

PROTINÁDOROVÁ VAKCÍNA S VYUŽITÍM MONOKLONÁLNÍHO IMUNOGLOBULINU U NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM - VÝSLEDKY KLINICKÉ STUDIE FÁZE II.

MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN-DERIVED VACCINE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA - PHASE II CLINICAL STUDY RESULTS

ZAHRAĐOVÁ L.^{1,2}, BÜCHLER T.^{1,2}, SMEJKALOVÁ J.², OČADLÍKOVÁ D.², KOVÁŘOVÁ L.², KREJČÍ M.¹, ADAM Z.¹, PENKA M.², VORLÍČEK J.¹, HÁJEK R.^{1,2}

¹INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

²LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE (LEHABI), ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

Souhrn

Východiska: Idiotypové (Id) proteinové struktury monoklonálního imunoglobulinu produkovaného maligními buňkami mnohočetného myelomu jsou exprimovány na buněčném povrchu myelomových plazmatických buněk a dají se využít pro indukci nádorově specifických T lymfocytů. **Typ studie a soubor:** V našem centru proběhla klinická studie fáze II, kde se Id-protein po konjugaci s imunogenním nosičem keyhole limpet hemocyanin (KLH) podával pacientům s mnohočetným myelomem. K posledním 3 aplikacím vakcíny se přidával interleukin 2. Vakcína byla použita ve skupině 12 nemocných po vysokodávkované chemoterapii s autologní transplantací kmenových buněk se stabilním nebo mírně aktivním onemocněním, u kterých nebyla indikována standardní terapie. **Metody a výsledky:** Podání vakcíny mělo minimální toxicitu. Během sledování došlo k progresi onemocnění u 3 pacientů, jedna pacientka zemřela bez souvislosti s vakcinací. Klinická odpověď na imunoterapii nebyla zaznamenána. Ve všech případech byla zaznamenána pozitivita testu oddálené hypersenzitivity na obě složky vakcíny (Id protein i KLH). Proliferační test mononukleárních buněk v přítomnosti antigenu byl pozitivní u 2 pacientů, aktivace mononukleárních buněk pomocí IFN γ metodou ELISPOT na úrovni jednotlivé buňky nebyla prokázána. Nespecifická monitorace imunitního systému neprokázala významnou aktivaci žádné složky imunity. Bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení počtu paměťových B lymfocytů. **Závěry:** Výsledky naznačují, že imunitní systém nemocných je schopen reakce na podaný antigen, který však není natolik imunogenní, aby vyvolal klinickou odpověď.

Klíčová slova: Id-protein, imunoterapie, mnohočetný myelom

Summary

Backgrounds: Malignant cells in multiple myeloma produce a monoclonal immunoglobulin which is tumor-specific and can be used for the induction of T lymphocytes. The idiotype (Id) is expressed at the cell surface of malignant plasma cells and allows for recognition and targeting of these cells by Id-specific T lymphocytes. **Design and subject:** A phase II clinical study underwent in our centre, investigating the efficacy and toxicity of Id conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH) given as a vaccine. 12 patients with multiple myeloma with stable disease or with slow progression not requiring systemic therapy were immunized six times without interleukin-2 (IL-2) or with IL-2 in the last three vaccination. **Methods and Results:** No significant toxicities were observed during vaccination. Three patients relapsed during the study, one patient died without connection to vaccination. Id-specific delayed type hypersensitivity skin tests were positive in 7 of 7 tested patients. The generation of Id-specific T-cell proliferative responses was documented in 2 patients. No significant production of interferon gamma was recorded. Relative number of memory B cells increased. No significant clinical response was observed. **Conclusions:** These findings shows that Id-protein is not a strong immunogen, therefore, the Id-KLH vaccine boosted by IL-2 can not evoke a significant clinical response.

