

Nowe cele terapii ukierunkowanej w nowotworach układu chłonnego z perspektywy ostatnich 5 lat badań

New therapeutic targets in lymphoid malignancies — 5-year research perspective

Przemysław Juszczynski

Pracownia Hematologii Doświadczalnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Badania translacyjne nad nowotworami układu chłonnego w perspektywie ostatnich 5 lat były wyjątkowo fascynującym i owocnym okresem. Przyczyniły się do tego nowe możliwości technologiczne, rozwój mocy obliczeniowych i bioinformatyki, a także współpraca ośrodków akademickich i przemysłu. Z perspektywy 5 lat i wpływu tych badań na praktykę kliniczną za szczególnie ważne należy uznać wyniki badań dotyczących epigenetycznych mechanizmów regulacji funkcji genomu, badań nad rolą receptora B-komórkowego oraz mechanizmów immunomodulacyjnych dotyczących nowotworu. Te obszary badawcze doprowadziły do rejestracji nowych leków, a ich potencjał translacyjny będzie najprawdopodobniej dalej rozwijany w kolejnych latach.

Słowa kluczowe: nowotwory układu chłonnego, sygnał BCR, zmiany epigenetyczne, mikrośrodowisko, immunomodulacja, leczenie celowane

Hematologia 2015; 6, 1: 1–9

Abstract

Translational studies on lymphoid malignancies have been, over the last 5 years, particularly intriguing and productive/fruitful. New discoveries have been fuelled by new technological research platforms, increasing computational powers, advances in bioinformatics and increasing academic-biotech/pharmaceutical partnerships. In some cases, this has led to vital advances in clinical practice where discoveries in epigenetic mechanisms were particularly significant in the regulation of human genome function, B-cell receptor signalling and tumour-associated immune escape mechanisms. It is very likely that the translational potential of these findings will thus be further developed in the future.

Key words: lymphoid malignancies, BCR signaling, epigenetic modifications, microenvironment, immunomodulation, targeted therapy

Hematologia 2015; 6, 1: 1–9

Adres do korespondencji: Przemysław Juszczynski, Pracownia Hematologii Doświadczalnej, Zakład Diagnostyki Hematologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: pjuszczynski@ihit.waw.pl

Wprowadzenie

Badania translacyjne nad nowotworami układu chłonnego w perspektywie ostatnich 5 lat były wyjątkowo fascynującym i owocnym okresem. Przyczyniły się do tego nowe możliwości technologiczne umożliwiające wielkoprzepustowe sekwencjonowanie genomu i badanie mechanizmów epigenetycznych odpowiadających za jego funkcjonowanie, rozwój mocy obliczeniowych i bioinformatyki, a także zacieśniająca się współpraca ośrodków akademickich i przemysłu. Coraz większą złożonością charakteryzowały się modele eksperymentalne pozwalające na określenie wpływu mikrośrodowiska na wzrost nowotworów układu chłonnego. Zmiany te doprowadziły, z jednej strony, do lawinowej identyfikacji sprawczych zaburzeń genetycznych, a z drugiej — do masowego testowania małowzrastkowych inhibitorów zmutowanych białek i badań biocząstek. Z perspektywy ostatnich lat i wpływu tych badań na praktykę kliniczną za szczególnie ważne należy uznać te, które pozwoliły bliżej poznać epigenetyczne mechanizmy regulujące funkcjonowanie genomu i których translacyjny potencjał będzie najprawdopodobniej dalej rozwijany w kolejnych latach. Do rejestracji nowych, skutecznych według pierwszych doniesień, leków doprowadziły badania nad rolą sygnału receptora B-komórkowego (BCR, *B-cell receptor*), a badania nad rolą mikrośrodowiska i mechanizmów immunomodulacyjnych dotyczących nowotworu pozwalają wykorzystywać potencjał układu odpornościowego do walki z nowotworem.

Mechanizmy epigenetyczne

Opublikowanie pierwszego draftu genomu człowieka 15 lat temu otworzyło drogę do dalszych badań, których celem było poznanie mechanizmów jego funkcjonowania. Ostatnie 5 lat przyniosło znaczny postęp w zrozumieniu roli struktury chromatyny warunkującej dostępność DNA dla aparatu transkrypcyjnego. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają modyfikacje epigenetyczne, w tym modyfikacje kowalencyjne białek histonowych, metylacja DNA oraz mechanizmy pozycjonowania nukleosomów [1]. Mechanizmy te wpływają na ekspresję genów poprzez utrzymanie otwartej, permisywnej struktury chromatyny dostępnej dla czynników transkrypcyjnych lub na jej upakowanie i transkrypcyjne wyciszenie. Modyfikacje epigenetyczne stanowiące sygnał dla aktywacji i represji mogą ze sobą współistnieć (chromatyna „dwuwartościowa” — *bivalent marks*), a usunięcie

jednych lub drugich podczas różnicowania komórki decyduje o wyciszeniu lub aktywacji danego regionu chromatyny i losie komórki [2]. Modyfikacje epigenetyczne mają ponadto charakter hierarchiczny i kooperatywny, ostateczny efekt modyfikacji zależy zatem od całego szeregu współistniejących zmian.

