

ARTUR JURCZYSZYN, TERESA WOLSKA-SMOLEŃ, ALEKSANDER B. SKOTNICKI

## Mechanizmy patogenetyczne warunkujące nowe sposoby terapii szpiczaka mnogiego II. Nowe leki

### Mechanisms of Pathogenesis Conditioning New Therapeutic Methods of Multiple Myeloma II. New Drugs

Katedra i Klinika Hematologii CM UJ w Krakowie

#### Streszczenie

Szpiczak mnogi (MM) jest wciąż nieuleczalną chorobą nowotworową charakteryzującą się nagromadzeniem klonalnych plazmocytw w szpiku kostnym. W Polsce, w 2000 r. zarejestrowano 823 nowe zachorowania na MM; przeważają mężczyźni (60%); 98% chorych ma > 40 lat. Nowe strategie terapeutyczne, ukierunkowane na mechanizmy, w wyniku działania których komórki MM wzrastają i proliferują w szpiku kostnym, w tym talidomid i jego analogi (Revimid) oraz inhibitor proteasomów (PS-341, Velcade), trójtlenek arsenu (Trisenox) oraz statyny (Luwastatyna) w wielu przypadkach mogą przezwyciężać oporność na standardowe leczenie w licznych badaniach klinicznych. Dokładne poznanie szlaków przewodzenia sygnałów apoptozy komórki szpiczakowej, jej swoistej relacji z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego będą stanowić przyszłe, nowe kierunki leczenia MM, które wreszcie doprowadzą do całkowitego wyleczenia tej choroby (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 1, 145–154).

**Słowa kluczowe:** szpiczak mnogi, cytokiny, talidomid, PS-341, statyny.

#### Abstract

Multiple myeloma (MM) is a continually incurable neoplastic disease characterised by an accumulation of clonal plasmocytes in the bone marrow. In Poland, in 2000 there were 823 registered new cases of MM; mostly in men (60%), while 98% of these patients were > 40 years of age. New therapeutic strategies, oriented on the mechanisms in which MM cells grow and proliferate, which include thalidomide and analogues (Revimid), proteasome inhibitors (PS-341, Velcade), arsenic trioxide (Trisenox) and statins (Lovastatin) are in many cases able to overcome resistance to standard treatment in numerous clinical trials. Recognition of myeloma cell apoptotic signal conduction pathways and myeloma cell relationship with bone marrow microenvironment will determine future and new directions of treatment of MM which finally lead to a complete cure of this disease (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 1, 145–154).

**Key words:** multiple myeloma, cytokines, thalidomide, PS-341, statins.

## Talidomid i jego analogi

Obecnie w badaniach przedklinicznych i klinicznych ocenia się wiele grup nowych leków. Leki te sklasyfikowano według określonych miejsc, na które działają (tab. 1). Leczenie jest ukierunkowane na komórki szpiczaka mnogiego oraz interakcje komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego.

Talidomid (Thal) – (alfa-N{ftalimido}glutariamid) jest pochodną kwasu glutaminowego, klasyfikowaną farmakologicznie jako środek immunomodulujący. Hamuje wytwarzanie TNF- $\alpha$  [1], a także blokuje angiogenezę przez inhibicję zaskadowego czynnika wzrostu fibroblastów (b-FGF) i/lub VEGF [2]. Talidomid został wycofany

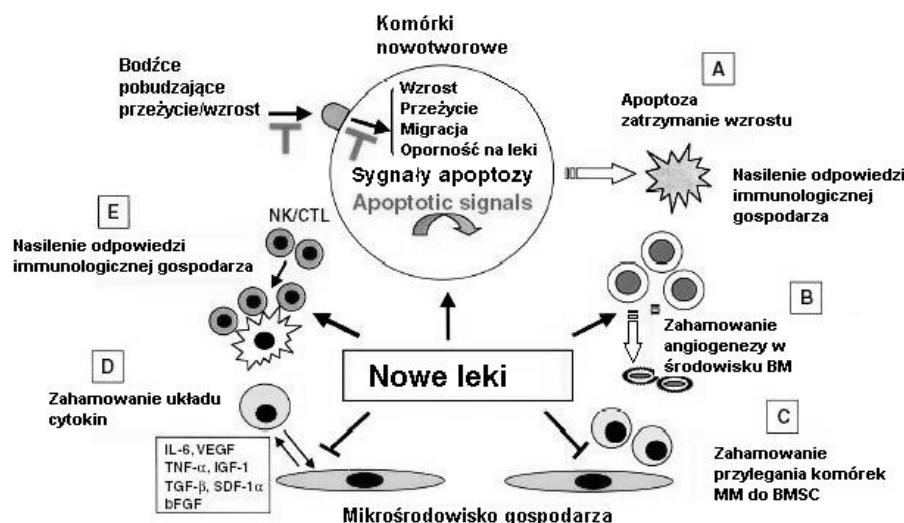
**Table 1.** New drugs in the therapy of multiple myeloma

<p>Ukierunkowane zarówno na klonalne plazmocyty, jak i interakcje komórek MM z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego</p> <p>talidomid i jego analogi (IMiDs, S-3APG)*</p> <p>inhibitory proteasomów (PS-341)*</p> <p>trójtlenek arsenu* (Trisenox)</p> <p>2-metoksyestradiol (2-ME2)*</p> <p>inhibitor acylotransferazy-β kwasu lizofosfatydowego</p>
<p>Ukierunkowane na obwody pośredniczące wzrost i przeżycie komórek MM</p> <p>inhibitor kinazy tyrozynowej receptora VEGF (PTK787/ZK222584)</p> <p>inhibitory transferazy farnesylowej*</p> <p>inhibitory deacetylazy histonów</p> <p>inhibitory białka szoku termicznego-90 (geldanamycyna)</p> <p>inhibitor telomerazy (Telomestatin)</p> <p>nietaksanowy lek stabilizujący mikrotubule (Epothilone B)</p> <p>oligonukleotyd antysensowny Bcl-2 (Genasense™)*</p>
<p>Ukierunkowane na mikrośrodowisko szpiku kostnego</p> <p>inhibitor kinazy IκB (IKK) (PS-1145)</p> <p>inhibitor p38 MAPK (VX-745)</p> <p>Neovastat (AE-941)*</p>
<p>Ukierunkowane na receptory powierzchni komórek</p> <p>indukujący apoptozę ligand pokrewny TNF/ligand Apo2</p> <p>inhibitor receptora IGF-1 (ADW)</p> <p>inhibitor reduktazy HMG-CoA (statyny)</p> <p>Przeciwciała monoklonalne przeciw-CD20 (rituksymab)*</p>

