticanje tolerancije na vlastito. Vezanje PD-1 inhibira proliferaciju stanica T, smanjuje stvaranje interferona  $\gamma$  (IFN), čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) i interleukina-2 (105). Jedna od ključnih razlika u aktivnosti dva najpoznatija i najistraženija inhibitora kontrolnih točaka je to što CTLA-4 ima bitnu ulogu tijekom rane indukcije imunosne tolerancije u sekundarnom limfnom tkivu, dok PD-1 u njezinom održavanju u perifernim tkivima (106).

U jednoj od kliničkih studija anti-PD1 monoklonsko protutijelo **nivolumab** je kombiniran s idarubicinom i citarabinom u bolesnika s *de novo* AML-om i MDS-om visokog rizika kako bi se procijenila učinkovitost nivolumaba kao prve terapijske opcije te su pokazani obećavajući rezultati. Duljina preživljenja u bolesnika u kojih je nakon postizanja remisije učinjena TKMS i onih koji su nakon postizanja remisije nastavili dobivati kombinaciju idarubicina, citarabina i nivolumaba bez TKMS je bila otprilike jednaka što potencijalno upućuje na obnovu antileukemijskog učinka imunskog sustava od strane nivolumaba (107). Također, nivolumab je testiran u kliničkoj studiji i kao terapija održavanja u bolesnika s visokorizičnom AML. Pokazao je relativno slabo produljenje trajanja remisije, ali ipak kao dobra terapijska opcija u bolesnika koji nisu kandidati za TKMS (108). Kombinacija nivolumaba (PD-1 inhibitor) i azacitidina je pokazala obećavajuće rezultate u kliničkoj studiji u bolesnika u relapsu i s refraktornom AML. Također, utvrđen je povećani izražaj CTLA-4 na CD4+ i CD8+ stanicama T u bolesnika koji nisu odgovorili na terapiju u usporedbi s onima koji su odgovorili, što



sugerira prekomjerni izražaj CTLA-4 kao potencijalni mehanizam otpornosti na blokadu PD-1 (109). Navedeno je potaknulo iste autore da organiziraju novu kohortu bolesnika po istim kriterijima kao i u prethodnom istraživanju, koji su uz dvojnu terapiju dodatno primali i ipilimumab, CTLA-4 inhibitor. Pokazalo se da trojna terapija ima bolji odgovor od kombinacije azacitidina i nivolumaba (110).

U drugoj kliničkoj studiji procijenjena je učinkovitost **pembrolizumaba** (također anti-PD-1 protutijela) u kombinaciji s azacitidinom i s decitabinom. Obje kombinacije su pokazale sličan medijan preživljenja i sigurnost uz dobru podnošljivost u relapsu i refraktornoj AML, dok je klinička aktivnost kombinacije s azacitidinom posebno istančana u novodijagnosticiranih starijih bolesnika (111,112). Također, ispitana je učinkovitost blokade imunskih kontrolnih točaka s pembrolizumabom nakon intenzivne kemoterapije. Utvrđena je podnošljivost i ohrabrujuća klinička aktivnost pembrolizumaba nakon visokih doza citarabina osobito u refraktornoj AML i kod bolesnika koji su primili navedeno liječenje kao prvu terapiju spašavanja (113). Retrospektivno je uspoređena duljina preživljenja u bolesnika koji su nakon indukcije citarabinom primali pembrolizumab i potom pristupili TKMS te onih bolesnika koji nisu primali pembrolizumab prije TKMS. Jednogodišnje preživljenje je bilo slično u obje ispitivane skupine, dok je smrtnost u prvih 100 dana bila nešto viša u skupini koja nije primala pembrolizumab (114).

**Spartalizumab** je još jedno monoklonsko protutijelo koje se veže na PD-1 i trenutno je u fazi kliničkog ispitivanja.

PD-L1 inhibitori do danas nisu pokazali kliničku aktivnost u liječenju AML-a. Klinička studija koja je uspoređivala učinak kombinacije azacitidina i **durvalumaba** (PD-L1 inhibitor) i učinak terapije samo azacitidinom u bolesnika s AML-om nije pokazala značajnu razliku u odgovoru i preživljenju (115).

CD47 je kontrolna točka karakteristična za makrofage. Vežanje s receptorom SIRP $\alpha$  izraženim na fagocitima inhibira njihovu funkciju te je pretpostavka da povećani izražaj CD47 u zloćudnih bolesti pozitivno utječe na širenje i razvoj tumora. **Magrolimab** je humanizirano IgG4 anti-CD47 protutijelo. Bolesnici s dijagnozom AML-a i MSD-a koji su liječeni kombinacijom magrolimaba i azacitidina u kliničkom ispitivanju pokazali su dobar odgovor na terapiju, a posebice u eliminaciji LSC. Također, izuzetno dobar odgovor je postignut u bolesnika s

mutacijom TP53 i time lošom prognozom (116). Liječenje trojnom terapijom koja se sastoji od azacitidina, venetoklaksa i magrolimaba u novodijagnosticiranih bolesnika koji nisu kandidati za intenzivnu kemoterapiju je polučilo odličan uspjeh u kliničkoj studiji (117). **Evorpaccept** je anti-CD47 monoklonsko protutijelo koje se tek počelo klinički ispitivati, a prvi rezultati pokazuju antileukemijski učinak kada se primjene u kombinaciji s azacitidinom i venetoklaksom (118). **Lemzoparlimab**, također CD47-inhibitor se u prvim rezultatima kliničke studije pokazao kao sigurna terapijska opcija (119).

**Sabatolimab** je humanizirano protutijelo specifično za TIM-3 (eng. T-cell immunoglobulin and mucin domain 3). TIM-3 predstavlja imunosnu nadzornu točku i izražavaju ga normalne krvotvorne i leukemijske stanice. Njegova blokada dovodi do povećane citotoksične aktivnosti stanica T, proizvodnje citokina i fagocitoze stanica koje izražavaju TIM-3, čime se postiže istovremeno direktni antileukemijski učinak, ali i modulacija te aktivacija imunosnog sustava (120). Lijek je pokazao antileukemijski učinak u kombinaciji s hipometilirajućim lijekovima u kliničkoj studiji u bolesnika s AML-om i visokorizičnim MDS-om (121).

LAG3 (eng. lymphocyte activating 3) je imunosna nadzorna točka prisutna na površini stanica T i stanica NK te se u fiziološkim uvjetima njegov izražaj na površini stanica T povećava s duljinom trajanja njihove stimulacije. Trajna aktivacija stanica T u okruženju kronične upale ili tumorskom okruženju rezultira trajnim izražajem LAG3 molekula na stanicama T što rezultira njihovom disfunkcijom (122). **Relatlimab**, monoklonsko protutijelo koje cilja LAG3 molekulu, trenutno je u fazi kliničkog istraživanja.

U zaključku, inhibitori kontrolnih točaka su skupina lijekova koji se aktivno klinički istražuju u liječenju oboljelih od AML-a, a temelje se na inhibiciji inhibitornih signala koji su fiziološki način borbe protiv prekomjernog upalnog odgovora. CTLA-4 inhibitori (ipilimumab) i PD-1 inhibitori (nivolumab, pembrolizumab, spartalizumab) su najčešće istraživani u ovoj skupini lijekova, dok PD-L1 (durvalumab) do sad nije pokazao kliničku koristi. Od ostalih se aktivno istražuju CD47-inhibitori (magrolibom, evorpaccept i lemzoparlimab), TIM-3 inhibitor (sabatolimab) i LAG3 inhibitor (relatlimab), a dosadašnji rezultati su pružili nadu u nastavak ispitivanja.

## STANIČNA TERAPIJA

### STANICE CAR-T

Stanice T su ključ uništenja premalignih i malignih stanica tijekom stanično posredovanih imunskih odgovora, a njihova smanjena funkcionalnost pogoduje malignoj proliferaciji. Terapija stanicama CAR-T označava opciju liječenja u kojoj se koriste stanice T obogaćene sintetskim receptorom specifičnim za određeni antigen, a cilj im je doskočiti problemu smanjene reaktivnosti bolesnikova imunskog sustava i posljedičnom smanjenom prepoznavanju tumorskih antigena (123). FDA je trenutno odobrila upotrebu šest CAR-T terapija, uglavnom u bolesnika oboljelih od multiplog mijeloma i B-staničnih limfoma, dok je u kontekstu liječenja AML-a primjena stanica CAR-T još u svom začetku.

CAR su sintetski receptori sastavljeni od 4 glavne komponente: izvanstaničnog dijela koji veže specifičan antigen, zglobne regije, transmembranskog dijela i unutarstaničnog signalnog dijela. Svrha im je pokrenuti stanice T da identificiraju i unište određene stanice koje prekomjerno izražavaju određeni antigen (123).