Komórki nowotworowe wykazują wiele podobieństw — zarówno w zakresie aktywności kompleksów enzymatycznych odpowiedzialnych za modyfikacje epigenetyczne, jak i samych modyfikacji — do komórek macierzystych/progenitorowych [2]. Zaburzona regulacja epigenetyczna w komórkach nowotworowych może zatem warunkować ich podobieństwo do komórek macierzystych (*stemness*) i zwiększać potencjał ich odnawialności. Komórki nowotworowe wykazują ponadto różnice w stosunku do prawidłowych, zróżnicowanych komórek im odpowiadających, dotyczące modyfikacji epigenetycznych wyłączających ekspresję nowotworowych genów supresorowych oraz antygenów związanych z nowotworem. Deregulacja epigenetyczna tych genów sprzyja zatem proliferacji i oporności na apoptozę oraz zmniejsza immunogenność komórek nowotworowych.

Enzymy warunkujące określone modyfikacje epigenetyczne mogą być również przedmiotem aberracji strukturalnych zmieniających ich aktywność. Mutacje w genach acetylotransferaz histonowych *CREBBP* (*CREB binding protein*) i *EP300* (*E1A binding protein p300*) są częstym zjawiskiem — obserwowanym u 36% chorych z chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) i 40% osób z chłoniakiem grudkowym (FL, *follicular lymphoma*) [3]. Mutacje te występowały w sposób wzajemnie się wykluczający i powodowały utratę funkcji kodowanych białek. Mutacje genu innego enzymu, *EZH2* (*enhancer of zeste 2, polycomb repressive complex 2 subunit*), wykazującego katalityczną aktywność metylotransferazy lizyny K27 histonu H3, są częstym zaburzeniem w postaciach *germinal center B-cell-like* DLBCL (GCB-DLBCL) [4–7]. Mutacja dotycząca Tyr641 katalitycznej domeny SET genu *EZH2* powoduje zwiększoną aktywność tego enzymu.

Niektóre zaburzenia w regulacji epigenetycznej w nowotworach układu chłonnego nie mają przyczyn strukturalnych. Redystrybucja i zaburzenia w metylacji DNA są typową cechą chłoniaków związanych z centrum germinacyjnym, w tym DLBCL. Hipermetylacja i wyciszenie ekspresji genów w DLBCL różnicuje ich pochodzenie (GCB *v.* ABC [*activated B-cell-like*]) i stanowi czynnik prognostyczny [1].

Deregulowane mechanizmy epigenetyczne w nowotworach układu chłonnego stanowią obiecujący cel terapeutyczny. Celowana interwencja może dotyczyć acetylacji chromatyny, metylacji DNA lub swoiście deregulowanych enzymów, na przykład EZH2. Po rejestracji inhibitorów deacetylaz histonowych (HDAC, *histone deacetylase inhibitors*) w leczeniu chorych na T-komórkowe chłoniaki nie-Hodgkina (T-NHL, *non-Hodgkin lymphoma*) leki te trafiły do badań klinicznych w B-komórkowych NHL (B-NHL). Obecnie trwają badania z ich użyciem w monoterapii lub w połączeniu z innymi lekami celowanymi lub konwencjonalną immunochemioterapią [8–10]. Na podobnym etapie badań w B-NHL są leki demetylujące. W badaniach przedklinicznych wykazano ponadto aktywność celowanych inhibitorów EZH2; inhibitor EPZ-6438, działający kompetycyjnie w stosunku do donora aktywnych grup metylowych S-adenozylometioniny, selektywnie hamuje metylację lizyny 27 histonu H3 (H3K27) zarówno w komórkach z mutacją aktywującą EZH2 Y641, jak i jego dziką formą. Zahamowanie metylacji H3K27 prowadzi selektywnie do apoptozy komórek z mutacją aktywującą EZH2, co wskazuje na zależność komórek chłoniakowych od tej aberracji [11]. Inhibitor trafił do badań klinicznych 1. fazy w 2013 roku (NCT01897571).

Aby zaburzenia ilości, jakości i dystrybucji modyfikacji epigenetycznych DNA i białek histonowych przełożyły się na funkcjonowanie aparatu transkrypcyjnego, niezbędna jest obecność białek zdolnych do ich odczytania (*chromatin readers*). Białka te poprzez obecność swoistych domen wiążą się z modyfikacjami DNA i białek histonowych i rekrutują białka odpowiadające za transkrypcję. Do białek odczytujących ten kod histonowych modyfikacji epigenetycznych należą białka zawierające bromodomeny [12]. Spośród 46 znanych białek tej rodziny szczególnie interesująca z punktu widzenia terapii celowanych jest podrodzina białek BET (*bromodomain and extra-terminal domain* BRD2, BRD3, BRD4). Białka te zawierają dwie bromodomeny na N-końcu odpowiedzialne za wiązanie hiperacetylowanych regionów promotorowych i sekwencji wzmacniających. Poprzez C-końcową domenę białka BET rekrutują P-TEFb (*positive transcription elongation factor*), który fosforyluje polimerazę RNA II, co prowadzi do jej pełnej aktywacji [12]. Białka BET wiążą się preferencyjnie z dużymi regionami chromatyny okupowanymi również przez białko MEDIATOR, zwanymi superenhancerami [13]; odpowiadają one za wzmocnienie ekspresji czynników transkrypcyjnych kluczowych dla ukierunkowania różnicowania komórek i odpo-

