

PERSPEKTIVY IMUNOTERAPIE V LÉČBĚ MNOHOČETNÉHO MYELOMU

PERSPECTIVE ON IMMUNOTHERAPY IN MULTIPLE MYELOMA

R. HÁJEK, A. KRIVÁNOVÁ, M. KREJČÍ, M. DOUBEK, M. KLABUSAY, Z. ADAM, J. MAYER, J. VORLÍČEK

II. INTERNÍ-HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

Souhrn: Myeloablativní chemoterapie zlepšila výsledky léčby mnohočetného myelomu, nemoc však zůstává stále nevléčitelná. Eradikace zbytkové nemoci je jedním z klíčových kroků ke zlepšení prognózy pacientů s mnohočetným myelomem. Udržovací terapie Interferonem alfa má nejednoznačné výsledky. Nové léčebné metody jako konsolidační terapie, využití monoklonálních protilátek, genové terapie, interleukinů, imunotoxinů, vakcín, aktivace dendritických buněk a indukce reakce štěpu proti nádoru, jsou testovány ve fázi I/II klinických studií. Tento článek stručně shrnuje nové léčebné možnosti imunoterapie. Pokrok v adoptivní buněčné imunoterapii a v indukci reakce štěpu proti myelomu jsou velice slibné. Stále však nejsme schopni převést velmi dobré preklinické výsledky imunoterapie do klinické praxe. Kombinace myeloablativní léčby s novým typem imunoterapie, jež má za úkol eradikaci nádorového onemocnění, je jednou z perspektivních variant léčby, která by mohla zlepšit současné kontroverzní postavení imunoterapie u mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: Mnohočetný myelom-immunoterapie-adoptivní buněčná terapie-reakce štěpu proti myelomu - cytokiny

Summary: Myeloablative chemotherapy has improved the results of multiple myeloma treatment but the disease remains incurable. Residual disease eradication is one of the main goals for further improvement of the prognosis of myeloma patients. Interferon alpha maintenance therapy has controversial results. New methods, such as consolidation therapy, antibody therapy, gene therapy, interleukins, immunotoxins, dendritic cells, vaccines and induction of graft-versus-tumor effect, are being tested in phase I/II clinical trials. This article briefly reviews the new treatment modalities of immunotherapy. Progress in adoptive cellular immunotherapy and progress in induction of graft versus myeloma effect are very promising. We are still not able to transfer the good preclinical results of immunotherapy into clinical results *in vivo* measured by event free and long-term survivals. Combination of myeloablative therapy followed by a new type of immunotherapy focusing on residual disease eradication evaluated in the setting of sensitive disease may be optimal. Such an approach could improve the current controversial status of immunotherapy in multiple myeloma.

Key words: multiple myeloma - immunotherapy-adoptive cell therapy - graft versus myeloma effect - cytokines

Úvod

Vysokodávkovaná chemoterapie s transplantací kmenových krvetvorných buněk je dnes považována za optimální léčebný postup u vhodných nemocných s mnohočetným myelomem (1). Ve vysokém počtu případů (30-50 %) je po provedení transplantace dosaženo kompletní léčebné odpovědi, což se projevuje i v prodloužení doby do relapsu onemocnění a celkového přežití ve srovnání se standardní léčbou. Přes nepochybný úspěch v léčbě s mnohočetným myelomem (MM) po 20 letech stagnace, se zavedením vysokodávkované léčby nedaří odvrátit relaps onemocnění. Pravidlo „vyšší dávka = lepší léčebná odpověď“ je limitováno vznikem nezvladatelné nehematologické toxicity. Rutinně se zkouší podání dvou intenzivních cyklů vysokodávkované chemoterapie v rychlém sledu za sebou a řada pracovišť tento postup považuje za optimální. Předběžné výsledky francouzské studie IFM 94 zatím neukazují na zásadní rozdíl mezi podáním jednoho nebo více intenzivních cyklů (2).

Zdá se nepochybně, že ani vysokodávkovaná léčba není schopna zničit všechny myelomové buňky. V těle přežívající nádorové buňky, tzv. zbytkové nádorové onemocnění (minimal residual disease) je rozhodující pro znovuobjevení choroby. Přístupy zaměřené na eradikaci zbytkového nádorového onemocnění nebo dlouhodobé udržení stabilního počtu nádorových buněk, jsou dnes považovány za klíčové přístupy, které

mohou dále prodloužit život nemocných s myelomem a nádorem obecně.

Nové přístupy musí být postaveny na základě našich prohlubujících se znalostí o biologii myelomu (3), cytokinové síti (4) a imunoregulačních mechanismech u mnohočetného myelomu (5), jak jsou postupně objevované.

Nové léčebné imunoterapeutické metody, jako je užití monoklonálních protilátek, imuno-genové léčby, interleukinů, imunotoxinů, vakcín a indukce efektu štěpu proti nádoru, jsou testovány ve fázi I/II klinických studií. Tento článek shrnuje současný stav imunoterapie v léčbě nemocných s MM z klinického hlediska a shrnuje současné poznatky a nové trendy v imunoterapii, jež by mohly zlepšit současné kontroverzní postavení imunoterapie v léčbě MM.

Role interferonu alfa

Udržovací léčba Interferonem alfa (IFN) je dnes standardní léčbou zbytkového nádorového onemocnění u nemocných s MM. Efekt IFN byl hodnocen v řadě studií jako součást léčby indukční nebo léčby udržovací s kontroverzními výsledky. V současnosti bylo uveřejněno 7 randomizovaných studií s použitím IFN v udržovací léčbě po standardní indukční léčbě (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Výsledky celkové analýzy dat pacientů s myelomem léčených IFN (1518 pacientů v indukční, 924 v udržovací léčbě) podpořily užití IFN jako udržovací léč-

by, nikoliv však jako součást léčby indukční (7). Z randomizovaných studií užívajících IFN jako udržovací léčbu po léčbě standardní vyplývá, že IFN má potenciál prodloužit přežití i dobu do relapsu onemocnění, v průměru však jen o měsíce. Je třeba najít silnější udržovací léčbu ke zlepšení prognózy nemocných s MM.

Imunoterapie je pravděpodobně schopna zničit limitovaný počet nádorových buněk. Proto by imunoterapie měla být teoreticky efektivnější při eradikaci zbytkové nádorové choroby - stavu, jehož je nejčastěji dosahováno díky vysokodávkovaným chemoterapeutickým režimům užívaných pro autologní či alogenní transplantaci kostní dřeně (TKD). Tato hypotéza je testována obecně v onkologii, tedy i u myelomu. První povzbudivé výsledky randomizované studie užívající IFN po autologní TKD s mediánem sledování 52 měsíců (13) ztratily na statistické významnosti po 5,5 letech sledování nemocných, protože významná část nemocných podlehlá onemocnění (14). Průkaz efektu IFN v udržovací léčbě následující po vysokodávkované chemoterapii může být prokázán v dalších probíhajících studiích. Časté relapsy ve skupině pacientů s MM léčených autologní BMT následovanou udržovací léčbou IFN však již nyní ukazují, že je nutné hledat účinnější typy udržovací léčby. Na základě kvalitně provedené metaanalýzy dat nemocných léčených IFN se dnes snaží vědci vytypovat skupinu nemocných s MM, kteří mohou profitovat z léčby IFN (7, 15). Je možné, že při eradikaci zbytkové nádorové choroby bude IFN účinnější v kombinaci jinými léčebnými postupy. První výsledky z velké srovnávací studie kombinující kortikoidy s IFN v udržovací léčbě po standardní chemoterapii jsou velmi povzbudivé. V současné době běžící randomizovaná multicentrická studie „4W“ České myelomové skupiny má podobný cíl – zhodnocení významu kombinované sekvenční léčby IFN s dexamethasonem oproti standardní udržovací léčbě IFN po provedení autologní transplantace (16).

