



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00346**

(22) Data de depozit: **30/06/2023**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. **3/2024**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE "ȘTEFAN S.NICOLAU"**, ȘOS.MIHAI BRAVU NR.285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **CHIVU-ECONOMESCU MIHAELA**, ȘOS. ȘTEFAN CEL MARE 240, BL. 59A, SC. 4, AP. 105, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DRAGU LAURA-DENISA**, SPLAIUL UNIRII, NR.49, BL.M19, SC.1, AP.33, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MATEI LILIA**, STR. CIOCĂNEȘTI, NR.20, SC.C, ET.3, AP.28C, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MAMBET CRISTINA**, STR.DR.IACOB FELIX, NR.95, BL.17A, AP.25, BUCUREȘTI, B, RO;
• **NECULA LAURA GEORGIANA**, ȘOS. COLENTINA NR. 10, BL. 6, SC. D, ET. 8, AP. 167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• **PITICA IOANA- MĂDĂLINA**, BD.CONSTANTIN BRÂNCOVEANU, NR.14, BL.B5, SC.1, ET.2, AP.10, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BLEOTU CORALIA**, ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5, SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **PANĂ LAVINIA- MIHAELA**, NR.278, SAT TUTANA, COMUNA BĂICULEȘTI, AG, RO;
• **PĂIȘ ALEXANDRA- CRISTIANA**, STR.SUBLOCOTENENT POPA, NR.1, BL.15, SC.2, ET.6, AP.91, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **GHEORGHE GINA**, STR.SUȘENI, NR.142, BOLINTIN VALE, GR, RO;
• **GURBAN PETRUȚA**, STR.MAȘINA DE PÂINE, NR.20, BL.OD37, SC.5, ET.9, AP.214, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CONSTANTINESCU ȘTEFAN NICULAE**, STR. PARIS, NR.7, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DIACONU CARMEN CRISTINA**, STR. BABA NOVAC, NR.21,G11, 7/74, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **METODĂ DE EVALUARE A EFICIENȚEI GREFĂRII XENOTRANSPLANTULUI DE LEUCEMIE MIELOIDĂ ACUTĂ (LMA) ÎNTR-UN MODEL ANIMAL MURIN**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de evaluare a eficienței grefării xenotransplantului de leucemie mieloidă acută (LMA) într-un model animal murin. Metoda, conform invenției, constă în etapele: obținerea celulelor mononucleare de la pacienți cu LMA, depleția de limfocite T CD3+ printr-o procedură de selecție negativă, caracterizarea blaștilor leucemici prin citometrie în flux, injectarea la șoareci imunodeficienți NSG pentru obținerea

modelului murin cu blaști leucemici, evaluarea grefării prin măsurarea splinei, analiza prezenței unor populații celulare de origine umană la nivelul măduvei osoase murine prin citometrie în flux și stabilirea profilului pro-inflamator care facilitează grefarea blaștilor leucemici.

Revendicări: 1
Figuri: 7

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2023 00346
Data depozit 3.0. -06- 2023.....

RO 138033 A0

45

12.2. DESCRIEREA BREVETULUI: METODA DE EVALUARE A EFICIENȚEI GREFĂRII XENOTRANSPANTULUI DE LEUCEMIE MIELOIDA ACUTA (LMA) INTR-UN MODEL ANIMAL MURIN

Invenția se referă la o metodă de evaluare a eficienței grefării xenotransplantului de leucemie mieloidă acută (LMA) într-un model animal murin. Metoda este caracterizată prin aceea că se obțin celulele mononucleare de la pacienți cu LMA, se realizează depletia de limfocitele T CD3+ printr-o procedură de selecție negativă, se caracterizează blastii leucemici prin citometrie în flux, se injectează la soareci imunodeficienți NSG pentru obținerea modelului murin cu blastii leucemici, urmată de evaluarea grefării prin măsurarea dimensiunii splinei, analiză prezentei unor populații celulare de origine umană la nivelul maduvei osoase murine prin citometrie în flux și *stabilirea profilului proinflamator care facilitează grefarea blastilor leucemici*.

Xenotransplantul de leucemie mieloidă acută (LMA) umană la animalele imunocompromise a fost esențial pentru definirea celulelor stem leucemice și rămâne metoda de elecție pentru evaluarea funcțională a biologiei LMA umane, precum și furnizarea celui mai bun model preclinic *in vivo*. Cu toate acestea, utilizarea modelelor de soarece imunodeficient pentru a studia probele primare de LMA a arătat multiple limitări. În ultimele decenii, s-au făcut progrese importante pentru a îmbunătăți modelarea xenogrefei (PDX) derivată din LMA umană prin utilizarea soarecilor imunodeficienți NOD / SCID, al căror fond genetic conține alele care reduc funcția macrofagelor și celulelor dendritice iar aditional conțin mutația scid, cu pierderea funcției genei Prkdc, care împiedică dezvoltarea celulelor T și B, și mai recent soarelele NSG (NOD scid gamma mouse - NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ), o tulpină de soareci de laborator extrem de imunodeficienți, care nu au celule mature T, B și celule naturale ucigăse (NK) (Shultz, Lyons et al. 2005). Soarecii marca NSG prezintă, de asemenea, o semnalizare deficicientă prin interleukinele IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 și IL-21 (Shultz, Schweitzer et al. 1995). Înșă, chiar și cu cel mai imunodeficient model de soarece (soareci NSG), doar 66% din LMA se grefează la 10 - 16 săptămâni după transplant (Feuring-Buske, Gerhard et al. 2003, Sanchez, Perry et al. 2009). Capacitatea de grefare a fost corelată cu prognosticul clinic al pacienților (Pearce, Taussig et al. 2006).

Paczulla și colab. (Haematologica, 2017) au demonstrat înșă că prin extinderea timpului de evaluare a grefării celulelor LMA la soareci imunodeficienți IL2R^Gnull NOD / SCID (NSG), toate tipurile de probe de LMA, inclusiv cele provenite de la pacienți cu prognostic favorabil, ar putea fi studiate prin această abordare (Paczulla, Dirnhofer et al. 2017). Durata dezvoltării unui nivel detectabil de grefare a fost corelată cu frecvența celulelor stem leucemice (LSC) la pacient (Griessinger, Anjos-Afonso et al. 2016), și este probabil dependentă de factorii de aderare, supraviețuirea într-o nișă străină, absența factorilor de creștere specifici și celulele stromale de susținere. Într-adevăr, observația că unele celule LMA proliferază mai puțin într-un stadiu incipient în mediul murin este susținută și de rezultatele obținute cu noul model de soarece umanizat transgenic MISTRG. În acest model, în care animalele pot secreta citokinele de origine umană: M-CSF, IL-3, GM-CSF și TPO, Ellegast și colab. au demonstrat grefarea reproductibilă a probelor de LMA cu prognostic favorabil într-o perioadă mai scurtă de timp (Ellegast, Rauch et al. 2016). Umanizarea micromediului prin utilizarea de soareci transgenici noi și / sau prin utilizarea matricelor tridimensionale ar trebui să contribuie semnificativ la scurtarea latentei dezvoltării bolii, extinzând utilizarea modelului PDX la toate probele de LMA.

