



T.C.
ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**MULTİPL MYELOM HASTALIĞINDA BCMA CAR, CD16, IL12
EKSPRESE EDEN NK92 HÜCRELERİNİN (BCMA CAR HAŞHAŞIN)
PREKLİNİK ETKİNLİK ÇALIŞMASI**

İLHAM GAFARLI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

- 1.TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Ayşe Nurdan Tözün
- 2.TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Siret Ratip
- 3.TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Ercüment Ovalı

İSTANBUL-2022



T.C.
ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**MULTİPL MYELOM HASTALIĞINDA BCMA CAR, CD16, IL12
EKSPRESE EDEN NK92 HÜCRELERİNİN (BCMA CAR HAŞHAŞIN)
PREKLİNİK ETKİNLİK ÇALIŞMASI**

İLHAM GAFARLI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

1.TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Ayşe Nurdan Tözün

2. TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Siret Ratip

3.TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Ercüment Ovalı

İSTANBUL-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

15.09.2022

İlham Gafarlı

TEŞEKKÜR

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince büyük emeği olan, hem “’askerlerine bilgi ve birikimini aktaran ve disiplinden taviz vermeyen, mazisi zaferlerle taçlanmış büyük komutan” kimliğini, hem de ince ruhuyla “’evlatlarını her zaman koruyan, kollayan, sahip çıkan bir anne” şefkatini kendinde harmanlayan saygıdeğer hocam, tez danışmanım

Prof. Dr. Ayşe Nurdan Tözün hocama,

Hekimlik duruşunu her zaman kendime örnek aldığım, tezimde bilgi ve tecrübelerinden yaralandığım saygıdeğer Prof. Dr. Siret Ratip hocama,

Tez sürecinde kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum, hekimlik, bilim insanlığı ve gerçek vatanseverliği ile örnek olan, çalışmalarımın her anında desteğini esirgemeyen saygıdeğer Prof. Dr. Ercüment Ovalı hocama,

Her zaman bilgi ve tecrübelerinden yaralandığım, sadece eğitimimiz ile değil, bize aile ortamı yaratarak özel sorunlarımıza bile çözüm arayan anne şefkatli bölüm başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Sevgi Şahin hocama,

Kendisini tanımaktan ve çalışmaktan kıvanç duyduğum, hekimliği, etik duruşu ve karakteri ile örnek olan saygıdeğer Doç. Dr. Müjdat Kara hocama ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tüm saygıdeğer hocalarıma

Tez deney çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen başta Derya hanım olmak üzere tüm emeği geçen Labcell çalışanlarına

Asistanlığımın ilk gününden itibaren hep desteğini esirgemeyen bana yardımcı olan kıdemlim Nigara Öz kardeşim gibi sevdiğim ve her zaman desteğini hissettiğim Hatun başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez sürecinde manevi ve teknik desteği için dostum Vefalı’ya

Tüm hayatım süresince her zaman yanımda olan, babam Fatullah’a, kardeşim Mahammad’a

Uzmanlık eğitimim sürecinde her zaman desteğini hissettiğim ve bu süreci bana kolaylaştırmak için ekstra emek sarf eden eşim Sevilay’a, bana manevi huzur veren ve en yorgun halimde bile ilham kaynağım olan ve bana güç katan kızlarım Elif, Leman ve Çiyelem İpek’e

Benim üzerimde sonsuz emeği olan, uzman olmamı benden daha çok isteyen, ruhen hep yanımda hissettiğim sevgili annem Çiyelem’e

Bu günlere gelmemdeki en derin sevgi ve güç kaynağım yüce Rabbime

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
1 GİRİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Tanım	5
2.2 Epidemiyolojisi.....	6
2.3 Etiyoloji	6
2.4 Patogenez.....	7
2.5 Genetik Faktörler	9
2.5.1 Myelomada Birincil Genetik Olaylar.....	9
2.5.2 Myelomada İkincil Genetik Olaylar	10
2.6 Klinik Bulgular	10
2.6.1 Anemi.....	11
2.6.2 Kemik Ağrıları.....	12
2.6.3 Böbrek Hasarı.....	12
2.6.4 Hiperkalsemi.....	13
2.6.5 Nörolojik Bulgular	13
2.6.6 Hiperviskozite	14
2.6.7 Enfeksiyonlar	14
2.7 Tanı	16
2.7.1 Labaratuar Bulgular.....	17
2.7.2 Radyolojik Değerlendirme	19
2.8 Tedavi	19
2.8.1 Tedavi seçenekleri	19
2.8.2 Yeni Teşhis Edilen Myelomun Tedavisi.....	20
2.8.3 Transplantasyon İçin Uygun Hastalarda Başlangıç Tedavisi	22
2.8.4 Transplantasyon İçin Uygun Olmayan Hastalarda Başlangıç Tedavisi ..	23
2.8.5 İlaç Dozları ve Proflaktik Önlemler	23
2.8.6 Kök Hücre Nakli.....	24
2.8.6.1 Otolog Kök Hücre Nakli(OKHT)	24
2.8.6.2 Tandem Nakli	25

2.8.6.3	Allojenik Transplantasyon	25
2.8.6.4	Pekiştirme Tedavisi	25
2.8.6.5	İdame Tedavisi.....	25
2.8.7	Nükseden MM Tedavisi	26
2.8.7.1	İlk Nüks Tedavisi.....	27
2.8.7.2	İkinci ve Sonraki Nükslerin Tedavisi	29
2.8.8	Araştırmacı Tedavi Yaklaşımları	30
2.8.9	NK92 ve CAR-T Hücre Tedavisi	30
2.8.9.1	CAR T Hücre Tedavisi	32
2.8.9.2	B Hücresi Olgunlaşma Antijeni(BCMA)	32
2.8.9.3	CAR NK Hücre Tedavisi	33
3	GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1	Gereç	34
3.1.1	Kullanılan Plazmidler.....	34
3.2	Yöntem	36
3.2.1	Lentivirüs Üretim Protokolü	36
3.2.2	Üretim	37
3.2.3	NK92, Haşhaşin NK92 kültür protokolü ve CAR NK92, Haşhaşin NK92 transdüksiyon prptokolü	37
3.2.4	BCMA Lentivirüs Titrasyonu.....	38
3.2.4	BCMA Lentivirüs RCL	39
4	BULGULAR.....	40
4.1	Farklı Değerlerde Lentivirüs Viral Titrasyon Analizleri	40
4.2	NK92 ve Haşhaşin Hücrelerinin BCMA CAR Ekspresyonları.....	44
4.3	Efektör Hücrelerin (NK92,BCMA NK92, HAŞHAŞİN ve BCMA HAŞHAŞİN) Etkinliği.....	45
5	TARTIŞMA.....	51
6	SONUÇ	54
7	KAYNAKLAR.....	55

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

APRIL	A Proliferation Inducing Ligand (A Proliferasyon İndükleyici Ligand)
BAFF	B-Cell Activating Factor (B-Hücre Aktivasyon Faktörü)
BCMA	B Cell Maturation Antigen (B Hücre Olgunlaşma Antijeni)
BCR	B Cell Receptor (B Hücre Reseptörü)
BMSC	Bone Marrow Stromal Cell (Kemik İliği Stromal Hücreleri)
BMTCTN	Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (Kemik İliği Nakli Klinik Araştırmalar Ağı)
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CAR	Chimeric Antigen Receptor (Kimerik Antijen Reseptörü)
CAR-T	Chimeric antigen receptor-T (Kimerik Antijen Reseptör-T)
CD	Cluster of Differentiation (Yüzey Farklılaşma Antijenleri)
CRAB	Hiperkalsemi, Böbrek yetmezliği, Anemi, Kemik hastalığı
CRS	Cytokine Release Syndrome (Sitokin Salma Sendromu)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DRd	Daratumumab, Lenalidomid ve Deksametazon
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFRt	Kesik Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMH	Ekstramedüller Hastalık
EPO	Eritropoetin
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü)
GM	Germinal Merkez
HLA	Human Leucocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
Ig	İmmünglobülin
IgA	İmmünglobülin A (alfa)
IgD	İmmünglobülin D(delta)

IgE	İmmünglobülin E(epsilon)
IgG	İmmünglobülin G(gamma)
IgH	İmmünglobülin Ağır Zincir
IgM-	İmmünglobülin M(mü)
IL	İnterlökin
IMWG	International Myeloma Working Group (Uluslararası Myelom Çalışma Grubu)
İİE	İdrar İmmünfiksasyon Elektroforezi
İVİG	İntravenöz İmmünoglobülin
K-RAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus (Kirsten Sıçan Sarkom Virüsü)
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LV	Lentivirüs
MGUS	Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (Önemi) (Bilinmeyen Monoklonal Gammopati)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi)
MIP	Makrofaj İnflamatuar Protein
MKH	Minimal Kalıntı Hastalık
MM	Multipl Myelom
MOİ	Multiplicity of Infection (Enfeksiyon Çeşitliliği)
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTO	Myelom Tanımlayıcı Olaylar
NK	Natural Killer (Doğal Öldürücü)
N-RAS	Neuroblastoma Rat Sarcoma Virus
OKHT	Otolog Kök Hücre Transplantasyonu
OPG	Osteoprotegrin
OS	Overall Survival (Genel Sağkalım)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Periferik Kan Mononükleer Hücre)

PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PFS	Progression Free Survival (Progresyonsuz <i>Sağkalım</i>)
PHD	Plazma Hücre Diskrazileri
PHL	Plazma Hücreli Lösemi
PS	Progresyonsuz Sağkalım
PsPAX	Lentiviral Ambalaj Plazmidi
RANK	Nükleer Faktör Kappa-B Reseptör Aktivatörü (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B)
RANK-L	Nükleer Faktör Kappa-B Ligandının Reseptör Aktivatörü (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand)
RNA	Ribonükleik Asit
SHZ	Serbest Hafif Zincir
SİE	Serum İmmüfiksasyon Elektroforezi
SMM	Smoldering Multiple Myeloma (Sessiz Multipl Myelom)
SPE	Serum Protein Elektroforezi
TCR	T Cell Receptor (T Hücre Reseptörü)
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TY	Tam Yanıt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü)
VLA	Very Late Antijen
VRd	Bortezomib, Lenalidomid, Deksametazon
VSVG	Vesicular Stomatitis Virus G Protein
XPO	Exportin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: MM Oluşumunun Başlatılması ve İlerlemesi	9
Şekil 2: Yeni Tanı Myelom için Güncel Tedavi Algoritması	21
Şekil 3: Nüks Myelom için Güncel Tedavi Algoritması	27
Şekil 4: PsPax viral paketlenme plazmidi	34
Şekil 5: pCMV-VSV-G: zarf plazmidi	35
Şekil 6: CAR BCMA plazmidi	35
Şekil 7: BCMA CAR dizaynında kullanılan konstrakt dizilimi	36
Şekil 8: BCMA CAR şematizasyonu	37
Şekil 9: 10 MOİ BCMA Lentivirüs Viral titrasyon Analizi.....	40
Şekil 10: 3 MOİ BCMA Lentivirüs Viral titrasyon Analizi.....	40
Şekil 11: 1 MOİ BCMA Lentivirüs Viral titrasyon Analizi.....	41
Şekil 12: 0.3 MOİ BCMA Lentivirüs Viral titrasyon Analizi.....	41
Şekil 13: 0.1 MOİ BCMA Lentivirüs Viral titrasyon Analizi.....	42
Şekil 14: 0.03 MOİ BCMA Lentivirüs Viral titrasyon Analizi.....	42
Şekil 15: MOİ titrasyonuna göre EGFRt ekspresyon yüzdesi.....	43
Şekil 16: 14.gün EGFRt ekspresyonu	44
Şekil 17: BCMA CAR ekspresyonu.....	44
Şekil 18: Saf H929 hattında Effektör hücrelerin etkinliği.....	45
Şekil 19: PBMC+H929 hattında Effektör hücrelerin etkinliği.....	47
Şekil 20: 1:1 oranında Effektör hücrelerin etkinliği.....	49
Şekil 21: 5:1 oranında Effektör hücrelerin etkinliği.....	50
Şekil 22: 10:1 oranında Effektör hücrelerin etkinliği.....	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: MM tanımlı hastalarda semptom ve bulgu oranları.....	11
Tablo 2. MGUS, SMM ve MM'nin ayırıcı özellikleri.....	17
Tablo 3. Ölçülebilir Hastalık Kriterlerini Karşılamayan MM Hastalık Tanımları.....	18
Tablo 4: Multipl Miyelomlu Hastaların Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	20
Tablo 5: MOİ titrasyonuna göre EGFRt ekspresyon yüzdesi.....	43
Tablo 6:Işın+Effektör hücrelerin etkinliği.....	45
Tablo 7: PBMC Varlığında Işın+Effektör hücrelerin etkinliği.....	47

ÖZET

MULTİPL MYELOM HASTALIĞINDA BCMA CAR, CD16, IL12 EKSPRESE EDEN NK92 HÜCRELERİNİN (BCMA CAR HAŞHAŞİN) PREKLİNİK ETKİNLİK ÇALIŞMASI

Amaç: Multipl miyelom (MM), hematolojik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturan ve kemik iliğinde klonal, malign plazma hücrelerinin çoğalması ve birikmesi ile karakterize neoplastik bir hastalıktır. MM hastalığı geliştirilen yeni terapötik ajanların etkisiyle hastalarının sağkalımında artışa rağmen, kür ihtimali çok azdır. Bu sebepten hastalığı kontrolde tutabilecek yeni ilaçlar araştırılmaya devam edilmektedir. Son yıllarda, miyeloma karşı farklı mekanizmalara sahip; proteazom inhibitörleri, monoklonal antikorlar, immün modülatör ilaçlar ve histon deasetilaz inhibitörleri gibi yeni ilaçlar geliştirilse de bilim dünyası hem yeni tedavi ajanları, hem de varolan ilaçların etkisini artıracak ve yan etkilerini minimize edecek yenilikler arayışındadır. Bu nedenle BCMA CAR, CD16, IL12 eksprese eden NK92 hücrelerinin (BCMA CAR HAŞHAŞİN) H929 myelom hücre hattında in vitro olarak etkinliğini araştırdık.

Gereçler ve yöntemler: Model olarak miyelom hücre hattı H929 kullanıldı. Kültür şartlarında 1:1, 5:1 ve 10:1 Haşhaşin, CAR Haşhaşin, NK-92, CAR NK-92 inkübe edilerdi. 72 saat sonra myelom hücrelerinin ölümleri flow sitometrik olarak test edildi.

Bulgular: Başlangıçta hücre canlılık oranı saf H929 myelom hücre hattında %95,25, H929+PBMC hücre hattında %92,16 olarak ölçüldü. Her iki grupta da BCMA CAR Haşhaşinin 10:1 oranda daha etkili olduğu (%10,12 ve %13,57) tespit edildi. PBMC eklenen gruplarda myelom hücre ölümlerinde diğer gruba kıyasla artış olmadı.

Sonuç: Yapılan çalışmamızda NK92 hücrelerinin Myelom üzerinde etkili olduğu tespit edildi. Elde ettiğimiz bu deyerler klinik çalışmalarda gösterilmiş NK92 antimyelom etkisi ile doğru orantılı bulunmuştur. Fakat çalışmamızdaki BCMA NK92, HAŞHAŞİN ve BCMA CAR HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkisi istatistiksel olarak belirgin bir üstünlük sağlayamamıştır. Bunun sebebi olarak kullandığımız konstraktın tam çalışmaması olarak düşünülmüştür. Konstraktın yeni dizaynı ile bu çalışmanın tekrar yapılması planlanmakta ve daha etkili bir sonuç elde edilmesi beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Multipl Miyelom, NK92, CAR-T, BCMA CAR, BCMA CAR Haşhaşin, in vitro etkinliği

ABSTRACT

PRECLINICAL EFFECTIVENESS STUDY OF NK92 CELLS EXPRESSING BCMA CAR, CD16, IL12 (BCMA CAR HASHASIN) IN MULTIPLE MYELOMA DISEASE

Objective: Multiple myeloma (MM) is a neoplastic disease that accounts for 10% of hematological cancers and is characterized by proliferation and accumulation of clonal, malignant plasma cells in the bone marrow. Despite the increase in the survival of patients with the effect of new therapeutic agents developed for MM disease, the probability of cure is very low. For this reason, new drugs that can keep the disease under control continue to be researched. In recent years, it has different mechanisms against myeloma; Although new drugs such as proteasome inhibitors, monoclonal antibodies, immunomodulatory drugs and histone deacetylase inhibitors have been developed, the scientific world is seeking both new treatment agents and innovations that will increase the effect of existing drugs and minimize their side effects. Therefore, we investigated the in vitro efficacy of NK92 cells (BCMA CAR ASSASSIN) expressing BCMA CAR, CD16, IL12 in H929 myeloma cell line.

Materials and methods: Myeloma cell line H929 was used as a model. They were incubated in culture conditions 1:1, 5:1 and 10:1 Hashasin, CAR Hashasin, nk-92, CAR nk-92. After 72 hours, the death of myeloma cells was tested flow cytometrically.

Results: Initially, cell viability was measured as 95.25% in the pure H929 myeloma cell line and 92.16% in the H929+PBMC cell line. In both groups, it was determined that BCMA CAR Hashasin was more effective at a ratio of 10:1 (10.12% and 13.57%). There was no increase in myeloma cell death in the PBMC added groups compared to the other group.

Conclusion: In our study, it was determined that NK92 cells were effective on Myeloma. These values we obtained were found to be directly proportional to the NK92 antimyeloma effect shown in clinical studies. However, the effect of BCMA NK92, HASHASIN and BCMA CAR HASHASIN on myeloma cells in our study did not provide a statistically significant advantage. We think that the reason for this is that the construct we use does not work properly. With the new design of the construct, this study is planned to be done again and we are expected to obtain a more effective result.

Keywords: Multiple Myeloma, NK92, CAR-T, BCMA CAR, BCMA CAR HASHASIN, in vitro activity

1.GİRİŞ

Multipl miyelom (MM), tüm malignitelerin %1'ni, hematolojik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturuyor. MM kemik iliğinde klonal, malign plazma hücrelerinin birikmesi ile karakterize edilen neoplastik bir hastalıktır (1).

Monoklonal plazma hücrelerinin kemik iliğinde kontrolsüz çoğalması ve immünglobülin (Ig) zincirlerinin aşırı oluşumuyla hastalık oluşur (2).

Plazma hücre diskrazilerinde (PHD) çok sık olarak görülen erken dönem bulgusu genellikle, paraprotein veya M proteini olarak isimlendirilen, monoklonal ağır ve hafif zincir antikorudur. Bu bulgu genellikle hastalıkla ilgili herhangi bir klinik semptom vermeden önce ortaya çıkar. PHD alt tipleri: Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gammopati (MGUS), Sessiz Multiple Myelom (SMM), Asemptomatik Myelom, Multiple Myelom, Plazma hücreli lösemi ve Amiloidoz olarak gösterilir (3).

Genelde ileri yaşlarda görülen bir hastalıktır ve tanı 60'lı yaşlarda alıyor hastalar. Vakaların %2'si daha genç yaşlarda (40 yaşın altı) tanı alıyor (7).

MM etiyojisinde kesin olarak suçlanan tek neden bilinmemektedir. Genetik ve çevresel faktörler, çeşitli enfeksiyon oluşturan etkenler, radyasyona maruz kalma, kimyasal maruziyeti, anlamı bilinmeyen monoklonal gamopati (MGUS), smoldering myelom (SMM) etiyojide ön planda düşünülen sebepler arasında gösterilmiştir (6).

Malign plazma hücreleri yani miyelom hücreleri, germinal merkezde Ig sınıf değişimine ve doğal mutasyona yatkın olan IgH geninin somatik hipermutasyonu sırasında meydana gelen ilk onkojenik olaylar sonucunda oluşur. Bu hücreler, M proteinleri olarak da bilinen fonksiyonel olmayan immünoglobulinler üretir (14).

MM patogeneğinde birçok moleküler değişikliklerle birlikte kemik iliği mikroçevre ilişkileri de önemli rol oynamaktadır (17).

MM'li hastaların çoğu semptomatik dönemde daha sıklıkla plazma hücrelerinin kemiğe veya diğer organlara infiltrasyonu sonucu anemi, litik kemik lezyonları, enfeksiyon ve Ig birikiminden kaynaklanan böbrek fonksiyonlarını etkileyen semptom ve şikayetlerle hastaneye başvururlar (30).

MM hastalığının tedavisinde İmmünmodülatör ilaçlar ve Proteozom inhibitörleri ilaçların kullanılmaya başlanmadan önce 5 yıllık genel sağkalım %25-34 iken son yıllarda uygulanan

tedavilerle birlikte bu oran %49-56'ya çıkmıştır. Günümüzde verilen tedavilerin gelişmesi ile MM hastalarının medyan sağkalım sürelerinin 7 yılın üzerine çıktığı bildirilmektedir. Tedavide yaşanan bu kadar olumlu sürece rağmen MM henüz tam kür sağlanabilen bir hastalık kategorisinde değildir (11).

CAR T-hücre tedavisinin etkinliği büyük ölçüde, hedef dışı tümör toksisitesini önlemek için normal hücrelere göre kanser hücrelerinde genel ve özel olarak belirlenen hedefi tanımlamaya bağlıdır (151; 152). Çoğu miyelom CAR T hücre ürünü, B hücresi olgunlaşma antijenini (BCMA) hedefler (153).

CAR-T hücrelerinin çok sayıda toksisitesi tanımlanmıştır. Bu nedenle, bazı çalışmalar, minimum toksisite ile daha iyi etkinliğe ulaşmak için başka bir sitotoksik hücre olan NK-92 hücresine başvurmuştur. Preklinik çalışmalar, genetiği değiştirilmiş NK-92 hücrelerinin in vitro ve in vivo olarak oldukça spesifik sitotoksositeye sahip güvenlik ve uygulanabilirliğini doğrulamıştır. Bu nedenle, NK-92 hücresinin, birincil NK hücreleri, ebeveyn NK-92 hücreleri ve otolog T hücreleri üzerindeki benzersiz avantajları nedeniyle CAR için başka bir ideal taşıyıcı haline gelmesi beklenmektedir (142). CAR ile modifiye edilmiş NK-92 (CAR-NK-92) hücreleri, güçlü antitümör etkileri göstermiştir (143). CAR-NK hücreleri, CAR-T hücreleri için potansiyel rakiplerdir. CAR-NK-92 hücreleri GVHD'ye neden olmaz ve daha fazla sitotoksositeye sahiptir (144, 145).