Postupak se sastoji od prikupljanja pacijentovih bolesnikovih vlastitih stanica T iz krvi i njihove genetske modifikacije koja dovodi do izražaja sintetskog receptora na površini koji je zaslužan za prepoznavanje TAA. Nakon što se umnože u staničnoj kulturi *in vitro* do veličine od nekoliko milijardi, stanice CAR-T se ubrizgavaju natrag u krvotok bolesnika pa se na taj način omogućava imunskom sustavu bolesnika prepoznavanje i uništenje tumorskih stanica. TAA prekomjerno izraženi na tumorima također imaju, doduše značajno niži izražaj i na zdravim stanicama te je kao rezultat toga primjena stanica CAR-T ograničena rizikom od toksičnosti (124).

U nekih bolesnika dolazi do značajnih nuspojava, uključujući simptome sindroma otpuštanja citokina s vrućicom, hipotenzijom, promijenjenim mentalnim stanjem i konvulzijama, dok neki od pacijenata zahtijevaju intenzivnu njegu (123).

U tijeku su brojna pretklinička i klinička istraživanja kojima je cilj utvrditi idealan antigen za terapiju stanicama CAR-T. Mutacija u genu za FLT3 je jedna od najčešćih mutacija u bolesnika s AML-om, a uz to je povezana i s lošom prognozom. FLT3, odnosno CD135, tirozinska je kinaza izražena na brojnim blastima oboljelih od AML. Stanice CAR-T specifične za FLT3 pokazale su obećavajuće rezultate na leukemijskim stanicama *in vitro* i na mišjem modelu s kseongraftom *in vivo* (125). U pretkliničkim istraživanjima stanice CAR-T usmjerene na CD33

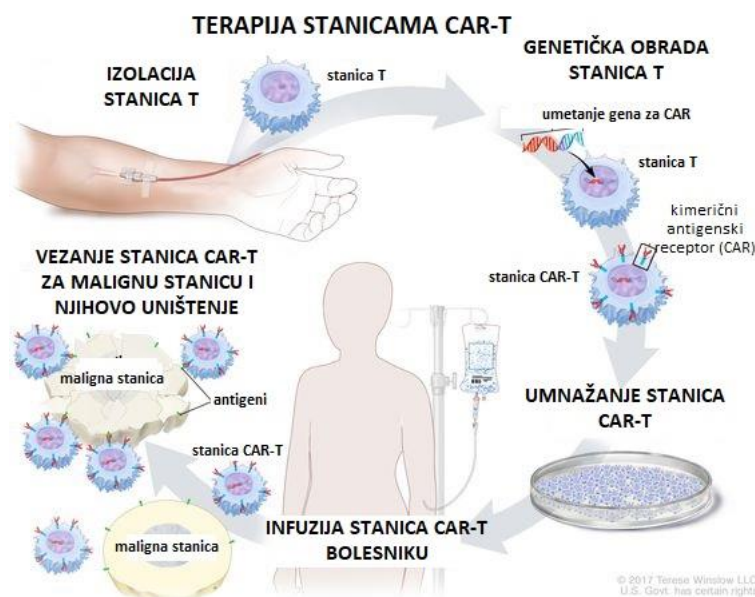
antigen su se pokazale uspješnim na leukemijskim stanicama *in vitro*, ali i na AML ksenograftu (126). B7-H3 tumorski je antigen koji se, osim u AML, nalazi u raznim tumorima, no vrlo malo ili uopće nije izražen na zdravim tkivima. To je koreceptor je koji pripada obitelji B7 kostimulacijskih molekula i prisutan je na blastima u značajnom broju bolesnika s AML-om. Stanice CAR-T usmjerene na ovaj antigen pokazale su kontrolu tumorskog rasta *in vitro* i *in vivo* na mišjem modelu (127).

Stanice CAR-T usmjerene protiv folatnog receptora  $\beta$ , stanice CAR-T koje se vežu na peptide predočene u kontekstu HLA-molekula podrijetlom od unutarstaničnog onkoproteina WT1, stanice CAR-T koje ciljaju CD70 molekule prisutne na većini blasta u bolesnika s AML-om sa slabim izražajem na normalnom tkivu, kao i stanice CAR-T usmjerene protiv CD7 molekule izražene na blastima i malignim progenitorskim stanicama također su pokazale ohrabrujuće rezultate u kulturi leukemijskih stanica *in vitro* i u humaniziranim mišjim modelima kseongrafta *in vivo* (128–131).

CD38 je antigen izražen u dijela oboljelih od AML, a u kliničkom okruženju anti-CD38 stanice CAR-T su pokazale uspjeh u bolesnika u relapsu AML-a nakon TKMS (132).

CLL-1 (engl. C-type lectin-like molecule-1) je izražen na površini stanica oboljelih od AML-a i na zdravim granulocitima. Anti-CLL-1 CAR-T stanična terapija je pokazala pozitivan učinak i podnošljivu sigurnost u kliničkom ispitivanju u bolesnika u relapsu i s refraktornim AML-om. TKMS mogla bi spriječiti dugotrajnu agranulocitozu uzrokovanu blokadom CLL-1 (133).

Trenutno je u tijeku preko stotinu kliničkih ispitivanja stanica CAR-T. Unatoč razvoju svih navedenih stanica CAR-T i njihovom potencijalu u kliničkom okruženju, niti ijedan pripravak nije pokazao značajan uspjeh u liječenju AML-a, ponajviše zbog nuspojava poput sindroma otpuštanja citokina i GvHD-a te bi stoga stanice CAR-NK mogle potencijalno biti terapija izbora zbog bolje kontrole bolesti i manje toksičnosti (1).



Slika 5. Primjena stanica CAR-T. Prevedeno i preuzeto iz National cancer institute.

## STANICE NK

Stanice NK čine otprilike 10% cirkulirajućih limfocita u ljudi. Za razliku od stanica T, njihova aktivacija nije antigen-specifična već potaknuta brojnim aktivirajućim i inhibirajućim receptorima. U fiziološkim uvjetima, stanice NK cirkuliraju perifernom krvi u latentnom stanju i ovisno o signalu koji potakne vezanje liganda za receptor, dolazi do inhibicije njihove aktivnosti u susretu sa zdravim tkivom čime se sprječava autodestrukcija ili do njihove aktivacije u susretu s vlastitim promijenjenim, malignim ili stranim stanicama što na posljeticu dovode do njihove apoptoze (135). Aktivirane stanice NK djeluju na maligne klonove posredno i neposredno. Posjeduju direktnu citolitičku aktivnost koju ostvaruju putem degranulacije uz otpuštanje tvari kao što su perforini i granzimi, ali i putem molekula poput čimbenika tumorske nekroze koji induciraju apoptozu ciljane stanice, dok s druge strane aktivirane stanice NK stvaraju brojne citokine koji snažno aktiviraju imunski sustav i mobiliziraju ostale izvršne stanice u borbi protiv tumora (136).

Djelovanje stanica NK trenutno je najčešće vezana uz primjenu monoklonskih protutijela koja povećavaju njihovu aktivnost putem ADCC. **Lirilumab** je monoklonalno protutijelo koje se veže na jednu vrstu KIR (eng. killer inhibitory receptor) molekula te blokira ovaj inhibični receptor čime se povećava aktivnost stanica NK u vidu otpuštanja toksičnih granula i

protuupalnih citokina protiv leukemijskih blasta. Lirilumab, monoklonalno anti-KIR protutijelo nije pokazalo učinkovitost u kliničkoj studiji kao terapija održavanja u starijih bolesnika, a klinička studija koja je ispitala učinkovitost kombinacije lirilumaba i azacitidina u liječenju relapsa ili refratorne AML je prekinuta zbog slabog kliničkog odgovora (137,138). **IPH2101**, monoklonsko protutijelo koje se također veže na KIR-receptor je u kliničkoj studiji pokazalo da povećava ukupno preživljenje i preživljenje bez relapsa uz izostanak značajnijih nuspojava u oboljelih od AML u kompletnoj remisiji (139).

Druga opcija vezana uz primjenu stanica NK u terapiji AML-a odnosi se na izolaciju stanica NK, njihovo pročišćavanje i genetsku modifikaciju kako bi izražavale receptor CAR ili na stimulaciju citokinima koji uzrokuju njihovu proliferaciju i samim time povećanje broja efektorskih stanica NK koje nakon infuzije u bolesnika imaju pojačan citotoksični, odnosno GvL učinak (135). Mogu se koristiti autologne stanice NK čija je izvedba tehnički jednostavnija ili alogične koji pokazuje bolju imunosnu reakciju najviše zbog nepodudarnosti poklapanja u KIR-ligandima između primatelja i darivatelja (60). U kliničkoj studiji nakon TKMS broj donorskih stanica NK je vrlo brzo rastao, a većina ih je proizvodila IL-10. Broj stanica NK pokazao se obrnuto proporcionalnim s incidencijom i stupnjem razvoja GVHD-a, a pretpostavlja se da u tome ključnu ulogu ima IL-10 te navedeno ide u prilog hipotezi da za razliku od stanica T, stanice NK ne izazivaju GvHD (140).