Jiné cytokiny

Interferon gama (IFN- γ) se jeví v preklinických studiích jako silný inhibitor cytokinů myelomové proliferace (17, 18). Bylo prokázáno, že IFN- prakticky kompletně inhibuje IL-6 řízený růst myelomových buněk a pravděpodobně je rovněž schopen blokovat kostní resorpci (18). První klinické studie neprokázaly léčebný efekt IFN- u MM (19). Domníváme se, že je třeba dalšího zkoumání účinků IFN- v dobře organizovaných studiích, jelikož naše znalosti o účincích IFN- u MM in vivo jsou minimální. Role IFN- podaného s Cyklosporinem A při indukci reakce štetu proti nádoru je zmíněna níže.

Interleukin 4 (IL-4) je cytokin s rozmanitými stimulačními i supresivními účinky. Je produkován aktivovanými pomocnými T-lymfocyty. Byl prokázán jeho protinádorový efekt a běží již první studie s rekombinantním IL-4 u různých malignit (20). IL-4 in vitro inhibuje růst myelomových buněk a to pravděpodobně cestou exprese IL-6 (21). Vesole a spol. zdokumentoval malý klinický účinek IL-4 u pacientů s pokročilým MM (22).

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) je jedním z růstových faktorů rutinně užívaných k ovlivnění prolongované leukopenie. GM-CSF je silným specifickým stimulatorem buněk kostní dřeně. Tento cytokin je jedním z nejčastěji užívaných cytokinů při ex vivo kultivaci různých buněčných progenitorů. GM-CSF je také používán jako adjuvans po podání aktivovaných imunokompetentních buněk (23, 24, 25). GM-CSF patří vedle IL-2 k nejčastějším cytokinům zkoušeným v experimentální imuno-genové léčbě (26).

Interleukin 2 (IL-2) je jedním ze základních imunomodulačních cytokinů. IL-2 stimuluje proliferaci T buněk a NK buněk in vitro i in vivo. Inkubace lymfocytů s IL-2 in vitro vede k proliferaci buněk označovaných jako lymphokine activated killer cells (LAK buňky), které mají popsán nespecifický protinádorový účinek v preklinickém modelu (27, 28). Zájemce o podrobnější informace o účincích IL-2 na efektorové imu-

nitní buňky odkazujeme na souhrnné práce citované v literatuře (28, 29).

Přestože byla terapie IL-2 klinicky testována v onkologii především u solidních nádorů po více než dvě dekády, klinické zkušenosti s IL-2 u nemocných s MM jsou stále omezené. U netransplantovaných nemocných byly popsány klinické léčebné odpovědi na IL-2 u MM (30). Gottlieb a spol. aplikoval IL-2 u pacientů po autologní BMT (31). IL-2 byl rovněž použit po auto-BMT u MM i jiných hematologických malignit (32). Ačkoliv byl IL-2 uveden do klinické praxe jako samostatný lék, je v současné době stejně jako jiné cytokiny, užíván v kombinaci či sekvenčně (33). Kombinovaná léčba IFN a IL-2 byla také zkoumána u hematologických malignit po ABMT s nízkou toxicitou a slibnými výsledky (34). Fáze II klinické studie podávání subkutánního IL-2 a IFN poprvé užitých u pacientů s MM byla publikována Belchem a spol. Toxicita byla podobná jako při monoterapii těmito cytokiny. I přes fakt, že nebylo dosaženo ani partiální remise onemocnění, všichni hodnocení nemocní s relabovaným MM dosáhli stabilizace onemocnění, jež přetrvávala více než jeden rok u 5 pacientů [33%] (35). Použití IL-2 v léčbě nemocných s MM reagujících na VAD v pilotní studii nepřineslo další zlepšení léčebné odpovědi (36).

Imunoterapie pomocí IL-2 může být účinnou možností ovlivnění relapsu po autologní TKD. Klinické studie užívající kombinované postupy a sekvenční aplikaci cytokinů s chemoterapií probíhají. Vzhledem k vysokému riziku nepředvídatelné těžké toxicity, jež byla v minulosti popsána, se obecně upustilo od pokusů o podávání IL-2 v nejvyšších dávkách. Specifická stimulace imunitního systému nízkodávkovaným IL-2 (32) nebo aktivace specifických imunologických efektorů ex vivo (viz níže) se jeví v současnosti jako slibnější přístupy v imunoterapii, lépe tolerované pacienty. Optimální dávka a doba podání IL-2 zatím nebyly stanoveny. Miller a spol. použil i nízkodávkovaný IL-2 (0,25 nebo 0,5 x 10⁶ IU/m²/den) s.c. po dobu 84 dnů s počátkem podávání 3 měsíce po autologní BMT u karcinomu prsu a lymfomů. Dávku limitující toxicita se projevila u 50 % pacientů, všechny symptomy vymizely do týdne po přerušení IL-2. Nejlépe tolerovaná dávka byla 0,25x10⁶ IU/m²/den (podáno 75 % plánované dávky). U pacientů s léčbou trvající nejméně 28 dnů byl zaznamenán více než 10násobný vzrůst cirkulujících CD56+/CD3- NK buněk se zvýšenou cytotoxicitou, která by mohla být dále zvýšena aktivací IL-2 ex vivo (37). Jiní autoři popisují nižší toxicitu subkutánně podávaného nízkodávkovaného IL-2 po autologní BMT v dávce 0,8 až 11,0x10⁶ IU/m²/den. Imunomodulační efekt byl podobný jako po i.v. podání v dávce 0,4 x 10⁶ IU/m²/den (38). Studium léčebného potenciálu nízkodávkovaného IL-2 v eradikaci zbytkové choroby po BMT by mohlo přinést zajímavé poznatky.