Neoplasmele mieloproliferative (NMP) sunt caracterizate de dominantă clonală și remodelarea nișei medulare într-un mod care promovează hematopoieza malignă față de cea normală cu supraproducția uneia sau mai multor linii de celule mature non-limfoide. Există ipoteze conform cărora acest proces de înlocuire are la bază hiperactivarea semnalelor inflamatorii și creșterea nivelului de

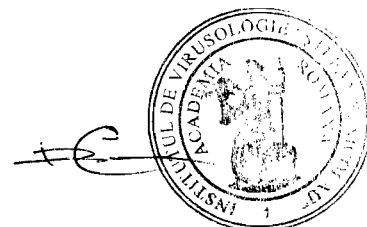


citokine inflamatorii, ceea ce face ca NMP sa fie nu numai afectiuni neoplazice ci si afectiuni inflamatorii cronice. Totusi multe studii considera componenta inflamatorie a fiziopatologiei NMP ca fiind secundara dezvoltarii lor neoplazice, aceste considerente bazandu-se pe numarul relativ redus de mutatii driver somatice dobandite la nivelul cailor inflamatorii. Inflamatia in micromediul maduvei osoase promoveaza transformarea fibrotica a acesteia si in plus poate conferi un avantaj competitiv clonei maligne.

Exista studii care sustin faptul ca inflamatia este intretinuta de o serie de mutatii, cea mai comuna fiind mutatia constitutiv activa JAK2 V617F care contribuie via STAT3 la cresterea productiei de citokine proinflamatorii precum IL-6 (Li, Sun et al. 2020) sau a proteinelor de faza acuta inflamatorie precum proteina-C reactiva (CRP) si pentraxin 3 (PTX-3) (Barosi, Massa et al. 2017). Alte mutatii bine caracterizate in NMP sunt cele din gena receptorului pentru trombopoietina (*MPL sau TpoR*) si gena calreticulinei (*CALR*). MPL semnalizeaza intracelular prin legarea si activarea JAK2 (Vainchenker and Kralovics 2017). Proteina CALR mutanta se leaga la receptorul MPL si determina semnalizarea constitutiv activa prin MPL (Elf, Abdelfattah et al. 2016). Drept urmare, in aproape toate cazurile de NMP, clona maligna contine mutatii care confera activarea constitutiva a JAK2. Chiar si in cazul NMP triplu negative s-au gasit mutatii in gene precum *CBL* si *SH2B3/LNK* care confera activitate constitutiv crescuta kinazei JAK 2 (Oh, Simonds et al. 2010, Pardanani, Lasho et al. 2010).

Studii mai noi arata ca o serie de factori de crestere de natura extrinseca, spre exemplu TGF- β , posibil secretat de celulele leucemice, este implicat in dialogul intercelular intre celulele stem hematopoietice si micromediul lor, avand efecte supresoare asupra functionalitatii normale a celulelor stromale medulare cu promovarea unei strome deficitare functional in sindroamele mielodisplazice (SMD) si in LMA (Stefanie, Manuel et al. 2018). In acest context, s-a demonstrat in mai multe modele murine ca perturbarea celulelor nisei medulare poate induce SMD si poate promova aparitia LMA (Raaijmakers, Mukherjee et al. 2010). Mai mult, celulele mioide maligne pot actiona asupra elementelor de nisa, sustinand celulele leucemice in detrimentul hematopoiezei normale prin secretia de citokine. In consecinta, analiza fenotipului inflamator din cadrul modelelor murine dezvoltate are potentialul de a fi valorificata pe de o parte ca marker al transformarii /grefarii leucemice dar si terapeutic prin dezvoltarea de noi tratamente care pot preveni inflamatia in NMP.

Analiza inventiei s-a facut prin comparatie cu Brevetul JP2015089359A care se refera la un model murin pentru leucemie mieloida acuta avand o mutatie a izocitrat dehidrogenazei (IDH) obtinuta prin injectarea intravenoasa a unor celule C-Kit pozitive purificate din celulele maduvei osoase ale soarecilor cu defecte heterozigote ale genei NPM si modificate cu vector retroviral prin introducerea a 4 gene mutante (NPMc, IDH2 / R140Q, DNMT3A / R882H si FLT3 / ITD) in soareci singenici de tip salbatic iradiati cu 6 Gy. Ca metoda de evaluare inventia verifica prezenta mutatiei IDH si sustine ca mutatia IDH a fost necesara pentru mentinerea LMA iar modelul de soarece poate fi utilizat la masurarea *in vivo* a eficacitatii medicamentelor si la screening-ul pentru inhibitori impotriva mutantilor IDH. De asemenea s-a facut comparatia cu Brevetul WO2017049002A1 care se refera la metoda de obtinere si utilizare a unui model mamifer non-uman pentru leucemia mieloida acuta umana NPM1c pozitiva cu sistem imunitar uman autolog prin injectarea unor celule stem hematopoietice umane modificate genetic pentru a exprima NPM1 uman mutant. Modelul este utilizat pentru determinarea toxicitatii (inclusiv a nivelurilor de citokine umane) si determinarea eficacitatii terapeutice (cuprinde monitorizarea prezentei celulelor leucemice in sangele sau maduva osoasa a mamiferului non-uman prin detectarea expresiei proteinei fluorescente verzi prin citometria in flux). Inventia de fata se refera la metoda de evaluare a eficientei de grefare exemplificata pe leucemie secundara post - NMP, in particular post-policitemie vera cu JAK2V617F (MYAL 3672), cuprinzand masurarea dimensiunii



splinei si analiza prezentei unor populatii celulare de origine umana la nivelul maduvei osoase murine, prin citometrie in flux, si stabilirea profilului proinflamator care faciliteaza grefarea blastilor leucemici.

Problema pe care inventia actuala o rezolva este stabilirea unei metode de evaluare a grefarii xenotransplantului de leucemie mieloida acuta (LMA) intr-un model animal murin. In scopul de a recrea patologia LMA in animalul de laborator, celulele leucemice izolate de la pacienti sunt injectate in soareci imunodeficienti NSG, grefarea realizandu-se cu eficienta diferita in functie de metodele de obtinere a xenogrefei dar si datorita evaluarii inadecvate/minimale a acesteia.

Solutia pe care o propune prezenta inventie este stabilirea unei metode de evaluare a grefarii xenotransplantului de leucemie mieloida acuta (LMA) intr-un model animal murin (soareci imunodeficienti NSG preconditionati cu 25 mg/kg corp/zi busulfan), obtinut prin injectare de blastii in concentratie 10^7 celule blastice CD3-, adica aproximativ 5×10^6 celule CD34+, metode care includ masurarea dimensiunii splinei, analiza prin citometrie in flux a prezentei unor populatii celulare de origine umana la nivelul maduvei osoase murine si evaluarea micromediului care faciliteaza grefarea blastilor leucemici.

Avantajul solutiei propuse de prezenta inventie este stabilirea concentratiei celulare adecvate pentru grefare eficienta la soareci imunodeficienti NSG preconditionati cu busulfan, si stabilirea metodelor minime de evaluare a prezentei blastilor umani dar si de evaluarea a procesului inflamator in timpul grefarii blastilor leucemici, precum si implicatiile acestui proces in modificarea nisei hematopoietice, in sensul sustinerii grefarii si proliferarii clonei maligne.