HMG-CoA – redukataza  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metyloglutarylo-koenzymu A; IMiDs – pochodne immunomodulujące; MAPK – aktywowana mitogenami kinaza białkowa; MM – szpiczak; S-3APG – S-3-[3-amino-ftalimido]-glutarimid; SAHA – suberoylanilide hydroxamic acid; TNF – czynnik martwicy nowotworów; VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego.

1. Działają bezpośrednio na komórki nowotworowe, indukując zatrzymanie fazy G1 wzrostu lub apoptozę, nawet w opornych na leki liniach komórek szpiczakowych i komórkach pochodzących od pacjentów [3]. Talidomid hamuje wywołaną przez TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  w komórkach Jurkat aktywność wiązania heterodimeru p50/p65 NF- $\kappa$ B z DNA [4], a IMiDs hamują czynność NF- $\kappa$ B w komórkach MM [3]. Aktywacja NF- $\kappa$ B reguluje przeżycie komórek, procesy antyapoptotyczne i wytwarzanie cytokin w szpiczaku mnogim, a zahamowanie aktywacji NF- $\kappa$ B przez Thal/IMiDs może nasilać wrażliwość na inne środki chemioterapeutyczne. Apoptoza komórek MM indukowana przez Thal/IMiDs jest pośredniczona przez kaspazę 8, co sugeruje potencjalne korzyści połączenia ich z lekami ukierunkowanymi na apoptozę pośredniczoną przez kaspazę 8 (tj. Dex) w celu wywołania podwójnego sygnału apoptotycznego [3, 5].

Od kilku lat, pod kierunkiem Dmoszyńskiej, są prowadzone w Polsce badania kliniczne związane z wykorzystaniem talidomidu u chorych na MM. Wyniki badań zaprezentowane w czasie IX Międzynarodowych Warsztatów Naukowych dotyczących MM w Salamance [8], u ponad 175 chorych z nawrotową lub pierwotnie oporną postacią MM wykazały, iż odsetek odpowiedzi na leczenie wynosił aż 56%. W grupie pacjentów odpowiada-



**Ryc. 1.** Nowe sposoby leczenia ukierunkowane na komórki szpiczaka mnogiego i mikrośrodowisko szpiku kostnego

**Fig. 1.** Novel biologically based therapies targeting multiple myeloma cells and the bone marrow microenvironment

jących na talidomid zaznaczyła się tendencja do szybkiej normalizacji stężenia białka całkowitego, często już po 4 tygodniach od rozpoczęcia terapii oraz powolnego obniżania stężenia białka M, połączonej z poprawą wskaźników aktywności choroby typowych dla MM, takich jak: procent plazmacytów w szpiku kostnym, stężenie  $\beta_2$ -mikroglobuliny i aktywność dehydrogenazy mleczanowej w surowicy. W badaniach polskich potwierdzono, iż talidomid hamuje sekrecję cytokin prozapalnych i proangiogennych, np.: IL-6, TNF- $\alpha$ , VEGF, b-FGF, HGF, u chorych na MM [9]. Wykazano również, iż lek ten ma immunomodulujący wpływ na sekrecję cytokin wydzielanych przez limfocyty T (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$ , zwiększa ilość IL-4, IL-5, IL-8 oraz hamuje wytwarzanie IL-12 i TNF- $\alpha$ ) [10].

W innych badaniach prowadzonych w różnych częściach świata publikacje donosiły o pozytywnej odpowiedzi na leczenie u 25–66% chorych z oporną postacią choroby [11–14]. W dwóch innych badaniach wykorzystujących połączenie Dex i Thal uzyskano odpowiedzi u około dwóch trzecich pacjentów ze świeżo rozpoznanym MM, bez toksycznego narażania następnie pozyskiwanych autologicznych komórek macierzystych z krwi obwodowej [15]. Zatem połączenie talidomidu z deksametazonem daje skuteczny schemat leczenia.

Niedawno zakończono badanie fazy I nad leczeniem Revimidem (CC-5013) u pacjentów z nawrotowym i opornym MM [16]. W tym badaniu u pacjentów z postępującą chorobą i narastającą paraproteinemią, mimo leczenia konwencjonalnego, u około dwóch trzecich osób uzyskano zadowalającą aktywność kliniczną przeciw MM, udowodnioną 25% zmniejszeniem białka monoklonalnego w surowicy, zaś ustabilizowanie się lub zmniejszenie paraprotein MM było widoczne u 79% pacjentów. Nie obserwowano senności,

neuropatii i zaparć związanych często z leczeniem talidomidem. Trwające wciąż badanie fazy II nad Revimidem ujawniło stabilizację choroby lub pozytywną odpowiedź (w tym kilka całkowitych remisji) u 39 z 46 pacjentów z chorobą nawrotową lub oporną na leczenie. Na podstawie wykazanej aktywności antynowotworowej i korzystnego profilu działań ubocznych, niedługo rozpoczną się badania fazy III w celu określenia użyteczności klinicznej Revimidu u pacjentów ze świeżo rozpoznanym MM, w chwili pierwszego nawrotu i jako leczenia podtrzymującego po wykonaniu autoprzeszczepu.