IL-6 a anti IL-6 monoklonální protilátky (MoABs): V současnosti jsou zkoušeny postupy ovlivňující IL-6 signální systém, protože IL-6 je považován za hlavní růstový faktor MM buněk (39). Myší IL-6 MoAbs byl testován u pacientů s pokročilým MM (40, 41). Ačkoliv žádný z pacientů nedosáhl remise či znatelného ústupu choroby dle standardních klinických kritérií, byla u 5 pacientů dokumentována inhibice proliferace myelomových buněk in vivo. Jak zmiňují autoři práce, sledovaný efekt u pacientů se špatnou prognózou musí být hodnocen spíše dle biologického účinku než užitím standardních kritérií (40). Nedávné výzkumy prokazují, že IL-6 působí rovněž jako osteolytický faktor (42). Užití lidské protilátky anti-IL-6 by mohlo být užitečné pro jisté riziko imunizace proti myší protilátce anti-IL-6 (40). Siegel a spol. zaznamenali minimální efekt anti-IL-6 MoAb nebo IL-6 u pacientů zrelabovaných po 1 či 2 autologních BMT (osobní komunikace). Young a spol. popsali celkovou léčebnou odpověď v 50 % při užití IL-6 a chemoterapie VAD u zrelabovaných a refrakterních pacientů dříve VAD léčených. U dvou nemocných byla patrna zvýšená sensitivita na VAD terapii při současném podá-

vání IL-6 (43). Klinické využití protilátky anti IL-6 a IL-6 čeká stále na své podrobnější zhodnocení.

Jiné protilátky užívané v imunoterapii: V klinických experimentech byly u MM zkoumány další protilátky, jako například anti-HM 1,24, anti-CD54 (ICAM-1) a anti-CD38 (ve spojení s ricinem jako imunotoxinem) (44, 45, 46). V klinických studiích nebyl zaznamenán žádný pozitivní efekt užití kterékoliv monoklonální protilátky u mnohočetného myelomu. Studie zkoušející podávání anti-CD 19 imunotoxinu IgG-HD37-SMPT-dgA u pacientů s MM, kteří dosáhli zbytkového nádorového onemocnění intenzivní chemoterapií, stále probíhají a nová perspektivní protilátka anti CD20 čeká na vyzkoušení u MM.

Adoptivní buněčná terapie

Adoptivní buněčná terapie zahrnuje sběr buněk, zprostředkovávajících obranu příjemce, od pacienta nemocného nádorem či jiného dárce, namnožení a aktivace imunitních buněk ex vivo s následnou aplikací buněk zpět nemocnému. Během zkoumání klinického využití cytokinů jako jsou interferony, interleukiny a monoklonální protilátky je zpravidla limitujícím faktorem jejich podání toxicita. Slibnou oblastí širokého pole imunoterapie je stimulace a expanze imunologických efektorových buněk s cytokiny ve vysoké koncentraci „ex vivo“ (mimo tělo nemocného), což v praxi vede k významnému omezení toxicity ve srovnání s prostou parenterální aplikací cytokinů a pravděpodobně dochází i k výhodnějšímu využití biologických účinků cytokinů. Po uvedení LAK buněk do klinických studií v 80. letech je nyní zkoumána aktivace celé řady typů imunokompetentních buněk.

Aktivace přirozených zabijců (NK = „natural killer“): NK buňkám je věnována velká pozornost pro jejich léčebný potenciál daný jejich schopností nespecifické lýzy nádorových kultur in vitro i in vivo. Byly zveřejněny výsledky řady preklinických studií ukazujících na významnou úlohu NK a LAK buněk v imunoterapii MM (47, 48). Léčba pomocí lymfokiny aktivovaných LAK buněk byla testována v řadě studií s minimálním efektem na celkové přežití, pokud byla použita jako součást standardních léčebných postupů (49, 50). Togawa et al. použil kombinaci IL-2 s LAK buňkami u pacientů s MM (51). O použití této kombinace u MM nebyly zatím zveřejněny přesvědčivé výsledky. Nedávno byly popsány nové techniky užívané relativně homogenní populace aktivovaných NK (ANK) buněk (52). Miller a spol. uvádí, že při 3 hodinovém sběru PBSC může být nasbíráno až 4×10^{10} ANK buněk (52). Rovněž ukázali, že pokud jsou ANK buňky kultivovány pomocí rIL-2 (v dávce nejméně 1 U/ml), tak aktivita NK a LAK buněk přetrvává více než 6 dnů (52). Tento přístup může být rovněž použit k prevenci relapsu onemocnění po autologní BMT u pacientů s MM. Další studie u jiných hematologických malignit v současnosti probíhají.

Aktivace T-buněk: Je znám rostoucí počet fenotypických a funkčních alterací T- buněk u pacientů s MM (5, 25, 53). Identifikace patřičného stimulu ovlivňujícího imunitu zprostředkovanou T- buňkami by mohla přispět ke kontrole průběhu nemoci. Dnes jsou k dispozici dvě základní jednoduché metody aktivace a expanze T-lymfocytů pomocí kombinace antiCD3/IL-2 nebo protilátek antiCD3/antiCD28. Lze tak poměrně jednoduše namnožit buňky až 100 x a získat aktivované T-lymfocyty s nespecifickou cytotoxicitou (25). Stimulace mononukleárních buněk u pacientů s MM pomocí anti-CD3 protilátky je spojena s rozsáhlou expanzí aktivovaných (CD3+CD25+) T buněk, které mají zesílenou schopnost zabíjení MM buněk (54). Stimulace T-buněk pravděpodobně není efektivním způsobem pro ex vivo čištění nebo pro další manipulaci se stěpem, ale tento přístup může být použit ke stimulaci protinádorových efektorových T buněk pro adoptivní imunoterapii (55). Kombinace anti-CD3 MoAb s IL-2 je efektivnější než užití samotného anti-CD3 MoAb či IL-2. Kombinace intravenózního anti-CD3 MoAb následovaného kontinu-

ální infusí střední dávky IL-2 byla použita k pokusu o prodloužení a zesílení aktivace T-lymfocytů indukovaných CD3 a to u pacientů s pokročilou hematologickou malignitou včetně 2 pacientů s MM. Toto schéma mělo jen minimální efekt u 2 pacientů s MM se stabilní chorobou. Imunoterapie byla velmi dobře tolerována, nebyla pozorována žádná výraznější toxicita (56). Lum a spol. prezentoval předběžné výsledky fáze I/II klinické studie využívající adoptivní terapii s aktivovanými T buňkami s IL-2 a GM-CSF po autologní PBSC u karcinomu prsu. Terapie měla akceptovatelnou toxicitu a celé množství 2×10^{11} aktivovaných T buněk bylo aplikováno během 2 měsíců (25). Probíhá i další studie užívaní podobný protokol u pacientů s hematologickými malignitami včetně MM a rovněž další studie užívaní podobné aktivace a expanze T-lymfocytů pomocí protilátek antiCD3 a antiCD28 (57).