Se prezinta in continuare 4 exemple ale inventiei in legatura cu figurile (7) si tabele (2):

Figuri (7):

Figura 1. Imagini dot-plot reprezentand caracterizarea prin citometrie in flux a populatiei celulare CD3 negativa obtinuta dupa selectia negativa a celulelor provenite din proba LMAs MYAL3672.

Figura 2. Imagine din timpul injectarii intravenoase a soarecilor NSG. Soarece anesteziat plasat in dispozitivul de continutie. Se evidentiaza vena codala pentru injectare.

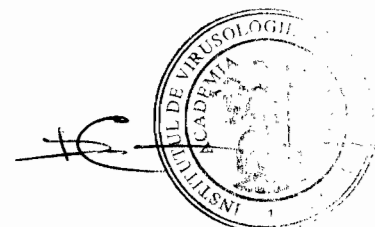
Figura 3. Analiza capacitatii de grefare a probei MYAL3672. Histograme reprezentand caracterizarea prin citometrie in flux a maduvei hematogene murine dupa injectare. Marcarea sa realizat cu anticorpi care tintesc specific celulele umane CD45+ (verde) versus controlul de autofluorescenta (rosu). a) 8; b) 20; c) 24 saptamani de la injectare.

Figura 4. Dimensiunea splinei la soareci NSG preconditionati cu busulfan si injectati cu proba LMAs (MYAL3672) comparativ cu lotul control preconditionat cu busulfan la a) 8; b) 20; c) 24; d) 34 de saptamani de la injectare.

Figura 5. Analiza capacitatii de grefare a probei LMAs (MYAL3672) la 34 saptamani de la injectare. (A) Imagini dot-plot reprezentand caracterizarea prin citometrie in flux a maduvei hematogene murine dupa injectare. Marcarea s-a realizat cu anticorpi care tintesc specific celulele umane CD45+ (rosu).

Figura 6. Profilul proinflamator rezultat in micromediul maduvei osoase murine in urma injectarii blastilor leucemici umani LMAs. Expresia citokinelor este prezentata in raport cu controlul neaktiv reprezentat de maduva murina de la un animal injectat doar cu tampon fosfat salin (TFS).

Figura 7. Reteaua de expresie a citokinelor proinflamatorii cu o crestere a expresiei mai mare de 1.5. Reteaua a fost construita folosind baza de date si instrumentul web STRING (<https://string-db.org>) care calculeaza si reprezinta grafic relatiile reciproce ale citokinelor selectate pe baza interactiunilor lor verificate experimental, co-expresii si co-citari in baze de date organizate si rezumate PubMed.



Tabele (2)

Tabel 1. Proteine din familia citokinelor si chemokinelor cu expresie crescuta de 1.5 ori in maduva hematogena a modelului murin generat prin injectarea de blasti leucemici umani izolati din LMAs.

Tabel 2. Cai de semnalizare implicate in procesele inflamatorii observate. Analiza bioinformatica efectuata cu Reactome Pathway.

Exemplul 1: *Obtinerea celulelor mononucleare de la pacienti si a celulelor mononucleare dupa depletia limfocitelor T CD3+*

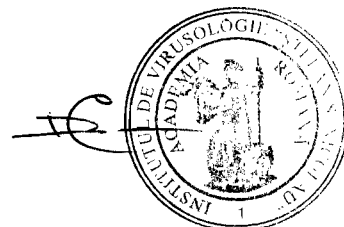
Separarea celulelor mononucleare din sange periferic (PBMC) recoltat pe anticoagulant s-a realizat prin centrifugare in gradient de densitate. Protocolul a implicat intr-un prim pas diluarea de doua ori cu TFS a sangelui periferic, pentru a asigura o separare celulara optima, dupa care sangele a fost adaugat incet peste un volum echivalent de mediu de separare (Lymphoprep™, # 07801, STEMCELL Technologies) si a fost centrifugat la o viteza de 800 x g timp de 20 de minute. In urma centrifugarii a rezultat un inel de PBMC-uri care a fost colectat, celulele fiind spalate de doua ori cu TFS si centrifugate la o viteza de 300 x g timp de 7 minute. Ulterior *celulele mononucleare au fost supuse depletiei de limfocitele T CD3+ prin* marcarea celulelor CD3+ cu bile magnetice, utilizand kitul CD3 MicroBeads human (cod catalog: 130-050-101, Miltenyi Biotec). Suspensia celulara a fost incarcata pe o coloana MS (cod catalog: 130-042-201, Miltenyi Biotec) care a fost plasata in campul magnetic al unui separator MACS astfel incat celulele CD3+ marcate magnetic sa fie retinute pe coloana. Celulele nemarcate trec si in aceasta fractiune celulara, numarul de celule CD3+ este semnificativ diminuat (depletia celulelor CD3+). Dupa indepartarea coloanei din campul magnetic, celulele CD3+ retinute magnetic pot fi eluate ca fractie de celule selectata pozitiv. Astfel, 10^7 celule mononucleare aflate in suspensie au fost centrifugate la o viteza de 300 x g timp de 10 minute pentru indepartarea completa a tamponului fosfat salin. Sedimentul de celule a fost resuspendat in 80 μ L tampon de lucru racit la 4 °C ce contine TFS pH 7,2, BSA (albumina serica bovina) 0,5% si EDTA 2 mM. Peste acest amestec s-au adaugat 20 μ L CD3 MicroBeads, amestecul a fost vortexat si incubat la 4–8 °C timp de 15 minute. Dupa expirarea timpului de incubare, celulele au fost spalate cu 1–2 mL de tampon de lucru, centrifugate la 300xg timp de 10 minute si s-a indepartat complet supernatantul. Ulterior celulele au fost resuspendate in 500 μ L tampon de lucru si s-a urmat protocolul de separare magnetica. Astfel, peste coloanele MS plasate in camp magnetic si spalate cu 500 μ L tampon de lucru a fost aplicata suspensia celulara. Celulele CD3-, nemarcate, care au trecut prin coloana au fost indepartate, si centrifugate iar coloana a fost spalata de trei ori cu tampon de lucru. Dupa spalarea coloanei aceasta a fost indepartata din separatorul magnetic si plasata intr-un tub de colectare de 12 ml, peste coloana aplicandu-se cu presiune 1mL tampon de lucru.

Exemplul 2: Caracterizarea prin citometrie in flux a populatiei celulare obtinuta in urma procedurii de selectie negativa

Pentru analiza s-a utilizat panelul de anticorpi CD34-FITC/CD33-PE/CD45-ECD (Beckman Coulter, # A07717) si anticorpi anti-CD38-Pacific Blue (Beckman Coulter, # B92396).

Rezultatele au aratat ca populatia obtinuta a fost reprezentata de 74,74% cellule CD45+, dintre acestea 48,40% fiind CD45+CD34+, unde CD34 este markerul pentru celule stem hematopoietice. Doar 5% dintre aceste celule au prezentat pe suprafata antigenul CD33, cunoscut ca fiind un marker al celulelor precursorare mieloide. S-a remarcat de asemenea absentia antigenului de suprafata CD38 (Figura 1). Celulele CD34+CD38- sunt cunoscute ca avand un potential de grefare crescut.

Pentru proba de leucemie secundara post - policitemie vera cu JAK2V617F (MYAL3672) au fost separate celule blastice CD3- in numar relativ crescut, respectiv 80×10^6 .