CAR-NK stanice su varijanta genetski modificiranih stanica NK koje kombiniraju prednosti CAR-receptora i stanica NK u vidu smanjenja ili odsutnosti sindroma otpuštanja citokina i GvHD-a. *In vitro* i u mišjem modelu CAR-NK anti-CD33 stanice pokazale su antileukemijski učinak, dok se u ljudi nije dokazala klinička aktivnost (141,142).

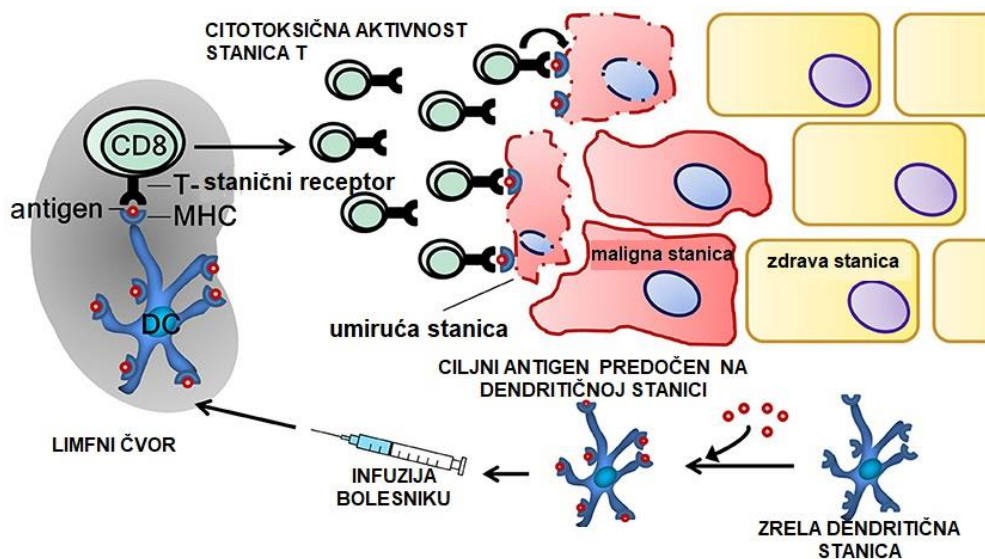
## CJEPIVA U AKUTNOJ MIJELOIČNOJ LEUKEMIJI

Cijepljenje označava postupak unošenja imunogene tvari u organizam koja aktivira imunosti sustav i na posljetku dovede do stvaranja specifične imunosti. U liječenju AML-a su definirana dva pristupa stvaranju antileukemijskih cjepiva.

Prva opcija je upotreba antigena u obliku peptidnih cjepiva. Antigeni korišteni u cjepivima su Wilmsov tumor 1 (WT1), proteinaza-3 (eng. proteinase-3, PR3), preferirano eksprimirani antigen melanoma (eng. preferentially expressed antigen of melanoma, PRAME) i receptor za pokretljivost posredovanu hijaluronskom kiselinom (eng. receptor for hyaluronic acid mediated motility, RHAMM) (4). Najveći broj kliničkih istraživanja odnosi se na cjepiva temeljena na antigenu WT1 koji je prekomjerno izražen u velikom broju bolesnika s AML, a služi i kao prognostički faktor jer je viši izražaj povezan s težim postizanjem kompletne remisije (143). U jednoj od kliničkih studija pokazano je da je cjepivo koje sadržava WT1-antigen uspješno potaknuto razvoj specifičnih citotoksičnih stanica T i značajno smanjiti tumorske mase u solidnih tumora, ali i u nekih oboljelih od AML-a smanjiti broj blasta i izražaj WT1 bez značajnijih nuspojava (144). Retrospektivna analiza tri slučaja u kojima su bolesnici nakon TKMS više od osam godina dobivali cjepivo temeljeno na WT1-antigenu pokazala je da se razine WT1 mRNA kao mjera MRD nalaze na nedetektabilnim razinama što sugerira potencijalno potpuno izlječenje navedenom terapijom (145). Peptidno cjepivo temeljeno na RHAMM antigenu prisutnom na površini blasta u velikom postotku ljudi oboljelih od AML nije polučilo pretjeran uspjeh u kliničkoj studiji (146).

Pored peptidnih cjepiva, druga mogućnost je primjena cjepiva s dendritičnim stanicama (eng. dendritic cell, DC) koje su prvi korak u konačnom uništenju stranih antigena, a djelovanje im se temelji na predočavanju antigena stanicama T u sklopu MHC i otpuštanju citokina koji privlače i aktiviraju stanice NK (4). Najčešća primjena navedenih cjepiva je u prevenciji relapsa u bolesnika s MRD-om, a posebice u bolesnika nepodobnih za intenzivniju terapiju (4). Mogu biti uzgojene iz bolesnikovih monocita ili leukemijskih stanica. Unatoč prednosti dendritičnih stanica uzgojenih iz leukemijskih u konstitutivnom izražaju TAA, dendritične stanica podrijetlom od monocita su uspješnije u aktivaciji autolognih stanica T specifičnih za leukemiju (147). Primjena dendritičnih stanica podrijetlom od monocita bolesnika zahtjeva prethodnu obradu kako bi mogle izražavati TAA i potaknuti aktivaciju imunostnog sustava. Prethodna obrada se temelji na „punjenju“ dendritične stanice antigenom kojeg će ona kasnije

preraditi i predočiti na svojoj površini, a za to postoji više načina. Elektroporacija mRNA je tehnika koja se koristi kod stvaranja cjepiva s dendritičnim stanicama koje izražavaju WT1-antigen, a temelji se na primjeni električnog impulsa koji učini staničnu membranu dendritične stanice kratkotrajno propusnom i omogući ulazak mRNA koja se potom prepisuje u protein čije fragmente na poslijetku DC predoči u kontekstu MHC na svojoj površini krajnjim izvršiteljima, odnosno stanicama T (148). Klinička studija koja je testirala primjenu cjepiva sačinjenog od autolognih DC fuzioniranih s leukemijskim stanicama u bolesnika u remisiji nakon TKMS pokazala je odlične rezultate personalizirane primjene cjepiva i ekspanziju stanica T specifičnih za leukemiju (149). Isto tako, klinička studija je pokazala da cijepljenje dendritičnim stanicama modificiranih peptidom WT1 povećava broj specifičnih stanica T *in vivo* u bolesnika, no broj im se brzo smanjio nakon završetka cijepljenja, dok se na uzorcima istih bolesnika *in vitro* primijetilo dulje preživljenje specifičnih stanica T (150). U ovom trenutku je nekolicina dendritičnih cjepiva u procesu kliničkog testiranja te se aktivno razrađuju nove strategije u upotrebi dendritičnih cjepiva u osoba oboljelih od AML.



Slika 6. Priprava cjepiva temeljenih na dendritičnim stanicama. Prevedeno i preuzeto iz van Willigen, 2018.



## ZAKLJUČAK

AML je maligna bolest koju karakterizira nekontrolirana proliferacija malignih blasta s ograničenim kapacitetom diferencijacije u zrele oblike u perifernoj krvi te konačno i zahvaćanje koštane srži. Dobno standardizirana stopa svih oblika leukemija u svijetu je 5,4 na 100 000 ljudi. U većini slučajeva razlog nastanka genetskih promjena koje dovedu do maligne promjene normalnih krvotvornih stanica nije jasan. Kliničku sliku karakteriziraju simptomi pancitopenije, odnosno smanjenja broja svih krvnih stanica - eritrocita, leukocita i trombocita. Dijagnostika AML-a se početno temelji na kompletnoj i diferencijalnoj krvnoj slici uz obaveznu aspiraciju ili biopsiju koštane srži koja nam omogućava određivanje udjela blasta. Prema prijašnjim definicijama WHO-a, udio od 20 % blasta na razmazu aspirata koštane srži bio je kriterij za definiciju AML-a, dok se od 2022. kod određenih genskih mutacija to više ne zahtjeva. Imunofenotipizacija protočnom citometrijom i citogenetske analize su slijedeći neophodni koraci za određivanje specifične, odnosno konačne dijagnoze i odabira najoptimalnije terapije. Imunoterapija se sastoji od potenciranja djelovanja bolesnikova imunskog sustava u borbi protiv AML-a ciljanjem raznih antigena, a odabir idealnog je onemogućen raznim načinima kojima leukemijski blasti izbjegavaju uništenje.