Key words: Id-protein, immunotherapy, multiple myeloma

Úvod

Nádorové buňky u mnohočetného myelomu produkují monoklonální imunoglobulin, který je prokazován v séru pacientů. Idiotypové (Id) proteinové struktury jsou exprimovány a pre-

zentovány hlavním histokompatibilním komplexem (MHC) na buněčném povrchu myelomových plazmatických buněk, a takto jsou předkládány jako vysoce specifický antigen asociovaný s nádorem (tumor-associated antigen) (1-3). Tato pre-

zentace Id-proteinu umožňuje předkládat nádorovou plazmatickou buňku jako terč pro Id-specifické T-buňky (4). Vakcinace Id-proteinem je jednou z možností imunoterapie mnohočetného myelomu a jiných B-buněčných malignit s cílem vyvolat specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Vzniklá celulární i humorální odpověď pak kontroluje růst myelomového klonu (3,5,6). V našem centru proběhla v roce 2003 - 2004 klinická studie, které se Id-protein po konjugaci s imunogenním nosičem keyhole limpet hemocyanin (KLH) podával pacientům s mnohočetným myelomem ve fázi stabilního onemocnění. Jedná se o první protinádorovou vakcínu vyrobenou v České republice. V článku uvádíme definitivní hodnocení souboru pacientů, první informace o studii byly publikovány v Büchler et al 2004 (7).

Soubor hodnocených pacientů a metody
Design studie

Vakcína byla použita ve skupině 12 předléčených nemocných se stabilním onemocněním nebo s mírnou aktivitou nevyžadující standardní terapii. Charakteristika pacientů ve studii je uvedena v tabulce 1. Pro všechny nemocné s MM byla základní podmínkou měřitelnost onemocnění pomocí imuno elektroforézy. Vakcína byla aplikována v měsíčních intervalech. Vždy se jednalo o očkovací látku Id proteinu konjugovaného s KLH, imunogenním peptidem, který byl při vakcinacích již vyzkoušen (8-10). Pro první 3 podání vakcíny byla podána vakcína samotná (0,5mg), poté byla při následujících 3 podáních vakcína kombinovaná s interleukinem-2 (IL-2) v netoxické dávce 1x10⁶IU/m² vyzkoušené v první generaci našich imunoterapeutických protokolů (11). Cytokin byl přidán ve snaze maximalizovat stimulační účinek vakcíny na buněčnou imunitu. Pacienti museli pro zařazení do studie splňovat tato kritéria: jednalo se o myelom produkující měřitelné množství sérového M-Ig, jehož hladina byla >10g/l, onemocnění bylo v platé fázi, pacient neobdržel poslední 3 měsíce žádnou specifickou léčbu na MM včetně glukokortikoidů a podepsal informovaný souhlas. Vylučovací kritéria studie byl nesecernující nebo relabující myelom a další závažná choroba s negativním vlivem na délku života.

Počet pacientů	12 (9 žen, 3 muži)
Věk (medián, rozsah)	62 (48-76) let
Typ myelomu	8 IgG kappa, 4 IgG lambda
Doba od stanovení dg. (medián, rozsah)	59 (13-108) měsíců
Předchozí léčba	medián 8 (4-14) cyklů chemoterapie 5 pacientů 1 x SCT, 2 pacienti 2x SCT UL: 9 pac. IFN, 1 pac. DEX, 2 pac. thalidomid
Vstupní stav nemoci (medián, rozsah)	MIg: 14,6 (10,2-34,2) g/l albumin: 42,4 (36,4-46,4) g/l beta 2-mikroglobulin: 2,1 (1,1-4,1) mg/l infiltrace kostní dřeně: 2,4 (0-10,8)%

Tab. 1.: Charakteristika pacientů.

SCT- autologní transplantace kmenových buněk
UL- udržovací léčba
IFN- interferon-alfa
DEX – dexamethason
MIg – monoklonální imunoglobulin

Terapeutické schéma

Terapeutické schéma je uvedeno v tabulce 2.

Příprava vakcíny

Izolace Id proteinu byla provedena z periferní krve nemocných s mnohočetným myelomem technikou afinitní chromatografie. Po vysrážení imunoglobulinové frakce síranem amonným v poměru

Cyklus A	Den 0	Podání Id-KLH, min. 0.5 mg i.d.
	Den 1-28	Bez léčby
Cyklus B – IL-2	Den 0	Podání Id-KLH, min. 0.5 mg i.d.
	Den 1-14	IL-2 1x 106 IU/m2 3 x týdně
	Den 15-28	Bez léčby

Tab. 2.: Terapeutické schéma vakcinace autologním Id-proteinem konjugovaným s KLH u pacientů s mnohočetným myelomem.