Exemplul 3: Elaborarea modelului animal - Injectarea soarecilor imunodeficienti NSG cu blasti leucemici

Una dintre conditiile identificate ca fiind necesare pentru dezvoltarea modelelor murine care suporta xenotransplantul si diferentierea mieloida este reprezentata de ablatia celulelor medulare de soarece pentru a crea nise deschise pentru celulele umane transplantate. Acesta ablatie poate fi obtinuta prin iradiere, prin introducerea mutatiilor genetice in gene cheie cu efect in hematopoieza cum ar fi gena c-Kit pentru receptorul SCF (McIntosh, Brown et al. 2015) sau prin utilizarea busulfanului (Choi, Chun et al. 2011, Kang, Ko et al. 2016). Utilizarea busulfanului ca agent chimioterapeutic este considerata o alternativa eficienta pentru conditionarea primitivului de transplant, mai simpla si mai putin toxica decat iradierea corporala totala.

Pentru preconditionare soarecii au fost injectati cu busulfan (25 mg/kg corp/zi). Umatoarele loturi de cate 8 soareci NSG preconditionati cu busulfan au fost injectati intravenos cu:

- **10 x 10⁶ blasti leucemici umani** proveniti de la o leucemie secundara post - NMP, respectiv post- policitemie vera cu JAK2V617F (MYAL3672) (Figura 2).
- TFS (doar preconditionati cu busulfan)

Soarecii au fost monitorizati zilnic urmarindu-se parametrii: modificare comportamentala, greutate corporala si grad de modificare la nivelul pielii (pierderea parului si eritem).

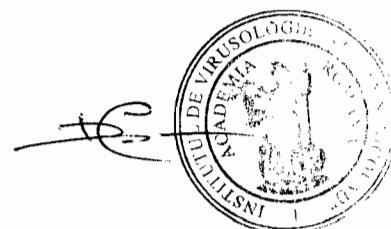
Exemplul 4: Evaluarea grefarii blastilor mieloizi umani CD3- in animalele model prin: masurarea dimensiunii splinei, analiza prin citometrie in flux a prezentei populatiilor celulare de origine umana la nivelul maduvei osoase murine si stabirea profilului proinflamator care faciliteaza grefarea blastilor leucemici

Evaluarea grefarii blastilor mieloizi umani CD3- injectati in concentratie de 10 x 10⁶ blasti / animal s-a realizat in comparatie cu animale din lotul control injectat doar cu TFS dar pre-conditionati cu busulfan.

Pentru investigarea grefarii blastilor mieloizi umani, soareci din fiecare lot au fost sacrificati la 8, 20, 24 si 34 de saptamani de la injectare. Investigatiile au vizat:

1. **Masurarea splinei:** animalele au fost sacrificate, iar splinele a fost recoltate si expuse in placa petri pentru a fi fotografiate.
2. **Analiza prezentei unor populatii celulare de origine umana la nivelul maduvei osoase murine prin citometrie in flux.** De la soarecii sacrificati s-a recoltat femurul din care s-a extras maduva hematogena prin injectare de tampon fosfat salin. Maduva a fost dispersata prin pipetare si filtrata prin mesa de 0,3 μ m pentru obtinerea unei suspensii unicelulare. Analiza prin citometrie in flux s-a realizat cu ajutorul panelul de anticorpi CD34-FITC/CD33-PE/CD45-ECD (Beckman Coulter, # A07717).
3. **Stabirea profilului proinflamator care faciliteaza grefarea blastilor leucemici** utilizand kitul Proteome Profiler Mouse Cytokine Array, si analiza integrativa a cailor de semnalizare activate prin xenotransplantarea LMA utilizand platformele web STRING si Reactome Pathway.

La evaluarea eficientei grefarii blastilor MYAL3672, prin metoda citometriei in flux, rezultatele noastre au aratat o crestere usoara a procentului de celule umane CD45+ (0,34%) la 8 saptamani post-injectare. Ulterior s-a remarcat mentinerea procentului de celule CD45+ pana la 20 de saptamani (0,34%), si cresterea acestuia la 24 saptamani post-injectare, respectiv 0,74% (Figura 3). De asemenea,



analiza rezultatelor se observa o usoara crestere in dimensiuni a splinei sorecilor injectati cu MYAL3672 (la 24 de saptamani de la injectare), comparativ cu controlul (Figura 4a,b,c).

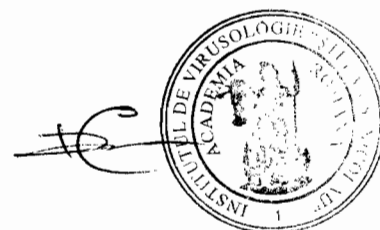
La 34 de saptamani, rezultatele au aratat o crestere semnificativa a procentului de celule umane CD45+ de la 0,74% la 24 de saptamani la 35,93% la 34 de saptamani post-injectare. Se remarca un procent similar de celule umane CD34+ (34,37%) si CD33+ (32,70%). De altfel, prin procedura de back-gating (colorare diferentiata a populatiilor celulare si prezentarea lor pe alte axe de fluorescenta) se poate observa ca populatia celulara de origine umana este triplu pozitiva CD45+CD34+CD33+ (Figura 5). Pe de alta parte, rezultatele au aratat si o crestere in dimensiuni semnificativa a splinei excizate la 34 saptamani comparativ cu splina soarecelui control injectat doar cu busulfan. Astfel, dimensiunea splinei a fost de 1,8 cm la modelul murin de LMA comparativ cu 1,3 cm la cel din lotul control, cresterea fiind de 0,5 cm (Figura 4d).

Pentru analiza nivelului de citokine murine s-a utilizat kitul Proteome Profiler Mouse Cytokine Array, Panel A (ARY006, R&D System) conform protocolului producatorului. Kitul are la baza metoda imunoenzimatica pe membrana si permite analiza simultana a 40 de citokine murine. Pe scurt, pentru analiza imunoblot, 180 µg extract proteic total din fiecare proba a fost amestecat cu un cocktail de anticorpi de detectie marcati cu biotina. Amestecul a fost incubat cu membrana continand spoturi de anticorpi de captare specifici pentru 40 de proteine tinta (citokine murine). Incubarea cu membrana s-a realizat peste noapte la 4 °C. Ulterior, membranele au fost spalate pentru a indeparta proteinele nelegate. Dupa spalarea repetata, membranele au fost incubate cu o solutie de streptavidina-HRP. Ulterior semnalele au fost detectate folosind reactia de chemiluminiscenta, semnalele fiind captate cu ajutorul MicroChemi 4.2 (Bio Imaging Systems). Imaginile au fost citite folosind software-ul ImageJ (National Institute of Health), iar analiza s-a efectuat utilizand valorile rezultate dupa scaderea zgomotului de fond (control negativ) din nivelurile semnalului si raportarea la proba control (maduva hematopoietica murina). Semnalul produs este proportional cu cantitatea de analit legata (Figura 6).