wiadających za ich tożsamość, ale również za ekspresję onkogenów. Zahamowanie wiązania BRD4 do chromatyny powoduje toksyczność w modelach *in vitro* i *in vivo* w wielu nowotworach układu chłonnego [14–17]. W komórkach szpiczaka plazmocytoowego (PCM, *plasma cell myeloma*) i chłoniaka Burkitta (BL, *Burkitt lymphoma*) inhibitory bromodomen powodują działanie cytostatyczne i cytotoksyczne w mechanizmie przynajmniej częściowo zależnym od zmian transkrypcji MYC (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) [17]. W DLBCL inhibitory BRD4 wykazywały cytostatyczny wpływ na szeroki panel linii komórkowych, niezależnie od ich charakterystyki molekularnej (ABC *v.* GCB) [14]. Inhibitory BRD4 wpływały głównie na zahamowanie cyklu komórkowego w DLBCL i istotnie ograniczały wzrost komórek ksenotransplantowanych immunoniekompetyntnym myszom. Wykazano, że BRD4 wiąże się bardzo asymetrycznie do genomu DLBCL — około 33% BRD4 lokalizowało się w obszarze 1,6% superehancerów aktywnych genów [14]. Do białek regulowanych przez superenhancery w DLBCL należą liczne onkogeny, między innymi: *BCL6* (*B-cell CLL/lymphoma 6*), *OCA-B* (*POU2AF1, POU class 2 associating factor 1*), *PAX5* (*paired box 5*), *IRF8* (*interferon regulatory protein 8*), *MYC*. Zahamowanie BRD4 ich swoistymi inhibitorami (JQ1) prowadziło do globalnego zmniejszenia transkrypcji zależnej od superenhancerów, a w szczególności zmniejszenia ekspresji onkogenów zależnych od tych sekwencji; BRD4 wiąże się na przykład silnie z superenhancerami *loci* immunoglobulinowych, przez co inhibicja BRD4 zmniejsza ekspresję onkogenów translokowanych w obręb genów kodujących łańcuchy ciężkie immunoglobulin (IgH, *immunoglobulin heavy chain*) Reasumując, badania te wskazują, że BRD4 stanowi pomost między zaburzeniami epigenetycznymi a nadekspresją onkogenów w DLBCL, zahamowanie aktywności BRD4 w DLBCL prowadzi natomiast do uniwersalnego zmniejszenia ich ekspresji. Obserwacje te tłumaczą szerokie spektrum aktywności inhibitorów bromodomen w nowotworach układów chłonnego i krwiotwórczego. Wykazano również aktywność inhibitorów BRD4 w przedklinicznym modelu przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL, *chronic lymphocytic leukemia*) i w ostrej białaczce limfoblastycznej (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*). Inhibitory bromodomen (JQ1, GSK525762, OTX015, CPI-0610) są aktualnie w trakcie badań klinicznych 1./2. fazy prowadzonych u chorych na różne nowotwory układów chłonnego, krwiotwórczego i narządów litych.

Sygnal BCR

Aktywność BCR wyzwalana przez kontakt z antygenem jest kluczowym mechanizmem warunkującym aktywację limfocytów i ich terminalne różnicowanie [18]. Ponadto BCR transmituje toniczne, niezależne od antygeny, sygnały działające antyapoptotycznie, a jego obecność na powierzchni naiwnych limfocytów B, limfocytów germinalnych i pamięci jest warunkiem podtrzymania ich populacji [18]. Patogenetyczną rolę sygnału BCR dla B-NHL udokumentowano w ostatnich 5 latach w wielu badaniach [19–21]. Komórkowe sygnały zależne od BCR wykazują cechy typowe dla aktywacji antygenem (sygnal przewlekłe aktywny) lub mogą mieć charakter toniczny (niezależny od antygeny). W pierwszym przypadku nasilony sygnal BCR prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*), a wyłączenie jego aktywności powoduje toksyczność w komórkach ABC-DLBCL. Do aktywacji sygnału BCR w tych komórkach zwykle prowadzą aberracje strukturalne dotyczące genów białek odpowiedzialnych za różne etapy przekazywania sygnałów od receptorów błonowych, a do najczęstszych należą mutacje *CD79B*, białek adaptorowych *CARD11* (*caspase recruitment domain family, member 11*) i *MYD88* (*myeloid differentiation primary response 88*), białek przekazujących sygnały *TRAF2* (*TNF receptor-associated factor 2*), *TRAF3*, *TRAF5*, *RANK* (*TNFRSF11a, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a*), *TAK1* (*MAP3K7, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7*) i negatywnego regulatora szlaku — *TNFAIP3* (*tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*) [22, 23]. Mechanizm wyzwalania sygnału „tonicznego” nie jest w pełni jasny; zahamowanie tego sygnału hamuje proliferację komórek DLBCL i indukuje ich apoptozę. Biochemicznie zahamowanie sygnału tonicznego poprzez wyłączenie aktywności kinazy SYK (*spleen tyrosine kinase*) prowadzi do zahamowania zależnych kaskad sygnałowych, skutkując obniżeniem stężenia jonów wapnia w przestrzeni wewnątrzkomórkowej, spadkiem aktywności AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*), ERK (*MAPK1, mitogen-activated protein kinase 1*) oraz ograniczeniem syntezy cholesterolu [24, 25]. Inaktywacja kinazy AKT prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i indukcji apoptozy zależnej od nadekspresji proapoptotycznego białka rodziny BCL2, HRK (*harakiri*) [20].