MM tedavisinde hem tam kür sağlayacak tedavilerin olmayışı nedeniyle hem de yeni hücresel tedavilerin yan etkilerini minimize etmek için bir çok yeni araştırmalar yapılmaktadır. Biz de bu çalışmamızda H929 insan myelom hücre hattı üzerinde BCMA CAR, CD16, IL12 eksprese eden NK92 hücrelerinin (BCMA CAR HAŞHAŞİN) in vitro etkinliğini araştırmayı planladık.

2. Genel Bilgiler

2.1. Tanım

Multipl miyelom (MM), hematolojik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturan ve kemik iliğinde klonal, malign plazma hücrelerinin birikmesi ile karakterize edilen neoplastik bir hastalıktır (1).

Monoklonal plazma hücrelerinin kemik iliğinde kontrolsüz çoğalması ve immünglobülin (Ig) zincirlerinin aşırı oluşumuyla karakterizedir (2).

Normal plazma hücreleri, IgG-gamma (γ), IgA-alfa (α), IgM-mü (μ), IgD-delta (δ) ve IgE-epsilon (ϵ) gibi farklı ağır zincir ve kappa (κ) ve lambda (λ) gibi hafif zincir özelliklerinde bir çok çeşit antikor üretirler. Plazma hücre diskrazilerinde (PHD) çok sık olarak görülen erken dönem bulgusu genellikle, paraprotein veya M proteini olarak isimlendirilen, monoklonal ağır ve hafif zincir antikor varlığıdır. Bu bulgu genellikle hastalıkla ilgili herhangi bir klinik semptom vermeden önce ortaya çıkar. Monoklonal gammopati, kanda veya idrarda klonal M proteininin bulunduğu ve klonal plazma veya lenfoid hücre proliferasyonunu yansıttığı herhangi bir durum olarak tanımlanır. Hem PHD hem de lenfoproliferatif bozukluklar M proteinleri üretebildiğinden, M proteininden hangi tip bozukluğun sorumlu olduğu arasındaki ayrımı yapmak çok önemlidir ve akış sitometrisi bu sürece yardımcı olabilir. PHD alt tipleri: Önemi Bilinmeyen Monoklonal Gammopati (MGUS), Sessiz Multiple Myelom (SMM), Asemptomatik Myelom, Multiple Myelom, Plazma hücreli lösemi ve Amiloidoz olarak gösterilir (3).

Plazma hücrelerindeki kontrolsüz artış sonucu aynı tipte olan antikorlar aşırı miktarda üretilir. Üretimi normal antikora kıyasla hatalı oluşan bu antikorlar serumda ve/veya idrarda monoklonal M proteini şeklinde tespit edilirler (4).

Serumda immünglobulin miktarının belirlenmesi serum protein elektroforezi ile sağlanır. Farklı immünglobulin tiplerinin elektrikli bir ortamda hareketleri heterojendir ve gamma bölgesinde keskin bir pik oluştururlar. Serum protein elektroforezinde gamma bölgesinde oluşan bu keskin pike M proteini denir (5).

MM vakalarının neredeyse tüme yakını MGUS öncü aşamasından geliştiği belirlenmiştir; fakat MGUS vakalarının çoğu malign bir neoplazmaya ilerlememektedir. MM dışında bazıları

Waldenstrom makroglobulinemisine, birincil AL amiloidozuna veya bir lenfoproliferatif bozukluğa dönüşmektedir. MM'ye veya başka bir malign bozukluğa ilerleme riskinin yılda %1 olduğu tahmin edilmektedir (6).

2.2. Epidemiyolojisi

Multiple myelom çoğunlukla ileri yaşlarda görülen bir hastalıktır. Hastalar genellikle altmışlı yaşlarında tanı almaktadır. Tüm malignitelerin tahmini %1'ini ve hematolojik malignitelerin %10'unu oluşturmaktadır. Tanı alan hastaların çok az bir kısmı (%2) 40 yaştan gençdir (7). MM kadınlara kıyasla erkeklerde daha sık görülmektedir (8). MM insidansı siyah ırkta beyaz ırka oranla 2-3 kat daha yüksektir (9).

MM olan hastalar için ortalama 5 yıllık sağkalım oranı %54'tür. MM hastalarının sadece %5'i erken evrede tespit ediliyor ve bu hastalar için 5 yıllık sağ kalım oranı %75'tir. İleri evrede teşhis edilen hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %53'tür. Vakaların yaklaşık %95'i bu aşamada tanı almaktadır (10).

MM'da ailesel olgular nadiren raporlanmış olsa da bir genetik kalıtsal hastalık olduğu söylenemez. MM hastalığının tedavisinde İmmünmodülatör ilaçlar ve Proteozom inhibitörleri ilaçların kullanılmaya başlanmadan önce 5 yıllık genel sağkalım %25-34 iken son yıllarda uygulanan tedavilerle birlikte bu oran %49-56'ya çıkmıştır. Günümüzde verilen tedavilerin gelişmesi ile MM hastalarının medyan sağkalım sürelerinin 7 yılın üzerine çıktığı bildirilmektedir. Tedavide yaşanan bu kadar olumlu sürece rağmen MM henüz tam kür sağlanabilen bir hastalık kategorisinde değildir (11).

2.3. Etiyoloji

Multipl Myelom kesin olarak sebebi bilinmeyen bir hastalıktır. Diğer malignitelerde olduğu gibi radyasyon, meslek ve yaşam tarzı ile bağlantılı olduğu ilişkilendirilse de, burada çelişkili veriler söz konusu olmuştur (12).

Genetik ve çevresel faktörler, çeşitli enfeksiyon oluşturan etkenler, radyasyona maruz kalma, kimyasal maruziyeti, anlamı bilinmeyen monoklonal gamopati (MGUS), smoldering myelom (SMM) etiyojide ön planda düşünülen sebepler arasında gösterilmiştir.

Multipl Myelom tanısından önce, hastaların neredeyse tümünde asemptomatik iyi huylu bir evre olan önemi belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) olduğu kabul edilmektedir. MGUS beyaz ırkta, 50 yaş üzeri kişilerde %4, 70 yaş üzeri kişilerde yaklaşık %5 oranında saptanmaktadır (6).

2.4. Patogenez

İmmün sistem hücrelerinin hepsinde olduğu gibi, B hücreleri de öncelikle kemik iliğinde veya fetal karaciğerde oluşan hematopoetik kök hücrelerden gelişir. Hematopoietik kök hücreler sırasıyla multi-potent progenitörlere, yaygın lenfoid progenitörlere ve nihayetinde prepro-B, pro-B, pre-B, olgunlaşmamış B ve geçiş B hücreleri aşamaları yoluyla olgun B hücrelerine farklılaşabilir. Bu, önce immünoglobulin ağır zincirinde (IgH) D → J segmentlerinde (pre-pro-B) ve ardından V → DJ segmentlerinde (pro-B) ilerler. Üretken (çerçeve içi) bir IgH geni yeniden birleştirilirse, daha sonra kopyalanır, çevrilir ve yüzeyde V → J segmentlerinde hafif zincir rekombinasyonunu tetikleyen bir vekil hafif zincir (VPREB ve IGLL1'den oluşur) ile eksprese edilir (hafif zincirler çeşitlilik segmenti içermez) ön B aşamasını işaretler. Bu, önce kappa hafif zincirinde ve üretken alel yapılmazsa lambda hafif zincirinde meydana gelir. B hücresi reseptörü (BCR) olarak adlandırılan çiftli ağır ve hafif zincirlerin yüzey ekspresyonu, olgunlaşmamış B hücreleri aşamasını işaretler, bundan sonra B hücreleri kemik iliğinden perifere ve olgunlaştıkları ikincil lenfoid dokulara geçebilirler (13). Spesifik antikolar üretmek için İmmünoglobulin ağır zincirin (IgH) hiperdeğişken bölgelerini kodlayan DNA'nın, somatik hipermutasyona uğramasını gerektirmektedir. Malign plazma hücreleri yani miyelom hücreleri, germinal merkezde Ig sınıf değişimine ve doğal mutasyona yatkın olan IgH geninin somatik hipermutasyonu sırasında meydana gelen ilk onkojenik olaylar sonucunda oluşur. Bu hücreler, M proteinleri olarak da bilinen fonksiyonel olmayan immünoglobulinler üretir (14).

MM patogenezinde birçok moleküler değişiklikle birlikte kemik iliği mikroçevre ilişkileri de önemli rol oynamaktadır (17).

Son yıllarda kemik iliği mikroçevre ile myelom plazma hücreleri arasında sinerjistik patolojik bir ilişki olduğu gösterilmiştir. IL-6, MM'de önemli bir büyüme ve apoptozu baskılayıcı faktördür. Miyelom hücrelerinin BMSC'lerle yapışması, IL-6 ekspresyonunu indükleyen klonal NF-kB yolunu aktive eder. Aynı zamanda bir NF-kB hedefli gen tarafından kodlanan miyelom hücresinden türetilen IL-1, BMSC'lerde klonal NF-kB sinyalini

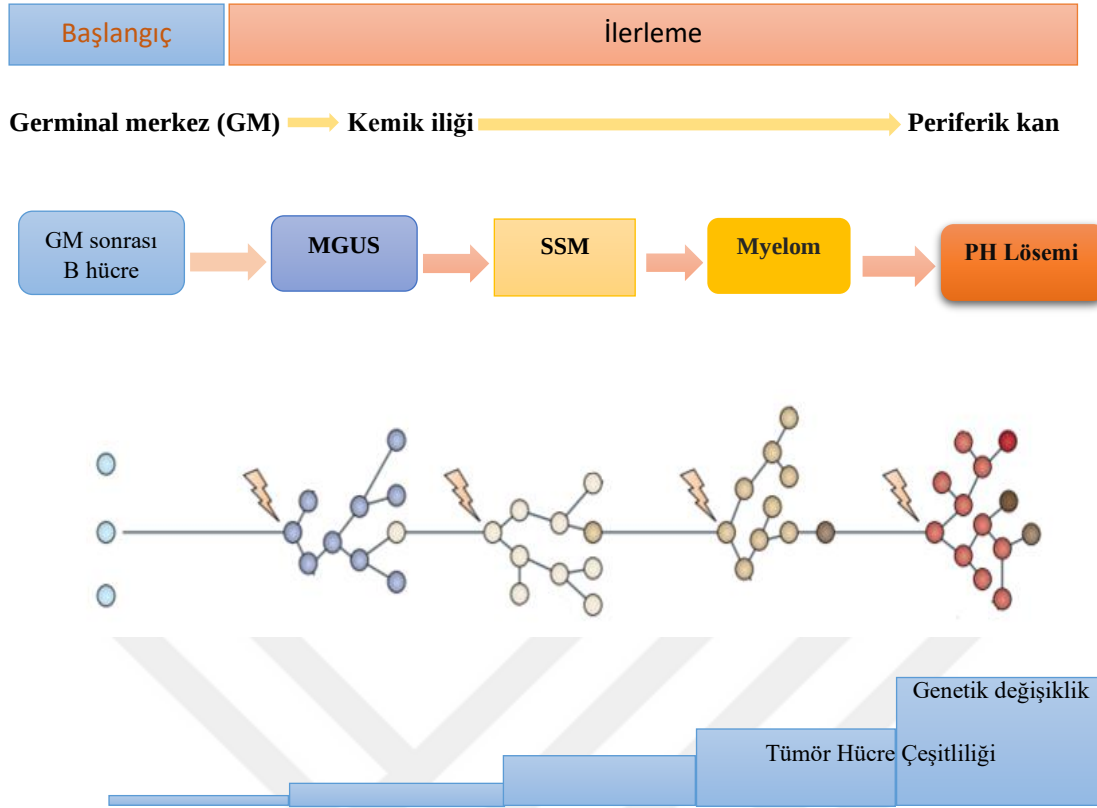
indükleyerek IL-6 üretimini teşvik eder. Ek olarak, IL-6, tümör mikroçevresinde anjiyogenezi ve neovaskülarizasyonu destekleyen vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) üretimini indükler (18).

Myelom hücrelerinin hematopoetik ve stromal hücreler adezyonu sonrasında IL6, VEGF, insülin like büyüme faktörü 1'i kapsayan büyüme faktörleri ve TNF, transforming growth faktör β , interlökin 10 süper ailesinin üyeleri dâhil sitokinlerin salgılanmasında rol alır (19).

Miyelom hücreleri, birbirlerine ve stromal hücrelere tutunmalarını sağlayan CD56, çok geç antijen (VLA-4, VLA-5) ve $\beta 1$ integrin gibi adezyon moleküllerini eksprese ederler. Bunlar arasında $\beta 1$ integrinleri, miyelom hücrelerinden salgılanan MIP-1 α ve IL-1 β ile birlikte osteoklastları aktive ederek kemik rezorpsiyonuna ve litik kemik lezyonlarına neden olur. (20).

MM vakalarının gelişimi ile ilişkili olası birincil genetik olaylar, kromozomal translokasyonlar ve anöploididir. MGUS ve SMM'den myeloma geçişi gösteren spesifik bir genetik olay olmamasına rağmen, DNA metilasyonu ve mikro RNA ekspresyonu dahil olmak üzere belirli genetik ve epigenetik anormallikleri olan hastaların MM'ye ilerleme şansı daha yüksektir (21).

MGUS zamanla myelom veya diğer plazma hücrelerine farklılaşmaktadır. MGUS hastalarının her yıl %1 oranında MM'ye dönüşme riski vardır. Monoklonal gamopati sonrasındaki süreç kemik iliğinde plazmasitozisin %10'un üstünde olması ve M proteinin 3 g/dl üstünde olması ile birlikte kalsiyum yüksekliği, anemi, kemikte litik lezyonlar, böbrek yetmezliği görülmesi ile semptomatik MM'ye dönüşüm gerçekleşmektedir. Bazı hastalarda ise kemik iliğinde plazmasitozisinin %10'un üzerinde tespit edilmesi ve M proteinin 3 g/dl üzerinde olmasına rağmen semptom görülmeyebilir. Bu şekilde sessiz miyelom tanısı konulmaktadır (22).



Şekil 1: MM Oluşumunun Başlatılması ve İlerlemesi: Önemli belirsiz monoklonal gamopati (MGUS), yılda %1 oranında miyelomaya dönüşen, yavaş, asemptomatik bir durumdur. Smoldering miyelom klinik özelliklerden yoksundur; aksine semptomatik miyelom, topluca kalsiyum, böbrek, anemi ve kemik anormallikleri (CRAB) olarak adlandırılan ve tedavinin gerekli olduğuna dair bir gösterge sağlayan çeşitli klinik özelliklere sahiptir. Daha sonra hastalık progresyonunda, miyelom plazma hücreleri artık kemik iliği içinde büyümeye kısıtlanmaz ve ekstramedüller bölgelerde ve dolaşımdaki lösemik hücreler olarak bulunabilir. Bu farklı durumlardan geçişin, miyelomun biyolojik özelliklerinin gelişmesine yol açan genetik anormalliklerin edinilmesini gerektirdiği düşünülmektedir. MGUS dan PHL e doğru genetik değişiklikler ve tümör hücre çeşitliliği artmaktadır. (15,16)'dan modifiye edilmiştir.

2.5. Genetik Faktörler

2.5.1. Myelomada Birincil Genetik Olaylar

Genelde MM hastalarındaki birincil sitogenetik bozuklukların %40'ı ya translokasyon ya da trizomiler oluşturur. Birincil translokasyonlar %90 oranında 14. kromozom üzerindeki immünoglobulin ağır zincir (IgH) gen lokusunun ve 4, 6, 11 ve 20 numaralı partner kromozomlardan birini içerir. Birincil translokasyonlar genellikle bir hipodiploid karyotip ile ilişkilidir. Birincil trizomiler tipik olarak %45 oranında tek numaralı 3, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15 numaralı kromozomları içerir ve bu da hiperdiploid karyotipe neden olur. Hem IgH translokasyonu hem de bir veya daha fazla trizomi vakası hastaların yaklaşık %10'unda tanımlanmıştır(23, 24).

2.5.2. Myelomada İkincil Genetik Olaylar

Hastalığın ilerlemesinde ikincil genetik olayların etkisi yüksektir ve sırasıyla SMM, MM ve PCL'de yükseklik oranları daha fazladır. Birincil olaylar ile işbirliği yaparak malign fenotipli Myelom üretmek için ortam yaratmaktadır. Bu ikincil olaylar translokasyonları, heterozigotluk kaybını, kopya sayısı varyasyonlarını, epigenetik modifikasyonları ve edinilmiş mutasyonları içerir (33).

İkincil olaylardan, 8q23'te onkojen *c-Myc*'yi aktive eden translokasyon t (8; 14) MM'nin %15'inde görülse de MGUS'ta enderdir veya yoktur. Ayrıca MGUS'ta 1q21 amplifikasyonunun varlığı saptanmamış ve SMM'nin %45'inde, yeni tanı konan MM'nin %43'ünde ve relaps MM'nin %72'sinde görülmüştür. MM hastalarının %11'i ve PCL'de yaklaşık %40'ı del (17p) ile etkisizleştirilmesi sonucunda *P53* tümör baskılayıcı geni 17p13'te alelini kaybeder. TP53 mutasyonları sıklıkla MM'nin ileri evrelerinde görülür. Çoğunlukla mutasyon olmuş genler arasında K-RAS, N-RAS ve FGFR3 bulunur. MikroRNA ekspresyonundaki değişiklikler gibi epigenetik düzensizlikler genetik anomalilerden bir diğeridir (25, 26, 27, 28).

Diğer hematolojik malignitelerin aksine, semptomatik myelomda ikincil genetik olayların gelişmesi, kemik iliği yapısı ve tümörü destekleyen bir mikro çevrenin varlığı ile mümkündür.

DNA onarımı, RNA düzenleme ve hücre farklılaşması gibi diğer hücresel süreçlerdeki anormal işlevler de miyelom gelişimine katkıda bulunabilir.

Kemik iliğinin mikroçevresindeki kemik iliği stromal hücreleri (BMSC'ler), osteoklastlar, osteoblastlar ve endotel hücreleri dahil olmak üzere bir çok yardımcı hücrelerle miyelom hücreleri etkileşime girer. Hem DNA onarımı, hem de RNA düzenlemesi ve hücre farklılaşması gibi diğer süreçlerde anormal mekanizmalar da miyelom gelişimine katkı sağlar (29).

2.5. Klinik Bulgular

MM'li hastaların çoğu semptomatik dönemde daha sıklıkla plazma hücrelerinin kemiğe veya diğer organlara infiltrasyonu sonucu anemi, litik kemik lezyonları, enfeksiyon ve Ig

birikiminden kaynaklanan böbrek fonksiyonlarını etkileyen şikayetlerle hastaneye başvururlar. Retrospektif bir çalışmada MM tanısı alan hastalarda semptom ve bulguların oranları tablo 1 de özetlenmiştir (30).

Tablo 1: MM tanılı hastalarda semptom ve bulgu oranları

Semptom ve Bulgular	Oran %
Anemi(kansızlık)	73
Kemik Ağrısı	58
Serum kreatinin yüksekliği	48
Yorgunluk/Halsizlik	32
Hiperkalsemi(Ca yüksekliği)	28
Kilo kaybı	24
Parastezi	5
Hepatomegali	4
Splenomegali	1
Lenfadenopati	1
Ateş	0.7

2.6.1. Anemi

MM hastalarında tanı anında yaklaşık %73 ve hastalık sürecinde herhangi bir zamanda ise %97 oranında anemi saptanmaktadır. Neoplastik plazma hücrelerinin kemik iliğini infiltre etmesi, kemik iliği mikroçevresinin bozulması, eritropoetin (EPO) eksikliği (böbrek yetmezliği sebebiyle), kemoterapinin kemik iliğini baskılayıcı etkisi aneminin etiolojisindeki önemli nedenlerdir (31). Anemiye katkı yaptığı düşünülen bir diğer faktör aşırı IL-6 üretimi sonucunda makrofajlardan demir salınmasını bloke eden ve bağırsaktan demir emilimini engelleyen hepsidin hepatic üretimini artırmasıdır (32).

Anemi çoğu hastada normokrom normositik olmakla birlikte Vitamin B12 eksikliğine bağlı makrositik anemi de hastaların yaklaşık %9-10'unda gözlenebilir (33).

2.6.2. Kemik Ağrıları

Kemik ağrıları MM da osteolitik lezyonlara ve patolojik kırıklara bağlıdır genellikle. Osteolitik lezyonlar MM'nin patognomik bir özelliğidir ve tanı anında hastaların yaklaşık %80'inde mevcuttur (34). Patolojik fraktürler MM hastalarının yaklaşık %40-50'sini etkilemektedir. Bu hastalarda kırığı olmayan hastalara göre ölüm riski %20'den fazla arttırmaktadır. Patolojik kırıklar hem myelom hücrelerinin kemik içerisinde doğrudan birikiminden, hem tümör hücrelerinden ve aynı zamanda kemik mikroortamından salgılanan sitokinlerden kaynaklanır. Bu durum osteoklast aktivitesinin uyarılmasına ve kemik rezorbsiyonuna sebep oluyor (35). Osteoklast aktivasyonundan ve farklılaşmasından RANK, RANK-L, osteoprotegerin (OPG), MIP-1 alfa ve aktivin-A gibi sitokinler sorumlu tutulmaktadır (36). MM'de hem RANKL düzeyinin yükselmesi, hem de OPG düzeyindeki azalmanın bir sonucu olarak RANKL/OPG oranı artar ve bu artmış kemik yıkımı ile sonuçlanır. Artmış RANKL/OPG oranı kemik hastalığının evresi ve genel sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (37; 38). Kırıklar en çok torakal ve lomber vertebralarda oluşmaktadır. Vertebral fraktürlere sağlıklı bireylere kıyasla MM hastalarında üç kat daha fazla rastlanmaktadır (39).

2.6.3. Böbrek Hasarı

MM'de böbrek hasarı sıklıkla cast nefropatisi (yaklaşık %90) şeklindedir. Cast nefropatisi yüksek serum konsantrasyonuna sahip monoklonal hafif zincirlerin Tamm-Horsfall proteini ile etkileşime girerek distal tübül içerisinde fazla birikimi ve buna bağlı olarak obstrüktif nefropatiye yol açmasından kaynaklanır. Sonuç olarak tübüler atrofi ve fibrozis gelişir (34).

MM böbrekte glomerüler bir hastalıktan ziyade öncelikle tübüler bir hastalık oluşturmaktadır. Başlangıçta glomerüler fonksiyon korunduğu için glomerüler hastalıkta gözlenen spesifik olmayan protein kaybı yerine idrarda Ig hafif zincir baskınlığı oluşuyor. Fonksiyonel bozukluğa neden olan monoklonal IgG proksimal tübüllerin yeniden absorbe etme kapasitesini bozup hipofosfatemi, hiperürisemi, glukozüri ve aminoasidüri ile seyreden Fanconi Sendromuna neden olabilir. IgG'ye kıyasla çok daha büyük bir molekül olan IgM, glomerüler kılcal damarları tıkayan birikintiler oluşturabilir ve hiperviskozite ile ilişkili böbrek yetmezliğine neden olabilir (34, 40).