Analiza a confirmat existenta unui profil proinflamator bazat pe o serie de citokine precum interleukina 12 (sub forma heterodimerului activ IL-12p70), interleukina 1 alfa (IL-1 α), interleukina 1 beta (IL-1 β), proteina inflamatorie secretata de macrofage 1 (MIP-1 β), monokina indusa de interferonul gama (MIG), factorul de stimulare a coloniilor de granulocite si macrofage (GM-CSF), ligandul de chemokina 1 (CXCL1) ca raspuns la grefarea si evolutia clonei leucemice. Pentru analize ulterioare au fost selectate proteinele cu care au avut un nivel de expresie de 1,5 ori mai mare decat controlul negativ (Tabel 1).

Proteinele secretate in micromediul maduvei osoase joaca un rol critic in LMA.

Interleukina (IL)-12 este un regulator puternic al raspunsurilor imune mediate de celule care induce productia de IFN- γ de catre celulele NK si T. Este produs de monocite/macrofage activate, limfocite B si mastocite. Printre activitatile sale biologice, IL-12 promoveaza cresterea si activitatea celulelor NK, CD4+ si CD8+ activate si induce dezvoltarea celulelor Th1 producatoare de IFN- γ (Jia, Ragoonanan et al. 2022). **CCL11/Eotaxin** este o chemokina importanta in recrutarea eozinofilelor in locurile de inflamatie. Insa in diverse forme de NMP s-a aratat ca eotaxin creste semnificativ odata cu gradul de fibroza, fiind semnificativ mai crescut in grupul pacientilor cu mielofibroza primara > pacienti cu mielofibroza primara prefibrotica (pre-PMF) > pacientilor cu trombocitemie. In acelasi timp, nivelul Eotaxin in plasma se coreleaza foarte bine cu cel din maduva, sugerand o potentiala valoare diagnostica pentru subtipurile MPN si valoarea prognostica pentru progresia fibrozei (Chen, Wu et al. 2021). **Factorul de stimulare a coloniilor de granulocite si macrofage (GM-CSF)** si **interleukina (IL)-5** alcatuiesc, alaturi de IL-3, familia de citokine a lantului comun β , cu rol in reglarea raspunsurilor inflamatorii care promoveaza eliminarea rapida a agentilor patogeni, dar si cu o contributie importanta in inflamatia cronica (Dougan, Dranoff et al. 2019). **Interleukina (IL)-5** este o



citokina puternic proinflamatoare care este responsabilă în principal de maturarea, proliferarea, activarea și migrarea eozinofilelor. **Factorul de stimulare a coloniilor de granulocite și macrofage (GM-CSF)** este implicat în inițiere, proliferare, diferențiere și activarea macrofagelor, neutrofilelor, diferitelor celule de prezentare a antigenului și, într-o oarecare măsură, a celulelor T, în plus față de câteva funcții imunostimulatoare directe. Aproximativ 50% din cazuri de leucemie mieloblastică acută prezintă transcripti GM-CSF sugerând contribuția la proliferarea anormală caracteristică LMA (Young, Wagner et al. 1987). **Axele receptorilor de chemokine** joacă de asemenea un rol important în dezvoltarea leucemiei, fiind implicate în progresia tumorilor și a diferitelor boli inflamatorii prin acțiunea asupra sistemului imun (Yazdani, Hassanshahi et al. 2021). Activarea axei CXCLs/CXCR activează mai multe căi de semnalizare, inclusiv caile PI3K, p38/ERK și JAK și reglează supraviețuirea și migrarea celulelor (Cheng, Ma et al. 2019). **Ligandul de chemokina 1 (CXCL1)** acționează ca un chemoattractant pentru mai multe celule imune, în special pentru neutrofile sau alte celule non-hematopoietice la locul leziunii sau infecției și joacă un rol important în reglarea sistemului imunitar și inflamator. **Axa CXCLs/CXCR2** joacă un rol vital în mediul tumoral și în recrutarea neutrofilelor în situsurile inflamatorii. Infiltrarea extensivă a neutrofilelor în timpul inflamației cronice este unul dintre cei mai importanți factori patogeni în diferite boli inflamatorii. Inflamația cronică este considerată a fi strâns corelată cu inițierea cancerului. În plus, efectele imunosupresoare ale celulelor supresoare derivate din mieloid (MDSC) împotriva celulelor T atenuează efectele antitumorale ale celulelor T și promovează invazia tumorală. În ultimele câteva decenii, multe strategii terapeutice care vizează CXCR2 au arătat rezultate promițătoare și au intrat în studii clinice.

În continuare s-a utilizat baza de date și instrumentul web STRING (<https://string-db.org>) pentru studiul interacțiilor dintre proteinele supraexprimate (Figura 7) și analiza căilor de semnalizare activate cu ajutorul Reactome Pathway (Tabel 2). Se observă că, la 34 de săptămâni de la injectare, caile de semnalizare active sunt cele legate de semnalizarea prin MAPK1/MAPK3 și semnalizarea prin IL-6, un profil proinflamator care susține grefarea cu succes a LMAs dezvoltate din NMP JAK2V617F.

Bibliografie:

Barosi, G., M. Massa, R. Campanelli, G. Fois, P. Catarsi, G. Viarengo, L. Villani, V. Poletto, T. Bosoni, U. Magrini, R. P. Gale and V. Rosti (2017). "Primary myelofibrosis: Older age and high JAK2V617F allele burden are associated with elevated plasma high-sensitivity C-reactive protein levels and a phenotype of progressive disease." *Leuk Res* 60: 18-23.

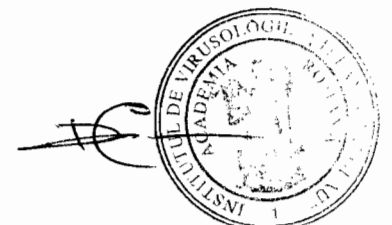
Chen, P., B. Wu, L. Ji, Y. Zhan, F. Li, L. Cheng, J. Cao, H. Chen, Y. Ke, Z. Min, L. Sun, F. Hua, H. Chen and Y. Cheng (2021). "Cytokine Consistency Between Bone Marrow and Peripheral Blood in Patients With Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms." *Frontiers in Medicine* 8.

Cheng, Y., X.-l. Ma, Y.-q. Wei and X.-W. Wei (2019). "Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1871(2): 289-312.

Choi, B., E. Chun, M. Kim, S. T. Kim, K. Yoon, K. Y. Lee and S. J. Kim (2011). "Human B cell development and antibody production in humanized NOD/SCID/IL-2R γ (null) (NSG) mice conditioned by busulfan." *J Clin Immunol* 31(2): 253-264.

Dougan, M., G. Dranoff and S. K. Dougan (2019). "GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation." *Immunity* 50(4): 796-811.

Elf, S., N. S. Abdelfattah, E. Chen, J. Perales-Patón, E. A. Rosen, A. Ko, F. Peisker, N. Florescu, S. Giannini, O. Wolach, E. A. Morgan, Z. Tothova, J. A. Losman, R. K. Schneider, F. Al-Shahrour and A. Mullally (2016). "Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation." *Cancer Discov* 6(4): 368-381.



Ellegast, J. M., P. J. Rauch, L. V. Kovtonyuk, R. Müller, U. Wagner, Y. Saito, N. Wildner-Verhey van Wijk, C. Fritz, A. Rafiei, V. Lysenko, E. Dudkiewicz, A. P. Theocharides, D. Soldini, J. S. Goede, R. A. Flavell and M. G. Manz (2016). "inv(16) and NPM1mut AMLs engraft human cytokine knock-in mice." *Blood* 128(17): 2130-2134.