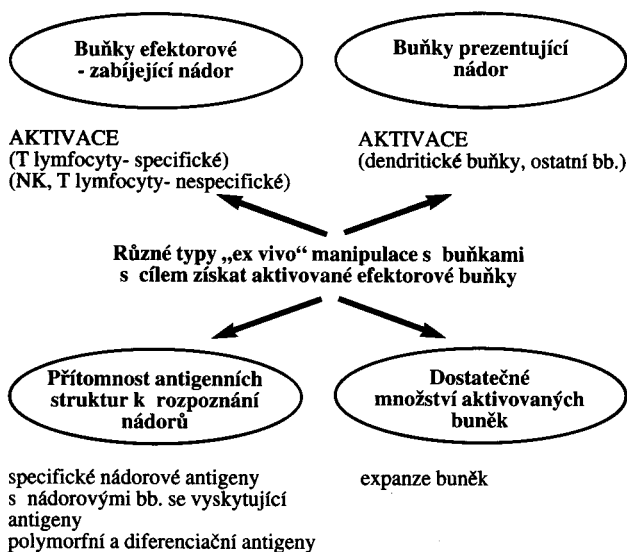
Vakcíny proti myelomovým buňkám jsou další z možností imunoterapie, jež jsou zkoumány v klinických studiích. Idiotyp (Id) myelomového imunoglobulinu lze použít jako unikátní nádorově-specifický antigen. Kwak a spol. úspěšně testoval i dárčovskou imunizaci myelomovým imunoglobulinem od budoucího příjemce štěpu. Tato skutečnost by mohla posílit specifický protinádorový efekt u alogenních transplantací (58). Podobná strategie je možná i po autologní transplantaci. Před započítím léčby je třeba sběru dostatečného množství patologického imunoglobulinu (59). V současnosti již probíhají klinické studie zkoumající užití kombinace idiotypických peptidů s aktivací a expanzí buněk prezentujících antigen (24) nebo aktivací specifických T-buněk (52, 60). Massaia a spol. prokázali indukci Id-reaktivních T-buněk in vivo s použitím kožního testu u pacientů s MM po vakcinaci autologních, z nádoru pocházejících Id-peptidu, následovaně nízkodávkovaným IL-2 a GM-CSF (23, 61). V preklinických experimentech je užívána i DNA vakcinace proti myelomovým buňkám (62).

Hlavní otázkou je, zda vůbec mají aktivované T buňky rozpoznávající specifický antigen (Id-peptid) specifický cytotoxický potenciál, jež vede ke smrti myelomových buněk v klinické praxi a zda je tento účinek dostatečný k dosažení klinického významného efektu. Jediné vlastnosti dendritických buněk prezentovat antigen, zmíněné níže, mohou hrát klíčovou roli v aktivaci cytotoxických T buněk.

Aktivace dendritických buněk: Dendritické buňky, v současnosti nejučinnější buňky předkládající antigen (antigen-presenting cells), jsou schopné silně aktivovat T-lymfocyty. Klinické využití dendritických buněk bylo zahájeno až po nedávném nalezení možnosti optimální přípravy a expanze dendritických buněk v dostatečném množství a v dostatečně čisté formě. V současnosti mohou být dendritické buňky získané z CD34+ buněk užitím GM-CSF a TNF-alfa nebo IL-4 nebo je lze získat z neproliferujících prekurzorů (CD14+, CD1a-) užitím GM-CSF a IL-4 (63, 64). Kromě těchto dvou základních postupů dnes existuje řada dalších kombinací cytokinů, pomocí kterých lze kultivovat dendritické buňky. První studie s nimi začaly i u nemocných s MM. Mezi pacienty s MM a kontrolní skupinou nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve stimulaci dendritických buněk (65). Poprvé byla použita vakcinace Id-antigenem používající dendritické buňky u pacientů s MM v roce 1996. Skupina autorů ze Stanfordu podávala Id-stimulované dendritické buňky intravenózně 3 měsíce po autologní transplantaci, následované subkutánním podáváním Id-proteinu (60). Bohlen a spol. použili dendritické buňky v kombinaci s idiotypickými peptidy a GM-CSF. Sedm pacientů s relabovaným MM dostávalo subkutánně $1-3 \times 10^7$ dendritických buněk získaných z CD 34+ progenitorů aktivovaných Id-peptidy. U 3 pacientů byl zaznamenán signifikantní pokles monoklonálního imunoglobulinu (24). První výsledky vakcinací Id aktivovaných dendritických buněk u MM jsou velmi slibné (24, 60). Kombinace dendritických buněk s ostatními metodami uvedenými výše se stávají perspektivní oblastí imunoterapie. Jednou z hlavních překážek by mohl být vznik tole-

rance T buněk. Na obrázku č. 1 jsou znázorněny různé faktory, efektory, které jsou studovány v různých kombinacích v současných klinických studiích.

Obr. 1 : Vývoj buněčné imunoterapie



Reakce štěpu proti myelomu

Navzdory velké terapeutické účinnosti alogenní transplantace, je tento přístup možnou léčebnou variantou jen u limitovaného počtu nemocných s MM. Důvodem je zpravidla vysoký věk nemocných či nemožnost najít vhodného dárce. Rovněž vysoká incidence morbidity a mortality spojená s alogenním přístupem (30-50%), především díky reakci štěpu proti hostiteli (GVHD), zabraňuje častějšímu užití této léčebné možnosti u pacientů s MM (66, 67). Přesto se zdá, že alogenní reakce štěpu proti myelomu (GVM) bude mít význam v léčbě mnohočetného myelomu podobně jako u CML (68).

Alogenní reakce štěpu proti myelomu: Bylo zveřejněno několik zpráv o možnosti dosažení alogenní GVM bez myeloablativní chemoterapie za pomoci užití infuze dárcovských lymfocytů (DLI-donor lymphocyte infusion): Tricot a spol. popsali 1 pacienta, který dostal malé množství DLI ($1,2 \times 10^6$ /kg CD3 buněk) bez další cytotoxické terapie. Bylo dosaženo kompletní remise trvající déle než 14 měsíců (68). Verdonck a spol. uveřejnili zprávu o 2 pacientech s relapsem MM po alogenní BMT, kteří rovněž dostali DLI. U obou pacientů se projevila GVHD reakce a bylo opět dosaženo kompletní remise (69). Bertz a spol. popsali případ pacienta, který dostal celkem $6,2 \times 10^7$ /kg CD3 buněk. Pro zesílení efektu T buněk bylo podáno subkutánně 6 x 5 milionů jednotek IFN. Po 5 dnech byl patrný ústup nádoru, k jehož úplnému vymizení došlo po 400 dnech (70). Aleya a spol. použili infuzi CD4+ buněk ($0,3-1,5 \times 10^8$ /kg) u pacientů s relapsem MM po alogenní BMT, u kterých zaznamenali odpověď u 4 pacientů ze 7. Jeden pacient reagoval bez spojení s GVHD (71). Lokhorst a spol. popsali případ 14 pacientů. Celková léčebná odpověď byla 62% (8/13 hodnotitelných) zahrnující 30% CR a 30% parciální remise (PR). U 2 pacientů se objevila aplasie kostní dřeně a zemřeli na sepsi. Medián intervalu sledování odpovědi byl 6 týdnů (4 až 10 týdnů) s průměrným trváním odpovědi 5 měsíců (2 až 38+). U 6 pacientů byla zaznamenána odpověď po prvním podání DLI v dávce $1-3,3 \times 10^6$ /kg T buněk (72). Kolb a spol. publikovali výsledky u 13 pacientů. Šest z nich bylo hodnotitelných, 33% (2 pacienti) dosáhlo CR. K posílení antigenní prezentace byla léčba DLI kombinována s GM-CSF (73). Ve třech z výše uvedených studií (70, 72, 68) byla pozorována těžká GVHD reakce obvyklá po aplikaci DLI u pacientů s relabovanou CML.