Miyelomda hiperkalsemi, hiperürisemi ve enfeksiyonlar böbrek yetersizliğine yol açan diğer nedenlerdendir. Dehidratasyon, nefrotoksik ilaçlar ve kontrastlı ajanların kullanımı MM’da monoklonal hafif zincirlerin toksik etkilerini şiddetlendirir (41).

Tanı anında hastaların yaklaşık olarak yarısında serum kreatinin yüksekliği görülmekte ve %30 hastada serum kreatinin değeri 1,5 mg/dl’nin üzerinde saptanmaktadır (42). Tüm myelomlu hastaların tanı ve hastalık değerlendirmesinde serum kreatinin, tahmini glomerüler filtrasyon hızı ve elektrolit ölçümlerinin yanı sıra, 24 saatlik idrarda serbest hafif zincir ve idrar elektroforezi olmalıdır (43).

2.6.4. Hiperkalsemi

MM’da en sık görülen metabolik komplikasyon hiperkalsemidir ve gelişiminde IL-6, hepatosit büyüme faktörü, lenfotoksin ve nükleer faktör kappa B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) gibi osteoklast aktive edici faktörlerin rolü vardır (44). Ayrıca MM hastalarında böbrek hasarına bağlı olarak azalmış glomerüler filtrasyon ve intravasküler sıvı azalması da hiperkalsemiye neden olan faktörler arasındadır (45).

M proteininin kalsiyuma bağlanması nedeniyle MM hastalarının serum kalsiyum konsantrasyonunda yükselme meydana gelebilir. Hastanın serum kalsiyum düzeyi yüksekse fakat hiperkalsemi semptomu yoksa iyonize kalsiyum ölçülmesi gerekir. Hiperkalsemik hastalarda semptom olmayabilir veya bulantı, kusma, konfüzyon, güçsüzlük, polidipsi, poliüri, kabızlık gibi semptom ve bulgular görülebilir. Hiperkalsemi artmış hastalık yükü ile doğru orantılı olup myelomlu hastaların %30-40’da görülür (46, 47).

2.6.5. Nörolojik Bulgular

MM hastalarında nörolojik bulgular birçok nedenle ortaya çıkabilmektedir. Bunlardan hiperkalsemi, üremi ve hiperviskozite gibi metabolik nedenlerle gelişen, otoimmün veya sitokin aracılı olarak gelişen, tedavide kullanılan ajanlara bağlı gelişen, radikülopati ve spinal kord basısı sonucu sinir kompresyonuna bağlı nörolojik semptomlar gözlenebilir. En sık görülen iki nörolojik olay radikülopati ve tedaviye sekonder gelişen periferik nöropatidir. Radikülopati paravertebral plazmasitoma bağlı sinir sıkıştırılması veya vertebral cisminde oluşan

kompresyon kırığından kaynaklanabilir. En sık torasik kord tutulumu görülmekte olup paraplejiye neden olabilir (48).

MM hastalarında periferik nöropati (PN), hastalığın kendisinden kaynaklanabileceği gibi tedavide kullanılan talidomid ve bortezomib içerikli ilaçların kullanımına bağlı olarak da gelişebilmektedir. Talidomide bağlı gelişen PN tedavi kesilmesinden sonra da ortaya çıkabilir ve genellikle kalıcı olsa da bortezomib ile indüklenen PN genelde geri dönüşümlüdür. Bu ilaçların myelin kılıfı ve Schwann hücrelerini etkilediği ve aksonal bir nöropatiye sebebiyet verdiği düşünülmektedir (49; 50). Periferik nöropatide semptomlar genelde simmetrik olup, ağrı, güçsüzlük, duyu kaybı, parestezi, yanma hissi, disestezi, uyuşma görülmektedir (51).

Merkezi sinir sistemi tutulumu MM'da nadir olarak görülür. Daha çok hastalığın ileri evrelerinde tanı almaktadır ve genellikle yüksek riskli sitogenetik ile ilişkilendirilir. Tanı aldığından itibaren OKİT dahil agresif tedaviye rağmen genel sağkalım süresi çok kısadır (52; 53).

2.6.6. Hiperviskozite

Hiperviskozite MM tanılı hastalarda yüksek miktarda üretilen M proteinine bağlı gelişmektedir. MM'nin çok sık görülmeyen bir komplikasyonu olsa da, semptomatik hiperviskozite acil müdahale gerektirecek tıbbi bir durum olarak değerlendiriliyor. Genelde burun ve ağız mukozasında kanama, bulanık görme, baş ağrısı, konfüzyon ve kalp yetmezliği bulguları gibi semptomlarla görülebilir. Hastanın mevcut semptomlarının hiperviskozite ile ilişkili olduğu düşünülüyorsa terapötik plazma değişimi yapılmalıdır (54; 55).

2.6.7. Enfeksiyonlar

MM hastalarında enfeksiyon riski artmış olup yüksek mortalite nedenleri arasında ilk sıradadır.

MM'de enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık çok faktörlüdür ve ana neden, bozulmuş antikor üretimine bağlı hastalıkla ilişkili olmayan immünoglobulinlerin sentezinde azalmadır (56).

Multipl miyelomda enfeksiyon nedenleri:

- Hastalıkla ilişkili olmayan immünoglobulinlerin sentezinde azalma;
- CD4/CD8 oranında dengesizlik;
- Kusurlu opsonizasyon;
- Azalmış granülosit yapışkanlığı;
- Bozulmuş lökosit göçü;
- Böbrek fonksiyon bozukluğu;
- Kemoterapiye bağlı granülositopeni;
- Glukokortikoid tedavisi (özellikle yüksek doz deksametazon).

En sık solunum yolu ve üriner sistem enfeksiyonları oluşmakta. Solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan en yaygın ajanlar Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae ve Haemophilus influenza iken, üriner sistemde ise Escherichia coli, Proteus sp, Pseudomona sp, Klebsiella ve Enterobacter gelişen enfeksiyonların olağan nedenleridir (56; 57).

MM ve komplikasyonlarına bağlı immün yetmezliğe ek olarak, kullanılan antitumör ilaçlar da enfeksiyonun gelişmesinde rol oynar. Bortezomib ile tedavi Herpes simplex ve Herpes zoster virüslerinin reaktivasyon riskinde artışa neden olurken, kök hücre transplantasyonu uygulaması Clostridium difficile ve sitomegalovirüs enfeksiyon riskinde artışa neden olmaktadır. Enfeksiyon yönetiminde spesifik risk faktörlerinin ve hastaların risk altında olduğu dönemlerin belirlenmesi çok önem arz etmektedir. Bu olası patojenlerin tahmin edilmesine ve riske göre ayarlanmış tedavi stratejilerinin uygulanmasına olanak sağlar (58; 59).

Enfeksiyon şüphesi olan MM hastalarında hem kapsüllü bakterilere hem de gram negatif bakterilere etki edecek geniş spektrumlu bir ampirik antibiyotik tedavisi hemen başlanmalıdır.

Myelom hastalarında enfeksiyonu önleyerek sağkalımı artırmak için profilaksi yöntemlerine başvurulabilir. Antiviral ajanlar, antibiyotikler, intravenöz immünoglobülin(İVİG) ve aşılar myelom hastalarında kullanımı mümkün olan profilaktik yaklaşımlardır. Aile bireyleri ile birlikte tüm myelom hastalarına yıllık grip aşısı yapılmalıdır. Hastaların Streptokokkus pnömonia, Hemofilus influenza ve Hepatit B'ye karşı aşı yaptırması da önerilmektedir. İVİG myelom hastalarında enfeksiyon riskini azaltabilir ve profilaktik amaçla kullanımı antibiyotikle profilaksi yapılmasına rağmen tekrarlayan ciddi enfeksiyon tablosu oluşan hastalarda düşünülmelidir (60).

2.7. Tanı

2014 Uluslararası Myelom Çalışma Grubu (IMWG) Kriterlerine Göre Multipl Myelom Tanımı:

Klonal kemik iliği plazma hücreleri $\geq 10\%$ veya biyopsi ile kanıtlanmış kemik veya ekstramedüller plazmasitoma varlığı ve aşağıdaki miyelom tanımlayan olaylardan herhangi biri veya daha fazlası:

- Miyelom tanımlayan olaylar:
- Altta yatan plazma hücresi proliferatif bozukluğuna atfedilebilecek uç organ hasarının kanıtı, CRAB belirti ve bulguları:
- Hiperkalsemi: serum kalsiyumu >0.25 mmol/L (>1 mg/dL) normalin üst sınırından yüksek veya >2.75 mmol/L (>11 mg/dL);
- Böbrek yetmezliği: kreatinin klerensi <40 mL/dk veya serum kreatinin >177 μ mol/L (>2 mg/dL);
- Anemi: Normal hemoglobin alt sınırının >2 g/dL altında değer veya emoglobin değerinin <10 g/dL olması;
- Kemik lezyonları: iskelet sistemi radyografisinde, Bilgisayarlı Tomografide (BT) veya PET-CT'de bir veya daha fazla osteolitik lezyon varlığı;
- Aşağıdaki malignite biyobelirteçlerinden herhangi biri veya birkaçı, SLiM Kriterleri:
- Klonal kemik iliği plazma hücre yüzdesi $\geq 60\%$;
- Hastalıkla ilişkili/hastalıkla ilişkisi olmayan serum serbest hafif zincir oranı ≥ 100 olması (Hastalıkla ilişkili hafif zincir düzeyi 10 mg/dL'nin üstünde olmalıdır);
- MRI çalışmalarında >1 fokal lezyon;

2014 Uluslararası Myelom Çalışma Grubu (IMWG) MM için güncellenmiş tanı kriterlerinde tedavi gerektiren myelomu tanımlayan CRAB (Hiperkalsemi, Böbrek yetmezliği, Anemi, Kemik hastalığı) bulgularına SLiM kriterleri (kemik iliğinde $\geq 60\%$ 'ın üzerinde klonal plazma hücre varlığı, Hastalıkla ilişkili/hastalıkla ilişkisi olmayan serum serbest hafif zincir oranının 100'ün üzerinde olması ve tüm vücut manyetik rezonans görüntüleme (MRG) birden fazla odaksal lezyon varlığı) eklenmiş ve tedavi gerektiren myelomu tanımlayan bulgular bütününe Myelom Tanımlayıcı Olaylar (MTO) adı verilmiştir. MTO, MM'nin MGUS

ve SMM gibi diğer plazma hücre bozukluklarından ayırt edilmesi için çok önemli göstergedir (61). MGUS, SMM ve MM birbirinden ayırıcı özellikleri tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. MGUS, SMM ve MM’nin ayırıcı özellikleri

	MGUS	SMM	Semptomatik MM
Kemik iliğinde plazma hücrelerinin oranı	<10%	≥ 10%	≥ 10% veya biyopsi ile doğrulanmış plazmositom
Serumdaki M proteini	<30 g/L	≥ 30 g/L	Serum ve/veya idrarda saptanabilir
MTO varlığı	Yok	Yok	Mevcut

2.7.1. Labaratuar Bulguları

MM ‘nin klinik değerlendirmesi için tam kan sayımı, periferik kan yayması, karaciğer ve böbrek fonksiyon, kantitatif serum immünglobulin düzeyleri (IgA, G, M), beta-2 mikroglobulin ve monoklonal protein düzeyleri değerlendirilmelidir (62). Serum beta-2 mikroglobulin, laktat dehidrogenaz (LDH) ve albümin düzeyleri MM’nin evreleme sistemi için bu mutlak gereklidir ve bu sebeple klinik değerlendirmenin de önemli bir parçasıdır (63).

Periferik kan yayması değerlendirilmesinde en sık görülen bulgular rulo formasyonu (>%50), lökopeni (%20), trombositopeni (%5)’dir (33). Plazma hücreleri çevresel kan yaymasında nadiren görülür. MM’nin nadir ama en agresif formu olan bPHL’de dolaşan plazma hücre oranı %20 veya dolaşan plazma hücre sayısı $2000/\mu\text{L}$ ’nin üzerinde görülmektedir.

Monoklonal protein düzeylerinin ölçülmesi, ağır ve hafif zincir tiplerinin ayrımının yapılması için serum protein elektroforezi (SPE), (SİE), serumda serbest kappa ve lambda hafif zincir düzeyleri ve oranı, 24 saatlik idrarda total protein miktarı ve total hafif zincirler, idrar protein elektroforezi, idrar immünfiksasyon elektroforezi (İİE) değerlendirilmelidir. Serum ve

İdrar immünoelektroforez testi monoklonal proteinin varlığını doğrulamaya, ağır ve hafif zincir tiplerinin ayrımını yapmaya olanak sağlar.

MM tanılı hastaların %80’de SPE’de lokalize bir band ve pik görülmektedir (33). SİE’nin eklenmesi duyarlılığı %90’nın üzerine, ek olarak İİE ve serum hafif zincir ölçümlerinin yapılması duyarlılığı %97’e çıkarmaktadır (33). SPE, SİE, İİE ve hafif zincir ölçümleri ile saptanabilir. M proteini olmayan hastalar non-sekretuar myelom olarak tanımlanmaktadır. Oligosekretuar ve non-sekretuar myelomun özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. MM’da Ölçülebilir Hastalık Kriterlerini Karşılamayan Hastalık Tanımları

Multipl Myelomda Ölçülebilir Hastalık Kriterlerini Karşılamayan Hastalık Tanımları	Serum M Protein değeri (g/dL)	İdrar M Protein değeri (mg/gün)	Serbest Hafif Zincir (SHZ)	Hafif Zincir Tutulumu (mg/dL)
Oligosekretuar Myelom	<1	<200	Normal/ Anormal	<10
Non-sekretuar Myelom	IF negatif	IF negatif	Normal	Normal

SHZ ölçümü ile serumdaki kappa ve lambda hafif immüoglobulin zincirleri ölçülür. Normal SHZ oranı 0,26-1,65 arasındadır. Son dönem böbrek yetmezliğinde kullanılması önerilen referans değerler 0,37-3,1 aralığıdır (60). MM’li hastaların %90’na yakın anormal SHZ oranları görülmektedir (64; 65).

Kemik iliği biyopsisi ve kemik iliği aspirasyonu MM tanısı için mutlak gereklidir ve kemik iliğinde $\geq$ % 10 klonal plazma hücre infiltrasyonu ve bir MTO ile tanı doğrulanmaktadır (21). Plazma hücre infiltrasyon oranı hem aspirasyon hem de biyopsi materyelinden değerlendirilebilir ama oranlar arasında farklılık olur ise yüksek olan oran esas alınmalıdır (66). Aspirasyon örneğinden bakılan akış sitometrik inceleme ile hücrelerin immünofenotiplendirilmesi de klonaliteyi tanımlamak mümkündür. Plazma hücrelerinin ayrılarak çalışıldığı interfaz FISH tekniği ile hastalığın genetik özellikleri incelenmektedir.

2.7.2. Radyolojik Değerlendirme

PET-BT, tüm vücut düşük doz BT ve tüm vücut MRG sık kullanılan görüntüleme yöntemleridir ve her üçünün de MM'de kemik lezyonlarını saptamadaki başarısı yüksektir (60). MRG PET/BT ve BT'e kıyasla fokal kemik lezyonlarını saptamada daha duyarlıdır ve radyasyon maruziyeti olmaması nedeniyle daha avantajlıdır ancak yüksek maliyet ve çekimin uzun sürmesi gibi dezavantajları da vardır. PET/BT taraması, kemik lezyonlarının saptanması için oldukça duyarlı ve spesifiktir. IMWG MM'de tanı anında kemik sağkalımını değerlendirmek amacıyla tüm vücut MRG ve EMH'ni değerlendirmek amacıyla PET-BT görüntülemesi önermektedir (67).

2.8. Tedavi

2.8.1. Tedavi Seçenekleri

MM'de etki göstermiş birçok ilaç günümüzde klinik kullanım için mevcuttur. Sonuç olarak farklı durumlarda MM tedavisi için mevcut olan bu aktif ilaçlardan iki veya daha fazlasının kullanımına olanak sağlayan çok sayıda rejim vardır. Ana gruplar, alkilleyici ajanları (melphalan, siklofosfamid), immünomodülatör ilaçları (talidomid, lenalidomid, pomalidomid), kortikosteroidleri (deksametazon, prednizon), ve proteazom inhibitörlerini (bortezomib, karfilzomib, ixazomib) içerir. Daratumumab ve isatuksimab, CD38'i hedefleyen monoklonal (M) antikorlardır ve MM tedavisinde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. Diğer aktif onaylı ajanlar arasında SLAMF7 antijenini hedefleyen bir M antikoru olan elotuzumab, bir histon deasetilaz inhibitörü olan Panobinostat ve bir exportin-1 (XPO1) inhibitörü olan selinexordur. Elotuzumab, panobinostat ve selinexor, önemli tek ajan aktivitesine sahip görünmüyor, ancak terapötik etkilerini diğer aktif ilaçlarla kombinasyon halinde gösteriyor gibi görünüyor. Antrasiklinler (doksorubisin ve lipozomal doksorubisin) MM'de minimum tek ajan aktivitesine sahiptir. Diğer aktif ajanların mevcudiyeti göz önüne alındığında, MM tedavisinde nadiren kullanılırlar. Bununla birlikte, doksorubisin agresif veya refrakter MM için bazı çoklu ajan kombinasyon rejimlerine dahil ediliyor (68).

Tablo 4: Multipl Miyelomlu Hastaların Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

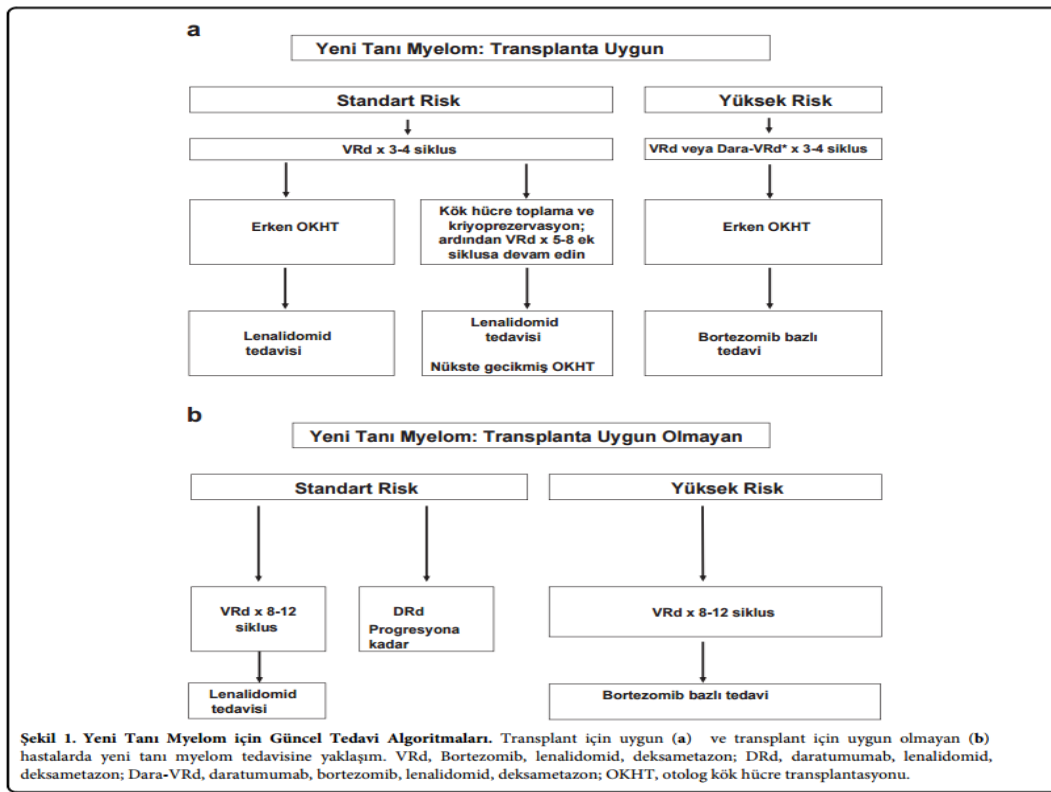
İlaç	Uygulama Yolu	Dozu	Süre
İmmünomodülatör ilaçlar			
Thalidomide	Ağızdan	50-200 mg	Günlük
Lenalidomide	Ağızdan	5-25 mg	Günlük (21/28 gün)
Pomalidomide	Ağızdan	1-4 mg	Günlük (21/28 gün)
Proteazom inhibitörleri			
Bortezomib	Subkutan/intravenöz	0.7-1.6 mg/m ²	Haftada bir veya iki kez
Carfilzomib	intravenöz	20-70 mg/m ²	Haftada bir veya iki kez (3 veya 4 hafta)
Ixazomib	Ağızdan	2.3-4 mg	Haftalık (3 veya 4 hafta)
Monoklonal antikorlar			
Daratumumab	intravenöz	16 mg/kg	Haftalık→2 haftada bir→ aylık
Elotuzumab	intravenöz	10 mg/kg	Haftalık→2 haftada bir→ aylık
Alkilatörler			
Cyclophosphamide	Ağızdan	50 mg	Günlük
Cyclophosphamide	Ağızdan	300-500 mg/m ²	Haftalık
Melphalan	Ağızdan	9 mg/m ²	Günlük x 4 gün/döngü
Melphalan	intravenöz	140-200 mg/m ²	Bir kez nakil için
HDAC(Histon deasetilasyon) inhibitörleri			
Panobinostat	oral	10-20 mg	haftada üç kez -2 veya 3 hafta boyunca
Steroidler			
Dexamethasone	oral	20-40 mg	Haftalık
Prednisone	oral	25-50 mg	Gün aşırı
Antrasiklinler			
Doxorubicin HCl liposomal	intravenöz	30 mg/m ²	3 haftada bir

2.8.2. Yeni Teşhis Edilen Miyelomun Tedavisi

Yeni teşhis edilen MM'ye yaklaşımımızı yönlendiren iki ana faktör, otolog kök hücre transplantasyonu (OKHT) için uygunluk ve risk sınıflandırmasıdır. Bu iki faktöre dayalı

semptomatik yeni tanı konmuş MM'nin tedavisi için mevcut algoritmalar Şekil 1'de gösterilmektedir.