Feuring-Buske, M., B. Gerhard, J. Cashman, R. K. Humphries, C. J. Eaves and D. E. Hogge (2003). "Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors." *Leukemia* 17(4): 760-763.

Griessinger, E., F. Anjos-Afonso, J. Vargaftig, D. C. Taussig, F. Lassailly, T. Prebet, V. Imbert, M. Nebout, N. Vey, C. Chabannon, A. Filby, F. Bollet-Quivogne, J. G. Gribben, J. F. Peyron and D. Bonnet (2016). "Frequency and Dynamics of Leukemia-Initiating Cells during Short-term Ex Vivo Culture Informs Outcomes in Acute Myeloid Leukemia Patients." *Cancer Res* 76(8): 2082-2086.

Jia, Z., D. Ragoonanan, K. M. Mahadeo, J. Gill, R. Gorlick, E. Shpal and S. Li (2022). "IL12 immune therapy clinical trial review: Novel strategies for avoiding CRS-associated cytokines." *Frontiers in Immunology* 13.

Kang, Y. K., Y. Ko, A. Choi, H. J. Choi, J. H. Seo, M. Lee and J. A. Lee (2016). "Humanizing NOD/SCID/IL-2R γ null (NSG) mice using busulfan and retro-orbital injection of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells." *Blood Res* 51(1): 31-36.

Li, R., N. Sun, X. Chen, X. Li, J. Zhao, W. Cheng, H. Hua, M. Fukatsu, H. Mori, H. Takahashi, H. Ohkawara, M. Fukami, M. Okamoto, Y. Hamazaki, K. Zheng, J. Yang and T. Ikezoe (2020). "JAK2(V617F) Mutation Promoted IL-6 Production and Glycolysis via Mediating PKM1 Stabilization in Macrophages." *Front Immunol* 11: 589048.

McIntosh, B. E., M. E. Brown, B. M. Duffin, J. P. Maufort, D. T. Vereide, Slukvin, II and J. A. Thomson (2015). "Nonirradiated NOD,B6.SCID Il2r γ ^{-/-} Kit(W41/W41) (NBSGW) mice support multilineage engraftment of human hematopoietic cells." *Stem Cell Reports* 4(2): 171-180.

Oh, S. T., E. F. Simonds, C. Jones, M. B. Hale, Y. Goltsev, K. D. Gibbs, Jr., J. D. Merker, J. L. Zehnder, G. P. Nolan and J. Gotlib (2010). "Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms." *Blood* 116(6): 988-992.

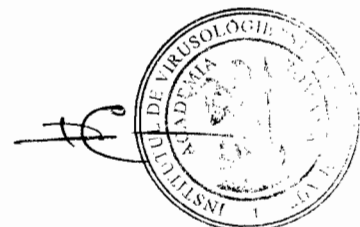
Paczulla, A. M., S. Dirnhofer, M. Konantz, M. Medinger, H. R. Salih, K. Rothfelder, D. A. Tsakiris, J. R. Passweg, P. Lundberg and C. Lengerke (2017). "Long-term observation reveals high-frequency engraftment of human acute myeloid leukemia in immunodeficient mice." *Haematologica* 102(5): 854-864.

Pardanani, A., T. Lasho, C. Finke, S. T. Oh, J. Gotlib and A. Tefferi (2010). "LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations." *Leukemia* 24(10): 1713-1718.

Pearce, D. J., D. Taussig, K. Zibara, L. L. Smith, C. M. Ridler, C. Preudhomme, B. D. Young, A. Z. Rohatiner, T. A. Lister and D. Bonnet (2006). "AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML." *Blood* 107(3): 1166-1173.

Raaijmakers, M. H., S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J. A. Schoonmaker, B. L. Ebert, F. Al-Shahrour, R. P. Hasserjian, E. O. Scadden, Z. Aung, M. Matza, M. Merckenschlager, C. Lin, J. M. Rommens and D. T. Scadden (2010). "Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia." *Nature* 464(7290): 852-857.

Sanchez, P. V., R. L. Perry, J. E. Sarry, A. E. Perl, K. Murphy, C. R. Swider, A. Bagg, J. K. Choi, J. A. Biegel, G. Danet-Desnoyers and M. Carroll (2009). "A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia." *Leukemia* 23(11): 2109-2117.



Shultz, L. D., B. L. Lyons, L. M. Burzenski, B. Gott, X. Chen, S. Chaleff, M. Kotb, S. D. Gillies, M. King, J. Mangada, D. L. Greiner and R. Handgretinger (2005). "Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells." *J Immunol* 174(10): 6477-6489.

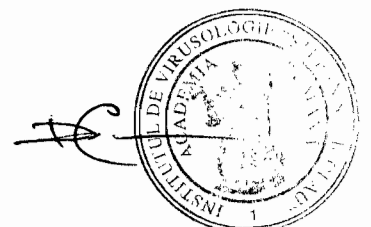
Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. V. Rajan, D. L. Greiner and et al. (1995). "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice." *J Immunol* 154(1): 180-191.

Stefanie, G., R.-P. Manuel, J. Paul, K. Annemarie, B. Felix, G. Julian, Z. Christoph, G. Ulrich, K. Guido, L. Frank, H. Rainer and S. Thomas (2018). "Transforming growth factor β 1-mediated functional inhibition of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia." *Haematologica* 103(9): 1462-1471.

Vainchenker, W. and R. Kralovics (2017). "Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 129(6): 667-679.

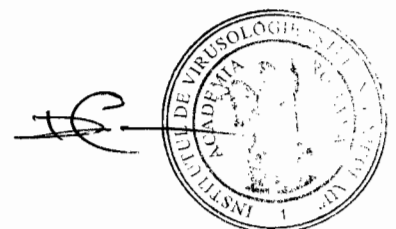
Yazdani, B., G. Hassanshahi, Z. Mousavi, Z. Ahmadi, H. Khorramdelazad, A. Moradabadi, M. Shafiepoor and A. Fatehi (2021). "CXCL1, CXCL10 and CXCL12 Chemokines are Variously Expressed in Acute Myeloid Leukemia Patients Prior and Post Bone Marrow Transplantation." *Asian Pac J Cancer Prev* 22(10): 3377-3384.

Young, D. C., K. Wagner and J. D. Griffin (1987). "Constitutive expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in acute myeloblastic leukemia." *The Journal of Clinical Investigation* 79(1): 100-106.



12.3. REVENDICARE: METODA DE EVALUARE A EFICIENTEI GREFARII XENOTRANSPLANTULUI DE LEUCEMIE MIELOIDA ACUTA (LMA) INTR-UN MODEL ANIMAL MURIN

Metoda de evaluare a eficientei grefarii xenotransplantului de leucemie mieloida acuta (LMA) intr-un model animal murin care este caracterizat prin aceea ca se obtin celulele mononucleare de la pacienti cu LMA, se realizeaza depletia de limfocitele T CD3+ printr-o procedura de selectie negativa, se caracterizeza blastii leucemici prin citometrie in flux, se injecteaza la soareci imunodeficienti NSG pentru obtinerea modelului murin cu blasti leucemici, urmata de evaluarea grefarii prin masurarea dimensiunii splinei, analiza prezentei unor populatii celulare de origine umana la nivelul maduvei osoase murine prin citometrie in flux si stabilirea profilului proinflamator care faciliteaza grefarea blastilor leucemici.