Možnost ovlivnění GVHD reakce může snížit vysokou mortalitu a morbiditu spojenou s touto léčebnou metodou a nabídnout léčebný potenciál GVM většímu počtu pacientů než doposud. Mechanismus vlastní odpovědi na DLI zůstává zatím nejasný. Tento fenomén by mohl aktivovat specifické cytotoxické efekторы namířené proti nádoru (CD4+ buňky, CD8+ buňky, NK buňky, antigen-předkládající buňky), ale také se může jednat jen o sekundární důsledek efektu cytokinové bouře, jež se rozvíjí během GVHD reakce. V současnosti pracuje na této problematice několik výzkumných center (71, 74). Existují i další možnosti modulace a zesílení DLI léčby. DLI aktivované in vitro anebo in vivo s IL-2 úspěšně zvrátily rezistenci pacientů s CML či AML na samotné DLI (75). Zkoumání možnosti posílení terapeutického efektu DLI užitím různých cytokinů je naléhavé rovněž u pacientů s MM. V současnosti probíhá studie zkoumající efekt stupňujícího se vlivu DLI na prevenci relapsu z CR po transplantaci u hematologických malignit (76).

Tato strategie by měla být jistě studována i u nemocných s MM, u kterých je relaps choroby stále nevyhnutelný. Podání dárcovských lymfocytů má silný protinádorový efekt. Citlivé využití této metody s možností modulace reakce a v optimálním případě její oddělení od GVHD reakce, by mělo lékařům umožnit zařazovat tento postup častěji do léčebné strategie než je v současnosti možné.

Autologní reakce štěpu proti myelomu: Ojedinele byla uveřejněna zpráva o spontánní autologní GVHD následující po transplantaci se zaznamenanou GVM reakcí (77). Testovány jsou různé imunoterapeutické přístupy vedoucí k rozvoji reakce štěpu proti nádoru po autologní TKD. Interferony, cyclosporin A (CsA) a jejich kombinace (78), IL-2 (79), aktivace LAK buněk pomocí IL-2 (80) či aktivace autologního štěpu IL-2 následovaná IL-2 terapií byly již zmíněny (28, 81, 82). Cílem těchto přístupů je demonstrovat GVHD, která je spojena s reakcí štěpu proti nádoru. Autologní GVHD reakce indukovaná CsA může být zesílena přidáním interferonů (účinek IFN gama je větší než IFN alfa), které regulují expresi antigenů II. třídy hlavního histokompatibilního (HLA) systému (83). Kultivace štěpu s IL-2 může být rovněž užitečná pro ex vivo čištění štěpu (84, 85). Indukce protinádorových cytotoxických efektorů užitím IL-2 je pravděpodobně universální nespecifickou cytotoxickou reakcí, protože IL-2 pravděpodobně aktivuje cytotoxické efektorové buňky nezávisle na HLA systému (85). Preklinické testy neprokazují žádné nežádoucí působení aktivovaných NK buněk na hematopoetické kmenové buňky a malý nebo žádný inhibiční efekt IL-2 na kmenové buňky a ostatní progenitory (86).

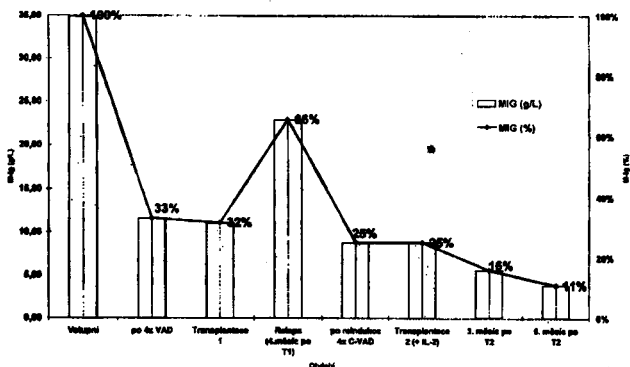
V našich ex vivo experimentech užívaných MM periferní kmenové buňky kultivované s 6000 IU IL-2/ml po 24 hodin v médiu bez séra, jsme pozorovali, ve shodě s jinými autory, nesignifikanční pokles CFU-GM i CD 34+ buněk za prvních 24 hodin ve srovnání s kultivovaným štěpem bez IL-2 (tabulka 1). Klinická studie probíhá. V současnosti dostali aktivovaný štěp s následnou měsíční kombinovanou imunoterapií (IL-2/GM-CSF) dva nemocní. K připojení štěpu došlo do 14

Tabulka 1: Preklinické výsledky kultivace štěpu s IL-2 zaměřené na ověření bezpečnosti kultivace u nemocných s mnohočetným myelomem.

Medián (n = 5)	Mo+Ly/kg (x 10 ⁶)	CD34+/kg (x 10 ⁶)	CFU-GM (x 10 ⁴)	Viabilita buněk
Před aktivací IL-2 (rozptýl)	1.54 (0.49-1.63)	8.80 (5.34-11.01)	14.20 (13.48-26.68)	85 % (80-90)
Po aktivaci IL-2 (rozptýl)	0.66 ^p (0.26-0.70)	7.44 (2.87- 14.11)	12.21 (9.50-36.37)	95 % (95-100)
Návratnost	43 %	85 %	86 %	-

^p = p < 0.05, Mo+Ly - monocytů + lymfocytů

Graf 1: Dynamika monoklonálního paraproteinů u nemocné od zahájení léčby po použití IL-2 aktivovaného štěpu při druhé autologní transplantaci a následném sledování.



dnů u obou nemocných. Rovněž následná imunoterapie byla velmi dobře tolerovaná. Vznik autologní reakce štěpu proti myelomu jsme nepozorovali. Graf 1 ukazuje dynamiku monoklonálního paraproteinů v průběhu času u nemocné, která tuto léčbu absolvovala při druhé autologní transplantaci při léčbě prvního relapsu.

Autologní GVHD reakce u pacientů s MM je reprodukovatelná užitím CsA (87) nebo CsA s interferonem gama (88) nebo užitím IL-2 aktivovaným štěpem následovaným infuzí IL-2 (89). Otázka vlivu na dlouhodobé přežití pacientů a období bez relapsu choroby zůstává otevřena. Dnes se zdá, že k vytvoření účinné autologní reakce štěpu proti nádoru s přiměřenou toxicitou by mohlo přispět vhodné začlenění dendritických

buněk, protože prezentace nádorového antigenu se zdá klíčová pro účinnost imunokompetentních buněk.

