

# Difuzní velkobuněčný B lymfom – moderní způsoby diagnostiky a molekulárně cílené léčby

## Diffuse Large B-cell Lymphoma – Modern Diagnostics and Molecularly Targeted Treatment

Pytlík R., Trněný M.

I. interní klinika – klinika hematologie 1. LF UK a VFN v Praze

### Souhrn

**Východiska:** Difuzní velkobuněčný B lymfom je označení zahrnující řadu klinicko-patologických jednotek lišících se molekulární patogenezi, klinickou prezentací i prognózou. Přesná korelace mezi klinicko-patologickými a molekulárními subtypy difuzního velkobuněčného B lymfomu nebyla dosud stanovena, byly však identifikovány klíčové signální dráhy, jejichž blokáda může být terapeuticky významná. **Cíl:** Cílem tohoto přehledu je ukázat moderní přístup k diagnostice difuzního velkobuněčného B lymfomu na molekulární úrovni, shrnout současné možnosti léčby nově diagnostikovaných pacientů s difuzním velkobuněčným B lymfomem a představit nové léčebné možnosti, které jsou v současné době zkoumány v klinických studiích. **Výsledky:** Současná molekulární diagnostika difuzního velkobuněčného B lymfomu se ubírá dvěma hlavními směry. První směr je členění podle genové exprese, buď na úrovni mRNA nebo na úrovni proteinové. Dle toho jsou pacienti děleni do podskupin podle buněčného původu nebo dle stromální signatury. Nejčastěji užívané je dělení podle buněčného původu, na lymfomy podobné B buňkám z germinálního centra (GCB subtyp) a na lymfomy podobné aktivovaným B buňkám (ABC subtyp). Druhý směr výzkumu představují studie genetické informace na úrovni DNA, kde jsou identifikovány genetické mutace, delece, amplifikace a ztráty heterozygoty, které mohou být specifické pro skupiny definované genovou expresí, ale mohou jít i napříč těmito skupinami. Oba tyto výzkumné směry se snaží identifikovat klíčové signální dráhy důležité pro přežití a růst nádorových buněk a v nich místa, která je možné farmakologicky zablokovat. V současné době jsou standardem léčby 1. linie pro všechny pacienty antracyklinové režimy s rituximabem, které zlepšily prognózu jak pacientů s ABC, tak pacientů s GCB subtypem, i když výsledky u pacientů s ABC subtypem jsou nadále horší. Existuje řada nových preparátů se slibnou účinností, jež se zkoumají v různě pokročilých fázích klinických studií (lenalidomid, bortezomib, idelalisib, venetoclax). Jejich předpokládaná účinnost se však bude týkat pouze přesně molekulárně definovaných podtypů difuzního velkobuněčného B lymfomu. **Závěr:** Na příchod nových cílených léků do praxe je nutno ještě vyčkat. Pro jejich efektivní užití bude nutný nejen průkaz jejich účinnosti v randomizovaných studiích, ale též rozšíření rutinní diagnostiky o molekulární metody a zajištění její přesnosti, rychlosti a dostupnosti.

### Klíčová slova

difuzní velkobuněčný B lymfom – exprese genu – signální transdukce – léčba

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR č. NT13072-4/2012 a NT12193-5/2011.

This study was supported by grants of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NT13072-4/2012 and NT12193-5/2011.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Robert Pytlík

I. interní klinika – klinika hematologie  
1. LF UK a VFN v Praze  
U Nemocnice 2  
128 08 Praha 2  
e-mail: pytlirik@seznam.cz

Obdrženo/Submitted: 25. 9. 2015

Přijato/Accepted: 28. 9. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20153564>