12.4 DESENE

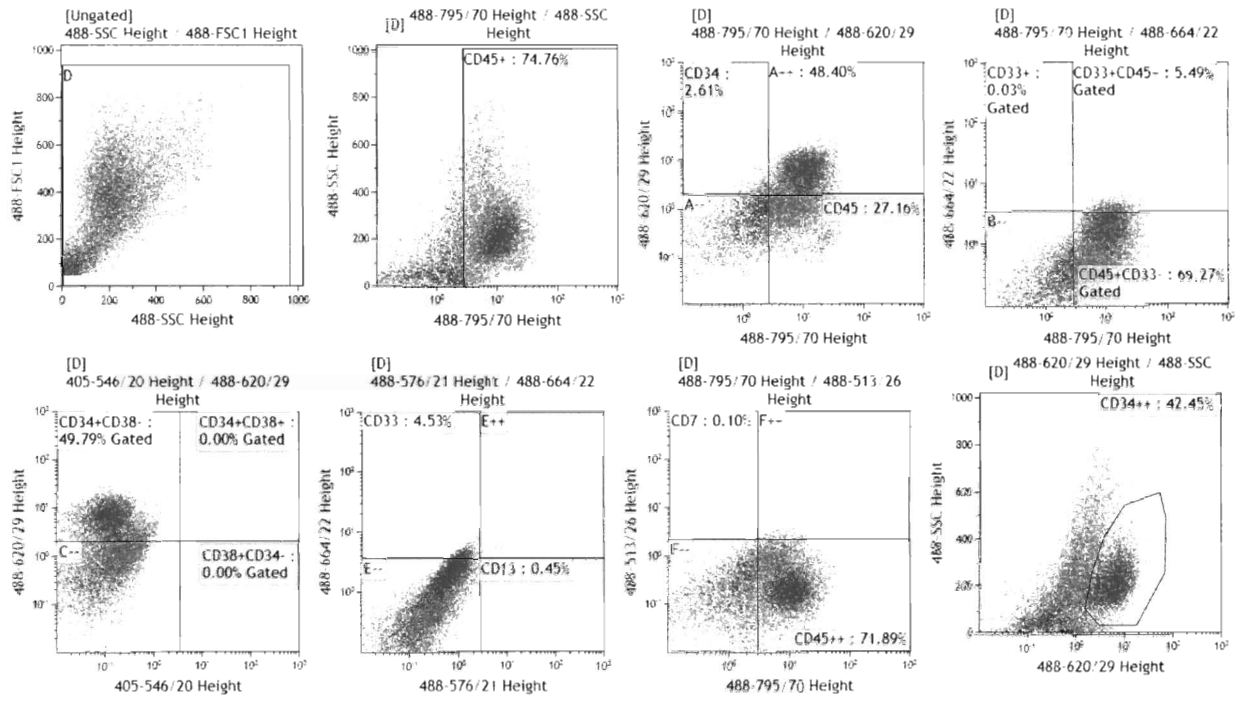


Figura 1.

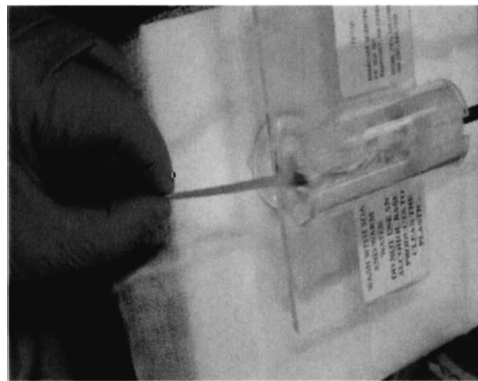
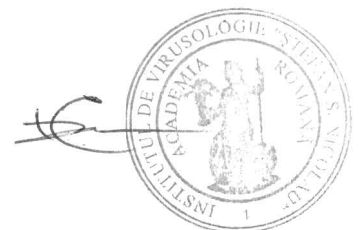


Figura 2



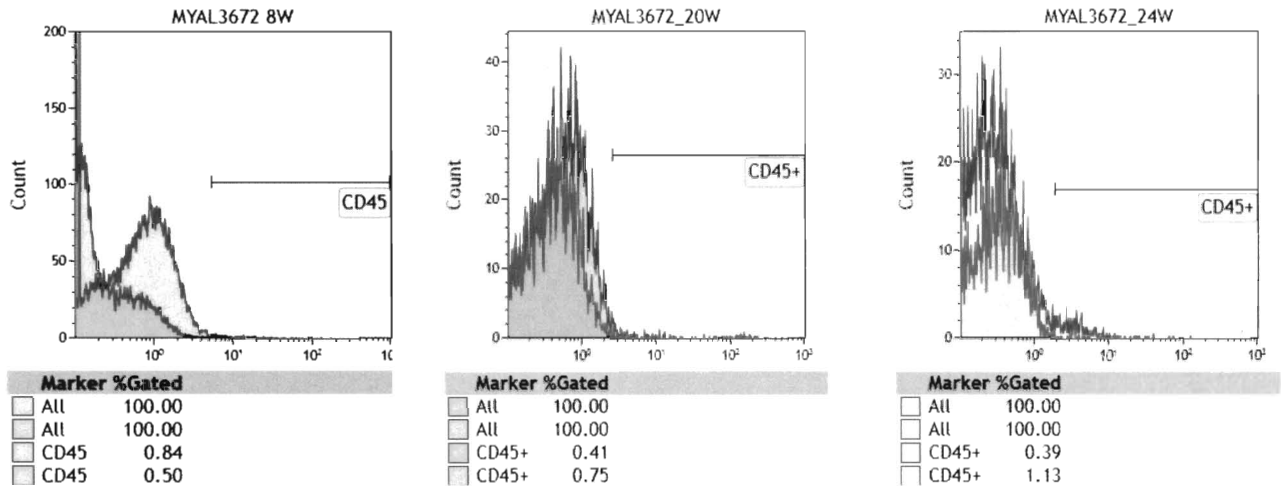


Figura 3.

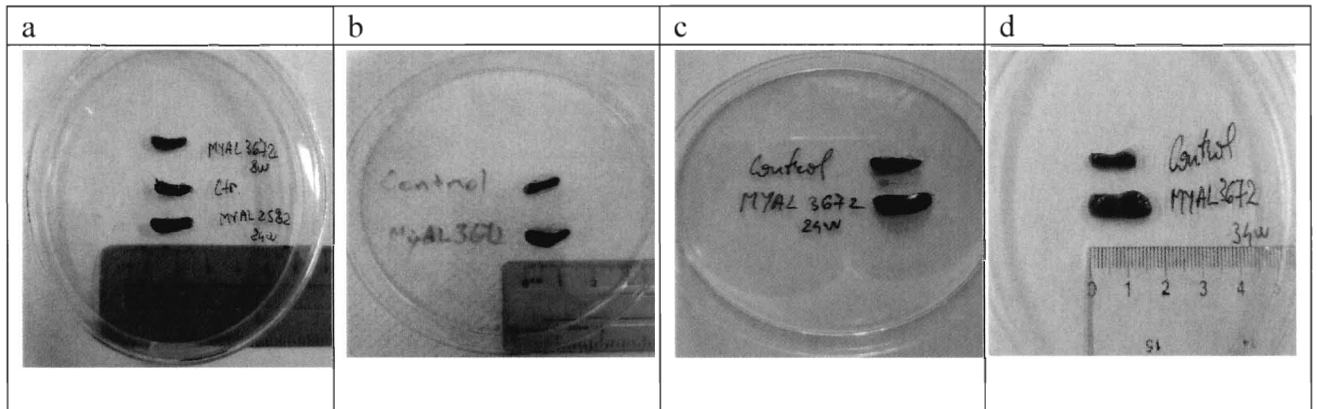


Figura 4.