Genel olarak, OKHT için uygunluk yaşı, performans durumu ve komorbiditelerden etkilenir. Modern tedaviler derin tepkiler üretebilir ve bazı hastalar minimal kalıntı hastalık MKH negatif durumuna ulaşabilir. MKH negatif durumu, progresyonsuz sağkalım (PS) ve genel sağkalım (OS) ile ilişkili olsa da, tedavinin amacı bu değildir. MKH pozitif hastalarda tedaviyi MKH negatif yapmak amacıyla değiştirmenin daha iyi sonuçlara yol açacağına dair randomize çalışmalardan elde edilen hiçbir veri yoktur. Devam eden randomize çalışmalar, MKH sonuçlarına dayalı tedaviyi değiştirmenin MM'de sağkalımı iyileştirip iyileştiremeyeceğini araştırıyor. Bu tür verilerin yokluğunda, yüksek riskli MM'li genç hastalar, özellikle çift veya üçlü vuruşlu MM'u olan genç hastalar dışında, MRD sonuçlarına göre tedavinin değiştirilmesi klinik uygulama için önerilmez (68).



Şekil 2:Yeni Tanı Myelom için Güncel Tedavi Algoritması (68) den uyarlanmıştır.

2.8.3. Transplantasyon İçin Uygun Hastalarda Başlangıç Tedavisi

Şekil 1'de özetlendiği gibi, OKHT için aday olan hastalar, 3-4 döngü indüksiyon tedavisi ve ardından kök hücre toplanır. Kök hücre hasatından sonra çoğu hasta OKHT ve ardından idame tedavisi uygulanmalıdır.

Ancak standart riskli MM olan seçilmiş hastalarda OKHT relapsa kadar ertelenebilir. Nükse kadar OKHT'yi erteleyen bu tür hastalara kök hücre hasatını takiben indüksiyon tedavisi verilmeli ve ardından birkaç döngü daha devam etmelidir.

OKHT adayı hastalar için tercih edilen başlangıç tedavisi bortezomib, lenalidomid, deksametazondur (VRd). VRd, uzun bir geçmişe sahip iyi tolere edilen bir rejimdir. Yüksek genel ve tam yanıt (TY) oranları ile ilişkilidir. Bir Southwest Oncology Group (SWOG) randomize çalışmasında, VRd ile tedavi, lenalidomid artı deksametazon (Rd) ile karşılaştırıldığında daha üstün PFS ve OS sağladığı görülmüştür (69).

Yeni tanı konmuş MM'de VRd'ye önemli bir alternatif daratumumab, lenalidomid ve deksametazondur (DRd). DRd, Rd ile karşılaştırıldığında gelişmiş PFS ile, transplantasyona uygun olmayan hastalarda yürütülen randomize bir çalışmada önemli etkinlik göstermiştir (70). Genel maliyete ve uzun vadeli verilere dayanarak çoğu hasta için VRd'yi DRd'ye tercih ediyoruz (71). Ancak DRd, önceden nöropatisi olan veya VRd'ye karşı intoleransı olan hastalar için uygun bir alternatiftir. Yüksek riskli hastalarda, özellikle çift vuruşlu MM veya üçlü vuruşlu MM'li hastalarda, standart VRd rejimine (Dara-VRd) daratumumab eklenmesi önerilmekte. Randomize bir faz II denemesinde, Dara-VRd, VRd'ye kıyasla daha iyi sonuçlar vermiştir (72). Umut vaat eden bir diğer dördümlü rejim daratumumab, bortezomib, talidomid, deksametazondur (Dara-VTd) (73).

Başlangıç tedavisi olarak carfilzomib, lenalidomid, deksametazon (KRd) önerilmiyor.

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) tarafından yakın zamanda yapılan bir randomize çalışmada, standart riskli yeni tanı konmuş MM hastalarında KRd ile VRd üzerinde anlamlı üstünlük sağlanmamıştır (74).

KRd daha pahalıdır ve VRd'den daha yüksek ciddi kardiyak, renal ve pulmoner toksisite riski ile ilişkilidir.

Primer plazma hücreli lösemi veya önemli ekstramedüller hastalığı olan hastalarda, hızlı hastalık kontrolü sağlamak için başlangıçta bortezomib/ deksametazon/ talidomid/ sisplatin/

doksorubisin/ siklofosamid/ etoposid (VDT-PACE) gibi çoklu ajan kombinasyon kemoterapisine ihtiyaç duyulabilir (75).

2.8.4. Transplantasyon İçin Uygun Olmayan Hastalarda Başlangıç Tedavisi

OKHT için uygun olmayan hastalarda başlangıç tedavisi için iki ana seçenek VRd ve DRd'dir (Şekil 1). Kök hücre hasarı, sekonder miyelodisplastik sendrom ve akut lösemi ile ilgili endişeler nedeniyle artık melfalan bazlı rejimler önerilmemektedir. VRd, Rd ile karşılaştırıldığında gelişmiş OS göstermiştir ve başlangıç tedavisi için tercih ettiğimiz seçimdir (69). VRd ~8–12 döngü boyunca uygulanır, ardından idame tedavisi yapılır. Kırılgan yaşlı hastalarda, daha düşük dozda lenalidomid ve deksametazon kullanılmalıdır. Parenteral uygulama için seyahat edememe nedeniyle VRd ile tedavi mümkün değilse, bortezomib yerine iksazomib düşünülebilir.

Nakil için uygun olmayan hastalarda başlangıç tedavisi için VRd'ye ana alternatif DRd'dir. DRd, PFS'nin Rd'den önemli ölçüde üstün olduğu bir randomize çalışmanın sonuçlarına dayanarak Amerika Birleşik Devletleri'nde yeni tanı konmuş MM'li hastalar için onaylanmıştır (70).

DRd'nin en büyük dezavantajı, üçlü rejimin yalnızca sınırlı bir süre (8-12 döngü) için kullanıldığı VRd'den farklı olarak, DRd tedavisinin hastalık progresyonuna kadar üç ilacın tümü ile tedavi gerektirmesi ve uzun vadede çok daha pahalı ve maliyetli bir rejimle sonuçlanmasıdır (71).

Daratumumab'ın deri altı uygulanabilirliği rahatsızlığı azaltabilir ancak yine de VRd'ye kıyasla birçok dezavantajı bulunmaktadır (76).

2.8.5. İlaç Dozları ve Proflaktik Önlemler

VRd ve diğer bortezomib içeren rejimler ile önemli bir periferik nöropati riski vardır. Bu, bortezomib'i haftada bir kez (77,78) kullanarak ve ilacın deri altından verilmesiyle en aza indirilebilir (79). Tüm rejimler için haftada bir kez deksametazon kullanılmalıdır (düşük doz deksametazon) (80).

Akut hafif zincirli “cast” nefropatisi olan hastalarda deksametazon günlük olarak ve ardından haftada bir kez uygulanabilen tedavinin ilk 4 günü bir istisnadır. Uzun süreli

lenalidomid tedavisi alan hastalarda yeterli kök hücre mobilizasyonu için pleriksafor gerekebilir (81).

Lenalidomid ile tedavi edilen tüm hastalarda derin ven trombozu ve pulmoner emboli profilaksisi gerekir. Aspirin çoğu hasta için yeterlidir, ancak tromboz riski yüksek olan hastalar düşük molekül ağırlıklı heparin, varfarin veya direkt trombin inhibitörleri almalıdır (82, 83, 84).

Proteazom inhibitörleri alan tüm hastaların herpes zoster profilaksisine ihtiyacı vardır. Deksametazon kullanan tüm hastalara pneumocystis jiroveci'ye karşı profilaksi önerilmekte. Ayrıca yeni tanı konmuş MM'li tüm hastalarda ilk iki siklus için günlük olarak levofloksasini öneriliyor (85).

2.8.6. Kök Hücre Nakli

2.8.6.1. Otolog Kök Hücre Nakli (OKHT)

OKHT, MM'de iyileştirici değildir, ancak medyan OS'yi ~12 ay kadar iyileştirir (86-90). Tedaviye bağlı ölüm oranı %1-2'dir. Hastaların ~%50'sinde OKHT ayaktan tedavi bazında yapılabilir (91). OKHT için tercih edilen şartlandırma rejimi melfalan, 200 mg/m²'dir. Daha önce tartışıldığı gibi, OKHT'nin erken yapılması tercih edilir, ancak standart riskli MM'li bazı hastalarda, öncelikle hasta seçimine bağlı olarak OKHT ilk relapsa kadar ertelenebilir (92). VRd rejiminin başlatılmasından önce yürütülen üç randomize çalışma, OKHT'nin erken (başlangıç tedavisinin 3-4 siklusundan sonra) veya gecikmeli (kurtarma tedavisi olarak nüks sırasında) yapılıp yapılmadığına bakılmaksızın OS'nin benzer olduğunu göstermiştir (93, 94).

VRd'yi başlangıç tedavisi olarak kullanan yakın tarihli bir randomize çalışma, PFS'yi iyileştirdiğini, ancak ilk nüks anında gecikmiş OKHT ile karşılaştırıldığında erken OKHT ile OS'de bir fark olmadığını buldu (95).

Bu nedenle, özellikle standart riskli hastalarda OKHT'nin zamanlamasına karar vermede hasta ve hekim tercihi önemli bir rol oynamaktadır. Düşük riskle yapılabildiği, lojistik açıdan daha kolay olduğu ve en uzun remisyon süresini sağladığı için çoğu hastada hala erken OKHT tercih edilmektedir. OKHT'da tedaviyle ilişkili sekonder miyelodisplastik sendrom ve akut lösemi açısından küçük bir riski vardır.

2.8.6.2. Tandem Nakli

Tandem (çift) OKHT, ilk transplantasyondan iyileşmeden sonra ikinci bir planlı OKHT'yi ifade eder. Tandem OKHT'nin miyelomdaki rolü sınırlıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde Kemik İliği Nakli Klinik Araştırmalar Ağı (BMTCTN) tarafından yürütülen randomize bir çalışmada tandem OKHT ile hiçbir fayda sağlamadığı (96), buna rağmen Avrupa Miyelom Ağı tarafından yürütülen randomize bir çalışmada hayatta kalmada yararlı olduğu bulunmuştur (97, 98).

Bu denemelerdeki çelişkili sonuçların kurtarma ortamında yeni tedavi seçeneklerine erişimi ve kullanılabilirliği yansıtmaması muhtemeldir. Şu anda, bir klinik deney ortamının dışında, yalnızca del 17p'li seçilmiş genç hastalarda tandem OKHT'yi düşünülüyor (68).

2.8.6.3. Allojenik Transplantasyon

Allojenik transplantasyon MM'de araştırma aşamasındadır. Kullanımı öncelikle klinik araştırmalarla ve ilk nüksde olan yüksek riskli MM'li genç hastalarla (<60 yaş) sınırlandırılmalıdır. Bu hastalara, prosedürle ilişkili, tedaviyle ilişkili yüksek ölüm oranı ve kesin yarar kanıtının olmaması konusunda danışmanlık verilmelidir.

2.8.6.4. Pekiştirme Tedavisi

BMTCTN tarafından yapılan randomize bir çalışma, OKHT sonrası pekiştirme tedavisinin uygulanmasında hiçbir fayda bulamadı (96). Sonuç olarak, OKHT'yi takiben ek VRd kemoterapi veya diğer pekiştirme tedavileri önerilmiyor. OKHT'den sonra, önemli rezidüel hastalık yokluğunda doğrudan idame tedavisine geçmeyi tercih ediyoruz.

2.8.6.5. İdame Tedavisi

Lenalidomidin OKHT'yi takiben OS'yi iyileştirdiği gösterilmiştir ve çoğu hasta için önerilen idame şeklidir (88, 99, 100, 101, 102, 103). SWOG çalışmasının sonuçlarına

dayanarak, OKHT uygulanmamış ancak VRd gibi bir üçlü ile başlangıç tedavisini tamamlamış hastalara da lenalidomid idamesi önerilmektedir (69).

Lenalidomid ile tedaviye bağlı miyelodisplastik sendrom da dahil olmak üzere ikinci kanser riskinde iki ile üç kat artış vardır ve bu hasta ile tartışılmalıdır (99; 100).

Yüksek riskli hastalarda bortezomib bazlı idame tercih edilir. Bir randomize çalışmada, nakil sonrası idame olarak iki haftada bir uygulanan bortezomib, talidomid idamesinden daha iyi OS sağladı (101).

Bortezomib, bortezomib ve lenalidomidin yararlı etkilerini birleştirmek için iki haftada bir tek başına veya düşük yoğunluklu VRd'nin bir parçası olarak verilebilir (104). Bortezomib'e erişemeyen veya bunu tolere edemeyen hastalarda, ixazomib, plasebo kontrollü randomize bir çalışmada fayda gösteren makul bir alternatiftir (105).

Optimum bakım süresine ilişkin mevcut veriler eksiktir. Uzun süreli belirsiz bakım maliyet, toksisite ve rahatsızlık ile ilişkilidir. Birçok hasta ilaçsız bir dönemden yararlanabilir. Halihazırda bir ECOG randomize çalışması, 2 yıllık sınırlı bir süre ile progresyona kadar verilen lenalidomid idamesini karşılaştırmaktadır. Denemeler ayrıca bakım süresinin MRD sonuçlarına göre değiştirilip değiştirilemeyeceğini de inceliyor. Şu anda, toksisite yokluğunda ilerlemeye kadar idame devam ediyoruz.

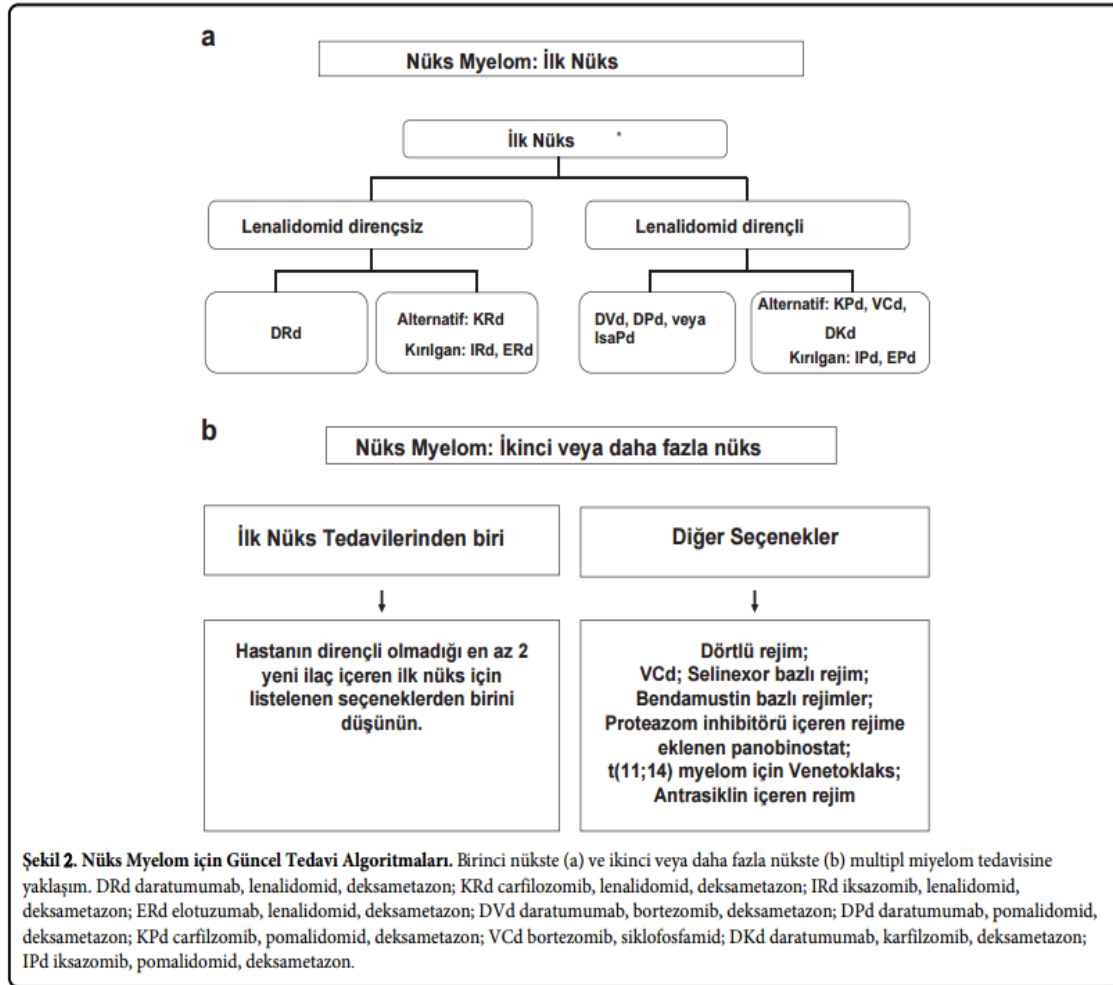
2.8.7. Nükseden MM Tedavisi

MM'li hemen hemen tüm hastalar sonunda nüks eder. MM çoklu remisyon ve relapslarla karakterize bir hastalıktır. Güncel tedavi rejimleri ile, MM'nin ilk nüksü, ilk tanıdan ~3–4 yıl sonra ortaya çıkar. Sonraki her remisyon daha kısa sürelidir. MM'li birçok hasta, birkaç yıl boyunca ardışık bir şekilde beş veya daha fazla tedavi hattı alır. Nükseden MM'de remisyon süresi her rejimde azalmaktadır (106).

Her nükste tedavi seçimi birçok faktörden etkilenir. Bunlar, nüksün zamanlamasını, önceki tedaviye yanıtı, nüksün agresifliğini ve performans durumunu içerir. OKHT için uygun hastalar, prosedürü ertelemeyi seçmişlerse veya idame ile 36 ay veya daha uzun bir remisyon olarak tanımlanan ilk OKHT ile mükemmel remisyon süresi elde etmişlerse, transplantasyon için düşünülmelidir. Genelde üçlü rejim tercih edilir. Her nükste, hastanın dirençli olmadığı en az iki yeni ilacı içeren bir rejim düşünülmelidir. Nükseden MM tedavisi için algoritmamız Şekil

2'de verilmiştir. Bu öneriler birkaç büyük randomize çalışmanın sonuçlarına dayanmaktadır (107-116).

Ne yazık ki bu çalışmaların çoğunda lenalidomid içeren rejimler, esas olarak daha önce lenalidomide maruz kalmamış hasta popülasyonlarında test edilmiştir. Ancak mevcut klinik uygulamada çoğu hasta başlangıç tedavisi olarak lenalidomid almıştır, bu da bu verilerin genelleştirilebilirliğini bir dereceye kadar sınırlandırmaktadır.



Şekil 3: Nüks Myelom için Güncel Tedavi Algoritması. (68)den uyarlanmıştır.

2.8.7.1. İlk Nüks Tedavisi

ASCT için uygun olan hastalar, daha önce hiç transplant yapmamışlarsa veya ilk OKHT ile uzun süreli remisyonları olmuşsa, ilk nüksde OKHT'yi kurtarma tedavisi olarak düşünülmelidir. Tüm tedavi durdurulduktan 6 ay sonra nüks meydana gelirse, başlangıçta MM'yi başarıyla kontrol eden ilk tedavi rejimi, mümkün olduğunda yeniden başlatılabilir. Diğer tüm

hastalar için, ilk relapsta tedavi stratejisi aşağıda açıklanmıştır. Nükseden MM tedavisi tipik olarak hastalık progresyonuna kadar sürdürülür. Bununla birlikte, tolere edilebilirlik ve yanıtı bağlı olarak, tedavi gerektirmeyen aralıkların yanı sıra döngüler arasındaki aralığı artırmayı düşünüyoruz. Genelde üçlü rejimler tercih edilir, ancak bazı yaşlı zayıf hastalarda indolent relapslı hastalarda pomalidomid, deksametazon gibi ikili rejimler düşünülebilir.

İlk nüksde, lenalidomide dirençli olmayan hastalarda, DRd, KRd, iksazomib, lenalidomid, deksametazon (IRd) ve elotuzumab, lenalidomid, deksametazon dahil olmak üzere çoklu üçlü rejimler düşünülebilir. Bu rejimlerin her biri randomize çalışmalarda Rd'ye göre üstünlük göstermiştir (108, 110, 111, 117).

Ancak klinik uygulama için en etkili kombinasyonu belirlemek için hiçbiri birbiriyle kıyaslanmamıştır (118).

Bu tür verilerin yokluğunda, etkinlik ve tolere edilebilirliğin randomize olmayan karşılaştırmalarına güvenmek zorundayız. Rd'ye kıyasla ilerleme riskinde en iyi azalmayı sağladığından ve tolere edilebilirliğine dayalı olarak tercih ettiğimiz seçenek DRd'dir. Daratumumab, infüzyonla ilişkili yan etkileri azaltan ve uygulama süresini kısaltan bir deri altı formülasyonu olarak da mevcuttur. Daratumumab mevcut değilse veya hasta daha önce daratumumab ile tedavi edilmişse KRd tercih edilen alternatifimizdir. Kırılgan hastalar için oral IRd, relaps için makul bir ilk tercih olacaktır.

Lenalidomide dirençli hastalarda, ilk relapsta tedavi seçenekleri birkaç pomalidomid bazlı veya bortezomib bazlı kombinasyonlardan oluşur. Pomalidomid bazlı kombinasyonlar arasında daratumumab, pomalidomid, deksametazon, karfilzomib, pomalidomid, deksametazon (KPd), isatuximab, pomalidomid, deksametazon, KPd ve elotuzumab, pomalidomid, deksametazon bulunur (116, 119, 120, 121).

Bortezomib bazlı kombinasyonlar arasında daratumumab, bortezomib, deksametazon (DVd), VCd ve bortezomib, pomalidomid, deksametazon (112, 122, 123) bulunur. Daratumumab, carfilzomib ve deksametazon da düşünülebilir. Ne yazık ki, bu rejimlerin hiçbiri randomize çalışmalarda bire bir karşılaştırılmamıştır. Etkinlik verilerinin randomize olmayan karşılaştırmalarına dayanan tercihimiz DVd'dir. Ancak daha önce daratumumab ile tedavi edilmiş hastalarda KPd tercihimiz olacaktır.

Diğer rejimlerden herhangi biri de kullanılabilirliğe ve komorbiditelere bağlı olarak makul alternatifler olacaktır. Yeni teşhis edilen MM'de olduğu gibi, VRd ve VTd de nüks eden hastalıkta kullanım için mevcut aktif rejimlerdir (124,125).

Bir ilaca dirençli hastaların aynı sınıftaki farklı ilaca dirençli olmaları muhtemel olsa da, iki önemli istisna mevcuttur. Pomalidomid, lenalidomide dirençli hastalarda klinik aktiviteye sahiptir (126), karfilzomib ise bortezomib'e dirençli hastalarda aktiviteye sahiptir (127). Carfilzomib tipik olarak 27 mg/m²'lik bir dozda haftada iki kez, ancak haftada bir kez 56-70 mg/m²'lik bir program eşit derecede etkili ve güvenli ve daha uygun olabilir (128). Carfilzomib, bortezomib'den daha düşük bir nörotoksisite riskine sahiptir, ancak hastaların ~%5'i ciddi kardiyak yan etkiler yaşayabilir.