## Inhibitor proteasomów

Wewnątrzkomórkowy, biochemiczny szlak ubikwityny/proteasomów jest systemem proteolitycznym zarówno w cytozolu, jak i w jądrze, regulującym cykliny oraz kinazowe inhibitory białkowe zależne od cyklin, tym samym regulując postęp cyklu komórkowego [17]. PS-341 (Velcade<sup>TM</sup>) należy do klasy inhibitorów proteasomów – boronianów peptydowych, hamujących aktywność proteasomów 26S [18]. Początkowym uzasadnieniem do zastosowania inhibitorów proteasomów w MM było hamujące działanie na aktywację NF- $\kappa$ B. Reguluje zarówno transkrypcję IL-6 w komórkach podścieliska szpiku kostnego, ekspresję cząsteczek adhezyjnych (CD54 i CD106) na komórkach MM i zrębu, jak i ekspresję białek cyklu komórkowego (cyklina D1) i antyapoptotycznych (IAPs, Bcl-x<sub>L</sub>) w komórkach nowotworowych. Aktywacja NF- $\kappa$ B nadaje komórkom MM oporność na leki, reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych na patologicznych plazmacytach i komórkach podścieliska szpiku kostnego. Reguluje ponadto zarówno konstytutywną, jak i zależną

od przylegania komórek MM transkrypcję oraz wydzielanie cytokin. PS-341 blokuje degradację I $\kappa$ B $\alpha$  (białka inhibitorowego związanego z cytozolem NF- $\kappa$ B), hamując w ten sposób I $\kappa$ B $\alpha$  oraz związane z tym translokacje jądrowe i wiązanie NF- $\kappa$ B ze swoim zgodnym motywem wiązania w DNA. W związku z tym PS-341 jest nowym środkiem terapeutycznym służącym do pokonania oporności na leki w komórkach MM, hamuje takie wiązanie patologicznych plazmocytozów w szpiku kostnym i wydzielanie cytokin. Badania *in vitro* potwierdziły, że PS-341 indukuje apoptozę przez aktywację kaspazy 8, 9 i 3 w opornych na leki liniach komórkowych MM oraz u pacjentów ze szpiczakiem mnogim [19]. PS-341 reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach MM oraz podścielisku szpiku kostnego i łączące się z tym wiązanie. Blokuje konstytutywne i indukowane przez przyleganie komórek MM, zależne od NF- $\kappa$ B wydzielanie cytokin w podścielisku szpiku oraz hamuje angiogenezę [20].

Chociaż PS-341 hamuje aktywację NF- $\kappa$ B, to molekularne mechanizmy jego aktywności przeciw-MM nie są w pełni określone. Profil mikrocząsteczek genowych wykazuje, że PS-341 reguluje transkrypcję genów wzrostu i przeżycia łącznie z indukacją transkryptów genów apoptotycznych, ubikwityny/proteasomów i odpowiedzi na stres w komórkach MM. Badania te określają czułość dotyczącą celów molekularnych i oporność na PS-341, uzasadniając konieczność łączenia z lekami konwencjonalnymi lub nowymi oraz uwzględniając rozwój celowanych leków następnej generacji, silnych, wybiórczych i mniej toksycznych. Przeprowadzone badania wykazały, że PS-341 hamuje naprawę DNA przez cięcie podjednostki katalitycznej zależnej od DNA kinazy białkowej [19]. Leczenie linii komórkowych MM opornych na środki uszkadzające DNA (melfalan, antracyklina) tymi lekami, na które są odporne, z następowym (po 12–24 godz) podawaniem subletalnych dawek PS-341, może hamować naprawę uszkodzeń DNA i przywrócić wrażliwość na leki [21]. PS-341 indukuje także zależne od kaspaz cięcie gp130 (CD130),  $\beta$ -podjednostki IL-6R [22], tym samym blokując pośredniczone przez IL-6 dalsze przekazywanie sygnałów: Raf/MEK/ERK1/2 MAPK, JAK2/STAT3 PI3K/Akt, pośredniczących odpowiednio we wzroście, przeżyciu i oporności na leki. Biorąc pod uwagę znaczenie sygnalizacji przez gp130 dla IL-6 i cytokin pokrewnych, ta wywoływana przez PS-341 degradacja gp130 może odpowiadać, przynajmniej po części, za jego nadzwyczajną aktywność antynowotworową. W wielośrodkowym badaniu II fazy nad zastosowaniem PS-341 u pacjentów z nawrotowym lub opornym na leczenie MM osiągnięto około 35% odpowiedzi, w tym wiele

trwałych odpowiedzi całkowitych (mediana 12 miesięcy). Skuteczne odpowiedzi wiązały się z korzyściami klinicznymi, w tym z: poprawą jakości życia, zwiększonym stężeniem hemoglobiny i zmniejszeniem liczby transfuzji preparatów krwiopochodnych, poprawą czynności nerek oraz zwiększeniem stężeń prawidłowych immunoglobulin [23]. W większości przypadków można było łatwo poradzić sobie z działaniem ubocznym leku, tj. zmęczeniem i dolegliwościami żołądkowo-jelitowymi. Trombocytopenia i neuropatia występowały głównie u pacjentów, u których te stany chorobowe już istniały uprzednio. Obecnie PS-341 oceniane jest w badaniach fazy II u chorych na MM we wcześniejszych stadiach (świeżo rozpoznanych, przy pierwszym nawrocie) i jest porównywany z deksametazonem w międzynarodowym, wielośrodkowym badaniu fazy III u pacjentów z nawrotem MM.