Liječenje AML-a započinje intenzivnom citotoksičnom terapijom u bolesnika čije opće stanje to dozvoljava, dok se u suprotnom kreće s manje intenzivnim protokolima. Za određene bolesnike sljedeći terapijski korak je transplantacija krvotvornih matičnih stanica kojoj je cilj iskorijeniti minimalnu rezidualnu bolest i uvesti bolesnika u dugotrajnu remisiju, a svoje djelovanje temelji na učinku presatka protiv primatelja u kojem glavnu ulogu imaju stanice T koje svojom aktivnošću djeluju negativno na maligne stanice (GvL), ali i na zdrave stanice primatelja što dovodi do bolesti davatelja protiv primatelja (GvHD) čime se znatno narušava ishod liječenja. Infuzija donorskih limfocita (DLI) je pristup čije se djelovanje također temelji na učinku GvL, no za razliku od TKMS, bolesniku se infundiraju limfociti periferne krvi (stanice T i NK) izdvojene postupkom leukaferoze iz krvi darivatelja, a može se koristiti u terapijske svrhe, profilaktički ili preemtivno.

Terapija AML monoklonskim protutijelima temelji se na primjeni kimeričnih/humaniziranih protutijela specifičnih za određene antigene pri čemu se razlikuje nekoliko načina njihove primjene. Nekonjugirana monoklonska protutijela svoj antileukemijski učinak postižu putem poticanja adaptivne imunosti - stanične citotoksičnosti posredovane komplementom i stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC), no ona se do sada u kliničkim istraživanjima

nisu pokazala uspješna. Konjugirana monoklonska protutijela su spoj specifičnog protutijela i citotoksičnog lijeka kojemu je svrha lijek dopremiti izravno do ciljne stanice, a od njih je najistraženiji i najkorišteniji gemtuzumab ozogamicin, protutijelo konjugirano s derivatom citotoksičnog antibiotika kalihemaicina koje cilja biljeg CD33 izražen na blastima u većine oboljelih od AML-a.

Prednost bispecifičnih protutijela u odnosu na klasična monoklonska protutijela je ta što se jednim svoji krajem vežu na ciljni antigen, dok se drugim svojim krajem izravno vežu za stanice T čime ih snažno aktiviraju i potaknu uništenje ciljne stanice. Sintetizirani su različiti oblici bispecifičnih protutijela koji ciljaju različite antigene te su u tijeku brojna klinička ispitivanja.

Imunosne kontrolne točke poput PD-1 i CTLA-4 nalaze se na površini stanica T i služe za kontrolu reakcije imunskog sustava i sprječavanje uništenja zdravog tkiva u fiziološkim uvjetima. U oboljelih od AML-a se pokazao njihov povećani izražaj te je to jedan od načina pomoću kojeg leukemijske stanice opstaju. Klinička istraživanja su pokazala da blokada imunskih točaka pozitivno utječe na produljenje preživljenja oboljelih od AML, posebice ako se daju u kombinaciji s hipometilirajućim lijekovima.

Stanična terapija koja se trenutno razvija s ciljem liječenja AML-a jesu stanice CAR-T i stanice NK. Genska preinaka bolesnikovih stanica T u svrhu izražavanja receptora CAR koji mogu prepoznati i djelovati na maligne stanice pokazale su se dobrom opcijom u liječenju AML-a, ali pretežito u pokusnim uvjetima *in vivo* i *in vitro*, dok su brojna klinička istraživanja trenutno u tijeku. Stanice NK u terapiji AML-a mogu se primijeniti na dva načina. Prvi način primjene označava primjenu protutijela koja potiču djelovanje stanica NK inhibirajući tzv. inhibitorne KIR-receptore na njihovoj membrani. Drugi način je vezan uz izolaciju stanica NK, njihovo pročišćavanje i gensku modifikaciju kako bi izražavali npr. receptor CAR ili se stimuliraju citokinima koji uzrokuju njihovu proliferaciju i samim time povećanje broja efektorskih stanica NK. Nakon obrade, stanice NK se infundiraju bolesniku čime je povećana njihova učinkovitost i učinak GvL.

Cjepiva koja se klinički ispituju u oboljelih od AML-a sastoje se od peptida unešenog u organizam oboljele osobe ili od prethodno obrađenih dendritičnih stanica bolesne osobe, a pokazala su se uspješnima u kliničkim istraživanjima te se očekuje njihovo daljnje usavršavanje.

Zaključno, liječenje AML-a je veliki izazov, a razvijaju se brojne terapijske opcije od kojih još ni jedna nije pokazala idealne rezultate u postizanju potpunog izlječenja te je potrebno i dalje aktivno istraživanje samog nastanka i mogućnosti izlječenja ove teške bolesti.

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem se svojem mentoru doc.dr.sc. Hrvoju Laliću na pokazanom neizmjernom strpljenju i želji za podučavanjem prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim članovima svoje obitelji koji su bili neizmjerna podrška tijekom ovog akademskog putovanja, a posebno hvala mojoj sestri na svemu.

## POPIS LITERATURE

1. Gurney M, O'Dwyer M. Realizing Innate Potential: CAR-NK Cell Therapies for Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. 2021 Mar 29;13(7):1568. doi: 10.3390/cancers13071568
2. Mitchell K, Steidl U. Targeting Immunophenotypic Markers on Leukemic Stem Cells: How Lessons from Current Approaches and Advances in the Leukemia Stem Cell (LSC) Model Can Inform Better Strategies for Treating Acute Myeloid Leukemia (AML). *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Jan 2;10(1):a036251. doi: 10.1101/cshperspect.a036251
3. Morsink LM, Walter RB. Novel monoclonal antibody-based therapies for acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019 Jun;32(2):116–26. doi: 10.1016/j.beha.2019.05.002
4. Barbullushi K, Rampi N, Serpenti F, Sciumè M, Fabris S, De Roberto P, i sur. Vaccination Therapy for Acute Myeloid Leukemia: Where Do We Stand? *Cancers*. 2022 Jun 17;14(12):2994. doi: 10.3390/cancers14122994
5. Huang J, Chan SC, Ngai CH, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE, i sur. Disease Burden, Risk Factors, and Trends of Leukaemia: A Global Analysis. *Front Oncol*. 2022 Jul 22;12:904292. doi: 10.3389/fonc.2022.904292
6. Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2019 [internet]. Škerija M ur. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2021 [pristupljeno 10.5.2023.]. Dostupno na: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/12/Bilten44\\_2019.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/12/Bilten44_2019.pdf)
7. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev*. 2019 Jul;36:70–87. doi: 10.1016/j.blre.2019.04.005
8. Bilić E, Turudić D, Jelić M. Etiologija akutnih leukemija u djece. *Paediatr Croat*, 2021, 65: 4-9.
9. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, i sur. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1703–19. doi: 10.1038/s41375-022-01613-1

10. Schiffer CA, Stone RM. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. Holland-Frei Cancer Medicine 6th edition [internet]. 2003 [pristupljeno 4.6. 2023]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13452/>
11. Chakraborty S, Park CY. Pathogenic Mechanisms in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2022 Nov 1;23(11):1522–34. doi: 10.1007/s11864-022-01021-8
12. Konoplev S, Yin CC, Kornblau SM, Kantarjian HM, Konopleva M, Andreeff M, i sur. Molecular characterization of *de novo* Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2013 Jan;54(1):138–44. doi: 10.3109/10428194.2012.701739
13. Khan I, Malinge S, Crispino JD. Myeloid Leukemia in Down Syndrome. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1–2):25–36. doi: 10.1615/critrevoncog.v16.i1-2.40
14. Cao D, Xu H, Xu X, Guo T, Ge W. High tumor mutation burden predicts better efficacy of immunotherapy: a pooled analysis of 103078 cancer patients. *Oncoimmunology*. 2019 Jun 16;8(9):e1629258. doi: 10.1080/2162402X.2019.1629258
15. Logan C, Koura D, Taplitz R. Updates in infection risk and management in acute leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2020 Dec 4;2020(1):135–9. doi: 10.1182/hematology.2020000098
16. Wagner G, Fenchel K, Back W, Schulz A, Sachse MM. Leukemia cutis - epidemiology, clinical presentation, and differential diagnoses. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012 Jan;10(1):27-36. doi: 10.1111/j.1610-0387.2011.07842.x
17. Sakata H, Nakao A, Matsuda K, Yoshie N, Yamada T, Osako T, i sur. Acute leukemia presenting as bone pain with normal white blood cell count. *Acute Med Surg*. 2014 May 19;1(4):249. doi: 10.1002/ams2.46
18. Avni B, Koren-Michowitz M. Myeloid sarcoma: current approach and therapeutic options. *Ther Adv Hematol*. 2011 Oct;2(5):309–16. doi: 10.1177/2040620711410774
19. Howard SC, Jones DP, Pui CH. The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med*. 2011 May 12;364(19):1844-54. doi: 10.1056/NEJMra0904569

20. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, i sur. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022 Sep 22;140(12):1345–77. doi: 10.1182/blood.2022016867
21. Ries S. Citomorfološka dijagnostika akutnih mijeloičnih leukemija – podjela prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji. *Med Flum*. 2011 Dec 1;47(4):353–9. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/76666>
22. Karami K, Akbari M, Moradi MT, Soleymani B, Fallahi H. Survival prognostic factors in patients with acute myeloid leukemia using machine learning techniques. *PLoS ONE*. 2021 Jul 21;16(7):e0254976. doi: 10.1371/journal.pone.0254976
23. Bhansali RS, Pratz KW, Lai C. Recent advances in targeted therapies in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2023 Mar 25;16(1):29. doi: 10.1186/s13045-023-01424-6
24. Bazinet A, Popradi G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Curr Oncol*. 2019 Jun;26(3):187-191. doi: 10.3747/co.26.5033
25. Vago L, Gojo I. Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 130(4):1552–64. doi: 10.1172/JCI129204
26. Gale RP, Opelz G. Commentary: does immune suppression increase risk of developing acute myeloid leukemia?. *Leukemia*. 2012 Mar;26(3):422–3. doi: 10.1038/leu.2011.224
27. Tettamanti S, Pievani A, Biondi A, Dotti G, Serafini M. Catch me if you can: how AML and its niche escape immunotherapy. *Leukemia*. 2022 Jan;36(1):13–22. doi: 10.1038/s41375-021-01350-x
28. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z, i sur. Elevated frequencies of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>lo</sup> regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 2011 Sep 15;129(6):1373–81. doi: 10.1002/ijc.25791
29. Tian T, Yu S, Liu L, Xue F, Yuan C, Wang M, i sur. The Profile of T Helper Subsets in Bone Marrow Microenvironment Is Distinct for Different Stages of Acute Myeloid Leukemia Patients and Chemotherapy Partly Ameliorates These Variations. *PLOS ONE*. 2015 Jul 2;10(7):e0131761. doi: 10.1371/journal.pone.0131761

30. Coles SJ, Hills RK, Wang ECY, Burnett AK, Man S, Darley RL, *i sur*. Increased CD200 expression in acute myeloid leukemia is linked with an increased frequency of FoxP3+ regulatory T cells. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):2146–8. doi: 10.1038/leu.2012.75
31. Williams P, Basu S, Garcia-Manero G, Hourigan CS, Oetjen KA, Cortes JE, *i sur*. The distribution of T-cell subsets and the expression of immune checkpoint receptors and ligands in patients with newly diagnosed and relapsed acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2019 May 1;125(9):1470–81. doi: 10.1002/cncr.31896
32. Schnorfeil FM, Lichtenegger FS, Emmerig K, Schlueter M, Neitz JS, Draenert R, *i sur*. T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *J Hematol Oncol*. 2015 Jul 30;8(1):93. doi: 10.1186/s13045-015-0189-2
33. Deng M, Gui X, Kim J, Xie L, Chen W, Li Z, *i sur*. LILRB4 signalling in leukaemia cells mediates T cell suppression and tumour infiltration. *Nature*. 2018 Oct;562(7728):605–9. doi: 10.1038/s41586-018-0615-z
34. Le Dieu R, Taussig DC, Ramsay AG, Mitter R, Miraki-Moud F, Fatah R, *i sur*. Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*. 2009 Oct 29;114(18):3909–16. doi: 10.1182/blood-2009-02-206946
35. Mohammadi Najafabadi M, Shamsasenjan K, Akbarzadehalaleh P. Angiogenesis Status in Patients with Acute Myeloid Leukemia: From Diagnosis to Post-hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Int J Organ Transplant Med*. 2017;8(2):57–67.
36. Ng AP, Alexander WS. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov*. 2017 Feb 6;3(1):1–4. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.2
37. Chopra M, Bohlander SK. The cell of origin and the leukemia stem cell in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Dec;58(12):850–8. doi: 10.1002/gcc.22805
38. Khaldoyanidi SK, Hindoyan A, Stein A, Subklewe M. Leukemic stem cells as a target for eliminating acute myeloid leukemia: Gaps in translational research. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2022 Jul 1;175:103710. doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103710



39. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 1957 Sep 12;257(11):491–6. doi: 10.1056/NEJM195709122571102
40. Pavletic SZ. Forty years of hematopoietic stem cell transplantation in Croatia: First-World options and First-World science. *Croat Med J.* 2023 Apr;64(2):65–6. doi: 10.3325/cmj.2023.64.65
41. Sweeney C, Vyas P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front Oncol.* 2019 Nov 19;9:1217. doi: 10.3389/fonc.2019.01217
42. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, Clift R, Forman SJ, Negrin R, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med.* 2001 Jan 18;344(3):175–81. doi: 10.1056/NEJM200101183440303
43. Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol.* 2000 Feb;18(3):537–46. doi: 10.1200/JCO.2000.18.3.537
44. McCann SR, Crampe M, Molloy K, Lawler M. Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transfus Apher Sci.* 2005 Feb 1;32(1):55–61. doi: 10.1016/j.transci.2004.10.006
45. Ferrara F, Picardi A. Is There Still a Role for Autologous Stem Cell Transplantation for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia? *Cancers.* 2020 Jan;12(1):59. doi: 10.3390/cancers12010059
46. McCluskey J, Peh CA. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet.* 1999;1(1):3–20.
47. Tiercy JM. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica.* 2016 Jun 1;101(6):680–7. doi: 10.3324/haematol.2015.141119
48. Biernacki MA, Sheth VS, Bleakley M. T cell optimization for graft-versus-leukemia responses. *JCI Insight.* 2020 May 7;5(9):e134939. doi: 10.1172/jci.insight.134939

49. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature*. 2001 May;411(6835):385–9. doi: 10.1038/35077251
50. Stern M, de Wreede LC, Brand R, van Biezen A, Dreger P, Mohty M, i sur. Sensitivity of hematological malignancies to graft-versus-host effects: an EBMT megafile analysis. *Leukemia*. 2014 Nov;28(11):2235–40. doi: 10.1038/leu.2014.145
51. Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, i sur. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*. 1990 Dec 15;76(12):2462–5.
52. Castagna L, Valli V, Timofeeva I, Capizzuto R, Bramanti S, Mariotti J, i sur. Feasibility and Efficacy of CD45RA+ Depleted Donor Lymphocytes Infusion After Haploidentical Transplantation With Post-Transplantation Cyclophosphamide in Patients With Hematological Malignancies. *Transplant Cell Ther*. 2021 Jun;27(6):478.e1-478.e5. doi: 10.1016/j.jtct.2021.03.010
53. Kordelas L, Buttkereit U, Lindemann M, Koldehoff M, Klisanin V, Horn PA, i sur.  $\alpha\beta$ -T-cell depleted donor lymphocyte infusion for leukemia relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Dec;52(12):1668–70. doi: 10.1038/bmt.2017.185
54. Maffini E, Ursi M, Barbato F, Dicaldo M, Roberto M, Campanini E, i sur. The prevention of disease relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Front Oncol*. 2022 Nov 30;12:1066285. doi: 10.3389/fonc.2022.1066285
55. Yan CH, Wang JZ, Liu DH, Xu LP, Chen H, Liu KY, i sur. Chemotherapy followed by modified donor lymphocyte infusion as a treatment for relapsed acute leukemia after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without in vitro T-cell depletion: superior outcomes compared with chemotherapy alone and an analysis of prognostic factors. *Eur J Haematol*. 2013;91(4):304–14. doi: 10.1111/ejh.12168
56. Jedlickova Z, Schmid C, Koenecke C, Hertenstein B, Baurmann H, Schwerdtfeger R, i sur. Long-term results of adjuvant donor lymphocyte transfusion in AML after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2016 May;51(5):663–7. doi: 10.1038/bmt.2015.234
57. Rettig AR, Ihorst G, Bertz H, Lübbert M, Marks R, Waterhouse M, i sur. Donor lymphocyte infusions after first allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in adults with acute