1:1 byla směs míchána 24 hod.; 4°C. Následovala centrifugace 20min; 10 000 rpm. Získaný precipitát byl rozpuštěn v minimálním množství fyziologického roztoku (PBS, pH 7,3) a dialyzován pro odstranění srážecího činidla. Při dialýze bylo použito dialyzační střívk (68035CY, MWCO:3,5K; BioTech), dialyzační roztok (PBS, pH 7,3), doba dialýzy 24 hodin s 3 násobnou výměnou dialyzačního roztoku. Následovalo stanovení koncentrace M-Ig v dialyzátu imunoturbidimetricky. Vlastní izolace M-Ig afinitní chromatografií byla provedena na protein-G koloně (Sigma P4691; kapacita kolony-30mg Ig/1ml Proteinu G). Vzorek byl na kolonu nanesen v množství, které odpovídalo kapacitě kolony. Nenavázané frakce byly odstraněny promytím 25-50 ml fyziologického roztoku (PBS, pH 7,3). Eluce navázaného proteinu byla provedena 0,2M glycínem (pH 2,7). Byly odebrány jednotlivé frakce po 0,9 ml, které byly okamžitě neutralizovány přidávkou 0,1 ml 1M TRIS - baze. Obsah proteinů ve frakcích byl stanoven na základě měření absorbance při vlnové délce 280nm. Dále byla provedena 4 hodinová inkubace s ekvivalentním množstvím proteinu KLH (Sigma) za přítomnosti 0, 1% glutaraldehydu (Sigma). Výsledný konjugát byl zbaven endotoxinu inkubací s Polymyxinem B (Sigma). Následovalo přečištění dialýzou a přefiltrování (0,22 m filtr) konjugátu (12). Případná přítomnost bakteriálních endotoxinů byla vyloučena LAL testem (Limus Amebocyte Lysate, Bio Whittaker).

Monitorování klinické a imunologické odpovědi

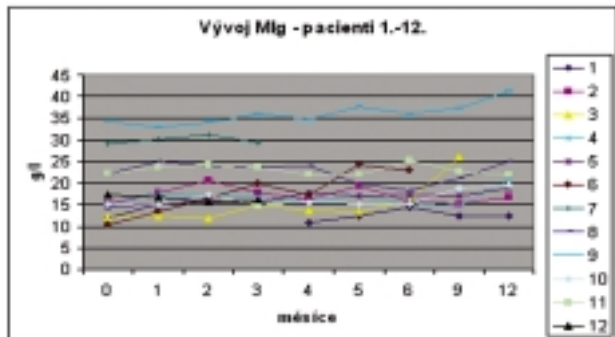
Vyšetření zahrnovala vyhodnocení imunitního systému a jeho reakce na vakcínu, klíčové bylo hodnocení léčebné účinnosti. Léčebná odpověď byla hodnocena dle EBMT kritérií. (13) Stimulace specifické imunitní odpovědi byla hodnocena thymidinovým proliferačním testem mononukleárních buněk v přítomnosti antigenu s pozitivní a negativní kontrolou a metodou ELISPOT. Metodou ELISPOT byla hodnocena specifická aktivace imunitního systému antigenem (Id-protein) na základě produkce aktivačního markeru interferonu gama (IFN γ) hodnocená na úrovni jednotlivé buňky. (2) Nespecifická imunitní odpověď byla hodnocena pomocí diferenciálního krevního obrazu a výsledků flow cytometrického panelu. Byly sledované tyto parametry: antigeny T buněk (CD3, CD5, kombinace CD4/8), NK buněk (kombinace CD16/CD56), B buněk (kombinace CD19/CD20), monocytů (CD14), dendritických buněk (kombinace CD83/DR/11c a CD83/DR/123) a aktivačních markerů (CD25, CD69, HLA-DR, CD45RO, CD45RA). Specifická imunitní reakce IV. typu byla hodnocena pomocí kožního testu s Id-proteinem a KLH, hodnotila se velikost zarudnutí a indurace (8). Test byl prováděn po dokončení série vakcinací. Současně byl odebrán základní panel autoimunity pro objektivní zhodnocení možnosti rizika autoimunity (protilátky anti-thyreoglobulin IgG, ANA (ANF) screening, ASLO, RF, IgE celkové). Dále byly před zahájením vakcinace zamrazeny 10 ml plazmy a 10 ml séra a 1x10⁶ mononukleárních buněk pro potřebu dalšího hodnocení.