## Trójtlenek arsenu

Trójtlenek arsenu (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Trisenox) również wywołuje apoptozę w wyniku aktywacji kaspazy 9 w liniach komórek MM opornych na leczenie i patologicznych plazmocytozach pochodzących od pacjentów. Hamuje również aktywację JAK/STAT3 i zwiększa Mcl-1 wywołowaną przez IL-6 oraz hamuje aktywację NF $\kappa$ B w podścielisku szpiku kostnego. W ten sposób obniża ekspresję CD54 i wiązanie komórka nowotworowa–komórka zrzębu oraz hamuje transkrypcję oraz parakrynną wydzielanie IL-6 i VEGF [24]. Lek ten zwiększa apoptozę komórek MM pośredniczoną przez limfocyty LAK przez selektywne zwiększenie ekspresji CD38 i CD54 na komórkach MM oraz CD31 i CD11a na komórkach LAK [25]. W badaniach klinicznych fazy I/II nad stosowaniem As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> u chorych na MM opornym na leki i nawrotowym wykazano nieznaczne zmniejszenia lub stabilizację paraproteiny MM. Skutki uboczne zastosowania As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obejmują: leukopenię, niedokrwistość, bóle brzucha, biegunkę, gorączkę oraz zmęczenie [26]. Indukowaną As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> cytotoksyczność względem komórek szpiczakowych może nasilać kwas askorbinowy [27]. Deksametazon również nasila *in vitro* apoptozę indukowaną przez Trisenox [24], uzasadniając cel badania klinicznego z zastosowaniem tego połączenia.

## 2-metoksyestradiol

2-metoksyestradiol (2ME2) jest naturalnym metabolitem estradiolu o silnej aktywności przeciwnowotworowej i przeciwingiogennej w biologicznych badaniach *in vitro* i *in vivo* [28]. Słabo



wiąże się z receptorem estrogenowym i pośredniczy swoje działania przeciwnowotworowe niezależnie od ekspresji receptora estrogenowego i jego aktywności. Hamuje wzrost i indukuje apoptozę w liniach komórek MM opornych na leki. Nasila apoptozę indukowaną przez deksametazon, przewyższa ochronne działanie IL-6, IGF-1, oraz zmniejsza wywołane wiązaniem komórek nowotworowych wydzielanie VEGF oraz IL-6 przez podścielisko szpiku kostnego [29]. 2ME2 indukuje apoptozę komórek MM przez uruchomienie mitochondrialnego cytochromu *c*, z następową aktywacją kaspazy 8, 9 i 3. Mechanizmy molekularne przeciwszpiczakowej aktywności 2ME2 określono z zastosowaniem profilu mikromacierzy genetycznych. Obecnie trwają badania kliniczne fazy II nad wykorzystaniem 2ME2 w leczeniu MM.

## **Inhibitor acylotransferazy- $\beta$ kwasu lizofosfatydowego**

Kwas lizofosfatydowy (LPA) i kwas fosfatydowy (PA) są fosfolipidami zaangażowanymi w przekaznictwo sygnałowe i biosyntezę lipidów. Swoiste dla izoformy czynnościowe inhibitory enzymu acylotransferazy LPA, konwertującej LPA do PA, wykazują silną cytotoksyczność względem linii komórkowych MM i komórek szpiku pacjentów. Inhibitory LPAAT- $\beta$  wywołują apoptozę w komórkach MM przez uszkodzenie polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP), nawet przy obecności IL-6, IGF-1 i komórek podścieliska (ryc. 1) [30], dostarczając podstawy do badań klinicznych.

## **Nowe leki ukierunkowane na szlaki związane z pośredniczeniem wzrostu i przeżycia komórek szpiczaka mnogiego**

### **Inhibitory transferazy farnezylowej**

Cytozolowy enzym – transferaza farnezylowa – przenosi grupy farnezyłowe z dwufosforanu farnezyłu na motyw CAAX białka Ras, ułatwiając tym samym jego przyłączenie do błony wewnętrznej komórki plazmatycznej i wiążące się z tym przekaznictwo sygnałowe [31]. Hamowanie farnezytacji jest metodą blokowania aktywności Ras, a kilka inhibitorów transferazy farnezylowej (FTIs) hamuje wzrost komórek nowotworowych zarówno w badaniu *in vitro*, jak i *in vivo* [32]. Indukowana

przez cytokiny (IL-6, VEGF i IGF-1) proliferacja komórek MM jest pośredniczona przez sygnalizację Ras/Raf/MAPK (ryc. 1), co dostarcza przedklinicznego uzasadnienia dla trwających badań klinicznych fazy I/II nad zastosowaniem w MM dwóch FTIs, SCH-66336<sup>33</sup> i R115777 [34].

## **Inhibitory deacetylazy histonów**

Acetylacja histonów moduluje ekspresję genów, różnicowanie i przeżycie komórek. Jest regulowana przez acetylotransferazy histonów i deacetylazy histonów (HDACs). Nowe, oparte na kwasie hydroksamowym, hybrydowe związki chemiczne, takie jak SAHA, są inhibitorami deacetylazy histonów. Indukują gromadzenie się acetylowanych nukleosomalnych rdzeni histonowych z wiążącą się z tym indukcją różnicowania i/lub apoptozy w komórkach transformowanych i nowotworowych. SAHA indukuje zatrzymanie wzrostu i apoptozę w komórkach chorych na MM oraz szpiczakowych liniach komórkowych, nawet tych opornych na Dex i leczenie konwencjonalne.<sup>35</sup> Inhibitor HDAC LAQ824, kwas cinnamylowo-hydroksamowy, indukuje zależną od kaspaz apoptozę komórek MM oraz hamuje zarówno aktywność proteasomów 20S, jak i konstytutywną aktywację NF- $\kappa$ B w MM (ryc. 1) [36].