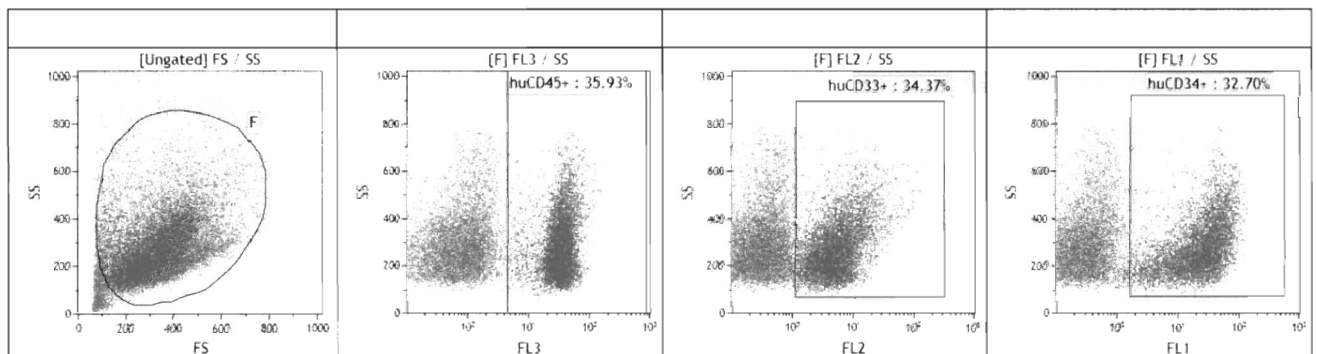
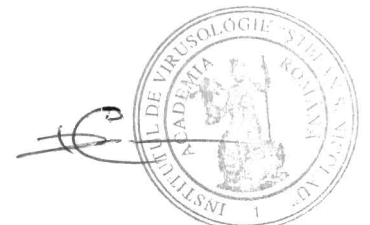


Figura 5.



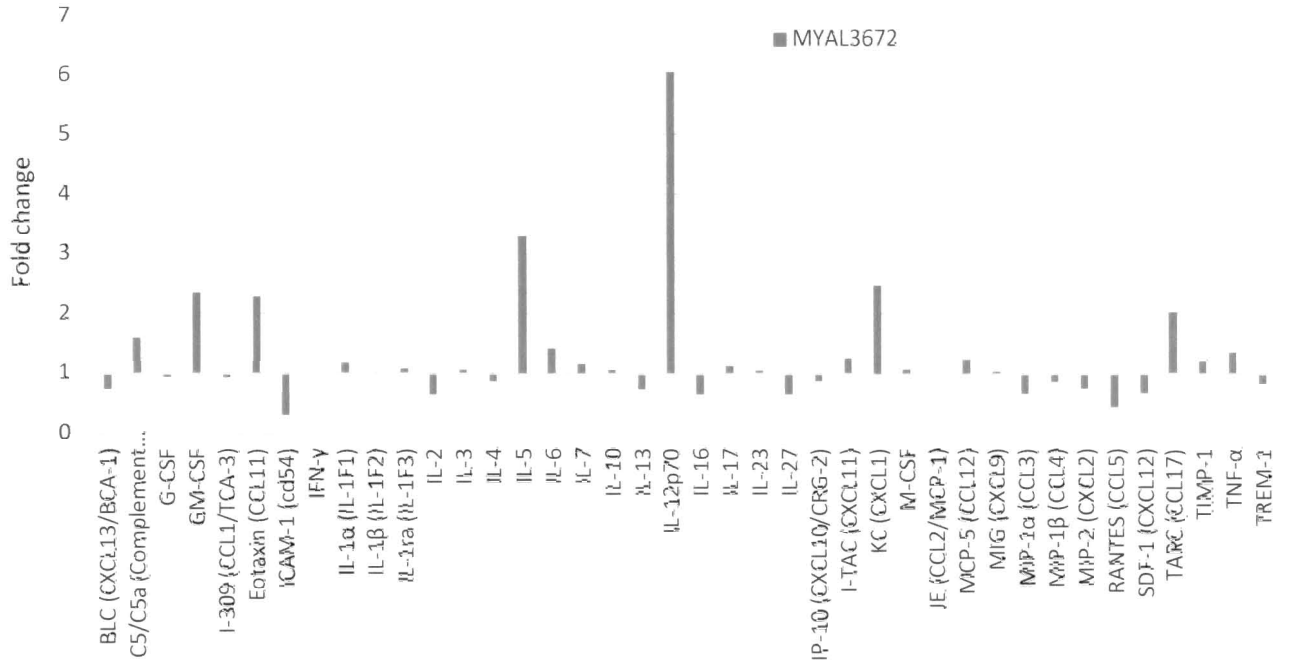


Figura 6.

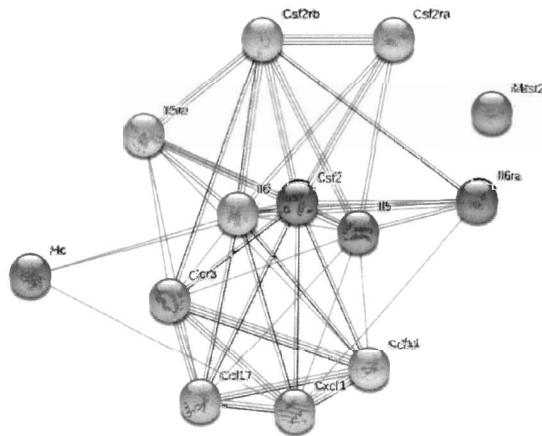


Figura 7.



Tabel 1.

Proteina	MYAL3672 LMAs cu JAK2V617F
IL-12p70	6,1
IL-5	3,3
KC (CXCL1)	2,5
GM-CSF	2,3
Eotaxin (CCL11)	2,3
TARC (CCL17)	2,0
C5/C5a	1,6
IL-6	1,4

Tabel 2.

Cai de semnalizare implicate conform Reactome Pathway (STRING)	Numar de gene implicate	Rata de descoperire falsa
MYAL3672 36W_JAK2V617F		
Transmiterea semnalului	8	0,0068
Sistem imun	6	0,0176
Receptori pentru peptide	4	0,0055
Semnalizarea prin interleukine	4	0,0068
Semnalizarea prin MAPK1/MAPK3	4	0,0068
Interactia chemokinelor cu receptorii proprii	3	0,0055
Semnalizarea prin IL-6	2	0,0068
Activarea MAPK3 (ERK1)	2	0,0068
Activarea MAPK1 (ERK2)	2	0,0068
Semnalizarea prin intermediul receptorului SHC pentru interleukine	2	0,0109