Výsledky

Sledování klinické a imunologické odpovědi na vakcínu

Vakcinace byla předčasně ukončena u 2 pacientů, v jednom případě pacient zemřel ve 4. měsíci vakcinace na náhlou srdeční smrt při současném onemocnění srdce, v druhém případě nastala progresse onemocnění ve 4. měsíci vakcinace. U 2 paci-

entů došlo k progresi onemocnění s nutností specifické terapie po ukončení vakcinace v 6. a 9. měsíci sledování. Základním parametrem pro sledování klinické odpovědi na vakcínu byla hladina monoklonálního imunoglobulinu v séru pacientů. Během vakcinací a při sledování po 3 a 6 měsících po jejím ukončení nebyla zaznamenána klinická odpověď u žádného pacienta, hladina MIG kolísala po dobu sledování v rozmezí 25% s výjimkou progredujících pacientů (graf 1). Specifická aktivace imunitního systému na základě produkce aktivního markeru IFN γ hodnocená na úrovni jednotlivé



Graf 1: Vývoj hladin monoklonálního imunoglobulinu (MIG) v průběhu vakcinací a 6 měsíců po ukončení vakcinace. K progresi onemocnění došlo u pacientů č. 2, 4 a 5.

buňky metodou ELISPOT byla pozitivní pouze ve dvou případech. Nejednalo o stejného pacienta a pozitivita testu byla vždy jednorázová. V jednom případě se objevila pozitivita již ve vstupním vzorku (průměrně 11 spotů), v dalších měsících se neopakovala. V druhém případě byla pozitivita detekována pouze ve 3. měsíci sledování (11,5 spotů).

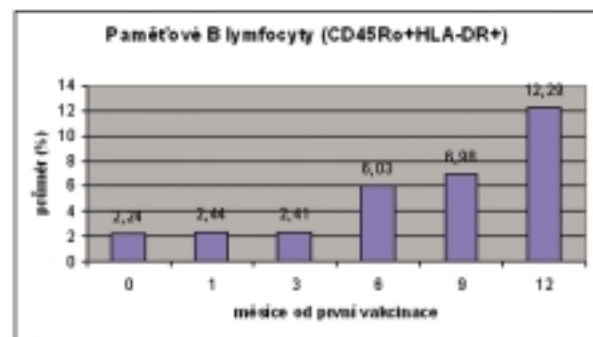
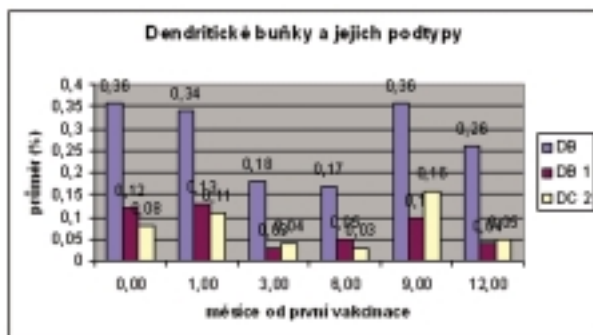
Proliferační specifických T lymfocytů stimulovaných Id proteinem byla hodnocena thymidinovým proliferačním testem. Test byl prováděn při vstupu do studie a dále každé 3 měsíce v průběhu a po ukončení vakcinací. Specifická anti-Id odpověď na Id-vakcínu byla pozorována u 2 pacientů. U pacientů s progresí byl proliferační index (poměr proliferační aktivity lymfocytů pacienta stimulovaných koncentrovanou vakcínou a proliferační aktivity samotných lymfocytů) ve srovnání s výchozí hodnotou při zahájení vakcinace v jednom případě bez významné změny (0,97 vs 1,05), v druhém případě zvýšen (0,93 vs 1,79) a ve třetím snížen (1,36 vs 0,8). Významné změny proliferačního indexu v souvislosti s progresí onemocnění nebyly tedy pozorovány.