- myeloid leukemia: a single-center landmark analysis. *Ann Hematol.* 2021 Sep 1;100(9):2339–50. doi: 10.1007/s00277-021-04494-z
58. Zahavi D, Weiner L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies.* 2020 Jul 20;9(3):34. doi: 10.3390/antib9030034
59. James JS, Dubs G. FDA approves new kind of lymphoma treatment. *Food and Drug Administration. AIDS Treat News.* 1997 Dec 5;(No 284):2–3.
60. Isidori A, Cerchione C, Daver N, DiNardo C, Garcia-Manero G, Konopleva M, i sur. Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia: Where We Stand. *Front Oncol.* 2021 May 10;11:656218. doi: 10.3389/fonc.2021.656218
61. Feldman EJ, Brandwein J, Stone R, Kalaycio M, Moore J, O'Connor J, i sur. Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2005 Jun 20;23(18):4110–6. doi: 10.1200/JCO.2005.09.133
62. Sekeres MA, Lancet JE, Wood BL, Grove LE, Sandalic L, Sievers EL, i sur. Randomized, phase IIb study of low-dose cytarabine and lintuzumab versus low-dose cytarabine and placebo in older adults with untreated acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2013 Jan 1;98(1):119–28. doi: 10.3324/haematol.2012.066613
63. Vasu S, He S, Cheney C, Gopalakrishnan B, Mani R, Lozanski G, i sur. Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. *Blood.* 2016 Jun 9;127(23):2879–89. doi: 10.1182/blood-2015-11-680546
64. Riether C, Pabst T, Höpner S, Bacher U, Hinterbrandner M, Banz Y, i sur. Targeting CD70 with cusatuzumab eliminates acute myeloid leukemia stem cells in patients treated with hypomethylating agents. *Nat Med.* 2020 Sep;26(9):1459–67. doi: 10.1038/s41591-020-0910-8
65. Montesinos P, Roboz GJ, Bulabois CE, Subklewe M, Platzbecker U, Ofran Y, i sur. Safety and efficacy of talacotuzumab plus decitabine or decitabine alone in patients with acute myeloid leukemia not eligible for chemotherapy: results from a multicenter, randomized, phase 2/3 study. *Leukemia.* 2021 Jan;35(1):62–74. doi: 10.1038/s41375-020-0773-5
66. Tian C, Chen Z. Immune therapy: a new therapy for acute myeloid leukemia. *Blood Sci.* 2023 Mar 30;05(01):15–24. doi: 10.1097/BS9.0000000000000140

67. Bross PF, Beitz J, Chen G, Chen XH, Duffy E, Kieffer L, i sur. Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2001 Jun;7(6):1490–6.
68. Castaigne S, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie JN, i sur. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond Engl*. 2012 Apr 21;379(9825):1508–16. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60485-1
69. Medeiros BC, Tanaka TN, Balaian L, Bashey A, Guzdar A, Li H, i sur. A Phase I/II Trial of the Combination of Azacitidine and Gemtuzumab Ozogamicin for Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018 May;18(5):346-352.e5. doi: 10.1016/j.clml.2018.02.017
70. Godwin CD, Rodríguez-Arbolí E, Othus M, Halpern AB, Appelbaum JS, Percival MEM, i sur. Phase 1/2 Trial of CLAG-M with Dose-Escalated Mitoxantrone in Combination with Fractionated-Dose Gemtuzumab Ozogamicin for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia and Other High-Grade Myeloid Neoplasms. *Cancers*. 2022 Jun 14;14(12):2934. doi: 10.3390/cancers14122934
71. Amadori S, Suciú S, Selleslag D, Aversa F, Gaidano G, Musso M, i sur. Gemtuzumab Ozogamicin Versus Best Supportive Care in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia Unsuitable for Intensive Chemotherapy: Results of the Randomized Phase III EORTC-GIMEMA AML-19 Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Mar 20;34(9):972–9. doi: 10.1200/JCO.2015.64.0060
72. Gamis AS, Alonzo TA, Meshinchi S, Sung L, Gerbing RB, Raimondi SC, i sur. Gemtuzumab Ozogamicin in Children and Adolescents With De Novo Acute Myeloid Leukemia Improves Event-Free Survival by Reducing Relapse Risk: Results From the Randomized Phase III Children’s Oncology Group Trial AAML0531. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20;32(27):3021–32. doi: 10.1200/JCO.2014.55.3628
73. O’Hear C, Inaba H, Pounds S, Shi L, Dahl G, Bowman WP, i sur. Gemtuzumab ozogamicin can reduce minimal residual disease in patients with childhood acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2013;119(22):4036–43. doi: 10.1002/cncr.28334
74. Pollard JA, Guest E, Alonzo TA, Gerbing RB, Loken MR, Brodersen LE, i sur. Gemtuzumab Ozogamicin Improves Event-Free Survival and Reduces Relapse in Pediatric

KMT2A-Rearranged AML: Results From the Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531. *J Clin Oncol*. 2021 Oct 1;39(28):3149–60. doi: 10.1200/JCO.20.03048

75. Stein EM, Walter RB, Erba HP, Fathi AT, Advani AS, Lancet JE, i sur. A phase 1 trial of vadastuximab talirine as monotherapy in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia. *Blood*. 2018 Jan 25;131(4):387–96. doi: 10.1182/blood-2017-06-789800

76. Fathi AT, Erba HP, Lancet JE, Stein EM, Ravandi F, Faderl S, i sur. A phase 1 trial of vadastuximab talirine combined with hypomethylating agents in patients with CD33-positive AML. *Blood*. 2018 Sep 13;132(11):1125–33. doi: 10.1182/blood-2018-03-841171

77. Daver N, Aribi A, Montesinos P, Roboz GJ, Wang ES, Walter RB, i sur. Safety and Efficacy from a Phase 1b/2 Study of IMG632 in Combination with Azacitidine and Venetoclax for Patients with CD123-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2021 Nov 5;138(1):372. doi: 10.1182/blood-2021-146503

78. Daver NG, Erba HP, Papadantonakis N, DeAngelo DJ, Wang ES, Konopleva MY, i sur. A Phase I, First-in-Human Study Evaluating the Safety and Preliminary Antileukemia Activity of IMG632, a Novel CD123-Targeting Antibody-Drug Conjugate, in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia and Other CD123-Positive Hematologic Malignancies. *Blood*. 2018 Nov 29;132(1):27. doi:10.1182/blood-2018-99-112955

79. Lane AA, Stein AS, Garcia JS, Garzon JL, Galinsky I, Luskin MR, i sur. Safety and Efficacy of Combining Tagraxofusp (SL-401) with Azacitidine or Azacitidine and Venetoclax in a Phase 1b Study for CD123 Positive AML, MDS, or BPDCN. *Blood*. 2021 Nov 5;138(1):2346. doi:10.1182/blood-2021-147486

80. Li F, Sutherland MK, Yu C, Walter RB, Westendorf L, Valliere-Douglass J, i sur. Characterization of SGN-CD123A, A Potent CD123-Directed Antibody-Drug Conjugate for Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2018 Feb 1;17(2):554–64. doi: 10.1158/1535-7163

81. Jiang YP, Liu BY, Zheng Q, Panuganti S, Chen R, Zhu J, i sur. CLT030, a leukemic stem cell-targeting CLL1 antibody-drug conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018 Jul 23;2(14):1738–49. doi: 10.1182/bloodadvances.2018020107

82. Gallazzi M, Ucciero MAM, Faraci DG, Mahmoud AM, Al Essa W, Gaidano G, i sur. New Frontiers in Monoclonal Antibodies for the Targeted Therapy of Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan;23(14):7542. doi: 10.3390/ijms23147542

83. Pagel JM, Gooley TA, Rajendran J, Fisher DR, Wilson WA, Sandmaier BM, i sur. Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with 131I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2009 Dec 24;114(27):5444–53. doi: 10.1182/blood-2009-03-213298
84. Vo P, Gooley TA, Rajendran JG, Fisher DR, Orozco JJ, Green DJ, i sur. Yttrium-90-labeled anti-CD45 antibody followed by a reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for patients with relapsed/refractory leukemia or myelodysplasia. *Haematologica*. 2020 Jun;105(6):1731–7. doi: 10.3324/haematol.2019.229492
85. Guy DG, Uy GL. Bispecific Antibodies for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018 Dec;13(6):417-425. doi: 10.1007/s11899-018-0472-8
86. Aigner M, Feulner J, Schaffer S, Kischel R, Kufer P, Schneider K, i sur. T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE antibody construct. *Leukemia*. 2013 Apr;27(5):1107–15.
87. Ravandi F, Walter RB, Subklewe M, Buecklein V, Jongen-Lavrencic M, Paschka P, i sur. Updated results from phase I dose-escalation study of AMG 330, a bispecific T-cell engager molecule, in patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia (R/R AML). *J Clin Oncol*. 2020 May 20;38(15):7508–7508. doi:10.1200/JCO.2020.38.15\_suppl.7508
88. Cheng P, Chen X, Dalton R, Calescibetta A, So T, Gilvary D, i sur. Immunodepletion of MDSC by AMV564, a novel bivalent, bispecific CD33/CD3 T cell engager, ex vivo in MDS and melanoma. *Mol Ther*. 2022 Jun 1;30(6):2315–26. doi: 10.1016/j.ymthe.2022.02.005
89. Westervelt P, Cortes JE, Altman JK, Long M, Oehler VG, Gojo I, i sur. Phase 1 First-in-Human Trial of AMV564, a Bivalent Bispecific (2:2) CD33/CD3 T-Cell Engager, in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2019 Nov 13;134:834. doi:10.1182/blood-2019-129042
90. Vadakekolathu J, Lai C, Reeder S, Church SE, Hood T, Lourdusamy A, i sur. TP53 abnormalities correlate with immune infiltration and associate with response to flotetuzumab immunotherapy in AML. *Blood Adv*. 2020 Oct 15;4(20):5011–24. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002512
91. Ravandi F, Bashey A, Stock W, Foran JM, Mawad R, Egan D, i sur. Complete Responses in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients on a Weekly Dosing