2.8.7.2. İkinci ve Sonraki Nükslerin Tedavisi

İkinci ve sonraki relapslar için algoritma Şekil 2'de verilmiştir. Her relapsta, hastanın dirençli olmadığı en az iki yeni ilaca sahip olmak amacıyla, ilk relapsta kullanım için belirtilen rejimlerden herhangi biri düşünülebilir. İki ve tercihen farklı bir ilaç sınıfından. Birçok durumda bu, bir dördüz rejim oluşturmak için üçlülerden birine bir M antikörünün eklenmesi gerekliliği anlamına gelebilir. Önemli olarak, bu aşamada alkilatör içeren rejimler düşünülmelidir.

İkinci veya daha yüksek relapslar için ek seçenekler arasında, proteazom inhibitörü içeren bir rejime panobinostat eklenerek (113) veya selinexor, bortezomib, deksametazon gibi selinexor içeren bir rejim kullanılabilir (129; 130). Uygun donörü olan genç yüksek riskli hastalar için, allojenik transplantasyon da bir seçenektir (131-79).

Venetoclax, MM'de kullanım için onaylanmamıştır, ancak ticari olarak mevcuttur ve MM'nin t (11; 14) alt tipi olan hastalarda tek ajan aktivitesine sahip olduğu görülmektedir (132).

Her remisyon bir öncekinden daha kısa olabilir. Bununla birlikte, mümkün olan çeşitli seçeneklerin ve kombinasyonların dikkatli analiziyle, hastanın iyi performans durumunda kalması ve tedaviye devam etmeye istekli olması koşuluyla, yaratıcı stratejilerle birden çok kez remisyon sağlayabiliriz (133). Seçilmiş hastalarda kullandığımız bir strateji, bir remisyon sağlamak için VDT-PACE gibi çoklu ilaç rejiminin bir ila iki döngüsü ve ardından daha yönetilebilir bir üçlü rejimle bunu sürdürmeye çalışmaktır. Her adımda klinik deneyler için

fırsatlar ortaya çıkabilir ve bunlar değerlendirilmelidir. Uygun donör hücrelerin mevcut olduğu, nükseden veya dirençli MM'li seçilmiş genç hastalarda allojenik transplantasyon düşünülebilir.

2.8.8. Araştırmacı Tedavi Yaklaşımları

MM için birkaç umut verici tedavi araştırılmaktadır. En heyecan verici seçeneklerden biri bb211 gibi B hücresi olgunlaşma antijenini (BCMA) hedefleyen kimerik antijen reseptör T hücreleridir (CAR-T) (134). şimdiye kadar yapılan çalışmalarda hastaların %80'inden fazlasının yanıt verdiği görülmektedir ve medyan yanıt süresi ~12 aydır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yakın zamanda onaylanan bir başka umut verici tedavi, bir mikrotübül bozucu ajan olan monometil auristatin-F'ye konjuge edilmiş hümanize bir anti-BCMA antikoru olan belantamab mafodotin'dir (135). Bir diğer umut verici yeni strateji, AMG 701 gibi bispesifik T-hücre angajesinin kullanılmasıdır (136; 137).

MM tedavisinde Cereblon E3 ligaz modlatrleri de umut verici görünmektedir (138).

2.8.9. NK 92 ve CAR-T Hücre Tedavisi

Doğal ldrc (NK) hücreler, insan lökosit antijeni (HLA) moleküllerini tanımadan hematolojik malignitelerde (lösemi ve lenfoma) güçlü bir sitotoksik aktiviteye sahiptir. Kimerik antijen reseptörü ile tasarlanmış NK hücreleri (CAR-NK hücreleri), malign tümör hücrelerinin immünoterapisi için NK92 hücre hattından, periferik kandan, kordon kanından ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerden üretilir (139).

Doğal ldrc (NK) hücre tedavileri potansiyel olarak geniş çapta uygulanabilir ve T hücre benzerlerinden farklı olarak graft-versus-host hastalığına neden olmaz. Bununla birlikte, birincil NK hücrelerinin etkinliği ve klinik in vitro veya in vivo genişlemesi, donörlerin veya hastaların bireysel farklılıkları nedeniyle her zaman değişken kalacaktır (140).

Güçlü bir antilsemi/lenfoma etkisine ve ciddi yan etkiler olmaksızın daha iyi proliferatif kapasiteye sahip CAR-NK hücrelerinin özellikleri, kullanıma hazır bir allojenik hücresel tedavi olarak inatçı hematolojik malignitelerin üstesinden gelmek için umut verici olabilir (139).

Yapılan bir çalışmada CS1 (SLAMF7)'ye özgü CAR-NK92 hücrelerinin uyarlanabilir transferi, insan IM9 çoklu miyelom hücrelerinin çoğalmasını engelledi ve farelerin daha uzun hayatta kalmasını sağladı (141).

CAR-T hücrelerinin çok sayıda toksisitesi tanımlanmıştır. Bu nedenle, bazı çalışmalar, minimum toksisite ile daha iyi etkinliğe ulaşmak için başka bir sitotoksik hücre olan NK-92 hücresine başvurmuştur. Preklinik çalışmalar, genetiği değiştirilmiş NK-92 hücrelerinin in vitro ve in vivo olarak oldukça spesifik sitotoksisiteye sahip güvenlik ve uygulanabilirliğini doğrulamıştır. Bu nedenle, NK-92 hücresinin, birincil NK hücreleri, ebeveyn NK-92 hücreleri ve otolog T hücreleri üzerindeki benzersiz avantajları nedeniyle CAR için başka bir ideal taşıyıcı haline gelmesi beklenmektedir (142). CAR ile modifiye edilmiş NK-92 (CAR-NK-92) hücreleri, güçlü antitümör etkileri göstermiştir (143).

CAR-NK hücreleri, CAR-T hücreleri için potansiyel rakiplerdir. CAR-NK-92 hücreleri GVHD'ye neden olmaz ve daha fazla sitotoksisiteye sahiptir (144; 145).

Aslında, CAR-NK-92 hücrelerinin aşağıdaki gibi birçok avantajı vardır:

1. CAR-NK-92 hücreleri, tümör hücrelerini hedefleyebilir ve hedef hücreleri öldürmek için NK-92 hücrelerini doğrudan aktive edebilir;
2. Tümör üzerindeki hedeflenen antijen hızla kaybolursa bile, CAR-NK-92 hücreleri, aktive edici reseptörleri tarafından yine de aktive edilebilir (146);
3. İnhibitör reseptörler yüzeyde düşük seviyelerde eksprese edilir (147) ve inhibitör reseptörlerin silinmesi NK-92 hücrelerini diğer immün hücrelere göre katı tümörlere karşı daha dirençli hale getirir.
4. NK-92 hücreleri, çoğalmaları için uzun bir süre in vitro kültürlenmelerine izin veren, tek tip bir fenotip ile ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarıdır. CAR-NK-92 hücreleri de ileri kanserli hastalarda bağışıklık hücresi canlılığındaki düşüşü telafi edebilen bu avantaja sahiptir. Tümörün tipine bağlı olarak, ilgili CAR-NK-92 hücreleri tedavi için doğrudan genişletilebilir, böylece tedavi döngüsü kısaltılır ve tedavi maliyeti düşürülür (148).

2.8.9.1. CAR T Hücre Tedavisi

Antijene özel tasarlanmış T hücrelerinin uyarlamalı transferi, monoklonal antikorların hedef özgüllüğünü T hücrelerinin sitotoksitesiyle birleştirir. Bu T-hücreleri, bir CAR kodlayan geni taşıyan bir lentiviral veya retroviral vektör ile dönüştürülür, ardından hastalara infüze edilmeden önce birden fazla genişletilirler. Hastalara infüze edildiğinde, bu CAR hücreleri antijenle karşılaşır ve yanıt olarak sitokinleri serbest bırakır, hedef hücreleri lize eder ve in vivo çoğalır (149).

CAR T-hücresi, genellikle bir monoklonal antikorun tek zincirli bir değişken fragmanından (scFv) türetilen, MHC olmayan hücre dışı bir kısıtlı hedefleme alanından, bir aralayıcı bölgeden, bir transmembran alanından ve CD3ζ aktivasyon alanını içeren hücre içi sinyalleşme alanlarından ve CD28 veya 4-1BB gibi bir ortak uyarıcı alanlardan oluşur (150).

MM klinik denemelerinde, çoğu CAR yapısı ikinci nesil CAR'lardan türetilir.

CAR T-hücre tedavisinin etkinliği büyük ölçüde, hedef dışı tümör toksisitesini önlemek için normal hücrelere göre kanser hücrelerinde genel ve özel olarak belirlenen hedefi tanımlamaya bağlıdır (151; 152). Çoğu miyelom CAR T hücre ürünü, B hücresi olgunlaşma antijenini (BCMA) hedefler (153).

2.8.9.2. B Hücresi Olgunlaşma Antijeni (BCMA)

Bir tip III transmembran reseptörü olan BCMA, CD38 ve SLAMF7 gibi diğer immün hedeflere kıyasla neredeyse tamamen plazma hücrelerinde eksprese edildiğinden immünoterapi için mükemmel bir hedeftir (154). Ayrıca tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 17 (TNFRSF17) veya CD269 olarak da bilinir.

BCMA için ligandlar, A Proliferasyon İndükleyici Ligand (APRIL) ve B-hücresi Aktivasyon Faktörü (BAFF) içerir ve bunlar osteoklastlar tarafından üretilir. BCMA ile etkileşimleri plazma hücrelerinin farklılaşmasını indükler ve ayrıca MM patogenezinde rol oynar (155).

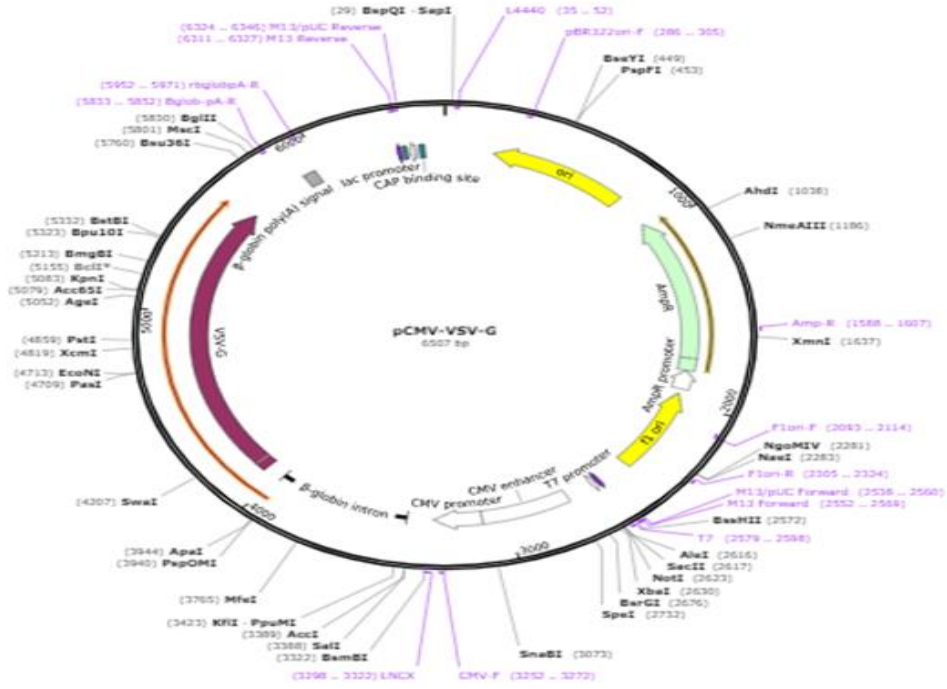
Çözünür BCMA, tümör yükünün bir belirteci olarak kabul edilir ve artan seviyeler daha kötü sonuçlarla ilişkilidir (156). BCMA hemen hemen tüm plazma hücreli neoplazmlarda eksprese edilir, ancak ekspresyonu oldukça değişkendir (157).

2.8.9.3. CAR NK Hücre Tedavisi

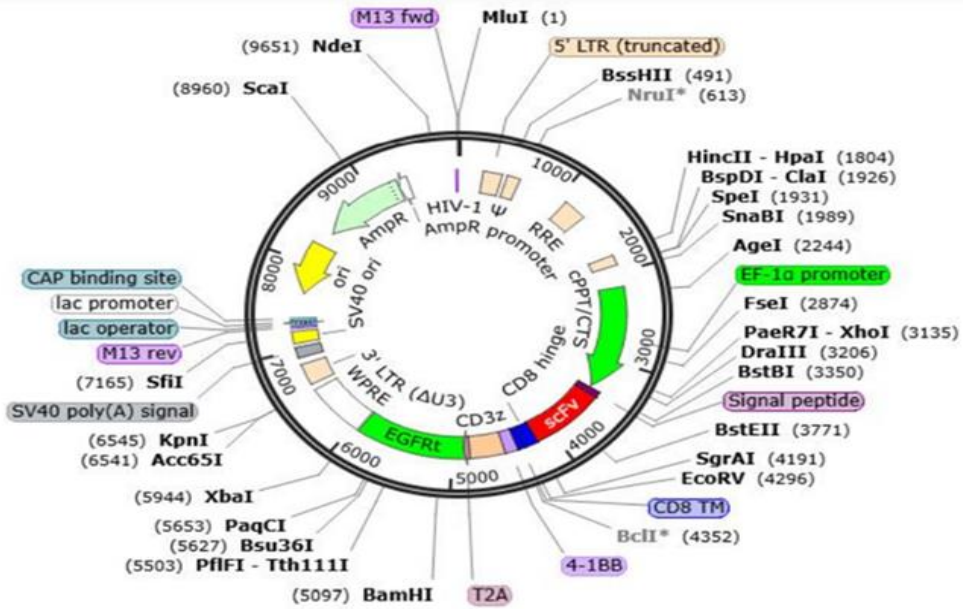
Doğal öldürücü (NK) hücreler doğuştan gelen bağışıklık sistemi için kritik öneme sahiptir ve aynı zamanda adaptif bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Antikorların ve majör histouyumluluk kompleksi (MHC) moleküllerinin yokluğunda stresli hücreleri tanıyabilirler, bu da çok daha hızlı bir bağışıklık tepkisine yol açar (158).



Şekil 5: B. pCMV-VSV-G: zarf plazmidi



Şekil 6: C.CAR BCMA plazmidi



Anti-BCMA scFv h(4-1BB-CD3ζ)-EGFRt CART, pCDCAR1-2

Figure 1. Schematic of Anti-BCMA scFv h(4-1BB-CD3)-EGFRt CART, pCDCAR1-2

Konstraktımız 2B4 kostimülatör ve CD3-z sinyalleme alanlarını içeren bir antiBCMA scFv ile lentiviral olarak transdüksiyona tabi tutulmuştur ve BCMA-CAR arasındaki etkinliği belirlemek ve hücreleri dönüştürmek için MOI kullanıldı.

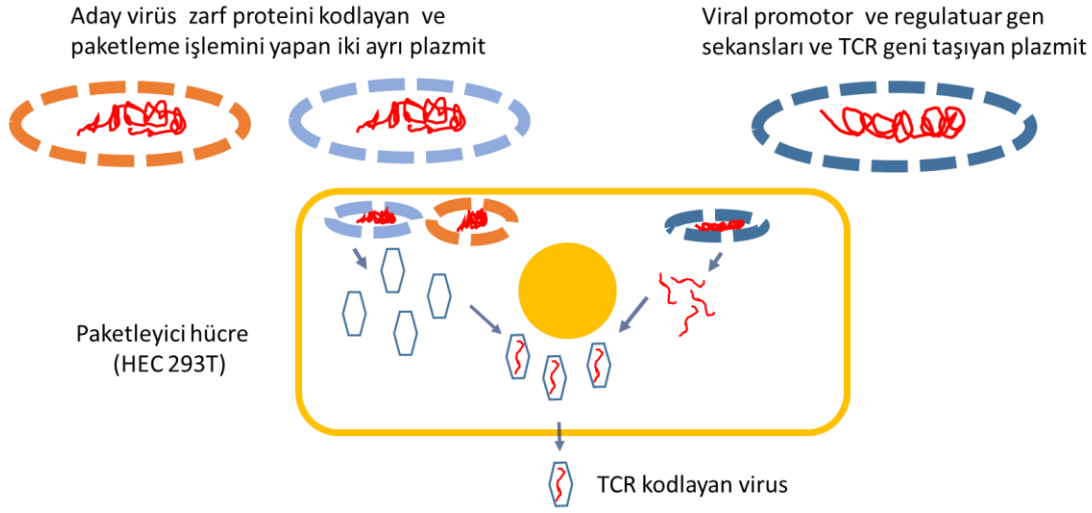
Şekil 7:BCMA CAR dizaynında kullanılan konstrakt dizilimi



3.2. Yöntem

3.2.1. Lentivirüs Üretim Protokolü

BCMA CAR transdüksiyonunda kullanılacak Lentivirüs üretimi aşağıda şematize edilmiştir. Temel prensip: Yapay bir Lentivirüs oluşturabilmek için üç plazmidin bir paketleyici hücrede birleştirilmesidir. Birinci plazmid PsPax plazmididir, bu hücre içinde oluşacak yeni genetik kodun birleştirilmesi-paketlenmesi işlemini yapar. İkinci Plazmid VSVG plazmididir olup yeni virüsün en dış tabakasındaki zarfı kodlar. Üçüncü plazmid ise transfer etmek istediğimiz genetik materyali taşır ki, bu çalışmada BCMA CAR molekülüdür.



Şekil 8:BCMA CAR şematizasyonu

3.2.2. Üretim

Lentivirüs üretimi için konakçı hücreler olarak HEK293T hücreleri, transfeksiyondan bir gün önce 5 katlı flaklara (NEST) ekildi. İzole edilmiş zarf (vsvg), paketlenme (pspax) ve CAR plazmitleri (1:1:2 oranı), %1 penisilin/streptomisin içeren Opti-MEM (serumsuz medium, Thermo Fisher Scientific) içinde lentivirüs üretimi için FuGENE HD (Promega) transfeksiyon reaktifi ile karıştırıldı.

Paketlenmiş rekombinant CAR lentivirüsü (CAR-LV), transfeksiyondan 48 saat sonra hücre kültürlerinin süpernatantından toplandı. CAR-LV'yi içeren süpernatant süzüldü (0.45 µm) ve Lenti-X yoğunlaştırıcı (Takara Bio) ile 100x konsantre edildi.

3.2.3. NK92, Haşhaşin NK92 kültür protokolü ve CAR NK92, Haşhaşin NK92 transdüksiyon prptokolü

NK92: Bu hat ATCC #CRL-2407 katalog numaralı NK hücreli bir lösemi hattıdır. Normalde klinik çalışmalarda en çok tercih edilen hücre hattıdır. Bu hücreler CD16 (Fc reseptörü) taşımazlar. Bu nedenle direk sitotoksitite yaratırken antikor aracılı sitotoksitide yer almazlar. Bu çalışmada klassik NK92 hücrelerine CAR BCMA transdüksiyonu sonrası in vitro etkinlikleri test edilmek istendi.

NK92 Haşşaşın (Assasin): Labcell Laboratuvarlarının kendi sentezlediği (PT2019-01624 (TR)) transgenik IL-12 ve CD 16 eksprese eden NK 92 hattıdır. Labcell bu hattı daha etkin olabilmesi amacı ile yine lentiviral transdüksiyon yöntemi kullanarak IL-12 sentez etmesi sağlandı (bunun nedeni NK-92'lerin direk toksik etkisinin yanında diğer inflamatuvar hücrelerin inflamasyon alanına çağrılarak reaksiyonun güçlendirilmesini hedeflemiştir), ikinci basamakta da ayrıca CD16 reseptörü bu hücreye takıldı (CD16 Fc reseptörü olup yeni NK-92'lerin antikor aracılıklı sitotoksitede görev almaları hedeflenmiştir). Bu çalışmada ise Haşşaşın hücrelerin BCMA CAR ile transdükte edildikten sonra Myelom spesifik etkinlikleri in vitro koşullarda test edilmek istendi.

NK92 Haşşaşın (Assasin) kültürü ve transdüksiyonu: Hücreler %10 fetal bovin serum albümini (FBS) (#10500064, Gibco) ve %1 penisilin-streptomisin (#03-031-5B, Biological Industries), 500.000 unit IL-2 eklenmiş TexMACS medium içerisinde kültürlendi. Hücre canlılığı pasajlama yoluyla korundu ve 37 °C'de inkübe edildi. Transdüksiyon işlemi NK92 hücreleri >%80 konfluense geldiklerinde ortama 6 mL /ml dozda Protamin Sülfat konduktan sonra değişik titrelerde (0.03-0.1-0.3-1-3-10 uL x100) CAR Lentivirüs ilavesi ile yapılmış (Protamin Sülfat virus partiküllerini hücre membranına yapışmasını kolaylaştıran ajandır). Transdüksiyon işlemin 24 saat sonra sonlandırılarak yukarıda tanımlanan media içeriği üç günde bir %50 oranında değiştirilerek kültüre devam edildi.

3.2.4. BCMA Lentivirüs Titrasyon

Bu işlem hem üretilen Lentivirüsün IFU hesabını yapmak, hem de enfeksiyon kapasitesinin ne kadar olduğunu ölçmek için yapıldı.

Jurkat hücre hattı (ATCC® TIB-152™), 10.000 olarak 96 kuyucuklu plakaya %10 FBS, %1 pens/strep, %1 esansiyel olmayan amino asitler, %1 sodyum piruvat ve %1 vitamin içeren glutamin HEPES ile 100 µL RPMI içinde ekildi. Kuyucuklar, her 50 uL medium içinde sırasıyla 10 uL, 3 uL, 1 uL, 0.3 uL, 0.1 uL ve 0.03 uL x100-konsantre CAR-LV solüsyonlarına sahip olacak şekilde seri dilüsyon yapıldı. Daha sonra her konsantrasyondan 50 uL virüs seyreltisi Jurkat kültür kuyucuklarına aktarıldı, toplam hacim 150 uL'ye ayarlandı ve hücreler 3-4 gün inkübe edildi. Akış sitometrisi, anti-EGFR (cetuximab) A488 antikoru (R&D Systems) ile EGFRt ekspresyonu için Miltenyi MACSQuant akış sitometrisi kullanılarak yapıldı.