Pomocí nespecifického hodnocení reakce imunitního systému na základě flow cytometrického panelu nebyly zaznamenány jasné známky aktivace imunitního systému reagující na podanou vakcínu. Ve 6, 9 a 12 měsíci sledování bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení počtu paměťových B lymfocytů (CD45RO⁺, HLA-DR⁺) oproti hodnotám před vakcinací (2,24% vs 6,03% resp. 6,98%, 12,29%; $p=0,015$ resp. 0,021, 0,017), snížení oproti hodnotám před vakcinací bylo zaznamenáno u monocytů (CD14⁺) v 9. měsíci sledování (0,779% vs 0,043%; $p=0,043$), u dendritických buněk (CD83⁺) v 3. a 6. měsíci (0,36% vs 0,18% resp. 0,17%; $p=0,011$, resp. 0,028), přičemž nedošlo ke změně jednotlivých podtypů DB, a v případě aktivčního markeru CD69⁺ na CD8⁺ T lymfocytech v 9. a 12. měsíci sledování (0,78% vs 0,37%, resp. 0,40% ; $p=0,015$, resp. 0,028). Výsledky flow cytometrického panelu viz. graf 2.

Jednoznačná pozitivita u všech pacientů byla detekována v případě specifické reakce IV. typu. Jako pozitivní reakce bylo hodnoceno zarudnutí a indurace. Kožní reakce byla testována jak na KLH, tak na Id vakcínu. Ve všech sedmi hodnocených případech došlo k zarudnutí, ve čtyřech případech též k induraci. U 4 pacientů byla reakce na Id vakcínu výraznější než reakce na KLH. Oddálený test hypersenzitivity byl jako jediný prokazatelně pozitivní u většiny pacientů, jeho pozitivita však nekorelovala

s imunologickými parametry ani klinickou odpovědí na vakcínu. Specifická imunitní odpověď, klinická odpověď ani nespecifická aktivace imunitního systému nebyla pozorována.

Nežádoucí účinky a reakce na vakcínu



Graf 2. Výsledky flow cytometrického panelu.

Během všech vakcinací jsme ve vakcinační studii nezaznamenali závažnější toxickou reakci stupně III/IV dle WHO. Z celkového počtu 65 vakcinací u všech pacientů byly u 4 pacientů zaznamenány febrilie nad 38°C, u 9 pacientů subfebrilie a u dvou jiné obtíže (exantém po podání IL-2, bolesti kloubů). U všech pacientů došlo po podání k lokální reakci - erytému v místě injekce, po první vakcinaci v průměru 50mm (min.25, max.65), po druhé 57mm (min.0, max.100). U 50% pacientů došlo i ke vzniku indurace. Lokální obtíže vymizely do 3-5 dnů.

Diskuze

Podání vakcín sestávajících z nádorového antigenu (Id protein, myelomové buňky) v kombinaci s imunostimulační látkou - proteinem keyhole limpet hemocyanin (KLH) nebo bez ní má minimální toxicitu. V odborné literatuře není popsán případ, kde by došlo k závažnějšímu ohrožení nemocného, podání vakcín lze považovat za bezpečnou terapii.

Klinický léčebný efekt ve smyslu redukce nádorové hmoty nebyl v průběhu sledování pozorován. V naší klinické studii nebyl dosud dosažen medián přežití, nelze se tedy vyjádřit k posouzení vlivu vakcinace na celkové přežití nemocných. Z předchozích studií však vyplývá, že nedostatečný léčebný efekt neovlivňuje negativně celkové přežití pacientů ani dobu do progresu onemocnění. (2, 3, 8)

V popsáných studiích prodělala většina zařazených pacientů chemoterapii případně vysokodávkovanou chemoterapii s autologní transplantací krevetvorných buněk. Vakcíny se skládaly z autologního nekonjugovaného Id proteinu vysráženého v aluminium fosfátu (2), podaného spolu s GM-CSF (3) nebo konjugovaného s KLH a zároveň podaného s GM-CSF, případně IL-2 (8). U jednoho pacienta došlo k poklesu sérového IgM o 65%, který trval 1 rok, žádná další klinická odezva nebyla pozorována.