Aktywność sygnału BCR odgrywa rolę patogenetyczną również w BL [26]. U myszy z równo-

czesną nadekspresją Myc i konstytutywnie aktywną formą Pi3k (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) chłoniaki rozwijały się szybciej niż u zwierząt z nadekspresją tylko Myc lub Pi3k. Co więcej, nowotwory powstające w tych podwójnie transgenicznym myszach są wierną fenokopią ludzkiego BL pod względem histologicznym, markerów powierzchniowych i profilu ekspresji białek [27]. Aktywacja szlaku PI3K jest również obserwowana w ludzkim BL, szczególnie w podtypie sporadycznym [26]. Głównym mechanizmem aktywującym ścieżkę PI3K są najprawdopodobniej mutacje aktywujące/zmieniające funkcję genu *TCF3* (*transcription factor 3*) oraz mutacje utraty funkcji genu *ID3* (*inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein*) będącego negatywnym regulatorem TCF3. Mutacje te są obserwowane w niemal 70% próbek pochodzących z ludzkich sporadycznych BL [26]. W komórkach tego nowotworu TCF3 zwiększa ekspresję komponentów BCR oraz hamuje ekspresję fosfatazy SHP-1 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6*) będącej inhibitorem sygnału BCR [26]. Obniżenie ekspresji czynnika TCF3 lub nadekspresja ID3 w liniach komórkowych BL zmniejszała toniczny sygnal BCR oraz poziom fosforylacji AKT [26].

Ze względu na istotną rolę patogenetyczną sygnału BCR w B-NHL, w tym w określonych podtypach molekularnych DLBCL, kaskady sygnałowe, które są aktywowane przez BCR, stanowią atrakcyjny cel interwencji terapeutycznej. Zależnie od strategii interwencji zahamowanie szlaku BCR może dotyczyć różnych kinaz. W ostatnich latach do badań przedklinicznych i klinicznych trafiły swoiste inhibitory, między innymi kinazy tyrozyny Brutona (BTK, *Bruton tyrosine kinase*), PI3K, mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), AKT i MEK (*MAP2K7, mitogen-activated protein kinase kinase 7*). Znaczenie BTK dla rozwoju i funkcjonowania limfocytów B opisano po raz pierwszy w 1993 roku, gdy zidentyfikowano mutacje inaktywujące BTK jako przyczynę agammaglobulinemii Brutona [28–31]. Skutki wyłączenia BTK potwierdzono eksperymentalnie na modelach mysich pozbawionych tej kinazy, w których obserwowano zaburzenie rozwoju limfocytów B [32]. Kinaza BTK jest aktywowana w chłoniakach przez sygnal z BCR i odgrywa kluczową rolę w transdukcji tego sygnału i aktywacji NFκB. Wyłączenie BTK metodami interferencji RNA jest toksyczne dla części linii komórkowych DLBCL z wysoką spoczynkową aktywnością tego czynnika transkrypcyjnego [33]. Ponieważ mechanizm toksyczności inhibitorów BTK w chłoniakach DLBCL polega w głównej mierze na zahamowaniu

kanonicznego szlaku aktywacji NFκB, oporność na inhibicję BTK może wynikać z obecności mutacji uniezależniających aktywność NFκB od BCR, na przykład mutacji aktywujących *CARD11* lub mutacji aktywujących białko MYD88 (*MYD88, myeloid differentiation primary response gene 88*) (uczestniczące w alternatywnej aktywacji NFκB) [34].

Selektywny inhibitor BTK — ibrutynib (PCI-32765) — zaprojektowano metodą analizy struktury białek oraz za pomocą narzędzi bioinformatycznych, takich jak SAR (*structural-activity relationship*), co umożliwiło opracowanie cząsteczek homologicznych do określonych domen BTK, spośród których wyselekcjonowano strukturę chemiczną ibrutynibu [35]. Inhibitor ten wiąże się kowalencyjnie z cysteiną w pozycji 481 (Cys481) znajdującą się w pobliżu centrum aktywnego BTK [35]. Ibrutynib wykazuje wysoką aktywność w monoterapii u chorych na chłoniaka komórek płaszczka (MCL, *mantle cell lymphoma*) lub CLL i jest obecnie zarejestrowany do ich leczenia [36–38]. W badaniu klinicznym 1. fazy z udziałem chorych na DLBCL [NCT00849654, ibrutynib spowodował częściową odpowiedź (PR, *partial response*) u 2 spośród 7 leczonych osób [36]. Lepsze wyniki raportowano w odniesieniu do DLBCL w badaniu klinicznym 2. fazy, w którym porównano odpowiedzi ABC-DLBCL w porównaniu z GCB-DLBCL. Wśród chorych na ABC-DLBCL odpowiedź uzyskano u 40% leczonych osób, natomiast wśród chorych na GCB-DLBCL obiektywne odpowiedzi odnotowano jedynie u 1 z 19 leczonych [39]. Z powodu zróżnicowania odpowiedzi chłoniaków typu ABC-DLBCL i GCB-DLBCL w trwającym badaniu klinicznym 3. fazy, dotyczącym kombinacji ibrutynibu ze schematem R-CHOP (rytuksymab, cyklofosfamid, doksorubicyna, winkrystyna, prednizon), włączani są tylko chorzy na DLBCL z podtypem innym niż GCB-DLBCL [NCT01855750]. Do innych inhibitorów BTK pozostających w badaniach klinicznych [NCT01659255, NCT01351935, NCT02031419] należą ONO-4059 oraz CC-292 (AVL-292) [40, 41].