## **Inhibitory białka szoku termicznego-90**

Białko szoku termicznego-90 ułatwia wewnątrzkomórkowe przemieszczanie, dojrzewanie konformacyjne i fałdowanie trójwymiarowe wymagane do prawidłowej czynności białka. Antybiotyk ansamycynowy geldanamycyna (GA) i jej analogi łączą się z krytycznym miejscem wiązania adenozynotrójfosforanu w Hsp90, w ten sposób znosząc jego aktywność w środowisku szpiku kostnego, zmniejszając ekspresję IGF-1R i IL-6R na komórkach MM, powodując deplecję kinaz wzrostowych (np. Akt, kinazy I $\kappa$ B – IKK i Raf) oraz białek przeciwapoptotycznych (FLIP, XIAP, cIAP i telomerazy), a także hamując indukowaną przez cytokiny aktywację NF- $\kappa$ B i telomerazy (hTERT) [37]. GA oraz inne inhibitory Hsp90 indukują apoptozę szpiczakowych linii komórkowych i komórek chorych na MM, opornych na Dex, antracykliny, Thal lub ImiDs i PS-341. Profil mikromacierzy genowych wykazuje, że PS-341 indukuje Hsp90 w komórkach MM. Przeciwnie, blokowanie tej odpowiedzi przez GA nasila wywołaną przez PS-341 apoptozę komórki. GA wykazuje aktywność przeciw MM w modelu ludzkiego szpi-

czaka u myszy ze SCID; w przyszłości będzie oceniana w protokołach klinicznych zarówno sama, jak i razem z PS-341.

### **G3139, oligonukleotyd antysensowny Bcl-2**

Członkowie rodziny białek Bcl-2 (tj. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>s</sub> i Bax) regulują apoptozę i oporność na leki w MM. Nadmierna ekspresja Bcl-2 korelowała również z opornością na IFN [38]. Apoptoza indukowana przez deksametazon w szpiczakowych liniach komórkowych ARP-1 i RPMI 8226 komórek MM koreluje z poziomem ekspresji Bcl-2. Ściśle rzecz biorąc oporność na deksametazon, ale nie na melfalan, wiąże się z nadmierną ekspresją Bcl-2 [39]. Genasense<sup>TM</sup> jest oligonukleotydem antysensownym Bcl-2, zmniejszającym stężenia mRNA i białka Bcl-2 w szpiczakowych liniach komórkowych MM i komórkach MM pacjentów [40]. W badaniach fazy III porównuje się zastosowanie w szpiczaku mnogim Dex vs. Dex z Genasense<sup>TM</sup>.

### **Nowe leki ukierunkowane na interakcje komórek nowotworowych z mikrośrodowiskiem szpiku kostnego**

#### **Inhibitor kinazy IκB PS-1145**

Nowy swoisty inhibitor IκB PS-1145 tylko częściowo hamuje proliferację komórek MM, co sugeruje, że blokada NF-κB nie może odpowiadać za całą aktywność przeciwnowotworową inhibitora proteasomów PS-341. PS-1145 blokuje aktywację NF-κB w komórkach MM i podścieliska szpiku kostnego. Blokuje także dalsze następstwa, w tym ekspresję cząsteczek adhezyjnych i wiązanie komórka MM–podścielisko, proliferację przylegających komórek MM oraz transkrypcję i wydzielanie IL-6. Badania te zwracają uwagę na znaczenie działania nowych środków terapeutycznych na patologiczne plazmocyty w mikrośrodowisku szpiku kostnego.

#### **Inhibitor p38 MAPK**

Białko p38 MAPK jest aktywowane przez cytokiny i czynniki wzrostu. Aktywacja p38 MAPK wiąże się z ekspresją genu i/lub wydzielaniem IL-6 w komórkach Sertoliego [41], komórkach mięśnia sercowego [42] i osteoblastach [43]. Swoisty inhi-

bitor p38 MAPK VX-745 hamuje wydzielanie IL-6 i VEGF w podścielisku szpiku kostnego oraz indukowane przez TNF-α wydzielanie IL-6. VX-745 hamuje także zarówno proliferację komórek MM, jak i wydzielanie IL-6 w mikrośrodowisku szpiku kostnego spowodowane przyleganiem patologicznych plazmocytoz do zrębu (ryc. 1). Badania te rozpoznają w p38 MAPK nowy cel terapeutyczny, który być może jest wart wykorzystania, aby przezwyciężyć oporność na dotychczasowe leczenie i poprawić wyniki terapeutyczne u chorych na MM.

### **Nowe leki ukierunkowane na receptory powierzchni komórki**

#### **Indukujący apoptozę ligand pokrewny czynnikowi martwicy nowotworów**

TRAIL/Apo2L (nadrodzina TNF – ligandy indukujące śmierć, obejmująca TNF-α i ligand Fas) indukuje pośredniczoną przez kaspazę 8 apoptozę ludzkich linii komórkowych MM i komórek pochodzących ze szpiku kostnego pacjentów, także tych, które są odporne na konwencjonalne sposoby leczenia [44]. TRAIL/Apo2L hamuje wzrost ludzkich komórek MM u myszy ze SCID [44], dlatego leki indukujące sygnalizację apoptotyczną TRAIL mogą przezwyciężyć kliniczną oporność na leki w MM.

#### **Inhibitory receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1**

Inhibitor kinazy tyrozynowej IGF-1R ADW pośredniczy w aktywności przeciwnowotworowej zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w modelu ludzkiego MM u myszy z cukrzycą i ze SCID, a bez otyłości. Ponieważ IGF-1 jest ważnym czynnikiem przeżycia w MM [45], to blokowanie kaskad sygnałowych pośredniczonych przez IGF-1 może być obiecującą opcją terapeutyczną.

#### **Statyny**

Statyny (lowastatyna i fluwastatyna) są nieodwracalnymi inhibitorami reduktazy β-hydroksy-β-metyloglutarylo-koenzymu A, co blokuje wytwarzanie mawelonianu, bardzo ważnego składnika w syntezie cholesterolu i izoprenoidów. Prenylacja

białek docelowych, w tym białka Ras wiążącego guanozyno-trójfosforan, jest niezbędna do ich umiejscowienia błonowego i sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Lowastatyna skutecznie indukuje apoptozę w liniach komórkowych MM i jest skuteczna w połączeniu z innymi lekami [46], np. indukuje apoptozę w komórkach MM pacjentów, nawet opornych zarówno na konwencjonalne, jak i nowe (IMiDs, PS-341) środki terapeutyczne [13, 47].