## Summary

**Background:** Diffuse large B-cell lymphoma is a common label for a number of clinico-pathological entities, which differ in molecular pathogenesis, clinical presentation and prognosis. Exact correlation between clinico-pathological and molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma was not optimally defined; however, key signal transduction pathways were identified; blockage of these pathways may be therapeutically significant. **Aim:** The purpose of this review is to show current approach to diagnostics of diffuse large B-cell lymphoma on molecular levels, to summarize current first-line treatment options for newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma patients and to introduce new treatment possibilities, which are currently under investigation in clinical trials. **Results:** Current molecular diagnostics of diffuse large B-cell lymphoma is evolving in two main directions. One direction is classification according to gene expression or protein levels. According to these studies, patients may be divided into subgroups according to the cell of origin or according their stromal signature. Most frequently used is classification according cell of origin (COO), which divides diffuse large B-cell lymphomas into GCB subtype (germinal B-cell like) or ABC subtype (activated B-cell like). Second direction is studying genetic information on DNA level, where genetic mutations, deletions, amplifications and losses of heterozygosity are identified, which may be specific for subgroups defined by gene expression analysis, but may go across them. Both these directions aim at identifying signaling pathways important for survival and proliferation of tumor cells and in these, to identify targets for pharmacological blockage. Currently, standard of first-line treatment for all patients is anthracycline-based regimen with rituximab, which improved prognosis in both cell of origin subtypes, even if patients in the ABC subgroup have still inferior outcome. There is a number of new drugs with promising effectivity, which are studied in different phases of clinical trials (lenalidomide, bortezomib, idelalisib, venetoclax), but their possible effectivity will be limited only for precisely defined molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. **Conclusion:** The advent of new targeted drugs for diffuse large B-cell lymphoma is still awaited. For their effective use, besides the proof of their effectivity in randomized studies, also the extension of use of molecular methods in routine diagnostics and ensuring their wide availability will be necessary.

## Key words

diffuse large B-cell lymphoma – gene expression profiling – signal transduction pathways – treatment

## Úvod

Diagnostika a léčba difuzního velkobuněčného B lymfomu (diffuse large B-cell lymphoma – DLBCL) představuje velmi úspěšnou kapitolu z dějin klinické onkologie. Z diagnostického hlediska tento lymfom (a lymfomy obecně) jsou jedním z prvních příkladů úspěšného použití monoklonálních protilátek, a to jak pomocí imunohistochemie, tak i průtokové cytometrie [1,2]. DLBCL byl jako jedno z prvních onemocnění úspěšně studován pomocí profilů genové exprese na úrovni microarrays (hned několik způsobů klasifikace) [3–5], molekulární patogenezi onemocnění pomáhá objasnit komparativní genomová hybridizace (aCGH) [6,7], k identifikaci genetických mutací jako potenciálně důležitých léčebně využitelných cílů výrazně přispělo sekvenování nové generace (next-generation sequencing – NGS) [8] a přenesení studia genové exprese DLBCL z experimentální na rutinní platformu výrazně přiblížilo úspěšné využití metody nanostringů [9]. Z terapeutického hlediska počet vyléčených pacientů s pokročilým DLBCL stoupl z počtu blízkého 0 na 30 % od poloviny minulého století do jeho osmé dekády [10] a dále na 50–60 % v prvním desetiletí tohoto století. Tento druhý skok se podařil zavedením anti-CD20 protilátky rituximabu do

rutinní praxe [11–13], což bylo umožněno až díky výše uvedené možnosti imunohistochemického průkazu membránových antigenů. Úspěch rituximabu je tedy rovněž jedním z prvních příkladů úspěšného přenesení metod moderní diagnostiky do praxe.

V posledních 10 letech k podobnému posunu v úspěšnosti léčby DLBCL nedošlo, avšak došlo k výraznému posunu v diagnostických možnostech, i když většina experimentálně užívaných metod nebyla ještě úspěšně převedena do rutinní praxe. Rozvoj těchto experimentálních metod však vedl k výraznému skoku v porozumění biologii DLBCL, zejména na úrovni klíčových signálních drah, které umožňují přežití a proliferaci nádorových buněk [14,15], a na úrovni imunologických mechanismů, které poskytují buňkám DLBCL ochranu [5,16]. Díky tomu došlo též k rozvoji experimentálních léčebných metod, z nichž se mnohé posunuly do II.–III. stadia klinických zkoušek. Zdá se tedy pravděpodobné, že v blízké budoucnosti dojde k dalšímu výraznému pokroku v léčbě tohoto nádorového onemocnění.

Tento přehled si klade za úkol krátce přiblížit způsoby, které pomohly identifikovat nové léčebné cíle, na základě současných léčebných postupů přiblížit skupiny pacientů se setrvalě špat-

nou prognózou, představit nové slibné strategie a krátce se zmínit o výzvách, které představuje jejich event. zavedení do klinické praxe. Co se týče léčby, budeme se zabývat vesměs léčbou nově diagnostikovaných pacientů, o léčbě re-labovaných lymfomů pojednává článek autorů Pohlreich et al v tomto čísle [17].