Oś PI3K–AKT–mTOR kontroluje większość istotnych dla rozwoju nowotworu aspektów: przeżywalność, proliferację, metabolizm, migrację [42]. W wielu nowotworach ta oś sygnałowa jest aktywowana poprzez mutacje genów kodujących podjednostkę katalityczną PI3K (PIK3CA) lub negatywny regulator aktywności PI3K — PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) [42]. W DLBCL aktywność osi PI3K–AKT–mTOR może zależeć od tych mechanizmów strukturalnych albo wiązać się z sygnałem BCR lub innych receptorów [43, 44]. Zahamowanie aktywności PI3K powoduje zmniej-

szenie fosforylacji AKT i indukcję apoptozy części chłoniakowych linii komórkowych [45]. W lipcu 2014 roku amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) zarejestrowała inhibitor PI3K — idelalisib (CAL-101, GS-1101), będący selektywnym inhibitorem PI3Kδ, do stosowania u chorych na CLL/SLL (*small lymphocytic lymphoma*) i FL. W badaniach klinicznych PR na leczenie idelalisibem zaobserwowano u 62% pacjentów z indolentnymi B-NHL, u 62% chorych na MCL i u żadnego z 9 leczonych z powodu DLBCL [46]. Połączenie idelalisibu z rytuksymabem u chorych na CLL wiązało się z 81% odpowiedzi, w grupie chorych otrzymujących jedynie rytuksymab obserwowano 13% odpowiedzi [47, 48]; OS u chorych leczonych rytuksymabem w połączeniu z idelalisibem po 12 miesiącach w tym badaniu wynosiło 92%, a w grupie otrzymującej rytuksymab z placebo — 80% [48]. Trwające badania kliniczne 2. fazy, między innymi w DLBCL, dotyczą łącznego stosowania inhibitora SYK (GS-9973) oraz idelalisibu [NCT01796470].

Poza inhibitorami PI3K selektywnymi wobec podjednostki p110 w badaniach klinicznych pozostaje również wiele inhibitorów PI3K hamujących wszystkie izoformy p110. Podstawą założenia o przewadze inhibitorów wszystkich podjednostek jest funkcjonalna kooperacja kilku podjednostek w transdukcji onkogennych sygnałów [42, 49]. Reprezentujący tę grupę buparlisib (BKM120) powodował apoptozę w liniach komórkowych BL, których przeżywalność zależy od tonicznego sygnału BCR [26]. Największym problemem związanym z pan-inhibitorami PI3K jest ich toksyczność [42].

Kinazę SYK zidentyfikowano jako cel terapeutyczny w wyniku prac nad rolą fosfatazy PTPROt (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, O, truncated*) w biologii komórek B [25]. Nadekspresja fosfatazy PTPROt powodowała ograniczenie aktywności kinazy SYK oraz zmniejszoną proliferację i indukcję apoptozy w liniach komórkowych DLBCL [25]. Zgodnie z tymi wynikami genetyczne lub farmakologiczne zahamowanie SYK w liniach komórkowych DLBCL zależnych od BCR prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i masywnej apoptozy [50, 51]. Pierwszym inhibitorem SYK poddanym badaniom klinicznym był fostamatynib (R788) — prolek, który po podaniu doustnym jest metabolizowany do postaci aktywnej, tj. R406 [52]. W badaniach klinicznych 1. i 2. fazy z zastosowaniem R406 najwyższy odsetek odpowiedzi uzyskano u chorych na CLL/SLL (całkowity odsetek odpowiedzi [ORR, *overall response rate*] 55%), a w przypadku DLBCL odsetek ten wynosił

22% [53]. Do nowszych inhibitorów SYK należą PRT060318, PRT062607 (P505-15) i GS-9973; PRT060318 i PRT062607 wykazywały aktywność w liniach komórkowych DLBCL, natomiast GS-9973 pozostaje w zaawansowanej fazie badań klinicznych [NCT01799889, NCT01796470] w nowotworach układów krwiotwórczego i chłonnego [51, 54].

Rola mikrośrodowiska i związanych z nowotworem mechanizmów immunomodulacyjnych

W badaniach z ostatnich lat wykazano, że mikrośrodowisko nie jest jedynie biernym „podścieliskiem” dla komórek nowotworowych, ale stanowi ważny element struktury nowotworu wspierający proliferację komórek nowotworowych i działający antyapoptotycznie. Najbardziej jaskrawym przykładem powiązań między mikrośrodowiskiem a komórkami nowotworowymi jest klasyczny chłoniak Hodgkina (cHL, *classical Hodgkin lymphoma*). Charakteryzuje się on obecnością nielicznych nowotworowych komórek Reed-Sternberga (R-S), otoczonych przez naciek limfocytów T, B, granulocytów, makrofagów, komórek plazmatycznych, eozynofików, komórek tucznych i fibroblastów [55]. Szczególnymi cechami tego nacieku są jego immunosupresyjny charakter oraz złożona sieć bilateralnych powiązań między jej elementami i komórkami R-S. Komórki R-S, poprzez wydzielane chemokiny i cytokiny, indukują infiltrację innych komórek nacieku, które zwrótnie wspierają ich proliferację. Wydzielane przez komórki R-S białka immunomodulujące bezpośrednio wpływają na polaryzację nacieku T-komórkowego w kierunku immunosupresyjnych limfocytów Th2 i Treg i wyłączają skuteczną odpowiedź immunologiczną [55]. Do substancji immunomodulujących wydzielanych przez komórki R-S należą cytokiny profilu Th2, w tym interleukiny (IL [IL-4, IL-6, IL-13, IL-10]), chemokiny, czynnik wzrostu nowotworów β (TGF- β , *tumor growth factor β*), galektyna 1 oraz ligandy receptora PD-1 (*programmed death*), PD-L1 i PD-L2 [55]. Wskutek wiązania obecnego na powierzchni limfocyta T receptora PD-1 przez jeden z jego ligandów receptor PD-1 rekrutuje fosfatazę SHP2 (PTPN11, *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*). Fosfataza ta defosforyluje białka kompleksu receptora T-komórkowego (CD3 δ , ZAP70, PKC θ), a w konsekwencji powoduje wyłączenie sygnału przekazywanego do wnętrza limfocyta przez ten receptor [56]; PD-L1 hamuje ponadto kostymulacyjny sygnał z receptora