## Przeciwciało przeciw CD20

Terapia skierowana przeciwko CD20 obejmuje jedynie mniejszość komórek nowotworowych MM pacjentów, ponieważ ekspresja CD20 w MM nie jest zbyt częsta (20% CD20<sup>+</sup>). Leczenie przeciwciałem monoklinalnym anti-CD20, rituksymabem, dało odpowiedź u około 32% uprzednio leczonych chorych na MM, u których stwierdzono CD20<sup>+</sup> komórki nowotworowe [48].

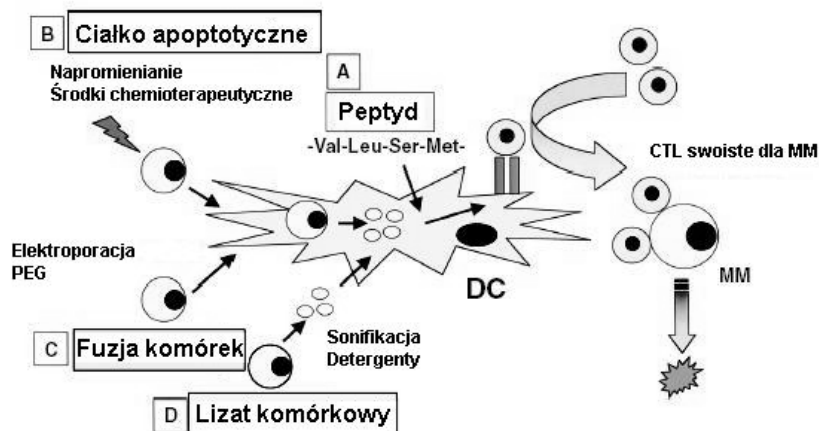
## Immunoterapia oparta na komórkach dendrytycznych

Komórki dendrytyczne (DCs) odgrywają główną rolę w prezentacji antygenów (Ag) naiwnym limfocytom T oraz w indukcji pierwotnych odpowiedzi immunologicznych. Chociaż w badaniach przedklinicznych wykazano, że DCs obciążone Ag *ex vivo* indukują silne odpowiedzi przeciwnowotworowe *in vitro* oraz *in vivo* w przypadku innych nowotworów złośliwych, to w MM immunoterapia oparta na komórkach dendrytycznych nie stanowi wciąż uznanej opcji. Co prawda w kilku badaniach wykazano, że DCs pochodzące od chorych na MM mogą wykazywać prawidłową czynność *in vitro* [49], to inne doniesienia wykazują zmniejszoną reaktywność DC na aktywację CD40 [50]. Dhodapkar et al. [51] donieśli, że limfocyty T indukowane przez wstrzyknięte DCs atakują świe-

że autologiczne komórki nowotworowe, a nie prawidłowe komórki szpiku kostnego. Z podobną wydajnością indukowano zarówno limfocyty efektorowe CD8<sup>+</sup> pochodzące z krwi obwodowej pacjenta, jak i szpik kostny.

Chociaż próbowano wielu opartych na DC strategii szczepienia (ryc. 2), to nie wiadomo, jaki antygen jest optymalny i skuteczny do obciążania DC. Peptydy wiążące się bezpośrednio z częściami ludzkich Ag leukocytów (HLA) na DCs są najlepszymi kandydatami wśród antygenów, ale istnieją pewne ograniczenia, które wynikają zarówno z restrykcji HLA pacjentów, jak i z wybiórczości ekspresji Ag na komórkach MM. Swoista idiotypowo determinanta regionu zmiennego Ig jest idealnym Ag docelowym do przezwyciężenia tych ograniczeń, ponieważ wykazuje unikatową ekspresję na komórkach nowotworowego klonu limfocytów B. Po pomyślnym klinicznie początkowym doniesieniu w chłoniaku grudkowym [52], przeprowadzono badania nad szczepieniem DCs obciążonych białkami idiotypowymi u chorych na MM [53]. Chociaż w tych badaniach swoiste idiotypowo limfocyty T cytotoksyczne (CTLs) podlegały indukcji, to dotychczas nie wykazano, by wiązało się to z trwałymi odpowiedziami klinicznymi. Metody oparte na stosowaniu pojedynczego Ag wykazują ograniczenia z powodu odpowiedzi krzyżowej z prawidłowymi komórkami lub w związku z ewolucją i „ucieczką” Ag-ujemnych klonów komórek nowotworowych [54].

Inna oparta na DCs strategia szczepienia obejmuje uzyskanie fuzji komórek MM i DCs z zastosowaniem glikolu polietylenowego. Takie komórki fuzyjne (MM/DC) utworzone z dojrzałych DCs i komórek MM są w badaniach *in vitro* silnymi induktorami odporności swoistej dla nowotworu [55]. Wytworzone dojrzałe DCs, jako komórki prezentujące antygen, porównano DCs z wstrzykniętymi ciałkami apoptotycznymi MM lub z wstrzykniętymi lizatami komórek MM. DCs z wstrzykniętymi ciałkami apoptotycznymi MM są bardziej



**Ryc. 2.** Strategie oparte na komórkach dendrytycznych mające na celu wytworzenie limfocytów T cytotoksycznych przeciw komórkom szpiczakowym

**Fig. 2.** Dendritic cells-based strategies to generate cytotoxic T lymphocytes against multiple myeloma

skutecznymi induktorami CTLs skierowanych przeciwko autologicznym komórkom MM niż DCs z wstrzykniętymi lizatami komórek MM, co dostarcza podstaw do innych badań nad szczepieniami [56].