## Současná klasifikace DLBCL – nové diagnostické metody, nové poznatky

Podle zatím poslední verze WHO klasifikace z roku 2008 se DLBCL dělí na řadu podtypů, variant a klinicko-patologických podjednotek včetně přechodných typů mezi DLBCL a jinými klinickými entitami (tab. 1) [18]. Toto rozdělení však jistě bude v následné klasifikaci, očekávané na přelomu tohoto a příštího roku, upraveno, protože jednak již neodpovídá poznatkům nashromážděným v posledních několika letech, jednak neposkytuje dostatečnou oporu pro stanovení léčebné strategie. Dá se však očekávat, že ani nová klasifikace nebude uspokojivě reflektovat všechny nové poznatky, a to především proto, že diagnostika DLBCL představuje „pohyblivý cíl“, ke kterému se navíc různé skupiny badatelů pokoušejí dospět různými metodami.

V éře po zavedení monoklonálních protilátek znamenalo zásadní změnu

v přístupu k diagnostice DLBCL jejich zkoumání na základě profilů genové exprese [3–5,16,19]. Globální profily genové exprese na úrovni mRNA studované pomocí tzv. microarrays umožnily rozdělení difuzních velkobuněčných lymfomů na dvě podskupiny podle buněčného původu (cell of origin – COO): lymfom podobný B buňkám z germinálního centra (germinal centre B-cell like – GCB) a lymfom podobný aktivovaným B lymfocytům (activated B-lymphocyte like – ABC) s malým množstvím případů, které se nepodařilo klasifikovat. Tento přístup rovněž vedl k potvrzení postavení primárního mediastinálního B lymfomu jako zvláštní klinické jednotky, která se liší od ostatních DLBCL i na molekulární úrovni, a konečně vedl i k molekulární definici tzv. lymfomů „šedé zóny“ [20,21]. Microarrays se však ukázaly jako nepoužitelné v běžné klinické praxi vzhledem ke své technické náročnosti, problémům se standardizací a potřebě čerstvě zmražené tkáně. Podařilo se sice vytvořit zjednodušený, šestigenový model, v němž byla genová exprese určována z archivních parafinových vzorků pomocí real-time kvantitativní PCR (RT-qPCR) [22], avšak tato metoda není praktická ke studiu exprese většího počtu genů.

V praxi se ukázalo schůdné zjišťování proteinové exprese pomocí imunohistochemie a bylo navrženo několik modelů k oddělení GC od non-GC fenotypu. Algoritmus dle Hansové se dočkal největší popularity [23], ale korelace tohoto i dalších modelů s profily genové exprese se ukázala jako omezená: v recentní studii srovnávající devět imunohistochemických algoritmů byly jen 4 % pacientů klasifikovány jako GC a 23 % jako ABC/nonGC všemi devíti [24]. Problematická je i korelace imunohistochemických modelů s výsledky léčby [24–26].

Řešením tohoto problému by mohla být nově zavedená metoda stanovení genové exprese na úrovni mRNA pomocí metody nanostringů [27]. Jedná se o metodiku, která vyžaduje pouze malé fragmenty mRNA, jež je možno získat z parafinových vzorků. Fragmenty mRNA jsou hybridizovány se dvěma DNA próbami, jednou fluorescenčně označenou

**Tab. 1. DLBCL – varianty, podskupiny, podtypy a klinické jednotky (podle [18]).**

#### **DLBCL – blíže nespecifikovaný**

- běžné morfoloické varianty
  - centroblastový
  - imunoblastový
  - anaplastický
- vzácné morfoloické varianty
- molekulární podskupiny
  - podobný B buňkám germinálního centra (GCB)
  - podobný aktivovaným B lymfocytům (ABC)
- imunohistochemické podskupiny
  - CD5 pozitivní DLBCL
  - podobný B buňkám germinálního centra (GCB)
  - nepodobný B buňkám germinálního centra (non-GCB)

#### **Podtypy difuzního velkobuněčného lymfomu**

- velkobuněčný B lymfom bohatý na T buňky a histiocyty
- primární DLBCL CNS
- primární kožní DLBCL, leg-type
- EBV pozitivní DLBCL starších osob