CD28 limfocyta T poprzez kompetycyjne wiązanie ligandu CD28, białka CD80 (B7-1) [56]. W konsekwencji tych zjawisk ekspresja PD-L1 prowadzi do zmniejszonej proliferacji w odpowiedzi na antygen, zmniejszonej produkcji interferonu gamma (IFN γ), zaburzeń degranulacji i obniżonej cytotoksyczności, określanych wspólnie jako zjawisko wyczerpania limfocytów T (*T-cell exhaustion*) [56]. Zjawisko to może w znacznym stopniu ograniczać skuteczność odpowiedzi immunologicznej gospodarza na obecność nowotworu. Nadekspresja PD-L1 w cHL wynika ze strukturalnej amplifikacji *locus* tego genu w obrębie regionu 9p24, obecnej zarówno w liniach komórkowych, jak i pierwotnych komórkach R-S [57]. Wskutek tej strukturalnej aberracji dochodzi również do koamplifikacji sąsiadującego z PD-L1 genu kinazy JAK2 (*Janus kinase 2*). Aktywność tej kinazy dodatkowo wzmacnia ekspresję PD-L1 poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych rodziny STAT (*signal transducer and activator of transcription*), wiążących się bezpośrednio w obrębie regionu promotorowego PD-L1 [57]. Limfocyty T nacieku komórkowego cHL wykazywały profil ekspresji genów charakterystyczny dla aktywacji receptora PD-1, a neutralizujące przeciwciała dla PD-1 przywracały prawidłową produkcję IFN γ w tych komórkach [58]. Z badań tych wynika, że blokada interakcji PD-1–PD-L1/PD-L2 może stanowić mechanizm wzmacniający T-zależną odpowiedź immunologiczną u chorych na cHL. Konsekwencją tych obserwacji były badania kliniczne 1. fazy u chorych na cHL z użyciem przeciwciał blokujących interakcję PD-1 i jego ligandów [59].

W pracy Ansell i wsp. [59] przedstawiono wyniki stosowania tego przeciwciała w grupie 23 chorych z opornym na leczenie cHL lub jego nawrotem. Spośród badanych chorych, 87% przeżyło przynajmniej 3 linie leczenia, 78% przeżyło przeszczepienie autologicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (auto-HSCT, *autologous hematopoietic stem cell transplantation*), a 78% otrzymywało wcześniej brentuksymab vedotin (BV). Interwencja polegała na podawaniu niwolumabu w dawce 3 mg/kg mc. co 2 tygodnie do progresji lub wystąpienia objawów toksyczności. W badaniu oceniono bezpieczeństwo stosowania niwolumabu, odpowiedź na leczenie i ekspresję potencjalnych biomarkerów (PD-L1 i STAT3). Działania niepożądane związane z podawaniem leku wystąpiły u 78% chorych (wysypka, małopłytkowość, biegunka, nudności, świąd, gorączka); działania niepożądane 3. stopnia odnotowano u 22% chorych. Obiektywną odpowiedź na leczenie stwierdzono u 20 spośród 23 leczonych chorych (87%), w tym

u 4 chorych (17%) uzyskano całkowitą remisję (CR), u 16 chorych (70%) — PR, a u 3 (13%) — stabilizację choroby. U 18 chorych, u których doszło do nawrotu po leczeniu BV, obiektywne odpowiedzi na leczenie dotyczyły 16 chorych (89%), w tym jeden chory uzyskał CR (6%), a 15 (83%) — PR; PFS w 24. tygodniu badania oceniono u 11 chorych (12 chorych wyłączone z badania z powodu zakwalifikowania do auto-HSCT, objawów toksyczności lub progresji choroby) i wyniósł on 86%. Mediana OS nie została osiągnięta. U 10 chorych, u których był dostępny materiał biopsyjny z tkanki guza, przeprowadzono analizę metodą hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) locus PD-L1/PD-L2 (9p24), stwierdzając amplifikację (3–15 kopii) locus. U wszystkich chorych stwierdzono również wysoką ekspresję PD-L1/PD-L2 w komórkach R-S w badaniu immunohistochemicznym. W amplifikowanym locus 9p24 lokalizuje się również gen kinazy JAK2, której amplifikacje powodują aktywację czynników transkrypcyjnych STAT i dodatkowo wpływają na zwiększenie ekspresji PD-L1/PD-L2. Aktywność STAT3 obserwowano u wszystkich ocenionych chorych, co dowodzi, że zjawiska leżące u podłoża nadekspresji PD-L1/2 w cHL mogą stanowić klinicznie dostępny biomarker.

Wyniki badań ukierunkowanych na blokadę PD-1 z użyciem innego przeciwciała, pembrolizumabu, u chorych na cHL zaprezentowano na konferencji ASH (*American Society of Hematology*) w 2014 roku [60]. W badaniach tych potwierdzono również, że przeciwciała monoklonalne ukierunkowane na wyłączenie immunologicznego punktu kontrolnego PD-1/PD-L1/2 u chorych na cHL są stosunkowo dobrze tolerowane i wykazują aktywność kliniczną.