İFU'nun hesaplanması: BCMA lentivirüsün viral titrasyon analizleri sonrası akım sitometrisi ile ölçülen EGFRt ifadesinin %5-10' unun üzerine karşılık gelen dilüsyon kat sayısı olarak hesaplanmaktadır.

3.2.5. BCMA Lentivirüs RCL

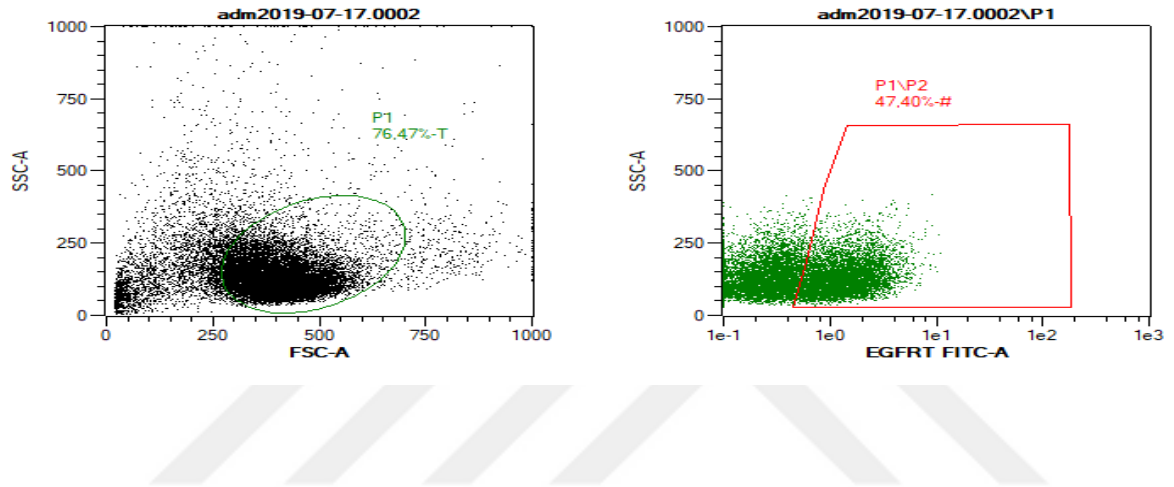
Üretilen Lentivirüsün Replikatif Kompetan olmadığını göstermek amacıyla bu tez kurulmuştur.

Titrasyon kuyucuklarındaki süpernatantlar uzun süreli kültüre alınarak 14. Gün jurkat hücreleri üzerine ekildi ve 3-4 gün inkübasyon sonrasında yapılan akış sitometri analizinde anti-EGFR (cetuximab) A488 antikoru (R&D Systems) ile EGFRt ekspresyonu tespit edilmediği kontrol edildi ve lentivirüsün güvenliği gösterildi.

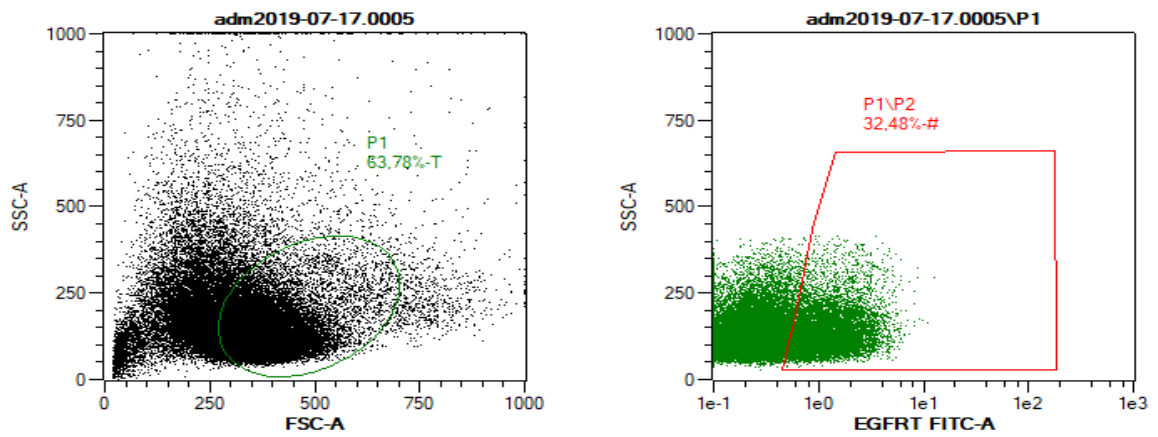
4. BULGULAR

4.1. Farklı Değerlerde Lentivirüs Viral Titrasyon Analizleri

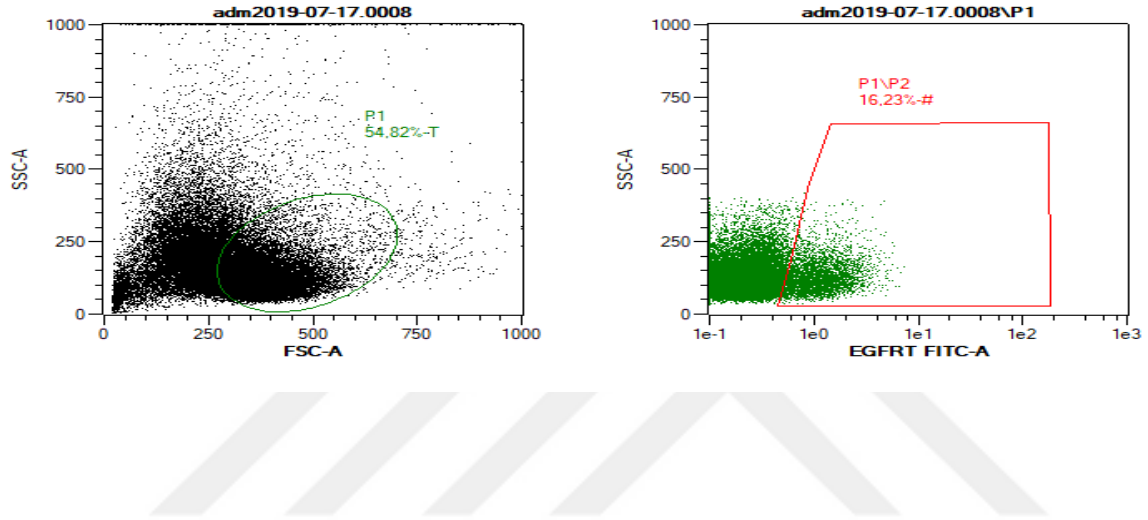
Şekil 9: 10 MOİ BCMA Lentivirüs Viral Titrasyon Analizi



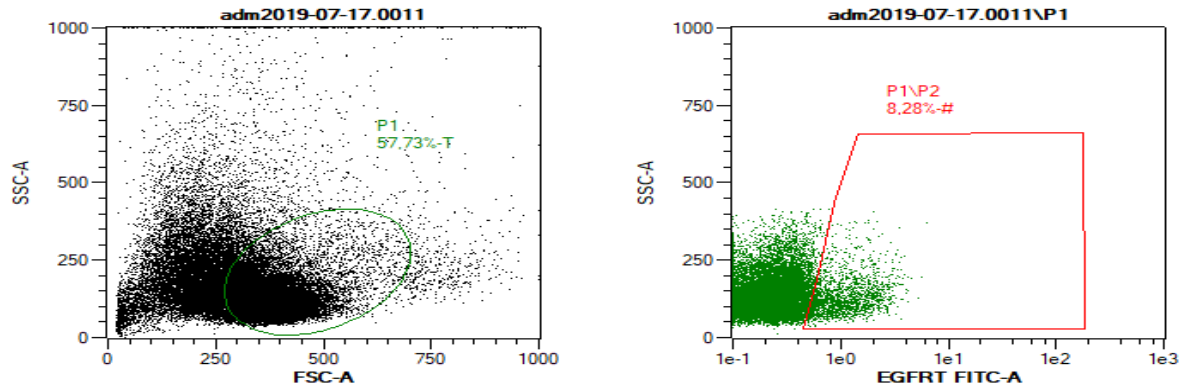
Şekil 10: 3 MOİ BCMA Lentivirüs Viral Titrasyon Analizi



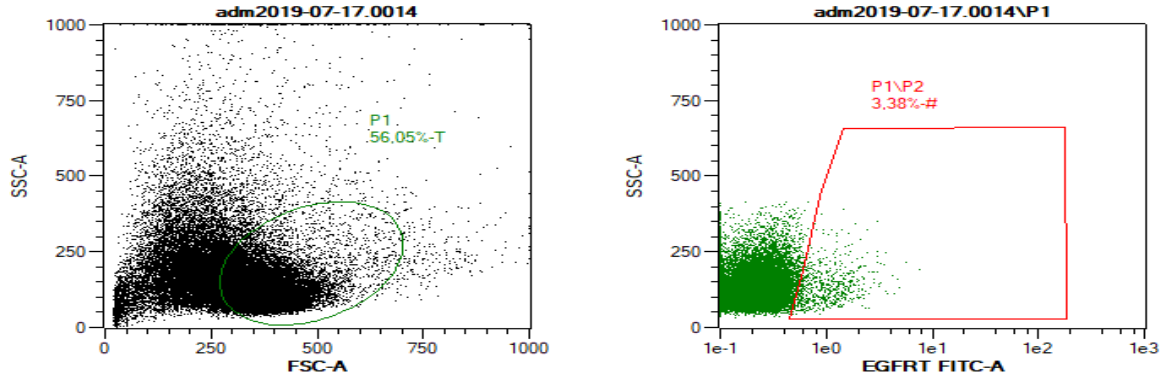
Şekil 11: 1 MOİ BCMA Lentivirüs Viral Titrasyon Analizi



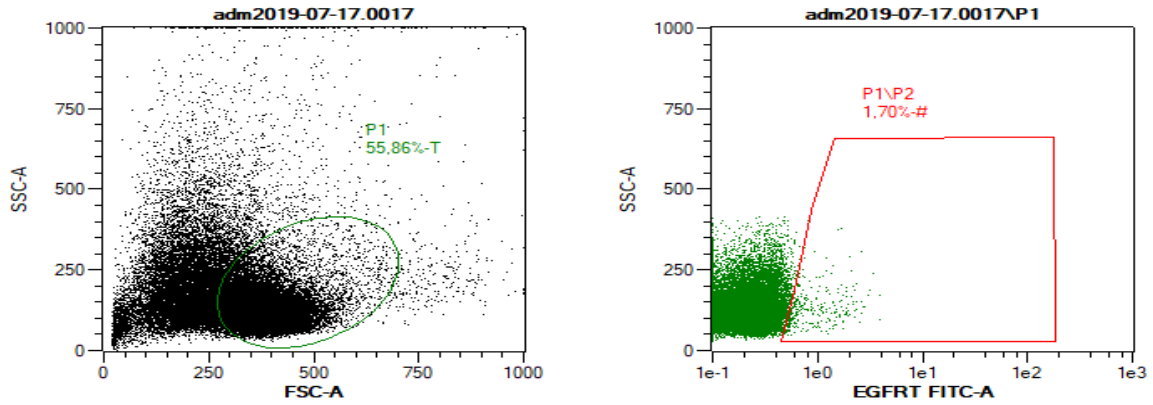
Şekil 12: 0.3 MOİ BCMA Lentivirüs Viral Titrasyon Analizi



Şekil 13: 0.1 MOİ BCMA Lentivirüs Viral Titrasyon Analizi



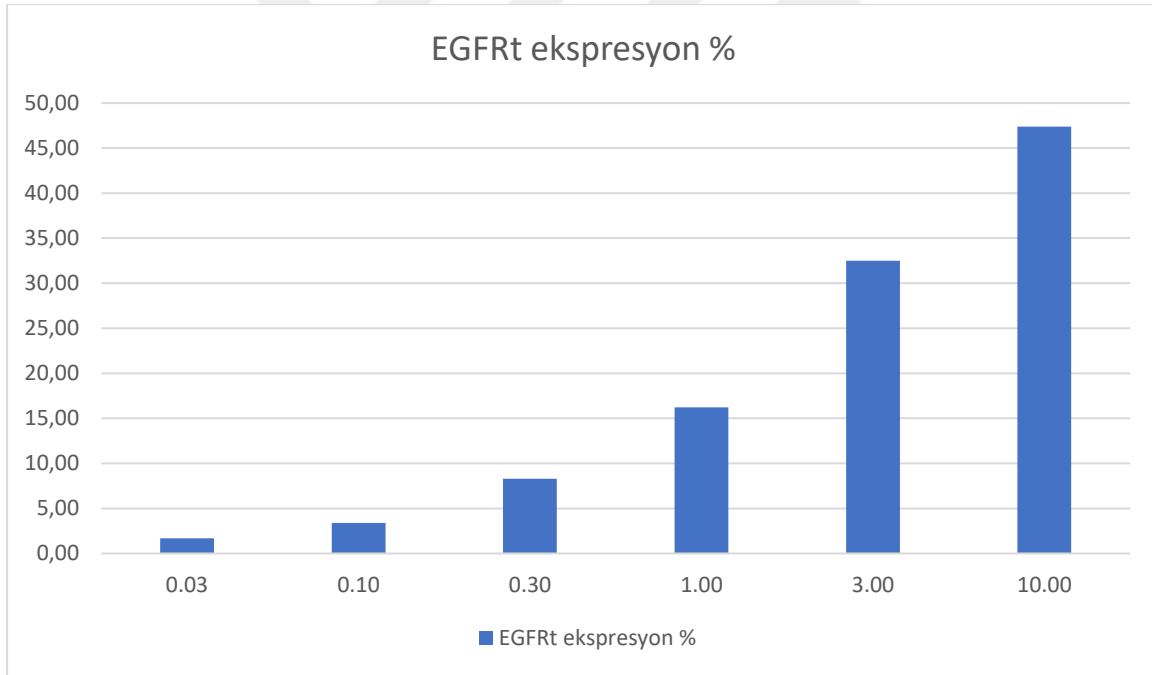
Şekil 14: 0.03 MOİ BCMA Lentivirüs Viral Titrasyon Analizi



Tablo 5: MOİ titrasyonuna göre EGFRt ekspresyon yüzdesi (%)

MOİ	EGFRt ekspresyon %
0.03	1.70
0.10	3.38
0.30	8.28
1.00	16.23
3.00	32.48
10.00	47.40

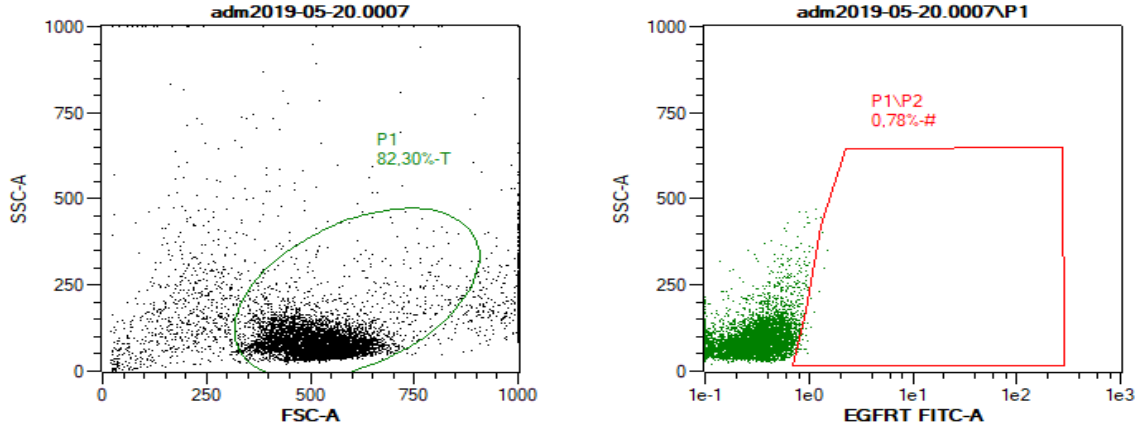
Şekil 15: MOİ titrasyonuna göre EGFRt ekspresyon yüzdesi (%)



EGFR ekspresyonunun %5-10 arası olduğu konsantrasyon (0.3) kabul alınarak IFU/ML hesaplandı.

Lentivirüs titrasyon sonucu: **2.7x10⁶ IFU/ml**

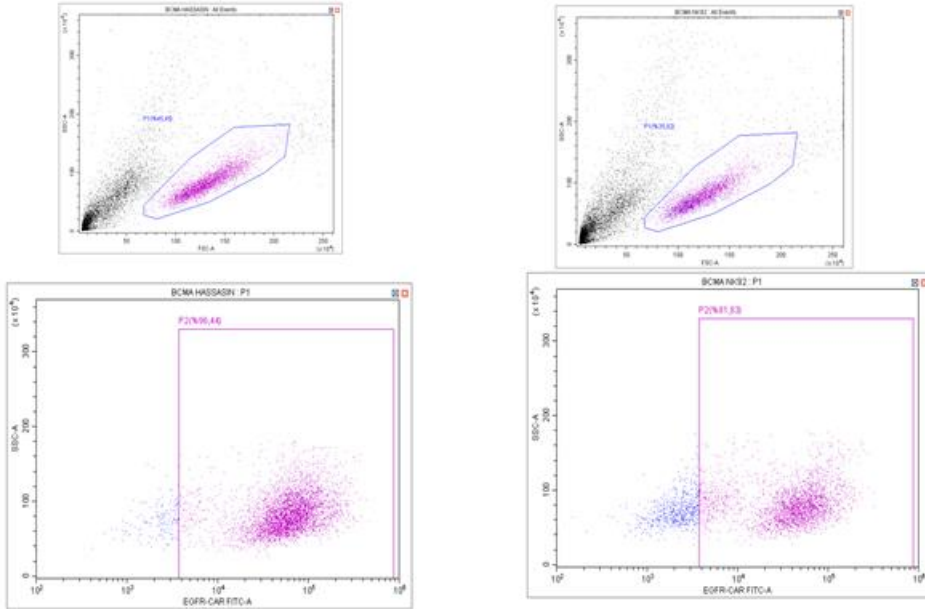
Şekil 16: 14.gün EGFRt ekspresyonu



14.gün EGFRt ekspresyonu %0.78 olarak hesaplandı.

4.2. NK92 ve Haşhaşin Hücrelerinin BCMA CAR Ekspresyonları

Şekil 17: BCMA CAR ekspresyonu



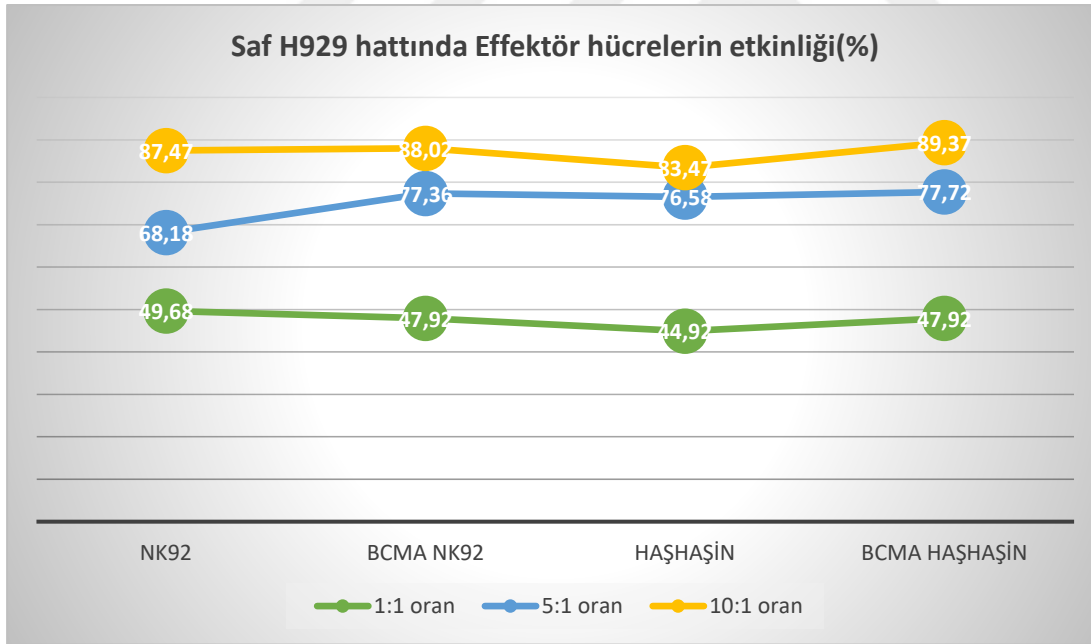
Sonuç: Yapılan akım sitometri analizlerinde BCMA CAR ekspresyonunun korunduğu saptanmıştır (%96.44).

4.3. Efektör Hücrelerin (NK92, BCMA NK92, HAŞHAŞİN ve BCMA HAŞHAŞİN) Etkinliği

Tablo 6: Işın+Effektör hücrelerin etkinliği

H929 oranı	NK92	BCMA NK92	HAŞHAŞİN	BCMA HAŞHAŞİN	SAF H929
1:1	47,93%	49,61%	52,46%	48,57%	95,25%
5:1	30,31%	21,56%	22,31%	21,22%	95,25%
10:1	11,93%	11,41%	12,83%	10,12%	95,25%

Şekil 18: Saf H929 hattında Efektör hücrelerin etkinliği



Saf H929 hücre hattımızda başlangıçta m-cherry ile işaretlenmiş olan myelom hücrelerinin flow sitometride canlılık oranı %95,25 olarak tespit edildi.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %47,93 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %49,68 olarak hesaplandı.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA-NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %49,61 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) BCMA-NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %47,92 olarak hesaplandı.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %52,46 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %44,92 olarak hesaplandı.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %48,57 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) BCMA HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %49 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %30,31 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (5:1) NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %68,18 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA-NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %21,56 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) BCMA-NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %77,36 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %22,31 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %76,58 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %21,22 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) BCMA HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %77,72 olarak hesaplandı.

10:1 oranda yaptığımız çalışmada NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %11,93 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %87,47 olarak hesaplandı.

10:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA-NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %11,41 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) BCMA-NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %88,02 olarak hesaplandı.