Závěr

Imunoterapie je velmi perspektivní disciplínou, jejíž preklinické výsledky se stále častěji dostávají do klinické experimentální medicíny s cílem zlepšení prognózy nemocných s nádorovým onemocněním. Do této doby byla jen infúze dárčových lymfocytů schopna navodit významnou léčebnou odpověď u nemocných s MM, relabujících po alogenní transplantaci. Výsledky ukazují, že GVM reakce může někdy probíhat nezávisle na GVHD. Využití GVM reakce může přispět k redukcí relapsů po alogenní transplantaci u MM. Jedná se o ojedinělý příklad účinné imunoterapie s demonstratelnou klinickou odpovědí limitovanou na malý počet pacientů. Bohužel nejsme stále schopni přenést obvykle slibné výsledky in vitro do výsledků in vivo měřených EFS nebo dlouhodobým přežitím u jiných typů imunoterapie. Současný klinický výzkum postrádá i dobrý klinický model pro testování nových terapeutických přístupů. Nové typy imunoterapie jsou stále klinicky zkoušené u nemocných s pokročilými malignitami a minimální prognózou. Takový přístup již obvykle není schopen demonstrovat jakoukoliv odpověď či výhodu imunoterapie. Zbytková nádorová choroba by mohla být optimálním polem pro různé typy imunoterapie. Nové terapeutické možnosti, jako jsou vakcíny užívané antigen-předkládající dendritické buňky, jsou dnes zkoušené ve fázi I/II klinických studií. Tyto nové typy imunoterapie by mohly zlepšit současné kontroverzní postavení imunoterapie u MM.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 4253-2 a grantem MSMT JD 7198 14110003

Literatura

- Adam Z., Vorlíček J., Hájek R. et al.: Pokroky v léčbě mnohočetného myelomu, 1999, Opuscula Haematologica, Masaryk University Brno, v tisku.
- Attal M., Payen C., Facon T. et al.: Single versus double transplant in myeloma: A randomized trial of the "Inter Groupe Français du Myelomé (IFM)", Blood 1997, 90, 10 (suppl. 1), pg. 418a (abstr. 1859).
- Nishimoto N., Shima Y., Yoshizaki K. and Kishimoto T.: Myeloma biology and therapy: present status and future developments. Hematology/Oncology Clinics of North America 1997; 11: 159-172.
- Klein B., Bataille R.: Cytokine network in multiple myeloma 1997. Hematology/Oncology Clinics of North America 1997; 11, 273-284.
- Munshi N. C.: Immunoregulatory mechanisms in multiple myeloma. Hematology/Oncology Clinics of North America 1997; 11: 51-69.
- Browman G. P., Rubin S., Walker I. et al.: Interferon-alpha-2b (IFN) maintenance therapy prolongs progression-free and overall survival in plasma cell myeloma (PM): Results of a randomized trial. Proc Am Soc Clin Oncol 1994; 13: 408 (abstr. 1391).
- Ludwig H., Cohen A. M., Polliac A., et al.: Interferon alpha for induction and maintenance in multiple myeloma: Results of two multicenter randomized trials and summary of other studies. Ann Oncol 1995; 6: 467-476.
- Mandelli F., Avvisati G., Amadori S. et al.: Maintenance treatment with recombinant interferon alpha-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. N Engl J Med 1990; 322 (20): 1430-1434.
- McSweeney E. N., Tobias J. S., Blackman G. et al.: Double hemibody irradiation (DHB) in the management of relapsed and primary chemoresistant multiple myeloma. Clin Oncol 1993; 5: 378-383.
- Peest D., Deicher H., Coldewey R. et al.: Induction and maintenance therapy in multiple myeloma: a multicenter trial of MP versus VCMP. Eur J Cancer Clin Oncol 1988; 24, 6: 1061-1067.
- Salmon S. E., Crowley J. J., Grogan T. M. et al.: Combination chemotherapy, glucocorticoids, and interferon alpha in the treatment of multiple myeloma: a Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol 1994; 12, 11: 2405-2414.
- Westin J.: Interferon therapy during the plateau phase of multiple myeloma: an update of a Swedish multicenter study. Semin Oncol 1991; 18, 5 (Suppl 7): 37-40.
- Cunningham D., Powles R., Malpas J. S. et al.: A randomized trial of maintenance therapy with Intron-A following high dose melphalan and ABMT in myeloma. Proc Am Soc Clin Oncol 1993; 12: 364 (abstr. 1232).
- Cunningham D., Powles R., Malpas J. et al.: A randomized trial of maintenance interferon following high dose chemotherapy in multiple myeloma: long-term follow-up results. Brit J Haematol 1998; 102, 495-502.
- Wheatley K.: Oxford Meta Analysis on Interferon. VI. Int. workshop on Multiple Myeloma 1997, Boston, Syllabus (abstr.).
- Hájek R., Adam Z., Ščudla Z. et al.: Report of the randomized trial, "4W" of Czech

- Myeloma Group: Maintenance therapy with interferon alpha-2B monotherapy or sequential maintenance therapy IFN and Dexamethasone after high dose Melphalan and PBSC support in patients with multiple myeloma, J Clin Oncol 1998, 17, (abstr. 100).
- Palumbo A., Bruno B., Boccadoro M. and Pileri A.: Interferon- in Multiple Myeloma. Leukemia and Lymphoma 1995; 18: 215-219.
- Portier M., Zhang X.-G., Caron E., Lu Z.-Y., Bataille R. and Klein B.: Interferon in multiple myeloma: Inhibition of interleukin-6 (IL-6)- dependent myeloma cell growth and downregulation of IL-6-receptor expression in vitro. Blood 1993; 81, 11: 3076-3082.
- Quesada J. R., Alexanian R., Kurzrock R., Barlogie B., Saks S., Gutterman J. U.: Recombinant interferon gamma in hairy cell leukemia, multiple myeloma, and Waldenstrom's macroglobulinemia. Am J Hematol 1988; 29, 1: 183-187.
- Bukowski R. M., McLain D., Finke J.: Clinical pharmacokinetics of interleukin 1, Interleukin 2, Interleukin 4, Tumor Necrosis factor, and Macrophage colony-Stimulating Factor. In: Cancer Chemotherapy and Biotherapy, sec. ed. by Chabner B.A. and Longo D.L., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996; 609-638.
- Taylor C. W., Grogan T. M. and Salmon S. E.: Effect of interleukin-4 on the in vitro growth of human lymphoid and plasma cell neoplasms. Blood 1990; 75: 1114-1118.
- Vesole D., Kornbluth J., Jagannath S., Szoln M. et al.: Biological response modifiers (BRM) in refractory multiple myeloma (MM): Lack of clinical efficacy of recombinant human interleukin-4 and ALL-trans retinoic acid (ATRA). Blood 1996; 88, 10 (Suppl. 1): 263a (abstr. 1037).
- Battaglio S., Napoli P., Beggiano E., Borriore P. et al.: Development of vaccines against autologous tumor-derived idiotic in human myeloma: rationale and preparation. Minerva Biotech 1996; 8: 1.
- Bohnen H., Titzer S., Christensen O., Manzke O. et al.: Dendritic cell based idiotype vaccination in multiple myeloma. Blood 1997; 90, 10 (Suppl. 1): 579a (abstr. 2577).
- Lum L. G., Treisman J., Taylor R. F., LeFever A.: Phase I/II trial of activated T cells (ATC), IL-2 and GM-CSF after PBSC transplant for stage IIIB or IV breast cancer. Blood 1997; 90, 10 (Suppl. 1-part 2 of 2), 381b (abstr. 4462).
- Munshi N. C., Ding L. M., Dahe Lu, Kornbluth J., Naugler S., Mahavi D. and Srivastava A.: GM-CSF transduction of the tumor cells provides lasting immune response in multiple myeloma. Blood 1996; 88, 10 (Suppl. 1): 585a (abstr. 2330).
- Grimm E. A., Mazumder A., Zhang H. Z. and Rosenberg S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral lymphocytes. J Exp Med 1982; 155: 1823-1841.
- Verma U. N., Charak B., Rajagopal Ch. and Mazumder A.: Interleukin-2 in bone marrow transplantation. In: Buckner CD. Technical and biological component of marrow transplantation. Kluwer Ac. Publ., Boston 1995; 315-336.