Punkt kontrolny PD-1/PD-L1/2 budzi duże zainteresowanie również w innych nowotworach układu chłonnego. Ekspresja ligandów tego układu dotyczy między innymi komórek CLL, FL i DLBCL o pierwotnej lokalizacji obejmującej jądra i ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Zwłaszcza w przypadku tych ostatnich nowotworów — dotyczących tak zwanych miejsc uprzywilejowania immunologicznego (*immune privilege sites*) — terapeutyczne strategie immunomodulacyjne mogą być szczególnie uzasadnione. Wykazano, że u ponad 40% chorych z pierwotnym chłoniakiem jądra występują amplifikacje 9p24 (PD-L1/2) [61]. Do nadekspresji ligandu PD-L2 może również prowadzić opisana po raz pierwszy translokacja t(3;9) *TBL1XR1-PDL2*. Skutkiem tej rearanżacji jest fizyczne zbliżenie regionu regulatorowe-

go *TBL1XR1* (chromosom 3) do 2 eksonu genu *PDCD1LG2*, w którym jest zlokalizowany kodon start rozpoczynający translację pełnego białka PD-L2. Komórki z tą translokacją charakteryzowały się szczególnie wysoką ekspresją powierzchniową PD-L2 [61]. W powyższych badaniach są identyfikowane mechanizmy sprzyjające immunologicznemu uprzywilejowaniu komórek chłoniakowych zlokalizowanych w ośrodkowym układzie nerwowym i jądrze, które mogą być celem interwencji terapeutycznej.

Podsumowanie

Ostatnie lata badań podstawowych i translacyjnych w onkohematologii, a szczególnie w nowotworach układu chłonnego, przyniosły wymierny, kliniczny i praktyczny wynik w postaci nie tylko nowych obserwacji dotyczących patogenezy chorób, ale także rejestracji nowych leków. Do największych wyzwań stojących przed badaczami należą dziś kwestie opracowania racjonalnych i klinicznie użytecznych biomarkerów umożliwiających identyfikację chorych, u których zastosowanie leku jest biologicznie uzasadnione. W odniesieniu do większości testowanych obecnie celów terapeutycznych i ich swoistych inhibitorów nie ma obecnie żadnego racjonalnego biomarkera, a zwłaszcza brakuje biomarkera „binarnego”, który pozwalałby w sposób jednoznaczny określić wskazania dla tych cząstek. W większości badań pojęcia „wysokiej” i „niskiej” ekspresji są arbitralne i niemożliwe do wystandaryzowania i zastosowania w praktyce klinicznej, a w szczególności w ramach badań klinicznych. Drugim wyzwaniem jest priorytetyzacja cząstek i logistyka badań klinicznych. Liczba powstających związków nie pozwala już dziś na testowanie każdego z nich w warunkach badań klinicznych i zmusza do wyboru związków najbardziej obiecujących. Ostatnie z wyzwań to opracowanie racjonalnych połączeń terapii celowanych, indywidualizacja terapii i poznanie interakcji między nowymi związkami.

Piśmiennictwo

1. Jiang Y., Hatzl K., Shaknovich R. Mechanisms of epigenetic de-regulation in lymphoid neoplasms. *Blood* 2013; 121: 4271–4279.
2. Easwaran H., Tsai H.C., Baylin S.B. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol. Cell* 2014; 54: 716–727.
3. Pasqualucci L., Dominguez-Sola D., Chiarenza A. i wsp. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011; 471: 189–195.
4. Yap D.B., Chu J., Berg T. i wsp. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 2011; 117: 2451–2459.