#### **Jiné klinické jednotky z velkých B buněk**

- primární mediastinální B lymfom (PMBL)
- intravaskulární velkobuněčný B lymfom
- DLBCL asociovaný s chronickým zánětem
- lymfomatoidní granulomatóza
- ALK pozitivní velkobuněčný B lymfom
- plazmablastický B lymfom
- velkobuněčný B lymfom vzniklý v terénu HHV-8 asociované multicentrické Castlemannovy choroby
- primární B lymfom vznikající ve výpotku

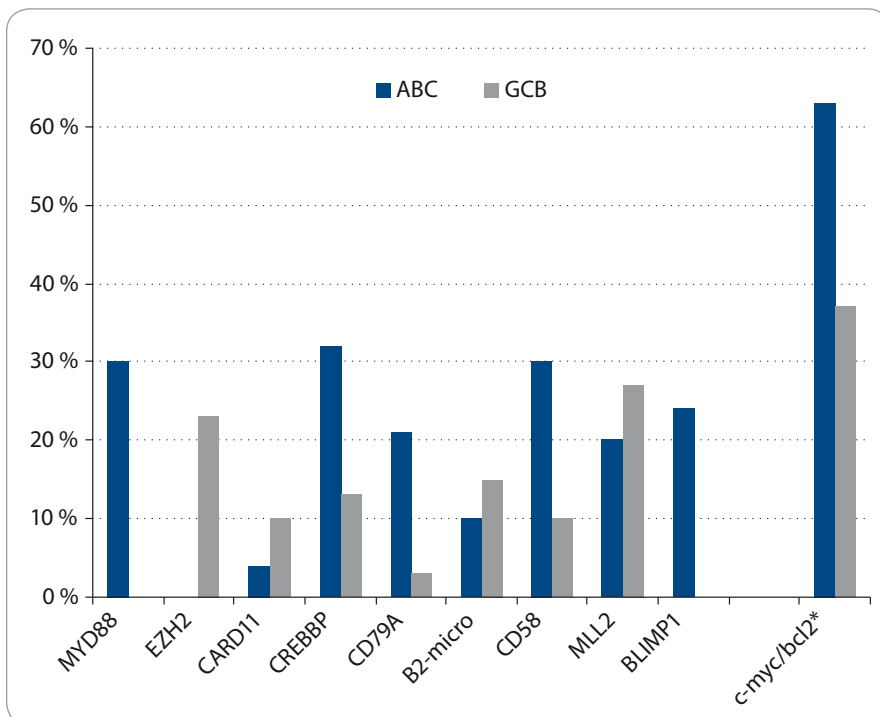
#### **Přechodné typy („šedá zóna“)**

- B lymfom blíže neklasifikovatelný, s rysy mezi difuzním velkobuněčným B lymfomem a Burkittovým lymfomem
- B lymfom blíže neklasifikovatelný, s rysy mezi difuzním velkobuněčným B lymfomem a klasickým Hodgkinovým lymfomem

a druhou imobilizační. Tak zvaný CodeSets (většinou pro několik desítek stanovovaných genů včetně kontrolních) mohou být individuálně připravené, ale existují i designované sety pro různé účely – konkrétně pro stanovení COO u DLBCL existuje platforma Lymph2Cx kvantifikující 20 genů [28]. CodeSets jsou následně imobilizovány a mRNA kopie jsou počítány digitálně. Platforma velmi dobře koreluje s klasickými mikroarray i RT-qPCR, velmi dobrá je rovněž korelace při opakovaném stanovení z téhož vzorku a korelace mezi různými šaržemi CodeSets je údajně stoprocentní. Nejdů-

ležitější však je, že COO stanovené pomocí nanostringů mají prognostický význam [29]. Nevýhodou je vysoká cena základního vybavení a (zatím) i reagentů. V této době je stanovení COO pomocí nanostringů užíváno v klinických studiích fáze III s cílenými léky (lenalidomid, ibrutinib), kde rozhoduje o vhodnosti zařazení pacientů.

Je ovšem nutné se zmínit, že v současné době existuje ještě jeden způsob dělení DLBCL na základě genové exprese, a to pomocí tzv. stromální signatury, tedy pomocí určování genové exprese nádorového mikroprostředí.



**Graf 1. Rozdělení genových mutací/zvýšených expresí u pacientů s DLBCL podle molekulárně biologických subtypů: GCB vs. ABC.**

\*Dvojitá exprese pomocí imunohistochemie, ostatní frekvence udávají frekvence mutací.

Tento způsob je nezávislý na COO a má rovněž prognostický význam [16].