29. Fefer A., Benyunes M. C.: Interleukin-2 as consolidative immunotherapy after clinical autologous bone marrow transplantation, in Spitzer T, Mazumder A (eds.): Immunotherapy and bone marrow transplantation. Armonk NY, Futura 1995; 101-121.
30. Peest D., Leo R., Bloche S. et al: Low-dose recombinant interleukin-2 therapy in advanced multiple myeloma. *Brit J Hematol* 1995; 89: 328-337.
31. Gottlieb D. J., Prentice H. G., Metha A. B. et al: Recombinant interleukin IL-2 in the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol* 1989; 189 (abstr).
32. Robinson N., Benyunes M.C., Thompson J.A. et al: Interleukin -2 after autologous stem cell transplantation for hematological malignancy: a phase I/II study. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 435-442.
33. Morecki S., Revel-Vilk S., Nabet C. et al: Immunological evaluation of patients with hematological malignancies receiving ambulatory cytokine-mediated immunotherapy with recombinant human interferon- α 2a and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 35, 401.
34. Nagler A., Ackerstein A., Naporstek RORe. and Slavin S.: Immunotherapy with recombinant human interleukin-2 and recombinant interferon-alpha in lymphoma patients postautologous marrow or stem cell transplantation. *Blood* 1997; 89, 11: 3951-3959.
35. Belch A. R., Eisenhauer E. A., Muldal A. et al.: Phase II study of subcutaneous rHu-interleukin-2 and rHu-interferon alpha-2a in previously treated patients with multiple myeloma. *Ann Oncol* 1995; 6 (7): 721 - 723.
36. Hussein M. A., Snyder J., Rayman P., McLain D. A. et al: The effect of IL-2 maintenance (Mn) therapy (TX) on duration of the plateau phase in responding multiple myeloma (MM) patients (PTS): *Blood* 1997; 90, 10(Suppl.1): 307b (abstr. 4132).
37. Miller J. S., Tesmer-Tuck J., Pierson B. A., Weisdorf D. et al: Subcutaneous IL-2 after autologous BMT expands NK in vivo but requires ex vivo high dose IL-2 for maximal activation. *Blood* 1996; 88, 10, (Suppl.1): 609a (abstr. 2426).
38. Lopez-Jimenez J., Perez-Oteyza J., Munoz A., Parra C., Villalon L. et al.: Subcutaneous versus intravenous low-dose IL-2 therapy after autologous transplantation: results of a prospective, non-randomized study. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 429-434.
39. Klein B.: Cytokine, cytokine receptors, transduction signals and oncogenes in human multiple myeloma. *Semin Oncol* 1995; 32, 1: 4-19.
40. Bataille R., Barlogie B., Yang Z. et al.: Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 1995; 86, 2: 685-691.
41. Klein B., Wijdenes J., Zhang X.-G. et al: Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patients with plasma cell leukemia. *Blood* 1991; 78: 1198-1242.
42. Tamura T., Udagawa N., Takahashi N., Miyaura C. et al: Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11924.
43. Young R. I., Ranson M., Chang, Lodr B. et al.: Phase II trial of rHuIL-6 prior to and concurrently with VAD chemotherapy for patients with multiple myeloma. *Europ J Cancer* 1997, 33, 2: 307-311.
44. Goldmacher V. S., Bourrel L. A., Levine B. A., Rasmussen R. A. et al: Anti-CD38-blocked ricin: an immunotoxin for the treatment of multiple myeloma. *Blood* 1994; 84(9): 3017-3025.
45. Huang Y. -W., Richardson J. A. and Vitetta E.: Anti- CD54 (ICAM-1) has antitumor activity in SCID mice with human myeloma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 610-616.
46. Ozaki S., Kosaka M., Wakatsuki S. et al: Immunotherapy of multiple myeloma with monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood* 1997; 90: 3179-3186.
47. Kornbluth J., Snead T., Page R. et al: Effective treatment of established human myeloma tumors in SCID mice with human natural killer cells and interleukins (IL-2 and IL-4). *Blood* 1993; 82: 263a.
48. Shimazaki C., Atzpodien J., Wisniewski D. et al: Cell-mediated toxicity of interleukin-2 activated lymphocytes against autologous and allogeneic human myeloma cells. *Acta Haematol* 1988; 80: 203.
49. Rosenberg S. A., Lotze M. T., Mul L. M. et al: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in patients with metastatic cancer. *N Eng J Med* 1985; 313: 1486-1492.
50. Rosenberg S. A., Lotze M. T., Yang J. C. et al: Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 622-632.
51. Togawa A., Sawada S., Amano M. et al: Treatment of multiple myeloma with LAK cells plus interleukin 2 or interleukin 2. *SO-Rinsho Ketsueki* 1989; 30: 650-658.
52. Miller J. S., Klingsporn S., Lund J., Perry E. H., Verfaillie C., McGlave P.: Large scale ex vivo expansion and activation of human natural killer cells for autologous therapy. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 555-562.
53. Aguila H. L., Weissman I.: Hematopoietic stem cells are not direct cytotoxic targets of natural killer cells. *Blood* 1996; 87,4: 1225-1231.
54. Yi Q., Osterborg A., Bergenbrant S. et al: Idiotype-reactive T-cell subsets and tumor load in monoclonal gammopathies. *Blood* 1995; 86, 8: 3043-3049.
55. Massaia M., Attisano C., Peola S., Montacchini I. et al: Rapid generation of anti-plasma cell activity in the bone marrow of myeloma patients by CD3 cross-linking. *Blood* 1993; 82: 1787-1797.
56. Attisano C., Bianchi A., Montacchini L., Carlesso N. et al.: Generation of anti-tumor activity by OKT3- stimulation in multiple myeloma: in vitro inhibition of autologous haematopoiesis. *Brit J Haematol* 1994; 87 (3): 494-502.
57. Borriero P., Montacchini L., Beggiato E., Pileri A. et al.: Clinical and immunological studies in advanced cancer patients sequentially treated with anti CD3 monoclonal antibody (OKT3) and interleukin-2. *Leukemia & Lymphoma* 1996; 21(3-4): 325-30.
58. Lum L. G., LeFever A. V., Treisman J., Garlie N. et al.: Phase I study of anti-CD3/antiCD28 coactivated T cells (COATS) in cancer patients: enhanced TH1 responses in vivo. *Experimental Hematology* 1998, 25, 8, s.772 (abstr 324).
59. Kwak L. W., Taub D. D., Duffey P. L., Bensing W. I. et al: Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunized marrow donor. *Lancet* 1995; 345: 1016-1020.
60. B.: T-cell responses elicited by immunization of multiple myeloma patients with idiotype M-protein plus GM-CSF in remission after autologous transplantation. *Blood* 1997; 90, 10(Suppl.1): 579a (abstr. 2576).