## Przyszłe kierunki badań

Terapie konwencjonalne i wysokodozowane mogą nieznacznie tylko poprawić wyniki leczenia u chorych na MM, ponieważ niewielu, a właściwie żaden z chorych zostaje całkowicie wyleczony. Obecnie dość dynamicznie rozwija się nowy paradygmat w terapii MM oparty na zastosowaniu le-

ków ukierunkowanych nie tylko na komórki szpiczakowe, ale także na interakcje komórka nowotworowa–podścielisko szpiku kostnego. Te nowe leki, stosowane same lub w połączeniach z konwencjonalnymi sposobami terapii, są bardzo obiecujące odnośnie do poprawienia ostatecznych wyników leczenia. Należy podkreślić, że macierze genowe i analiza proteomu próbek szpiku kostnego, uzyskanych od pacjentów leczonych według protokołów klinicznych wykorzystujących nowe leki pozwolą określić mechanizmy molekularne wrażliwości i oporności na leki komórek nowotworowych, dostarczając tym samym podstaw do rozwoju nowej generacji silniejszych i bardziej wybiórczych, a jednocześnie mniej toksycznych sposobów leczenia szpiczaka mnogiego.

## Piśmiennictwo

- [1] Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G: Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991, 173, 699–703.
- [2] D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J: Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 4082–4085.
- [3] Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi NC, Treon SP, Anderson KC: Apoptotic signalling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 2002, 99, 4525–4530.
- [4] Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS Jr: Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by thalidomide through suppression of I $\kappa$ B kinase activity. *J Biol Chem* 2001, 276, 22382–22387.
- [5] Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Treon S, Urashima M, Kharbanda S, Anderson KC: Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene* 1997, 15, 837–843.
- [6] Haslett PA, Klausner JD, Makonkawkeyoon S, Moreira A, Metatrapi P, Boyle B, Kunachiwa W, Manekarn N, Vongchan P, Corral LG, Elbeik T, Shen Z, Kaplan G: Thalidomide stimulates T cell responses and interleukin 12 production in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999, 15, 1169–1179.
- [7] Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, Lin B, Podar K, Gupta D, Chauhan D, Treon SP, Richardson PG, Schlossman RL, Morgan GJ, Muller GW, Stirling DI, Anderson KC: Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2001, 98, 210–216.
- [8] Dmoszyńska A, Hus M, Soroka-Wojtaszko M, Mańko J, Jawnika D, Legieć W, Grzasko N, Hellmann A, Ciepluch H, Baran W, Skotnicki A, Wolska-Smoleń T, Sulek K, Borysewicz-Czajka T, Sawicki W, Robak T, Szmigielska A, Konopka L, Pszenna E, Szpila T, Kłoczko J, Piszcz J, Zdziarska B: Multicenter clinical study of thalidomide efficacy in patients with refractory and relapsed multiple myeloma. *Hematol J* 2003, 4, Suppl. 1, Abstract 308.
- [9] Dmoszyńska A: Talidomid – nowe możliwości leczenia szpiczaka mnogiego. *Acta Haematol Pol* 2000, 31, 1, 5–9.
- [10] Dmoszyńska A: Immunomodulatory biologiczne w leczeniu szpiczaka plazmocytozy. *Pol Arch Med Wewn* 2002, CVIII, 5, 11, 1091–1096.
- [11] Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B: Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999, 341, 1565–1571.
- [12] Alexanian R, Weber D: Thalidomide for resistant and relapsing myeloma. *Semin Hematol* 2000, 37, 22–25.
- [13] Dmoszyńska A: Nowe możliwości leczenia szpiczaka plazmocytozy. *Acta Haematol Pol* 2003, 34, Supl. 1, 78–82.
- [14] Hus M, Dmoszyńska A, Soroka-Wojtaszko M, Jawnika D, Legieć W, Ciepluch H, Hellmann A, Wolska-Smoleń T, Skotnicki A, Mańko J: Thalidomide treatment of resistant or relapsed multiple myeloma patients. *Haematologica* 2001, 86, 404–408.
- [15] Weber D, Rankin K, Gavino M, Delasalle K, Alexanian R: Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2003, 21, 16–19.
- [16] Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, Hideshima T, Mitsiades C, Davies F, LeBlanc R, Catley LP, Doss D, Kelly K, McKenney M, Mechlowicz J, Freeman A, Deocampo R, Rich R, Ryoo JJ, Chauhan D, Balinski K, Zeldis J, Anderson KC: Immunomodulatory derivative of thalidomide CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* 2002, 100, 3063–3067.
- [17] King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW: How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996, 274, 1652–1659.