Klíčovým prostředkem ke zhodnocení ovlivnění imunitního systému a účinnosti a rozsahu protinádorové odpovědi u vakci-

novaných pacientů je monitorace imunitního systému. Hodnotili jsme specifickou i nespecifickou složku imunitního systému. Proliferačním testem byla ve studii detekována Id-specifická odpověď u 2 z 12 pacientů. V literatuře byla odpověď zaznamenána u 20% pacientů. Proliferační test nemusí být nejvhodnější metodou k hodnocení buněčné zprostředkované imunitní odpovědi. Jednak generace cytotoxických T lymfocytů (což je hlavní cíl vakcinací) se může projevit spíše produkcí cytokinů než významnou proliferací. Dále pak může být frekvence Id- reaktivních T buněk tak nízká, že nemusí být detekovatelná krátkodobými proliferačními testy.

Pomocí testu oddálené hypersenzitivity jsme u všech sedmi pacientů, u kterých byl test prováděn, zaznamenali pozitivní reakci nejen na KLH, ale také na samotný Id protein. Ve 4 případech byla reakce výraznější na Id než na KLH. Test je založen na lokálním rozpoznání antigenu, kterým byl hostitel imunizován po předchozí expozici, prostřednictvím CD4 a CD8 T lymfocytů. Ve studii Massaia et al. (8) prováděli biopsie z místa pozitivní kožní reakce. Zaznamenali perivaskulární infiltrace CD4 a CD8 T lymfocyty bez granulocytární komponenty, což odpovídá histologickému nálezu antigen-specifické kožní reakce. Intenzita perivaskulární infiltrace odpovídala intenzitě lokální reakce. Naopak kožní test hypersenzitivity byl negativní ve studii Osterborga et al. (3), kde byli pacienti vakcinováni autologním Id bez přítomnosti KLH. Tato diskrepance může souviset s různým protokolem vakcinací jako je konjugace s KLH, dávky a typy použitých cytokinů a počet imunizací. Tato skutečnost svědčí o tom, že organismus na podanou vakcínu sice reaguje, ale reakce není dostatečně silná nejen k vyvolání klinické odpovědi, ale i pozorovatelného efektu na imunitní systém nemocného ve smyslu aktivace antigen kompetentních buněk. Bergenbrand et al. (2) sledovali také humorální imunitní odpověď na Id protein u vakcinovaných pacientů a s použitím metody Elispot detekovali B buňky produkující anti-Id protilátky. Jejich počet stoupal v průběhu imunizace, po skončení pak došlo k poklesu.

V naší studii se nepodařilo až na 2 výjimky (v jednom případě již ve vstupním vzorku před vakcinací) prokázat aktivaci T lymfocytů pacientů na základě produkce IFN γ . Jiní autoři (3) zvýšenou produkci cytokinů prokázali. Produkce IFN γ , ale také IL-2 stoupla až 2-3 násobně.

Pomocí nespecifického hodnocení reakce imunitního systému na základě flow cytometrického panelu nebyly zaznamenány jasné známky aktivace imunitního systému. Tato metoda je pravděpodobně málo citlivá ke zhodnocení stavu imunitního systému po málo výrazné stimulaci jakou je Id-protein.

Celkové výsledky lze hodnotit jako očekávané. Podobný typ vakcín byl již vyzkoušen a nežádoucí účinky byly vždy zanedbatelné. Podobně tomu bylo i v této studii.