61. Reichardt V., Okada C., Benike C., Long G. et al: Idiotypic vaccination using dendritic cells for multiple myeloma patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1996; 88, 10 (Suppl. 1): 481a (abstr. 1913).
62. Massaia M., Mariani S., Battaglio S., Beggiato E. et al: Idiotypic reactive T cells. VI Int. Workshop Multiple Myeloma Boston 1997; Syllabus (abstr).
63. Stevenson F. K.: DNA vaccines against B-cells tumors. VI. Int. Workshop on Multiple Myeloma Boston 1997; Syllabus (abstract).
64. Bender A., Sapp M., Schuler G., Steinman R. M. and Bhardwaj N.: *J. Immunol. Methods* 1996, 121-135.
65. Girolomoni G., Ricciardi-Castagnoli P.: Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunology Today* 1997; 104, 3: 18.
66. Pfeiffer S., Samson D., Apperley J. and Gooding R.: Ex vivo generation and function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood* 1996; 88, 10 (Suppl. 1): 392a.(abstr. 1556).
67. Bensing W. I.: Prognostic factors for outcomes after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. VI Int. Workshop on Multiple Myeloma, Boston 1997; USA (abstr).
68. Bjorkstrand B., Ljungman P., Svensson H. et al.: Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: A retrospective case-matched study from The European Group for Blood and marrow Transplantation. *Blood* 1996; 88: 4711-4719.
69. Tricot G., Vesole D. H., Jagannath S. et al: Graft-versus-myeloma-effect: Proof and principle. *Blood* 1996; 87: 1196-1197.
70. Verdonck L. F., Lokhorst H. M., Dekker A. W., Nieuwenhuis H. K., Petersen E. J.: Graft-versus-myeloma effect in two cases. *Lancet* 1996; 3, 348 (9023): 346.
71. Bertz H., Burger J. A., Kunzmann R., Mertelsmann R. and Finke J.: Adoptive immunotherapy for relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation (BMT): evidence for a graft-versus-myeloma effect. *Leukemia* 1997; 11(2): 281-283.
72. Alyea E. P., Schlossman R. L., Canning C., Collins H. et al.: CD-8 depleted donor lymphocyte infusion mediate graft-versus multiple myeloma effect. *Blood* 1996, 88, 10 (Suppl.1): 258a (abstr.1021).
73. Lokhorst H. M., Schattenberg A., Cornelissen J. et al: Successful induction of graft-versus-myeloma by donor leukocyte infusion in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. VI Int. Workshop of Multiple Myeloma, Boston 1997; Syllabus (abstr).
74. Kolb H. J., Menzel H., Holler E., Verdonck D. et al: Donor cell transfusion for the treatment of recurrent leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90, 10(Suppl 1): 46a (abstr. 2434).
75. Munchi N. C., Govindarajan R., Drake R. et al: Thymidine Kinase (TK) gene-transduced human lymphocytes can be highly purified, remains fully functional, and are killed efficiently with ganciclovir. *Blood* 1997; 89, 4: 1334 - 1340.
76. Slavin S., Naporstek E., Nagler A., Ackerstein A. et al: Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87, 6: 2195-2204.
77. Nagler A., Ackerstein A., Naporstek RORe., Kapelushnik J. and Slavin S.: Implications of donor lymphocyte infusion (DLI) on acute graft versus host disease (GVHD) tolerance in patients in relapse vs remission post matched allogeneic bone marrow transplantation (BMT). *Blood* 1997; 90, 10(Suppl.1): 383b (abstr. 4470).
78. Byrne J., Iqbal A., Davis J., Haynes A. P. and Russell N. H.: Autologous GVHD following PBSCT, with evidence for a graft versus myeloma effect. *Brit J Hematol* 1997; 97(Suppl. 1): 398 (abstr 143).
79. Jones R. J., Hess A.: Autologous graft-versus-host disease. In: Spitzer T., Mazumder A.: Immunotherapy and Bone Marrow Transplantation. Armonk, NY Futura Publishing 1995; 59 - 69.
80. Massumoto C., Benyunes M. C. et al: Close stimulation of acute graft-versus host disease by interleukin-2 administered after autologous bone marrow transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 351-356.
81. Benyunes M. C., Higuchi C., York A., Lindgren C. et al.: Immunotherapy with interleukin 2 with or without lymphokine-activated killer cells after autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma: a feasibility trial. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16 (2): 283-288.
82. Beaujean F. et al.: Successful engraftment after autologous transplantation of 10-day cultured bone marrow activated by interleukin-2 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15, 5: 691-696.
83. Klingemann H. G., Eaves C. J., Barnett M. J. et al: Transplantation of patients with high risk acute myeloid leukemia in first remission with autologous marrow cultured in interleukin-2 followed by interleukin-2 administration. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 389-396.
84. Vogelsang G. B., Hess A. D., Altomonte V., Bitton R. et al: Interferons augmentation of autologous graft versus host disease (GVHD). *Blood* 1996; 88, 10 (Suppl. 1): 129a (abstr. 504).
85. Margolin K. A., Wright C. and Forman S. J.: Autologous bone marrow purging by in situ IL-2 activation of endogenous killer cells. *Leukemia* 1997; 9: 723-728.
86. Verma U. N., Areman A., Dickerson S. A. et al: Interleukin-2 activation of chemotherapy and growth factor-mobilized peripheral blood stem cells for generation of cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant* 1995, 15, 199-206.
87. Aguila H. L., Weissman I.: Hematopoietic stem cell are not direct cytotoxic targets of natural killer cells. *Blood* 1996, 87,4: 1225-1231.
88. Giralt S., Weber D., Colome M., Dimopoulos M. et al: Phase trial of cyclosporine-induced autologous graft-versus-host disease in patients with multiple myeloma undergoing high-dose chemotherapy with autologous stem-cell rescue. *J Clin Oncol* 1997; 15(2): 667-73.
89. Giralt S., Weber D., Colome M. et al.: Induction of autologous graft-versus-host-disease in patients with myeloma undergoing high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue. VI Int. Workshop of Multiple Myeloma, Boston 1997; (abstr 6-11).
90. Meehen K.R., Badros A., Frankel S. R., Cahill R. et al.: A pilot study evaluating interleukin-2 activated hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *J Hematotherapy* 1997, 6, 457 - 464.