- [18] Kissel AF, Goldberg AL: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001, 21, 1–20.
- [19] Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC: Molecular mechanisms mediating anti-myeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003, 101, 1530–1534.
- [20] LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neuberg D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC: Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 2002, 62, 4996–5000.
- [21] Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC: The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 2003, 101, 2377–2380.
- [22] Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC: Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004, 104 (3), 607–618.
- [23] Richardson P: A phase II multicenter study of the proteasome inhibitor Bortezomib (Velcade<sup>TM</sup>, formerly PS-341) in multiple myeloma patients (pts) with relapsed/refractory disease. *Blood* 2002, 100, 104a.
- [24] Hayashi T, Hideshima T, Akiyama M, Richardson P, Schlossman RL, Chauhan D, Munshi NC, Waxman S, Anderson KC: Arsenic trioxide inhibits growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Mol Cancer Ther* 2002, 1, 851–860.
- [25] Deaglio S, Canella D, Baj G, Arnulfo A, Waxman S, Malavasi F: Evidence of an immunologic mechanism behind the therapeutical effects of arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) on myeloma cells. *Leuk Res* 2001, 25, 227–325.
- [26] Hussein MA: Arsenic trioxide: a new immunomodulatory agent in the management of multiple myeloma. *Med Oncol* 2001, 18, 239–242.
- [27] Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, Oshiro MM, Dalton WS, Boise LH: Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Blood* 2001, 98, 805–813.
- [28] Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ: Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res* 1997, 57, 81–86.
- [29] Chauhan D, Catley L, Hideshima T, Li G, Leblanc R, Gupta D, Sattler M, Richardson P, Schlossman RL, Podar K, Weller E, Munshi N, Anderson KC: 2-Methoxyestradiol (2ME2) acts directly on tumor cells and in the bone marrow microenvironment to overcome drug resistance in multiple myeloma. *Blood* 2002, 100, 2187–2194.
- [30] Hideshima T: Induction of apoptosis by lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT)-b inhibitors in multiple myeloma (MM). *Blood* 2002, 100, 813a.
- [31] Kato K, Cox AD, Hisaka MM, Graham SM, Buss JE, Der CJ: Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 6403–6407.
- [32] Karp JE, Kaufmann SH, Adjei AA, Lancet JE, Wright JJ, End DW: Current status of clinical trials of farnesyltransferase inhibitors. *Curr Opin Oncol* 2001, 13, 470–476.
- [33] Adjei AA, Davis JN, Bruzek LM, Erlichman C, Kaufmann SH: Synergy of the protein farnesyltransferase inhibitor SCH66336 and cisplatin in human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2001, 7, 1438–1445.
- [34] Karp JE, Lancet JE, Kaufmann SH, End DW, Wright JJ, Bol K, Horak I, Tidwell ML, Liesveld J, Kottke TJ, Ange D, Buddharaju L, Gojo I, Highsmith WE, Belly RT, Hohl RJ, Rybak ME, Thibault A, Rosenblatt J: Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase I clinical-laboratory correlative trial. *Blood* 2001, 97, 3361–3369.
- [35] Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Anderson KC, Treon SP: The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces growth arrest and apoptosis in multiple myeloma (MM) and Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) cell lines and patient tumor cells. *Blood* 2001, 98, 376a.
- [36] Catley L: LAQ824 is a novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma: results of a preclinical evaluation *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2002, 100, 106a.
- [37] Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Akiyama M, Treon SP, Anderson KC: The HSP90 molecular chaperone as a novel therapeutic target in hematologic malignancies. *Blood* 2001, 98, 377a.
- [38] Sangfelt O, Osterborg A, Grander D, Anderbring E, Ost A, Mellstedt H, Einhorn S: Response to interferon therapy in patients with multiple myeloma correlates with expression of the Bcl-2 oncoprotein. *Int J Cancer* 1995, 63, 190–192.
- [39] Gazitt Y, Rothenberg ML, Hilsenbeck SG, Fey V, Thomas C, Montgomery W: Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells. *Int J Oncol* 1998, 13, 839–848.
- [40] Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR: Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucl Acid Drug Dev* 2002, 12, 193–213.
- [41] De Cesaris P, Starace D, Riccioli A, Padula F, Filippin A: Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces interleukin-6 production and integrin ligand expression by distinct transcription pathways. *J Biol Chem* 1998, 273, 7566–7571.
- [42] Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuerauf DJ, Andrews C, McDonough PM, Glembotski CC: p38 MAPK and NF- $\kappa$ B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. *J Biol Chem* 2000, 275, 23814–23824.
- [43] Chae HJ, Chae SW, Chin HY, Bang BG, Cho SB, Han KS, Kim SC, Tae KC, Lee KH, Kim DE, Im MK, Lee SJ, Chang JY, Lee YM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH, Kim HR: The p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumor necrosis factor in osteoblasts. *Bone* 2001, 28, 45–53.

- [44] Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, Hideshima T, Anderson KC: TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001, 98, 795–804.
- [45] Ogawa M, Nishiura T, Oritani K, Yoshida H, Yoshimura M, Okajima Y, Ishikawa J, Hashimoto K, Matsuura I, Tomiyama Y, Matsuzawa Y: Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. *Cancer Res* 2000, 60, 4262–4269.
- [46] van de Donk NW, Kamphuis MM, Lokhorst HM, Bloem AC: The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 2002, 16, 1362–1371.
- [47] Mitsiades CS: HMG-CoA inhibitors (statins) induce growth arrest, apoptosis of multiple myeloma (MM) and Waldenstrom's macroglobulinemia (WM) cells and enhance their sensitivity to conventional or novel therapies. Molecular profiling of HMG-CoA inhibition in MM/WM and framework for translation to therapeutic application. *Blood* 2002, 100, 597a.
- [48] Treon SP, Pilarski LM, Belch AR, Kelliher A, Preffer FI, Shima Y, Mitsiades CS, Mitsiades NS, Szczeppek AJ, Ellman L, Harmon D, Grossbard ML, Anderson KC: CD20-directed serotherapy in patients with multiple myeloma: biologic considerations and therapeutic applications. *J Immunother* 2002, 25, 72–81.
- [49] Raje N, Gong J, Chauhan D, Teoh G, Avigan D, Wu Z, Chen D, Treon SP, Webb IJ, Kufe DW, Anderson KC: Bone marrow and peripheral blood dendritic cells from patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus gene sequences. *Blood* 1999, 93, 1487–1495.
- [50] Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D: Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor- $\beta$ 1 and interleukin-10. *Blood* 2001, 98, 2992–2998.
- [51] Dhodapkar MV, Krasovsky J, Olson K: T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99, 13009–13013.
- [52] Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, Benko FA, Sternas LA, Pennington R, Watson TM, Reynolds CW, Gause BL, Duffey PL, Jaffe ES, Creekmore SP, Longo DL, Kwak LW: Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med* 1999, 5, 1171–1177.
- [53] Reichardt VL, Okada CY, Liso A, Benike CJ, Stockerl-Goldstein KE, Engleman EG, Blume KG, Levy R: Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma – a feasibility study. *Blood* 1999, 93, 2411–2419.
- [54] Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G: Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999, 190, 1669–1678.
- [55] Grosman DD: Dendritic cell (DC) – tumor fusions generated with mature as compared to immature DC potently induce myeloma specific immunity. *Blood* 2002, 100, 399a.
- [56] Hayashi T: *Ex vivo* induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2002, 100, 400a.

### Adres do korespondencji:

Artur Jurczyszyn  
Katedra i Klinika Hematologii CM UJ  
ul. Kopernika 17  
31-501 Kraków  
e-mail: mmjurczyn@cyf-kr.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 19.11.2003 r.  
Po recenzji: 18.10.2004 r.  
Zaakceptowano do druku: 3.11.2004 r.

Received: 19.11.2003  
Revised: 18.10.2004  
Accepted: 3.11.2004