Schedule of Vibecotamab (XmAb14045), a CD123 x CD3 T Cell-Engaging Bispecific Antibody; Initial Results of a Phase 1 Study. *Blood*. 2020 Nov 5;136:4–5. doi: 10.1182/blood-2020-134746

92. Watts J, Maris M, Lin TL, Patel P, Madanat YF, Cogle CR, i sur. Updated Results from a Phase 1 Study of APVO436, a Novel Bispecific Anti-CD123 x Anti-CD3 Adaptir™ Molecule, in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Blood*. 2022 Nov 15;140(1):6204–5.

93. Braciak TA, Roskopf CC, Wildenhain S, Fenn NC, Schiller CB, Schubert IA, i sur. Dual-targeting triplebody 33-16-123 (SPM-2) mediates effective redirected lysis of primary blasts from patients with a broad range of AML subtypes in combination with natural killer cells. *Oncoimmunology*. 2018;7(9):e1472195. doi: 10.1080/2162402X.2018.1472195

94. Van Loo PF, Doornbos R, Dolstra H, Shamsili S, Bakker L. Preclinical Evaluation of MCLA117, a CLEC12AxCD3 Bispecific Antibody Efficiently Targeting a Novel Leukemic Stem Cell Associated Antigen in AML. *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):325. doi:10.1182/blood.V126.23.325.325

95. Brauchle B, Goldstein RL, Karbowski CM, Henn A, Li CM, Bücklein VL, i sur. Characterization of a Novel FLT3 BiTE Molecule for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2020 Sep 2;19(9):1875–88. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1093

96. Dao T, Pankov D, Scott A, Korontsvit T, Zakhaleva V, Xu Y, i sur. Therapeutic bispecific T-cell engager antibody targeting the intracellular oncoprotein WT1. *Nat Biotechnol*. 2015 Oct;33(10):1079–86. doi: 10.1038/nbt.3349

97. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):98-106. doi: 10.1097/COC.00000000000023998

98. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng QR, i sur. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia*. 2014 Jun;28(6):1280–8. doi: 10.1038/leu.2013.355

99. Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*. 2000 Oct;101(2):169–77. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x.

100. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, i sur. The Interaction Properties of Costimulatory Molecules Revisited. *Immunity*. 2002 Aug 1;17(2):201–10. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00362-x.
101. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*. 1996 Jun;4(6):535–43. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80480-x
102. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, i sur. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303–10. doi: 10.1084/jem.192.2.303
103. Davids MS, Kim HT, Bachireddy P, Costello C, Liguori R, Savell A, i sur. Ipilimumab for Patients with Relapse after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med*. 2016 Jul 14;375(2):143–53. doi: 10.1056/NEJMoa1601202
104. Garcia JS, Flamand Y, Tomlinson BK, Keng M, Mendez LM, Khaled S, i sur. Safety and Efficacy of Decitabine Plus Ipilimumab in Relapsed or Refractory MDS/AML in the Post-BMT or Transplant Naïve Settings. *Blood*. 2020 Nov 5;136 (1):15–7. doi: 10.1182/blood.2022017686
105. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26(1):677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
106. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. 2008 Aug;224:166-82. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x
107. Ravandi F, Assi R, Daver N, Benton CB, Kadia T, Thompson PA, i sur. Idarubicin, cytarabine, and nivolumab in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia or high-risk myelodysplastic syndrome: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Haematol*. 2019 Sep;6(9):e480–8. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30114-0
108. Reville PK, Kantarjian HM, Ravandi F, Jabbour E, DiNardo CD, Daver N, i sur. Nivolumab maintenance in high-risk acute myeloid leukemia patients: a single-arm, open-label, phase II study. *Blood Cancer J*. 2021 Mar 17;11(3):1–5. doi: 10.1038/s41408-021-00453-z



109. Daver N, Garcia-Manero G, Basu S, Boddu PC, Alfayez M, Cortes JE, i sur. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Response to Azacitidine and Nivolumab in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Nonrandomized, Open-Label, Phase II Study. *Cancer Discov.* 2019 Mar 1;9(3):370–83. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0774
110. Daver NG, Garcia-Manero G, Konopleva MY, Alfayez M, Pemmaraju N, Kadia TM, i sur. Azacitidine (AZA) with Nivolumab (Nivo), and AZA with Nivo + Ipilimumab (Ipi) in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia: A Non-Randomized, Prospective, Phase 2 Study. *Blood.* 2019 Nov 13;134(1):830.
111. Goswami M, Gui G, Dillon LW, Lindblad KE, Thompson J, Valdez J, i sur. Pembrolizumab and decitabine for refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer.* 2022 Jan;10(1):e003392. doi: 10.1136/jitc-2021-003392
112. Gojo I, Stuart RK, Webster J, Blackford A, Varela JC, Morrow J, i sur. Multi-Center Phase 2 Study of Pembroluzimab (Pembro) and Azacitidine (AZA) in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) and in Newly Diagnosed ( $\geq 65$  Years) AML Patients. *Blood.* 2019 Nov 13;134(1):832. doi:10.1182/blood-2019-127345
113. Zeidner JF, Vincent BG, Ivanova A, Moore D, McKinnon KP, Wilkinson AD, i sur. Phase II Trial of Pembrolizumab after High-Dose Cytarabine in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood Cancer Discov.* 2021 Nov 1;2(6):616–29. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0070
114. Tschernia NP, Kumar V, Moore DT, Vincent BG, Coombs CC, Van Deventer H, i sur. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Prior to Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia. *Transplant Cell Ther.* 2021 Dec 1;27(12):1021.e1-1021.e5. doi: 10.1016/j.jtct.2021.08.022
115. Zeidan AM, Cavenagh J, Voso MT, Taussig D, Tormo M, Boss I, i sur. Efficacy and Safety of Azacitidine (AZA) in Combination with the Anti-PD-L1 Durvalumab (durva) for the Front-Line Treatment of Older Patients (pts) with Acute Myeloid Leukemia (AML) Who Are Unfit for Intensive Chemotherapy (IC) and Pts with Higher-Risk Myelodysplastic Syndromes (HR-MDS): Results from a Large, International, Randomized Phase 2 Study. *Blood.* 2019 Nov 13;134:829. doi: 10.1182/bloodadvances.2021006138
116. Sallman DA, Asch AS, Al Malki MM, Lee DJ, Donnellan WB, Marcucci G, i sur. The First-in-Class Anti-CD47 Antibody Magrolimab (5F9) in Combination with Azacitidine Is

Effective in MDS and AML Patients: Ongoing Phase 1b Results. *Blood*. 2019 Nov 13;134:569. doi: 10.1182/blood-2019-126271

117. Daver N, Konopleva M, Maiti A, Kadia TM, DiNardo CD, Loghavi S, et al. Phase I/II Study of Azacitidine (AZA) with Venetoclax (VEN) and Magrolimab (Magro) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Older/Unfit or High-Risk Acute Myeloid Leukemia (AML) and Relapsed/Refractory (R/R) AML. *Blood*. 2021 Nov 23;138:371. doi: 10.1182/blood-2022-170188

118. Garcia-Manero G, Przespolewski A, Abaza Y, Byrne M, Fong AP, Jin F, et al. Evorpaccept (ALX148), a CD47-Blocking Myeloid Checkpoint Inhibitor, in Combination with Azacitidine and Venetoclax in Patients with Acute Myeloid Leukemia (ASPEN-05): Results from Phase 1a Dose Escalation Part. *Blood*. 2022 Nov 15;140(Supplement 1):9046–7.