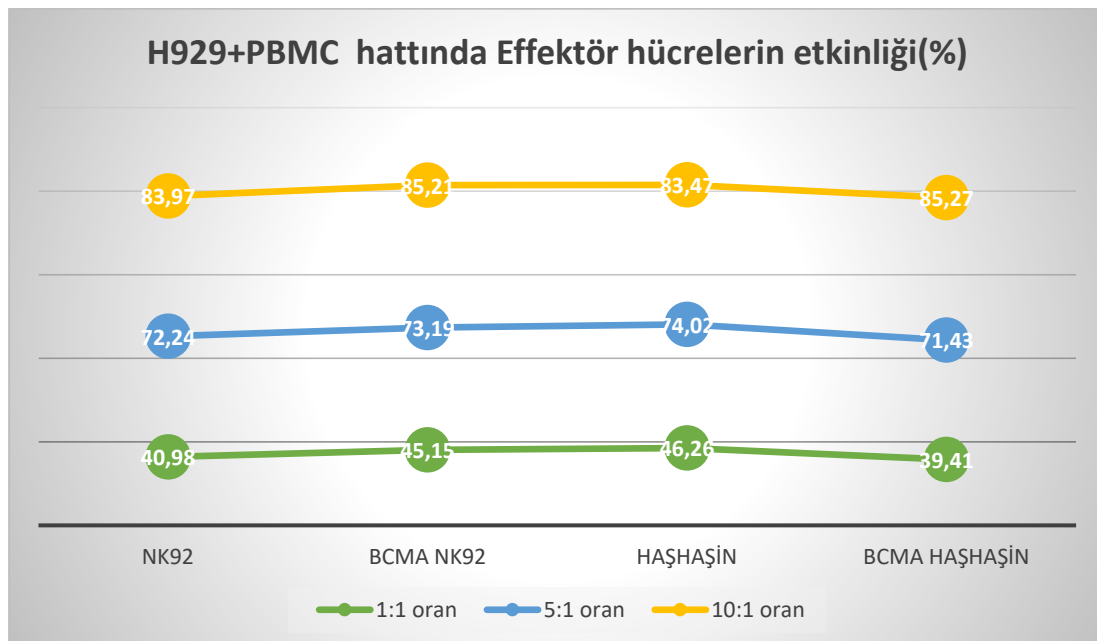
10:1 oranda yaptığımız çalışmada HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %12,83 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %86,53 olarak hesaplandı.

10:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %10,12 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) BCMA HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %89,37 olarak hesaplandı.

Tablo 7: PBMC Varlığında Işın+Effektör hücrelerin etkinliği

H929 oranı	NK92 + PBMC	BCMA NK92 + PBMC	HAŞHAŞİN + PBMC	BCMA HAŞHAŞİN + PBMC	H929 + PBMC
1:1	54,39%	50,55%	49,53%	55,84%	92,16%
5:1	25,58%	24,71%	23,94%	26,33%	92,16%
10:1	14,77%	13,63%	15,23%	13,57%	92,16%

Şekil 19: PBMC+H929 hattında Effektör hücrelerin etkinliği (%)



H929+PBMC hücre hattımızda başlangıçta m-cherry ile işaretlenmiş olan myelom hücrelerinin flow sitometride canlılık oranı %92,16 olarak tespit edildi.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %54,39 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %40,98 olarak hesaplandı.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA-NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %50,55 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) BCMA-NK 92'nin myelom hücrelerine etkinliği %45,15 olarak hesaplandı.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %49,58 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %46,26 olarak hesaplandı.

1:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %55,84 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (1:1) BCMA HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %39,41 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %25,58 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (5:1) NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %72,24 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA-NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %24,71 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (5:1) BCMA-NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %73,19 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %23,94 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (5:1) HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %74,02 olarak hesaplandı.

5:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %26,33 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (5:1) BCMA HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %71,43 olarak hesaplandı.

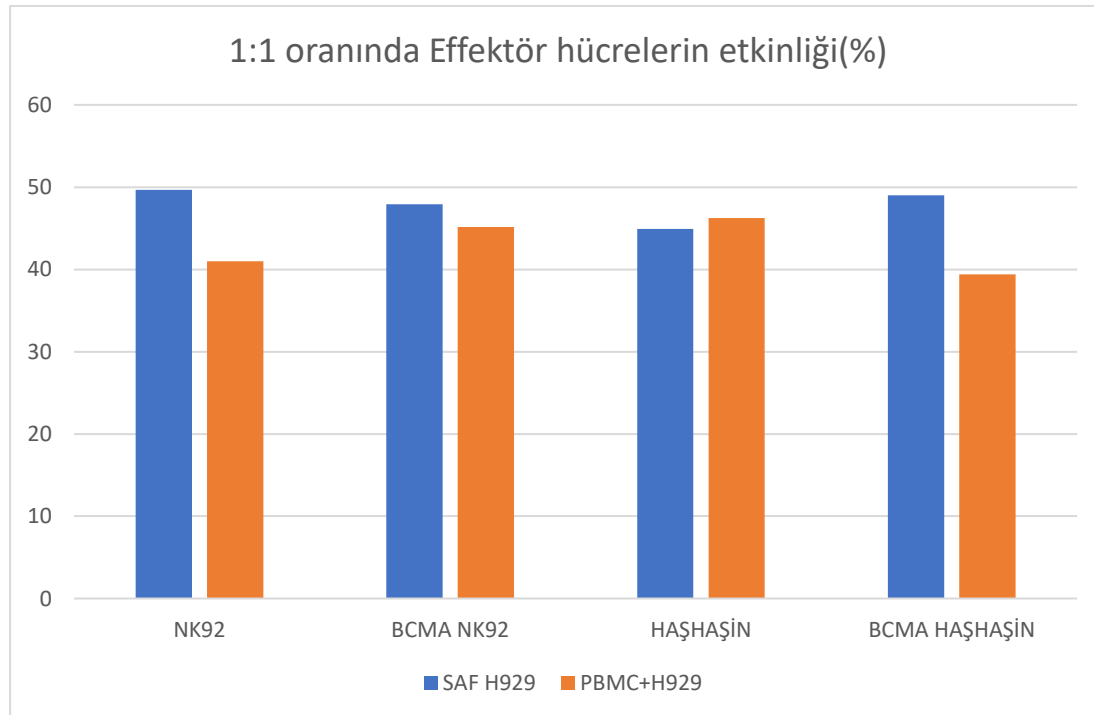
10:1 oranda yaptığımız çalışmada NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %14,77 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) NK 92'nin myelom hücrelerine etkinliği %83,97 olarak hesaplandı.

10:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA-NK92 ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %13,63 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) BCMA-NK 92 nin myelom hücrelerine etkinliği %85,21 olarak hesaplandı.

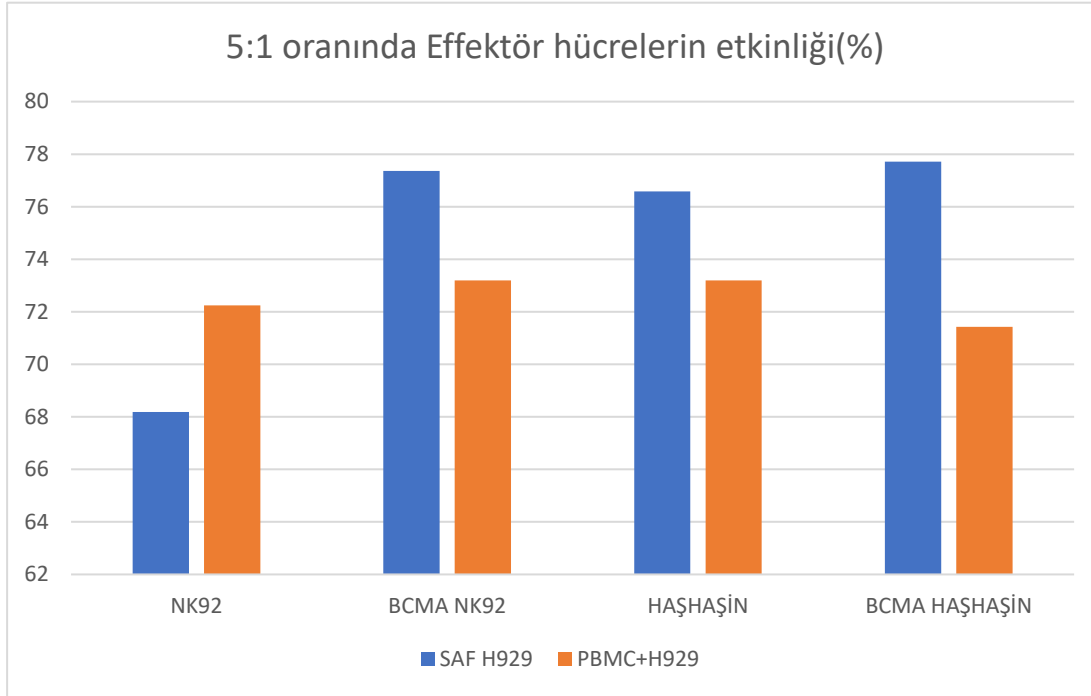
10:1 oranda yaptığımız çalışmada HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %15,23 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %83,47 olarak hesaplandı.

10:1 oranda yaptığımız çalışmada BCMA HAŞHAŞİN ile işlem yapılan hücre hattımızda deney sonunda canlı myelom hücre oranı %13,57 olarak tespit edildi. Çalışmamızda (10:1) BCMA HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkinliği %85,27 olarak hesaplandı.

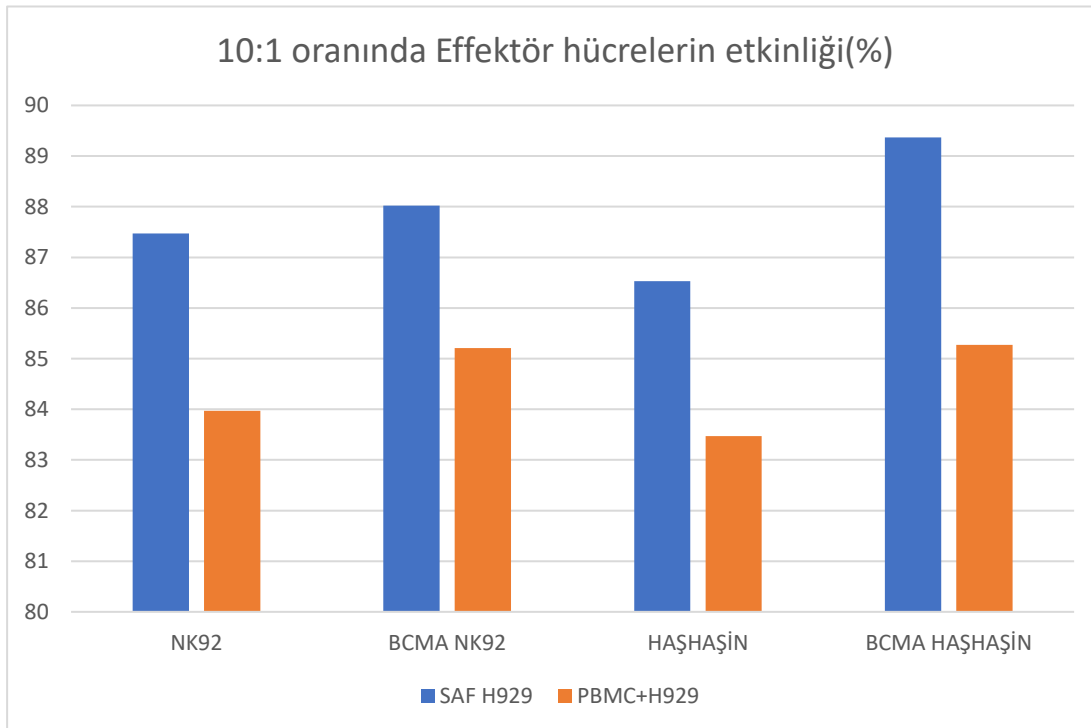
Şekil 20: 1:1 oranında Effektör hücrelerin etkinliği (%)



Şekil 21: 5:1 oranında Effektör hücrelerin etkinliği (%)



Şekil 22: 10:1 oranında Effektör hücrelerin etkinliği (%)



5. TARTIŞMA

Multipl miyelom (MM), tüm kanserlerin %1'ini, hematolojik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturan bir malign plazma hücre neoplazisidir (1,7). Normalde plazma hücrelerinden, IgG-gamma (γ), IgA-alfa (α), IgM-mü (μ), IgD-delta (δ) ve IgE-epsilon (ϵ) gibi farklı ağır zincir ve kappa (κ) ve lambda (λ) gibi hafif zincir özelliklerinde birçok çeşit antikör üretilir. Fakat Plazma hücre diskrazilerinde (PHD) paraprotein veya M proteini olarak isimlendirilen, monoklonal ağır ve hafif zincir antikoru üretimi olur ve kontrolsüz bir şekilde aşırı miktarda birikimi olur (3,4).

MM'li hastaların çoğunda semptomatik dönemde daha sıklıkla plazma hücrelerinin kemiğe veya diğer organlara infiltrasyonu sonucu anemi, litik kemik lezyonları, enfeksiyon ve Ig birikiminden kaynaklanan böbrek fonksiyonlarında bozulmalar oluyor (30).

MM hastalığında kullanılan ilaçlar alkilleyici ajanlar, kortikosteroidler, immünomodülatör ilaçlar ve proteazom inhibitörleri olarak sınıflandırılır (68). Bu ana sınıf ilaçlar tabloxxx de belirtilmiştir.

MM hastalığının tedavisinde İmmünomodülatör ilaçlar ve Proteozom inhibitörleri ilaçların kullanılmaya başlanmadan önce 5 yıllık genel sağkalım %25-34 iken son yıllarda uygulanan tedavilerle birlikte bu oran %49-56'ya çıkmıştır. Günümüzde verilen tedavilerin gelişmesi ile MM hastalarının medyan sağkalım sürelerinin 7 yılın üzerine çıktığı bildirilmektedir. Tedavide yaşanan bu kadar olumlu sürece rağmen MM henüz tam kür sağlana bilen bir hastalık kategorisinde değildir (11).

Yeni teşhis edilen MM hastalarına yaklaşımımızda başlıca iki ana faktör, otolog kök hücre transplantasyonu (OKHT) için uygunluk ve risk sınıflandırmasıdır. Bu iki faktöre dayalı semptomatik yeni tanı konmuş MM'nin tedavisi için mevcut algoritmalar Şekil 1'de gösterilmektedir (68).

OKHT, MM'de iyileştirici değildir, ancak medyan OS'yi ~12 ay kadar iyileştirir (86; 87; 88; 89; 90).

MM'li hastaların neredeyse tümü sonunda nüks eder. Aslında MM, çoklu remisyon ve relapslarla karakterize bir hastalıktır. Modern tedavi ile, MM'nin ilk nüksü, ilk tanıyı takip eden ~3-4 yıl sonra ortaya çıkar. Sonraki her remisyon daha kısa sürelidir. MM'li birçok hasta, birkaç

yıl boyunca ardışık bir şekilde beş veya daha fazla tedavi şeması alır. Nükseden MM'de remisyon süresi her rejimde azalmaktadır (106). Nüks hastalarına tedavi yaklaşımı şekil 2'de özetlenmiştir.

Tüm tedavilere rağmen kür sağlanamadığı için MM'da yeni tedavi seçenekleri araştırılmakta ve preklinik ve klinik olarak denenmektedir. Bu seçenekler arasında en heyecan verici seçeneklerden biri BCMA hedefleyen CAR-T hücreleridir (134).

CAR-T hücrelerinin multipl miyelomda (MM) etkileyici ön etkinliğine rağmen, NK hücre mühendisliği rekabetçi ve daha güvenli bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. NK-92, daha önce klinik deneylerde kullanılan evrensel, ucuz ve hızlı bir hücresel tedavidir. MM'de bu hücrelerle mütevazı tepkiler bildirilmiş olsa da, onkolitik potansiyelleri genetik modifikasyonla arttırılabilir. Şimdiye kadar, CAR NK-92 ile MM'ye karşı, CD138 veya CS1'i (SLAMF7) hedef alan iki klinik öncesi çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, sırasıyla hedef dışı tümör etkisi veya fratrisit (kardeş hücre katli) nedeniyle klinik sonuçları hakkında hala makul şüpheler vardır. Bu nedenle, çalışmamızın amacı, MM tedavisi için yeni CAR NK-92 modifikasyonu ürününü üretmek ve etkinliğini test etmektir.

Bu sebeple biz de çalışmamızda insan myelom hücre hattı olan H929 hücreleri üzerinde Labcell üretimi olan BCMA CAR, CD16, IL12 eksprese eden NK92 hücrelerinin (BCMA CAR HAŞHAŞİN) invitro etkinlik çalışmasını yaptık.

Çalışmamızda hem saf H929 myelom hücre hattına, hem de PBMC eklenmiş H929 hücre hattına (H929+PBMC) ayrı-ayrılıkta 1:1, 5:1, 10:1 nispetinde NK92, BCMA+NK92, HAŞHAŞİN, BCMA HAŞHAŞİN hücreleri eklenerek Myelom hücrelerinin flow sitometri yöntemiyle canlılık oranlarını tespit ettik.

Saf H929 ve H929+PBMC gruplarımız arasında etkinlik kıyaslandığı zaman NK92 ve HAŞHAŞİN etkisi (1:1, 5:1, 10:1) her iki hücre hattında da bir birine tam üstünlük sağlayacak sonuçlar vermemiştir. Fakat BCMA NK92 ve BCMA HAŞHAŞİN saf H929 hücre hattında, H929+PBMC hücre hattına kıyasla daha etkili olmuştur. Bu etkinlik üstünlüğü 1:1, 5:1, 10:1 oranlarının hepsinde sağlanmıştır.

İlk anti-BCMA CAR, Ulusal Kansere Enstitüsü (NCI) araştırmacıları tarafından tasarlandı ve bir murin türevi scFv ve in vivo etkinlik gösteren bir retroviral vektör ile dönüştürülmüş bir CD28 kostimülatör alanından oluşuyordu (159). Daha sonra MM'li relaps refrakter hastalarda BCMA CAR T hücrelerinin (CAR BCMA) insanda ilk faz I doz yükseltme klinik denemesini

gerçekleştirdiler. Dört doz seviyesi, 0.3 x 10⁶ ila 9 x 10⁶ hücre/kg aralığındaydı. İlk üç doz seviyesi fazla toksisite veya etkinlik göstermedi. En yüksek doz seviyesinde 9 x 10⁶ hücre/kg'da hem toksisiteler hem de tepkiler görüldü, ilk iki hastada ciddi bir sitokin salma sendromu (CRS) ve uzun süreli sitopeniler gelişti. Bu önemli toksisite ve CRS derecesinin tümör yükü ile ilişkili olduğu endişesi nedeniyle, daha sonra < %30 kemik iliği tutulumu olan hastalarda bu en yüksek doz seviyesinde uygunluğu sınırladılar. Medyan 9.5 önceki tedavi hattına sahip toplam 16 hasta, 9 x 10⁶ hücre/kg ile tedavi edildi. %63 $\geq$ VGPR ile %81'lik bir ORR ($\geq$ PR) ve 7.1 aylık medyan olaysız sağkalım bildirdiler. Yanıt veren ($\geq$ PR) 11 hasta vardı ve ayrıca MKH durumu açısından değerlendirildi. Hepsinde kemik iliği MKH negatifti. Bu dozda hastaların %94'ünde (%60 derece 3-4) CRS gelişti ve bu tüm hastalarda düzeldi. Bu hastalardan alınan periferik kan analizi, infüzyondan 6-9 gün sonra oldukça farklılaşmış CD8⁺ CAR-T hücrelerinin artışı gösterdi ve bu daha yüksek genişleme seviyeleri, anti-MM yanıtları ile ilişkili olduğu saptanmıştır (160; 161).

Yapılan bir diğer çalışmada NKG2D-CAR NK ve altın standart BCMACAR arasında, yüksek oranda ve benzer BCMA ve NKG2DL ekspresyonuna sahip MM hücre hatlarına karşı önemli bir fark tespit edilmemiştir. Ayrıca, hedef ligandların tümör üzerindeki ekspresyonu ile her iki CAR'ın etkinliği arasındaki korelasyon da gösterilmiştir. CAR NK-92MI üzerinde çalışılan popülasyonların hiçbirisi sağlıklı donörlerden alınan PBMC'lere karşı toksisite göstermediği ve in vivo MM ortotopik ksenograft fare modeli deneyleri devam ettiği belirtilmiştir (162).

6.SONUÇ

Yapılan in vitro etkinlik çalışmamızda en düşük dozda bile (1:1) NK92 hücrelerinin Myelom üzerinde %50 etkili, yüksek dozlarda (10:1) ise etkinlik oranının %90'a yaklaştığı tespit edildi. Elde ettiğimiz bu değerler klinik çalışmalarda gösterilmiş NK92 antimyelom etkisi ile doğru orantılı bulunmuştur. Fakat çalışmamızdaki BCMA NK92, HAŞHAŞİN ve BCMA CAR HAŞHAŞİN'in myelom hücrelerine etkisi istatistiksel olarak belirgin bir üstünlük sağlayamamıştır. Bunun sebebi olarak kullandığımız konstraktın planlanan etkiyi sağlamaması; özellikle CD8a, NKG2D TM, 2B4 ve CD3zeta bölgelerinin herhangi birinde veya birkaçında etkileşimde sorun olduğu düşünülmektedir. Konstraktın yeni dizaynı ile bu çalışmanın tekrar yapılması planlanmakta ve daha etkili bir sonuç elde edilmesi beklenmektedir.

7.KAYNAKLAR

- 1.SV Rajkumar, S Kumar. Multiple myeloma: diagnosis and treatment- Mayo Clinic Proceedings, 2016.
2. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. Semin Oncol Nurs. 2017; 33(3): 225-36.
- 3.Soh K. T., Tario J. D. Jr, Wallace P. K. Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry. *Clin Lab Med*. 2017; 37(4): 821-853. doi:10.1016/j.cll.2017.08.001.
4. Kyle RA, Rajkumar SV, Lust JA. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Multiple Myeloma. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B editors. Wintrobe's clinical hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.2565-2581, 2004.
5. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. A long term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. N. Engl. J. Med 2002; 346:564-569
6. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood. 2009;113(22):5412-7.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019; 69(1): 7-34.
8. Cancer Statistics Review, 1975-2013 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review [Internet]. [cited 2021 Apr 11]. Available from: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/
9. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, Anderson WF, Weiss BM, Kristinsson SY, et al. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: A population-based study. Blood [Internet]. 2010 Dec 16 [cited 2021 Apr 11];116(25):5501–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20823456/>
10. Multiple Myeloma: Statistics Approved by the Cancer.Net Editorial Board, 08/2021.
11. Türk Hematoloji Derneği Multipl Myelom Tanı ve Tedavi Kılavuzu, Mart 2020.