Určení COO však není všespásné i z jiných důvodů. Jednak ani tento, ani žádný jiný algoritmus rozdělení pacientů na základě globální genové exprese nedokáže oddělit pacienty s pravděpodobností vyléčení blížíící se 100 % od pacientů s pravděpodobností vyléčení blízkou nule, jednak proto, že na základě studia genetické informace na úrovni DNA se podařilo určit mutace, amplifikace a delece, které jsou někdy specifické pro určitou COO podskupinu, jiné naopak jdou napříč oběma podskupinami (graf 1) [30,31]. Podobně jako stanovení genové exprese na úrovni mRNA i metody ke studiu DNA jsou založeny na array technologiích umožňujících rychlé zkoumání velkého počtu vzorků. Arraye komparativní genomové hybridizace (aCGH) zjišťují genové delece či amplifikace chromozomálních úseků od velikosti 120 kbp výše [6,7]. Jejich nevýhodou je, že nedokáží zjistit balancované translokace. NGS umožňuje stanovit mutační stav včetně bodových mutací, pokud jsou tyto přítomny alespoň u 5 %

buněk ve vzorku [8]. Nakonec ani imunohistochemické vyšetření není možné zcela zavrhnout, protože určování duální exprese bcl2/c-myc proteinů má i v éře microarrays prognostický význam nezávislý na COO [29,32].

### Současný standard léčby DLBCL a identifikace pacientů s nepříznivou prognózou

Prognóza pacientů s DLBCL je již po déle než 20 let stanovována pomocí mezinárodního prognostického indexu (International prognostic index – IPI) včetně jeho modifikací (aaIPI, R-IPI, NCCN-IPI, E-IPI) [33–36]. IPI se ukázal jako užitečný i při určování prognózy relabujících a refrakterních DLBCL (saIPI) [37], alespoň v předrituximabové éře. Problém IPI, stejně jako dalších klinických prognostických indexů, z nichž uvedeme alespoň tzv. ABE index pro pacienty starší 60 let vyvinutý českou Kooperativní lymfomovou skupinou [38], je především v tom, že pacienty se špatnou prognózou sice identifikují, ale neumožňují nám účinně zasáhnout (tab. 2). Kombinace tradičních prognostických znaků

s prognostickými znaky biologickými, včetně COO, tento potenciál sice mají, ale optimální způsob jejich kombinace nebyl dosud nalezen.

V současné době je standardem léčby pro všechny pacienty s DLBCL, bez ohledu na věk a počet nepříznivých prognostických faktorů, režim s rituximabem a antracykliny, přičemž randomizované studie neprokázaly, že jakýkoli režim by byl lepší než R-CHOP (kombinace rituximabu a chemoterapie CHOP – cyklofosamid, doxorubicin, vinkristin a prednison) podávaný ve třítydenních intervalech (R-CHOP-21). Podle revidovaného IPI (R-IPI) pak i pacienti v prognosticky nejméně příznivé skupině (3–5 nepříznivých znaků) mají pravděpodobnost čtyřletého přežití bez progresu zhruba 50 %, tedy i v případě, že bychom měli k dispozici účinnější léčebný režim, znamenalo by to, že 50 % pacientů bude léčeno zbytečně intenzivně a s vyšší toxicitou.

V předrituximabové éře německá skupina pro studium vysoce maligních lymfomů ukázala v randomizovaných studiích, že zkrácení intervalu pro podání CHOP z 21 dnů na 14 (CHOP-14) u pacientů nad 60 let a přidání etoposidu k CHOP (CHOEP) u mladších nízké rizikových pacientů zlepšuje přežití bez události a celkové přežití (overall survival – OS) cca o 10 % v pěti letech [39,40]. Tyto výsledky se však nepodařilo v éře R-CHOP potvrdit [41–43].

Mírné kontroverze v současné rituximabové éře před nástupem novějších cílených způsobů léčby budí podskupina mladších nemocných (do 60 let) s vyšším aaIPI (2–3). Tato skupina nebyla ve směr zařazována do randomizovaných studií užívajících jako jedno z léčebných ramen R-CHOP-21. Výjimku tvoří pouze Cunninghamova studie [41], kde však nebyl uveden ani přesný počet těchto nemocných, ani jejich výsledky. Někteří odborníci se proto domnívají, že tito nemocní zaslouží intenzivnější přístup.