5. Bodor C., O'Riain C., Wrench D. i wsp. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* 2011; 25: 726–729.
6. Morin R.D., Johnson N.A., Severson T.M. i wsp. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 2010; 42: 181–185.
7. Jiang Y., Melnick A. The epigenetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* 2015; 52: 86–96.
8. Watanabe T., Kato H., Kobayashi Y. i wsp. Potential efficacy of the oral histone deacetylase inhibitor vorinostat in a phase I trial in follicular and mantle cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2010; 101: 196–200.
9. Amengual J.E., Clark-Garvey S., Kalac M. i wsp. Sirtuin and pan-class I/II deacetylase (DAC) inhibition is synergistic in pre-clinical models and clinical studies of lymphoma. *Blood* 2013; 122: 2104–2113.
10. Straus D.J., Hamlin P.A., Matasar M.J. i wsp. Phase I/II trial of vorinostat with rituximab, cyclophosphamide, etoposide and prednisone as palliative treatment for elderly patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma not eligible for autologous stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2015; 168: 663–670.
11. Knutson S.K., Kawano S., Minoshima Y. i wsp. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* 2014; 13: 842–854.
12. Belkina A.C., Denis G.V. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2012; 12: 465–477.
13. Loven J., Hoke H.A., Lin C.Y. i wsp. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 2013; 153: 320–334.
14. Chapuy B., McKeown M.R., Lin C.Y. i wsp. Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2013; 24: 777–790.
15. Mertz J.A., Conery A.R., Bryant B.M. i wsp. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2011; 108: 16669–16674.
16. Filippakopoulos P., Qi J., Picaud S. i wsp. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468: 1067–1073.
17. Delmore J.E., Issa G.C., Lemieux M.E. i wsp. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011; 146: 904–917.
18. Białopiotrowicz E., Warzocha K., Juszczyński P. Patogeneza nowotworów układu chłonnego. *Hematologia* 2013; 4: 321–332.
19. Niemann C.U., Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin. Cancer Biol.* 2013; 23: 410–421.
20. Chen L., Monti S., Juszczynski P. i wsp. SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT-dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas. *Cancer Cell* 2013; 23: 826–838.
21. Young R.M., Staudt L.M. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2013; 12: 229–243.
22. Compagno M., Lim W.K., Grunn A. i wsp. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009; 459: 717–721.
23. Pasqualucci L., Trifonov V., Fabbri G. i wsp. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* 2011; 43: 830–837.
24. Juszczynski P., Chen L., O'Donnell E. i wsp. BCL6 modulates tonic BCR signaling in diffuse large B-cell lymphomas by repressing the SYK phosphatase, PTPROt. *Blood* 2009; 114: 5315–5321.
25. Chen L., Juszczynski P., Takeyama K., Aguiar R.C., Shipp M.A. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O truncated (PTPROt) regulates SYK phosphorylation, proximal B-cell-receptor signaling, and cellular proliferation. *Blood* 2006; 108: 3428–3433.
26. Schmitz R., Young R.M., Ceribelli M. i wsp. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012; 490: 116–120.
27. Sander S., Calado D.P., Srinivasan L. i wsp. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012; 22: 167–179.
28. Vetrie D., Vorechovsky I., Sideras P. i wsp. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the Src family of protein-tyrosine kinases. 1993. *J. Immunol.* 2012; 188: 2948–2955.
29. Vetrie D., Vorechovsky I., Sideras P. i wsp. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993; 361: 226–233.
30. Tsukada S., Saffran D.C., Rawlings D.J. i wsp. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. 1993. *J. Immunol.* 2012; 188: 2936–2947.
31. Tsukada S., Saffran D.C., Rawlings D.J. i wsp. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993; 72: 279–290.
32. Khan W.N., Alt F.W., Gerstein R.M. i wsp. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 1995; 3: 283–299.
33. Davis R.E., Ngo V.N., Lenz G. i wsp. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; 463: 88–92.
34. Ngo V.N., Young R.M., Schmitz R. i wsp. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; 470: 115–119.
35. Pan Z., Scheerens H., Li S.J. i wsp. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *Chem. Med. Chem.* 2007; 2: 58–61.
36. Advani R.H., Buggy J.J., Sharman J.P. i wsp. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 88–94.
37. Wang M.L., Rule S., Martin P. i wsp. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369: 507–516.
38. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E. i wsp. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369: 32–42.
39. Wilson W.H., Gerecitano J.F., Goy A. i wsp. The Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ibrutinib (PCI-32765), Has preferential activity in the abc subtype of relapsed/refractory de novo diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): interim results of a multicenter, open-label, phase 2 study. *Blood* 2012; 120: 686.
40. Harb W.A., Hill B.T., Gibrilove J. i wsp. Phase 1 study of single agent CC-292, a highly selective Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2013; 122: 1630–1630.
41. Yoshizawa T., Yasuhiro T., Honda H., Kawabata K. ONO-4059 — a potent and selective reversible Bruton's tyrosine kinase (Btk) inhibitor: single agent, twice daily (BD) dosing and dosing with food results in sustained, high trough levels of ONO-4059, trans-

- lating into 100% tumour remission in a TMD-8 xenograft model. *Blood* 2014; 124: 4502.
42. Fruman D.A., Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014; 13: 140–156.
 43. Pfeifer M., Grau M., Lenze D. i wsp. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110: 12420–12425.
 44. Abubaker J., Bavi P.P., Al-Harbi S. i wsp. PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21: 2368–2370.
 45. Lannutti B.J., Meadows S.A., Herman S.E. i wsp. CAL-101, a p110 delta selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011; 117: 591–594.
 46. Kahl B., Byrd J.C., Flinn I.W. i wsp. Clinical safety and activity in a phase I study of CAL-101, an isoform-selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110{delta}, in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2010; 116: abstrakt 1777.
 47. Gopal A.K., Kahl B.S., de Vos S. i wsp. PI3Kdelta inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370: 1008–1018.
 48. Furman R.R., Sharman J.P., Coutre S.E. i wsp. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370: 997–1007.
 49. Foukas L.C., Berenjano I.M., Gray A., Khwaja A., Vanhaesebroeck B. Activity of any class IA PI3K isoform can sustain cell proliferation and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 11381–11386.
 50. Chen L., Monti S., Juszczyński P. i wsp. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008; 111: 2230–2237.
 51. Cheng S., Coffey G., Zhang X.H. i wsp. SYK inhibition and response prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2011; 118: 6342–6352.
 52. Braselmann S., Taylor V., Zhao H. i wsp. R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 319: 998–1008.
 53. Friedberg J.W., Sharman J., Sweetenham J. i wsp. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115: 2578–2585.
 54. Spurgeon S.E., Coffey G., Fletcher L.B. i wsp. The selective SYK inhibitor P505-15 (PRT062607) inhibits B cell signaling and function in vitro and in vivo and augments the activity of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013; 344: 378–387.
 55. Juszczyński P. Mikrośrodowisko komórek Reed-Sternberga w klasycznym chłoniaku Hodgkina — rola patogenetyczna i cel terapeutyczny. *Hematologia* 2011; 2: 1–14.
 56. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26: 677–704.
 57. Green M.R., Monti S., Rodig S.J. i wsp. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010; 116: 3268–3277.
 58. Chemnitz J.M., Eggle D., Driesen J. i wsp. RNA fingerprints provide direct evidence for the inhibitory role of TGFbeta and PD-1 on CD4+ T cells in Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007; 110: 3226–3233.
 59. Ansell S.M., Lesokhin A.M., Borrello I. i wsp. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372: 311–319.
 60. Moskowitz C.H., Ribrag V., Michot J.M. i wsp. D-1 Blockade with the monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure: preliminary results from a phase 1b study. *Blood* 2014; 124: abstrakt 290.