12. Kyle R, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009; 23(1):3.
13. Barwick B. G., Gupta V. A., Vertino P. M., Boise L. H. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2019;10:1121. doi: 10.3389/fimmu.2019.01121
14. Boyle E. M., Davies F. E., Leleu X., Morgan G. J. Understanding the multiple biological aspects leading to myeloma. *Haematologica*. 2014;99(4):605-12. doi: 10.3324/haematol.2013.097907.
15. Engelhardt M., Terpos E., Kleber M., Gay F., Wäsch R., Morgan G., ve ark. European Myeloma Network. European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2014;99(2):232-42. doi: 10.3324/haematol.2013.099358.
16. Morgan, G. J., Walker, B. A., & Davies, F. E. (2012). The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), 335–348. doi:10.1038/nrc3257.
17. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. Vol. 374, *The Lancet*. 2009. p. 324–39.
18. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Gavriatopoulou M., Dimopoulos M. A. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J*. 2018;8(1):7. doi: 10.1038/s41408-017-0037-4.
19. Antonio P, Anderson K. Medical Progress Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 2011; 364:1046-60.
20. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004; 104(3): 607-11.
21. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017; 3:1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>.
22. Türk Hematoloji Derneği Hematolog. 3-1. Plazma Hücreleri ve İmmünoglobulinler, 2013:8-16.

23. Kumar S. K., Rajkumar S.V. The multiple myelomas - current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(7):409-421.
24. Castaneda O., Baz R. Multiple Myeloma Genomics - A Concise Review. *Acta Med Acad*. 2019;48(1):57-67. doi: 10.5644/ama2006-124.242.
25. Kuehl W. M., Bergsagel P. L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:175-187.
26. Corthals S. L., Sun S. M., Kuiper R., ve ark. MicroRNA signatures characterize multiple myeloma patients. *Leukemia*. 2011;25:1784-1789
27. Hanamura I., Stewart J. P., Huang Y., ve ark. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 2006;108:1724-1732.
28. Bozkurt S., Okay M., Sağlam F., Haznedaroğlu Cİ. Retrospective evaluation of chromosome 1 anomalies in hematological malignancies: A single center study. *Genetics&Applications*. 2019; 3; 17-24.
29. Webb S. L., Edwards C. M. Novel therapeutic targets in myeloma bone disease. *Br J Pharmacol*. 2014;171(16):3765-76. doi: 10.1111/bph.12742.
30. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2022 Feb 17];78(1):21–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12528874/>
31. Mikhael J, Ismaila N, Cheung MC, Costello C, Dhodapkar M V., Kumar S, et al. Treatment of multiple myeloma: ASCO and CCO joint clinical practice guideline. Vol. 37, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2019. p. 1228–63.
32. The Clonal Lymphoid and Plasma Cell Diseases In: Marshall A. Lichtman M, editor. *Williams Manual of Hematology*. Ninth ed. 2017: McGraw-Hill Education; 2017. p. 641-60.
33. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21-33.

34. Terpos E, Kleber M, Engelhardt M, Zweegman S, Gay F, Kastritis E, et al. European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications. *Haematologica*. 2015;100(10):1254-66.
35. Sonmez M, Akagun T, Topbas M, Cobanoglu U, Sonmez B, Yilmaz M, et al. Effect of pathologic fractures on survival in multiple myeloma patients: a case control study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008;27(1):11
36. Terpos E, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann Oncol*. 2005;16(8):1223-31.
37. Terpos E, Szydlo R, Apperley JF, Hatjiharissi E, Politou M, Meletis J, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*. 2003;102(3):1064-9.
38. Pearce RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11581-6.
39. Raje N, Roodman GD. Advances in the biology and treatment of bone disease in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(6):1278-86.
40. Audard V, Georges B, Vanhille P, Toly C, Deroure B, Fakhouri F, et al. Renal lesions associated with IgM-secreting monoclonal proliferations: revisiting the disease spectrum. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(5):1339-49.
41. Dimopoulos MA, Kastritis E, Rosinol L, Bladé J, Ludwig H. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008;22(8):1485-93.
42. Knudsen LM, Hjorth M, Hippe E. Renal failure in multiple myeloma: reversibility and impact on the prognosis. Nordic Myeloma Study Group. *Eur J Haematol*. 2000;65(3):175-81.
43. Dimopoulos MA, Sonneveld P, Leung N, et al. International Myeloma Working Group Recommendations for the Diagnosis and Management of Myeloma-Related Renal Impairment. *J Clin Oncol*. 2016;34(13):1544-1557.
44. Terpos E, Christoulas D, Gavriatopoulou M. Biology and treatment of myeloma related bone disease. *Metabolism [Internet]*. 2018 Mar 1 [cited 2022 Feb 25];80:80-90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29175022/>

45. Oyajobi BO. Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1(Suppl 1):S4.
46. Niesvizky R, Warrell RP, Jr. Pathophysiology and management of bone disease in multiple myeloma. *Cancer Invest.* 1997;15(1):85-90.
47. Abe M. [Hypercalcemia in myeloma]. *Nihon Rinsho.* 2007;65(12):2245-9.
48. Dispenzieri A, Kyle RA. Neurological aspects of multiple myeloma and related disorders. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005;18(4):673-88.
49. Mohty, B., El-Cheikh, J., Yakoub-Agha, I., Moreau, P., Harousseau, J.-L., & Mohty, M. *Peripheral neuropathy and new treatments for multiple myeloma: background and practical recommendations. Haematologica, 2010;95(2), 311–319.*
50. Richardson PG, Delforge M, Beksac M, Wen P, Jongen JL, Sezer O, et al. Management of treatment-emergent peripheral neuropathy in multiple myeloma. *Leukemia.* 2012;26(4):595-608.
51. Mohty B, El-Cheikh J, Yakoub-Agha I, Moreau P, Harousseau JL, Mohty M. Peripheral neuropathy and new treatments for multiple myeloma: Background and practical recommendations [Internet]. Vol. 95, *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation; 2010 [cited 2022 Feb 27]. p. 311–9. Available from: [/pmc/articles/PMC2817035/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2817035/)
52. Fassas AB, Muwalla F, Berryman T, Benramdane R, Joseph L, Anaissie E, et al. Myeloma of the central nervous system: association with high-risk chromosomal abnormalities, plasmablastic morphology and extramedullary manifestations. *Br J Haematol.* 2002;117(1):103-8.
53. Egan, P. A., Elder, P. T., Deighan, W. I., O'Connor, S. J. M., & Alexander, H. D. *Multiple myeloma with central nervous system relapse. Haematologica, haematol.2020.248518.* doi:10.3324/haematol.2020.248518
54. Mehta J, Singhal S. Hyperviscosity syndrome in plasma cell dyscrasias. *Semin Thromb Hemost.* 2003;29(5):467-71.
55. Angelova EA, Li S, Wang W, Bueso-Ramos C, Tang G, Medeiros LJ, et al. IgM plasma cell myeloma in the era of novel therapy: a clinicopathological study of 17 cases. *Hum Pathol.* 2019;84:321-34.

56. Bladé, J., & Rosiñol, L. Complications of multiple myeloma. *Hematology/oncology clinics of North America*, 2007;21(6), 1231-1246.
57. Bladé J, Rosiñol L. Renal, hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005;18(4):635-52.
58. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist UH, Landgren O, Björkholm M, Hultcrantz M, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015;100(1):107-13.
59. Nucci M, Anaissie E. Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents. *Clin Infect Dis*. 2009;49(8):1211-25.
60. Türk Hematoloji Derneği Multipl Myelom Tanı ve Tedavi Kılavuzu Mart 2020
61. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014 Nov;15(12): e538-48.
62. Fonseca R, Bergsagel P, Drach J, Leukemia JS-, 2009 undefined. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *nature.com* [Internet]. [cited 2022 May 17]; Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2009174>
63. Dimopoulos M, Kyle R, Blood JF-, Journal T, 2011 undefined. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *ashpublications.org* [Internet]. [cited 2022 May 17]; Available from: <https://ashpublications.org/blood/articleabstract/117/18/4701/21362>
64. Kyrtsolis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N, Sachanas S, Tzenou T, Papadogiannis A, et al. Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007 May;137(3):240–3.
65. Snozek C, Katzmann J, Kyle R, Leukemia AD-, 2008 undefined. Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. *nature.com* [Internet]. [cited 2022 May 18]; Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2008171>

66. Multiple myeloma: Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis - UpToDate [Internet]. [cited 2022 May 18]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/multiple-myeloma-clinical-features-laboratorymanifestations-and-diagnosis?search=multipilmyeloma&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1
67. Dimopoulos M, Terpos E, Comenzo RL, Tosi P, Beksac M, Sezer O, et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma [Internet]. Vol. 23, Leukemia. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2022 May 18]. p. 1545
56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19421229/>
68. Rajkumar, S.V., Kumar, S. Multiple myeloma current treatment algorithms. *Blood Cancer J.* 10, 94 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00359-2>
69. Durie, B. G. M. et al. Bortezomib, lenalidomide and dexamethasone vs. lenalidomide and dexamethasone induction followed by lenalidomide and dexamethasone maintenance in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem cell transplant: results of the Randomised Phase III SWOG Trial S0777. *Lancet* 389, 519–527 (2017).
70. Attal, M. et al. Autologous transplantation for multiple myeloma in the era of new drugs: a phase III study of the Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM/DFCI 2009 Trial). *Blood* 126, 391 (2015).
70. Facon, T. et al. Daratumumab plus lenalidomide and dexamethasone for untreated myeloma. *N. Engl. J. Med.* 380, 2104–2115 (2019).
71. Kapoor, P. & Rajkumar, S. V. MAIA under the microscope—bringing trial design into focus. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 339–40 (2019).
72. Voorhees, P. M. et al. Daratumumab, lenalidomide, bortezomib, & dexamethasone for transplant-eligible newly diagnosed multiple myeloma: GRIFFIN. *Blood* 136, 936–945 (2020).
73. Moreau, P. et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, openlabel, phase 3 study. *Lancet* 394, 29–38 (2019).
74. Kumar, S. K. et al. Carfilzomib or bortezomib in combination with lenalidomide and dexamethasone for newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-

cell transplant (E1A11): a multicenter, open label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30452-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30452-6) (2020).

75. Barlogie, B. et al. Incorporating bortezomib into upfront treatment for multiple myeloma: early results of total therapy 3. *Br. J. Haematol.* 138, 176–85 (2007).

76. Mateos, M. V. et al. Subcutaneous versus intravenous daratumumab in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (COLUMBA): a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 7, e370–e380 (2020).

77. Mateos, M. V., Oriol, A. & Martinez-Lopez, J. Bortezomib/melphalan/prednisone (VMP) versus bortezomib/thalidomide/prednisone (VTP) as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib/thalidomide (VT) versus bortezomib/prednisone (VP): a randomised trial in elderly untreated patients with multiple myeloma older than 65 years. *Lancet Oncol.* 11, 934–941 (2010)

78. Palumbo, A. et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J. Clin. Oncol.* 28, 5101–5109 (2010)

79. Moreau, P. et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol.* 12, 431–40 (2011)

80. Rajkumar, S. V. et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 11, 29–37 (2010)

81. Kumar, S. et al. Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide-, or bortezomib-containing regimens. *Blood* 114, 1729–1735 (2009)

82. Palumbo, A. et al. Aspirin, warfarin, or enoxaparin thromboprophylaxis in patients with multiple myeloma treated with thalidomide: a phase III, open-label, randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 29, 986–993 (2011).

83. Larocca, A. et al. Aspirin or enoxaparin thromboprophylaxis for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with lenalidomide. *Blood* 119, 933–939 (2011).

84. Palumbo, A. et al. Prevention of thalidomide- and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia* 22, 414–423 (2008).

85. Drayson, M. T. et al. Levofloxacin prophylaxis in patients with newly diagnosed myeloma (TEAMM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 20, 1760–72 (2019).

86. Child, J. A. et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 348, 1875–83 (2003).

87. Fermand, J. P. et al. High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Myelome-Autogreffe. *J. Clin. Oncol.* 23, 9227–33 (2005).

88. Palumbo, A. et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 371, 895–905 (2014).

89. Gay, F. et al. Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 16, 1617–1629 (2015).

90. Attal, M. et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone with transplantation for myeloma. *N. Engl. J. Med.* 376, 1311–1320 (2017).

91. Gertz, M. A. et al. Autologous stem cell transplantation in 716 patients with multiple myeloma: low treatment-related mortality, feasibility of outpatient transplantation, and impact of a multidisciplinary quality initiative. *Mayo Clin. Proc.* 83, 1131–1135 (2008).

92. Kumar, S. K., Buadi, F. K. & Rajkumar, S. V. Pros and cons of frontline autologous transplant in multiple myeloma: the debate over timing. *Blood* 133, 652–659 (2019).

93. Fermand, J. P. et al. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 92, 3131–3136 (1998).

94. Facon, T. et al. Front-line or rescue autologous bone marrow transplantation (ABMT) following a first course of high dose melphalan (HDM) in multiple myeloma (MM). Preliminary results of a prospective randomized trial (CIAM) protocol. *Blood* 88, 685a (1996).

95. Attal, M. et al. Autologous transplantation for multiple myeloma in the era of new drugs: a phase III study of the Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM/DFCI 2009 Trial). *Blood* 126, 391 (2015).
96. Stadtmauer, E. A. et al. Comparison of autologous hematopoietic cell transplant (autoHCT), bortezomib, lenalidomide (Len) and dexamethasone (RVD) consolidation with len maintenance (ACM), tandem autohct with len maintenance (TAM) and autohct with len maintenance (AM) for up-front treatment of patients with multiple myeloma (MM): primary results from the randomized phase III trial of the blood and marrow transplant clinical trials network (BMT CTN 0702-StaMINA Trial). *Blood* 2016;128:LBA-1-LBA-1.
97. Cavo, M. et al. Double autologous stem cell transplantation significantly prolongs progression-free survival and overall survival in comparison with single autotransplantation in newly diagnosed multiple myeloma: an analysis of phase 3 EMN02/HO95 study. *Blood* 130, 401 (2017).
98. Cavo, M. et al. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation versus bortezomib-melphalan-prednisone, with or without bortezomiblenalidomide-dexamethasone consolidation therapy, and lenalidomide maintenance for newly diagnosed multiple myeloma (EMN02/HO95): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Haematol.* 7, e456–e468 (2020).
99. Attal, M. et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 366, 1782–1791 (2012).
100. McCarthy, P. L. et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 366, 1770–1781 (2012).
101. Sonneveld, P. et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J. Clin. Oncol.* 30, 2946–2955 (2012).
102. Palumbo, A. et al. Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 366, 1759–1769 (2012).
103. Benboubker, L. et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N. Engl. J. Med.* 371, 906–917 (2014).

104. Nooka, A. K. et al. Consolidation and maintenance therapy with lenalidomide, bortezomib and dexamethasone (RVD) in high-risk myeloma patients. *Leukemia* 28, 690–693 (2014).
105. Dimopoulos, M. A. et al. Oral ixazomib maintenance following autologous stem cell transplantation (TOURMALINE-MM3): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 393, 253–264 (2019).
106. Kumar, S. K. et al. Clinical course of patients with relapsed multiple myeloma. *Mayo Clin. Proc.* 79, 867–874 (2004).
107. Lonial, S. et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 373, 621–631 (2015).
108. Stewart, A. K. et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 372, 142–152 (2015).
109. Siegel, D. S. et al. Improvement in overall survival with carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 36, 728–734 (2018).
110. Moreau, P. et al. Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 374, 1621–1634 (2016).
111. Dimopoulos, M. A. et al. Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 375, 1319–1331 (2016).
112. Palumbo, A. et al. Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 375, 754–766 (2016).
113. San-Miguel, M. D. J. F., Hungria, V. T. M. & Yoon, M. D. S. Randomized phase 3 trial of the deacetylase inhibitor panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15, 1195–1206 (2014).
114. San Miguel, J. et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus highdose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14, 1055–1066 (2013).

115. Dimopoulos, M. A. et al. Carfilzomib or bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): an interim overall survival analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 18, 1327–1337 (2017).
116. Attal, M. et al. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet* 394, 2096–2107 (2019).
117. Dimopoulos, M. A. et al. Elotuzumab plus lenalidomide/dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma: ELOQUENT-2 follow-up and posthoc analyses on progression-free survival and tumour growth. *Br. J. Haematol.* 178, 896–905 (2017).
118. Rajkumar, S. V. & Kyle, R. A. Progress in myeloma—a monoclonal breakthrough. *N. Engl. J. Med.* 375, 1390–1392 (2016).
119. Chari, A. et al. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 130, 974–981 (2017).
120. Bringhen, S. et al. Once-weekly carfilzomib, pomalidomide, and low-dose dexamethasone for relapsed/refractory myeloma: a phase I/II study. *Leukemia* 32, 1803–1807 (2018).
121. Dimopoulos, M. A. et al. Elotuzumab plus pomalidomide and dexamethasone for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 379, 1811–1822 (2018).
122. Kropff, M. et al. Bortezomib and low-dose dexamethasone with or without continuous low-dose oral cyclophosphamide for primary refractory or relapsed multiple myeloma: a randomized phase III study. *Ann. Hematol.* 96, 1857–1866 (2017).
123. Richardson, P. G. et al. Pomalidomide, bortezomib, and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma previously treated with lenalidomide (OPTIMISMM): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 20, 781–794 (2019).
124. Pineda-Roman, M. et al. VTD combination therapy with bortezomibthalidomide-dexamethasone is highly effective in advanced and refractory multiple myeloma. *Leukemia* 22, 1419–1427 (2008).

125. Richardson, P. G. et al. Multicenter, phase I, dose-escalation trial of lenalidomide plus bortezomib for relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 27, 5713–5719 (2009).
126. Richardson, P. G. et al. Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. *Blood* 123, 1826–1832 (2014).
127. Siegel, D. S. et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 120, 2817–2825 (2012).
128. Bringhen, S. et al. Once-weekly versus twice-weekly carfilzomib in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a pooled analysis of two phase I/II studies. *Haematologica* 104, 1640–1647 (2019).
129. Chari, A. et al. Oral selinexor-dexamethasone for triple-class refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 381, 727–738 (2019).
130. Dimopoulos M. A., et al. Weekly selinexor, bortezomib, and dexamethasone (SVd) versus twice weekly bortezomib and dexamethasone (Vd) in patients with multiple myeloma (MM) after one to three prior therapies: initial results of the phase III BOSTON study. *Proc. ASCO Annual Meeting Abstracts*, A8501(2020).
131. Laubach, J. et al. Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia* 30, 1005–1017 (2016).
- 132-80. Kumar, S. et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/ refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood* 130, 2401–2409 (2017).
133. Rajan, A. M., Buadi, F. K. & Rajkumar, V. Effective use of panobinostat in combination with other active agents in myeloma in a novel five-drug combination: case report and interesting observations. *Am. J. Hematol.* 91, E5–E6 (2016).
134. Raje, N. et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 380, 1726–1737 (2019).
135. Lonial, S. et al. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 21, 207–221 (2020).

136. Topp, M. S. et al. Anti-B-cell maturation antigen BiTE molecule AMG 420 induces responses in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.* 38, 775–783 (2020).
137. Kumar, S. & Rajkumar, S. V. BiTEing the tumor. *J. Clin. Oncol.* 38, 2077–2079 (2020).
138. Bjorklund, C. C. et al. Ixerdomide (CC-220) is a potent cereblon E3 ligase modulator with antitumor and immunostimulatory activities in lenalidomide and pomalidomide-resistant multiple myeloma cells with dysregulated CRBN. *Leukemia* 34, 1197–1201 (2020).
139. Tanaka J. (2021). Recent advances in chimeric antigen receptor natural killer cell therapy for overcoming intractable hematological malignancies. *Hematological oncology*, 39(1), 11–19. <https://doi.org/10.1002/hon.2802>
140. Klingemann HG, Martinson J (2004) Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 6:15–22
141. Chu J, Deng Y, Benson DM, et al. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(4):917-927.
142. Wang, W. N., Zhou, G. Y., & Zhang, W. L. (2017). NK-92 cell, another ideal carrier for chimeric antigen receptor. *Immunotherapy*, 9(9), 753–765. <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0022>
143. Zhang, J., Zheng, H., & Diao, Y. (2019). Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 317. <https://doi.org/10.3390/ijms20020317>
144. Domogala, A.; Madrigal, J.A.; Saudemont, A. Natural Killer Cell Immunotherapy: From Bench to Bedside. *Front. Immunol.* 2015, 6, 264.
145. Boissel, L.; Betancur, M.; Lu, W.; Krause, D.; Van Etten, R.; Wels, W.; Klingemann, H. Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncoimmunology* 2014, 2, e26527.
146. Mehta, R.S.; Rezvani, K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunol.* 2018, 9, 283.

147. Gong, J.H.; Maki, G.; Klingemann, H.G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994, 8, 652–658.
148. Glienke, W.; Esser, R.; Priesner, C.; Suerth, J.D.; Schambach, A.; Wels, W.S.; Grez, M.; Kloess, S.; Arseniev, L.; Koehl, U. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Front. Pharmacol.* 2015, 6, 21.
149. Ma T, Shi J, Liu H. Chimeric antigen receptor T cell targeting B cell maturation antigen immunotherapy is promising for multiple myeloma. *Ann Hematol* 2019 Apr;98(4):813–22. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-03592-9>. Epub 2019 Jan 28.
150. Ghosh A, Mailankody S, Giralt SA, Landgren CO, Smith EL, Brentjens RJ. CAR T cell therapy for multiple myeloma: where are we now and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 2018;59(9):2056–67.
151. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med* 2012;14(6):405–15.
152. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16011.
153. Shah UA, Smith EL. Multiple myeloma, targeting B-cell maturation antigen with chimeric antigen receptor T-cells. *Cancer J* 2019;25(3):208–16.
154. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Rose JJ, Raffeld M, Yang S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2013;19(8):2048–60.
155. Hengeveld PJ, Kersten MJ. B-cell activating factor in the pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Canc J* 2015;5:e282.
156. Cho SF, Anderson KC, Tai YT. Targeting B cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: potential uses of BCMA-based immunotherapy. *Front Immunol* 2018;9:1821.
157. Khattar P, Pichardo J, Jungbluth A, Gao Q, Smith EL, Roshal M, et al. B- cell maturation antigen is exclusively expressed in a wide range of B-cell and plasma cell neoplasm and in a potential therapeutic target for bcma directed therapies. *Blood* 2017;130(Suppl 1):2755.

158. Shah, U. A., & Mailankody, S. (2020). CAR T and CAR NK cells in multiple myeloma: Expanding the targets. *Best practice & research. Clinical haematology*, 33(1), 101141. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2020.101141>
159. Carpenter RO, Evbuomwan MO, Pittaluga S, Rose JJ, Raffeld M, Yang S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2013;19(8):2048–60.
160. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood* 2016;128(13):1688–700.
161. Brudno JN, Maric I, Hartman SD, Rose JJ, Wang M, Lam N, et al. T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2018;36(22):2267–80.
162. Martín, Elena Maroto et al. Exploring NKG2D and BCMA-CAR NK-92 for Adoptive Cellular Therapy to Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, Volume 19, Issue 10, e24- e25.