U pacientů s MM po vysokodávkované chemoterapii s autologní transplantací krevetvorných buněk se podařilo vyvolat reakci imunitního systému, ale omezenou pouze na kožní test oddálené hypersenzitivity a ve 2/12 případech proliferační test. Tyto výsledky svědčí o tom, že imunitní kompetence je u těchto pacientů přes předchozí léčbu zachována. Z výsledků studie je však zjevné, že ani použití Id-KLH (6x) spolu s imunomodulační dávkou IL-2 nedokáže vystimulovat imunitu nemocného k pozorovanému klinickému účinku, respektive poklesu monoklonálního imunoglobulinu. Na druhé straně vzhledem k zanedbatelným nežádoucím účinkům může být Id-KLH vakcinace využita k udržovací terapii po autologní transplantaci periferních kmenových buněk. Coscia et al. publikovali podobnou účinnost Id-KLH vakcinace jako při použití IFN α nebo kombinaci IFN α s kortikoterapií (14). O to více je nezbytné pokračovat ve vývoji účinnějších vakcín v rámci klinických studií fáze II z oblasti buněčné terapie. Další perspektivní imunoterapeutickou možností je využití přirozeného adjuvans dendritických buněk (5,6). Při použití dendritických buněk dochází k výraznější aktivitě odpovědi T-lymfocytů ve srovnání se samotnou Id-KLH vakcínou (15, 16, 17). Další možností posílení imunitní reakce organismu na vakcínu je použití více imunogenního antigenu ve formě apoptických tělísek nádorových buněk nebo vybraných proteinů (18). Protokol klinické studie, kde by se u pacientů s mnohočetným myelomem podávaly dendritické buňky exprimující autologní Id-protein či jiný nádorový antigen, v současnosti připravujeme.

Poděkování

Tato práce vznikla ve spolupráci s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství.

Došlo: 20. 9. 2005

Přijato: 15. 10. 2005

Literatura

1. Kwak LW, Taub DD, Duffey PL et al. Transfer of myeloma id iotype-specific immunity from an actively immunized marrow donor. *Lancet* 1995; 345: 1016-20.
2. Bergenbrand S, Yi Q, Osterborg A et al. Modulation of anti-idiotypic immune response by immunization with the autologous M-component protein in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 1996; 92: 840-6.
3. Osterborg A, Yi Q, Henriksson L et al. Idiotype immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type I, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T-cell responses. *Blood* 1998; 91: 2459-66.
4. Titzer S, Christensen O, Manzke O et al. Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cell: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* 2000; 108: 805-16.
5. Büchler T, Hájek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma: advances and limitations. *Med Oncol* 2002; 19: 213-8.
6. Büchler T, Musilová R, Kovářová L, Hájek R. Vakcíny v léčbě mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie* 2002; 15 (Suppl): 44-7.
7. Büchler T, Hanak L, Smejkalová J et al. Využití monoklonálního imunoglobulinu k přípravě protinádorové vakcíny u nemocných s mnohočetným myelomem - první zkušenosti z klinické studie. *Klinická onkologie* 2004; 17: 64-7.
8. Massaia M, Borriero P, Battaglio S et al. Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999; 94: 673-83.
9. Reichardt VL, Okada CY, Liso A. Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma - a feasibility study. *Blood* 1999; 93: 2411-9.
10. Liso A, Stockerl-Goldstein KE, Auffermann-Gretzinger S et al. Idiotype

- vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 621-7.
11. Hájek R, Zacková D, Buchler T et al. Treatment of chronic myeloid leukemia with autologous transplantation using peripheral blood stem cells or bone marrow cultured in IL-2 followed by IL-2, GM-CSF, and IFN- α administration. *Med Oncol* 2003; 20: 69-76.
12. Musilová R, Táborská E, Bourková L et al. Příprava a použití nádorového antigenu z patologického imunoglobulinu pro pacienty s mnohočetným myelomem. *Transfúze a hematologie* 2002; 8: 91-5.
13. Blade J, Samson D, Reece D et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1998; 102: 1115-23.
14. Coscia M, Mariani S, Battaglio S et al. Long-term follow-up of idiotype vaccination in human myeloma as a maintenance therapy after high-dose chemotherapy. *Leukemia* 2004; 18: 139-145.
15. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis AT et al. Idiotype-pulsed dendritic cells vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune response in 35 patients. *Blood* 2002; 99: 1517-1526.
16. Cull G, Durrant L, Stainer C et al. Generation of anti-idiotypic immune responses following vaccination with idiotype-protein pulsed dendritic cells in myeloma. *Br J Haematol* 1999; 107: 648-55.
17. Reichardt VL, Milazzo C, Brugger W et al. Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells. *Hematologica* 2003; 88: 1139-49.
18. Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M et al. Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2003; 102: 1435-1442.