V randomizovaných studiích mladších rizikových pacientů byl nejvíce zkoumán přínos pozdní intenzifikace v podobě vysokodávkované léčby s podporou autologních křevetvorných buněk (HDT-ASCT). Byly publikovány celkem čtyři randomizované studie, které ne-

**Tab. 2. Prognostické systémy pro DLBCL založené na klinických parametrech (podle [33–38]).**

**A. Originální Mezinárodní prognostický index pro agresivní lymfomy léčené režimem s antracykliny, bez rituximabu (IPI) [33].**

Parametry: věk > 60, stadium III–IV, zvýšené LDH, špatný performance status (ECOG ≥ 2), postižení více než 1 extranodálního orgánu. Bod za každý nepříznivý prognostický faktor.

Bodů	Kompletní remise (%)	Celkové přežití v 5 letech (%)
0–1	87	73
2	67	51
3	55	43
4–5	44	26

**B. Věkově upravený Mezinárodní prognostický index (aaIPI) [33].**

Dělení podle věku: ≤ 60 a > 60 let, vypadáva postižení extranodálních orgánů, ostatní parametry jako u IPI.

Bodů	Kompletní remise (%)		Celkové přežití v 5 letech (%)	
	≤ 60 let	> 60 let	≤ 60 let	> 60 let
0	92	91	83	56
1	78	71	69	44
2	57	56	46	37
3	46	36	32	21

**C. Věkově upravený Mezinárodní prognostický index pro relabující a refraktení pacienty (sekundární aaIPI, saIPI) pro pacienty ≤ 60 let, léčba ICE, bez rituximabu [34].**

Stejně parametry jako u aaIPI.

Bodů	Kompletní remise (%)	Celkové přežití ve 4 letech (%)
0	60	74
1	28	49
2–3	21	18

**D. Revidovaný Mezinárodní prognostický index (R-IPI) pro pacienty léčené R-CHOP [35].**

Stejně parametry jako u IPI.

Bodů	Přežití bez selhání ve 4 letech (%)	Celkové přežití ve 4 letech (%)
0	94	94
1	80	79
2–3	53	55

**E. Upravený IPI (NCCN-IPI) pro pacienty léčené režimem s antracykliny a rituximabem [36].**

Parametry: věk do 40 let 0 bodů, > 40 let až ≤ 60 let 1 bod, > 60 let až ≤ 75 let 2 body, > 70 let 3 body, LDH – v normě 0 bodů, > 1 až ≤ 3násobek normy 1 bod, > 3násobek normy 2 body. Dále 1 bod za stadium III–IV, ≥ 1 extranodální postižení, ECOG performance status ≥ 2.

Bodů	Přežití bez selhání v 5 letech (%)		Celkové přežití v 5 letech (%)	
	NCCN	BCCA	NCCN	BCCA
0–1	91	94	96	96
2–3	74	72	82	77
4–5	51	54	64	56
≥ 6	30	35	33	38

NCCN – trénigový dataset (National Cancer Centers Network), BCCA – validační dataset (British Columbia Cancer Agency)

**E. E-IPI (elderly IPI) pro pacienty starší 60 let léčené R-CHOP [37].**

Prognostické faktory: stejné jako v IPI, pouze věková hranice je 70 let.

Bodů	Přežití bez selhání ve 3 letech (%)	Celkové přežití ve 3 letech (%)
0–1	77 (95% CI 69–89 %)	86 (95% CI 78–94 %)
2	62 (95% CI 50–73 %)	74 (95% CI 64–84 %)
3	47 (95% CI 36–59 %)	58 (95% CI 47–69 %)
4–5	28 (95% CI 14–43 %)	36 (95% CI 21–50 %)

**F. ABE3 prognostický index České Kooperativní lymfomové skupiny pro pacienty starší 60 let léčené antracyklinovým režimem s rituximabem [38].**

Nepříznivé faktory: věk ≥ 70 let, masivní postižení ≥ 7,5 cm, ECOG ≥ 2.

Skupina I – žádný nepříznivý faktor či jen věk, skupina II – masivní postižení, špatný celkový stav (ECOG) nebo kombinace věku a špatného celkového stavu, skupina III – masivní postižení v kombinaci s alespoň jedním dalším nepříznivým faktorem.