119. Berlin J, Harb W, Adjei A, Xing Y, Swiecicki P, Seetharam M, et al. 385 A first-in-human study of lemezoparlimab, a differentiated anti-CD47 antibody, in subjects with relapsed/refractory malignancy: initial monotherapy results. *J Immunother Cancer*. 2020;8(Suppl 3):A233–4. doi: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0385

120. Schwartz S, Patel N, Longmire T, Jayaraman P, Jiang X, Lu H, et al. Characterization of sabatolimab, a novel immunotherapy with immuno-myeloid activity directed against TIM-3 receptor. *Immunother Adv*. 2022 Jan 1;2(1):ltac019. doi: 10.1093/immadv/ltac019

121. Brunner AM, Esteve J, Porkka K, Knapper S, Vey N, Scholl S, et al. Efficacy and Safety of Sabatolimab (MBG453) in Combination with Hypomethylating Agents (HMAs) in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) and High-Risk Myelodysplastic Syndrome (HR-MDS): Updated Results from a Phase 1b Study. *Blood*. 2020 Nov 5;136:1–2. doi:10.1182/blood-2020-136855

122. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017;276(1):80–96. doi: 10.1111/imr.12519

123. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J*. 2021 Apr 6;11(4):1–11. doi: 10.1038/s41408-021-00459-7

124. Aravalli RN, Steer CJ. Immune-Mediated Therapies for Liver Cancer. *Genes*. 2017 Feb;8(2):76. doi: 10.3390/genes8020076

125. Wang Y, Xu Y, Li S, Liu J, Xing Y, Xing H, i sur. Targeting FLT3 in acute myeloid leukemia using ligand-based chimeric antigen receptor-engineered T cells. *J Hematol Oncol*. 2018 May 2;11(1):60. doi: 10.1186/s13045-018-0603-7
126. Qin H, Yang L, Chukinas JA, Shah NN, Tarun S, Pouzolles M, i sur. Systematic preclinical evaluation of CD33-directed chimeric antigen receptor T cell immunotherapy for acute myeloid leukemia defines optimized construct design. *J Immunother Cancer*. 2021 Sep 16;9(9):e003149. doi: 10.1136/jitc-2021-003149
127. Lichtman EI, Du H, Shou P, Song F, Suzuki K, Ahn S, i sur. Preclinical Evaluation of B7-H3-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2021 Jun 1;27(11):3141–53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2540
128. Lynn RC, Feng Y, Schutsky K, Poussin M, Kalota A, Dimitrov DS, i sur. High affinity FR $\beta$ -specific CAR T cells eradicate AML and normal yeloid lineage without HSC toxicity. *Leukemia*. 2016 Jun;30(6):1355–64. doi: 10.1038/leu.2016.35
129. Rafiq S, Purdon TJ, Daniyan AF, Koneru M, Dao T, Liu C, i sur. Optimized T-cell receptor-mimic chimeric antigen receptor T cells directed toward the intracellular Wilms Tumor 1 antigen. *Leukemia*. 2017 Aug;31(8):1788–97. doi: 10.1038/leu.2016.373
130. Sauer T, Parikh K, Sharma S, Omer B, Sedloev D, Chen Q, i sur. CD70-specific CAR T cells have potent activity against acute myeloid leukemia without HSC toxicity. *Blood*. 2021 Jul 29;138(4):318–30. doi: 10.1182/blood.2020008221
131. Gomes-Silva D, Atilla E, Atilla PA, Mo F, Tashiro H, Srinivasan M, i sur. CD7 CAR T Cells for the Therapy of Acute Myeloid Leukemia. *Mol Ther*. 2019 Jan 2;27(1):272–80. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.001
132. Cui Q, Qian C, Xu N, Kang L, Dai H, Cui W, i sur. CD38-directed CAR-T cell therapy: a novel immunotherapy strategy for relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol*. 2021 May 25;14(1):82. doi: 10.1186/s13045-021-01092-4
133. Jin X, Zhang M, Sun R, Lyu H, Xiao X, Zhang X, i sur. First-in-human phase I study of CLL-1 CAR-T cells in adults with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2022 Jul 7;15(1):88. doi: 10.1186/s13045-022-01308-1

134. National cancer institute. CAR T-cell therapy [slika s interneta]. [pristupljeno 20.6.2023.] dostupno na: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/car-t-cell-therapy>
135. Allison M, Mathews J, Gilliland T, Mathew SO. Natural Killer Cell-Mediated Immunotherapy for Leukemia. *Cancers*. 2022 Jan;14(3):843. doi: 10.3390/cancers14030843
136. Kaweme NM, Zhou F. Optimizing NK Cell-Based Immunotherapy in Myeloid Leukemia: Abrogating an Immunosuppressive Microenvironment. *Front Immunol*. 2021 Jun 17;12:683381. doi: 10.3389/fimmu.2021.683381
137. Daver N, Boddu P, Garcia-Manero G, Ravandi F, Jabbour EJ, Borthakur G, i sur. Phase IB/II Study of Lirilumab with Azacytidine (AZA) in Relapsed AML. *Blood*. 2017 Dec 8;130:2634. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.e18505
138. Vey N, Dumas PY, Recher C, Gastaud L, Lioure B, Bulabois CE, i sur. Randomized Phase 2 Trial of Lirilumab (anti-KIR monoclonal antibody, mAb) As Maintenance Treatment in Elderly Patients (pts) with Acute Myeloid Leukemia (AML): Results of the Effikir Trial. *Blood*. 2017 Dec 8;130:889. doi: 10.1182/blood.V130.Suppl\_1.889.889
139. Vey N, Bourhis JH, Boissel N, Bordessoule D, Prebet T, Charbonnier A, i sur. A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood*. 2012 Nov 22;120(22):4317–23. doi: 10.1182/blood-2012-06-437558
140. Chan YLT, Zuo J, Inman C, Croft W, Begum J, Croudace J, i sur. NK cells produce high levels of IL-10 early after allogeneic stem cell transplantation and suppress development of acute GVHD. *Eur J Immunol*. 2018 Feb;48(2):316-329. doi: 10.1002/eji.201747134
141. Albinger N, Pfeifer R, Nitsche M, Mertlitz S, Campe J, Stein K, i sur. Primary CD33-targeting CAR-NK cells for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2022 Apr 13;12(4):1–9. doi: 10.1038/s41408-022-00660-2
142. Tang X, Yang L, Li Z, Nalin AP, Dai H, Xu T, i sur. First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res*. 2018 Jun 1;8(6):1083–9.
143. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, Nakagawa M, Yamagami T, Miwa H, i sur. WT1 as a New Prognostic Factor and a New Marker for the Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia. *Blood*. 1994 Nov 1;84(9):3071–9.

144. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, i sur. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci*. 2004 Sep 21;101(38):13885–90. doi: 10.1073/pnas.0405884101
145. Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Elisseeva OA, Kawakami M, i sur. Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia*. 2012 Jun;26(6):1410–3. doi: 10.1038/leu.2011.343
146. Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT, Chen J, Giannopoulos K, Fei F, i sur. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1357–65. doi: 10.1182/blood-2007-07-099366
147. Draube A, Beyer M, Wolf J. Activation of autologous leukemia-specific T cells in acute myeloid leukemia: monocyte-derived dendritic cells cocultured with leukemic blasts compared with leukemia-derived dendritic cells. *Eur J Haematol*. 2008;81(4):281–8. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01110.x
148. Van Acker HH, Versteven M, Lichtenegger FS, Roex G, Campillo-Davo D, Lion E, i sur. Dendritic Cell-Based Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2019 Apr 27;8(5):579. doi: 10.3390/jcm8050579
149. Rosenblatt J, Stone RM, Uhl L, Neuberg D, Joyce R, Levine JD, i sur. Individualized vaccination of AML patients in remission is associated with induction of antileukemia immunity and prolonged remissions. *Sci Transl Med*. 2016 Dec 7;8(368):368ra171-368ra171. doi: 10.1126/scitranslmed.aag1298
150. Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, i sur. A phase I/IIa clinical trial of immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukaemia using dendritic cells co-pulsed with WT1 peptide and zoledronate. *Br J Haematol*. 2011;153(6):796–9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08490.x.
151. van Willigen WW, Bloemendal M, Gerritsen WR, Schreiber G, de Vries IJM, Bol KF. Dendritic Cell Cancer Therapy: Vaccinating the Right Patient at the Right Time. *Front Immunol*. 2018 Oct 1;9:2265. doi: 10.3389/fimmu.2018.02265

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27.1.1998. u Varaždinu. Nakon završene opće gimnazije, upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine. Dobitnica sam Dekanove nagrade za uspjeh u akademskoj 2020./2021. godini. U suradnji sa sestrom, studenticom tada četvrte godine Ekonomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, akademske 2021./2022. godine osmislila sam i provela interdisciplinarno istraživanje koje se temelji na spoju javnog zdravstva, organizacije zdravstvenog sustava i ekonomije na temu „Investicijski potencijal mirovinskih fondova u dugotrajnu skrb za starije“ pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Jakše Krište, te za istoimeni rad dobivamo Rektorovu nagradu. Dugogodišnji sam demonstrator na Katedri za histologiju i embriologiju te na Katedri za propedeutiku.