Skupina	Celkové přežití ve 3 letech (%)
I	92 (95% CI 86–98 %)
II	67 (95% CI 61–74 %)
III	36 (95% CI 26–51 %)

prokázaly přínos autologní transplantace [44–47]. Problém těchto studií spočívá jednak v samotném konceptu – pozdní intenzifikace nemůže pomoci pacientům, kteří nedosáhnou remise předchozí konvenční léčbou –, jednak i v tom, že ve třech ze čtyř studií byla použita v netransplantačním ramenu intenzivnější léčba než R-CHOP-21. V poslední studii pak byly zahrnuty i jiné diagnózy než DLBCL a 30 % pacientů s DLBCL nedostalo rituximab. Zatímco tedy bylo všeobecně přijato, že HDT-ASCT konsolidace nemá místo v léčbě 1. linie u pacientů s DLBCL, není jasné, zda některý z intenzivnějších indukčních režimů (R-CHOP-14, R-CHOEP-14 či R-MegaCHOP) má být u mladších rizikových pacientů pokládán za „nový standard“.

### Nové léčebné metody

Léků, které navazují na výše uvedené poznatky z biologie DLBCL, je v současné době v různých pokročilých fázích klinického zkoumání několik desítek a v preklinickém pochopitelně mnohem více. Z těchto důvodů se zde zaměříme na ty, které jsou již ve fázi randomizovaných klinických studií v primoléčbě, a na ty, u nichž probíhají nebo jsou připravovány klinické studie i v ČR.

### Lenalidomid

Lenalidomid je imunomodulační agens aktivující T lymfocyty a NK buňky. Kromě toho blokuje angiogenezi a má i přímý protinádorový účinek. Ve dvou pilotních studiích [48,49] byla prokázána jeho účinnost jako monoterapie u 19 %, resp. 28 % pacientů s relabovaným či refrakterním DLBCL. V následné studii zjišťující aktivitu lenalidomidu u různých DLBCL bylo zjištěno, že léčebná odpověď byla pozorována u 53 % pacientů s non-GC fenotypem, ale pouze u 9 % pacientů s GC fenotypem určeným dle algoritmu Hansové [23,50].

V dalších studiích vyšlo najevo, že část přímé protinádorové aktivity i aktivace T lymfocytů je zprostředkována aktivací exprese cereblonu (kódovaného genem *CRBN*). Cereblon způsobuje změnu afinity E3 ubikvitin ligázy, a tím zvýšenou degradaci určitých substrátů, včetně NF- $\kappa$ B, jehož signální dráha

hraje klíčovou roli v patogenezi non-GC (či ABC) lymfomů. Stejným způsobem jsou degradovány transkripční faktory IKZF1 (Ikaros) a IKZF3 (Aiolos) u T lymfocytů, což způsobuje jejich aktivaci. Lenalidomid rovněž snižuje expresi interferon regulačního faktoru 4 (IRF4), na němž je závislá aktivace *MYC* onkogenu [51,52]. V následující studii fáze II kombinující R-CHOP s lenalidomidem (R2-CHOP) bylo zjištěno, že lenalidomid ruší negativní prognostický efekt non-GC fenotypu u DLBCL [53].

V současné době jsou v běhu dvě randomizované studie fáze II–III zkoumající R-CHOP vs. R2-CHOP v primoléčbě DLBCL. První zahrnuje neléčené pacienty bez ohledu na jejich molekulární subtyp (NCT01856192), druhá, probíhající i v ČR, zahrnuje pouze pacienty s ABC subtypem na základě mRNA exprese vyšetřované pomocí nanostringů (NCT02285062). Přestože podání lenalidomidu těmto nemocným představuje potenciální přínos, referování pacientů do studie je poměrně obtížné právě vzhledem k nutnosti čekání na výsledky tohoto vyšetření. Vzhledem k potenciální efektivitě u pacientů se zvýšenou expresí *MYC* onkogenu probíhá rovněž pilotní studie lenalidomidu v kombinaci s DA-EPOCH-R u těchto nemocných (NCT02213913).

### Bortezomib

Bortezomib je první z inhibitorů proteazomu či dráhy ubikvitin-proteazom (UPP). Předpokládaným mechanismem účinku bylo přerušení NF- $\kappa$ B dráhy, i když jiným způsobem, než jakým funguje lenalidomid – bortezomib měl zabránit degradaci inhibitoru NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), a tím translokaci NF- $\kappa$ B do buněčného jádra [54]. Následně však bylo zjištěno několik dalších mechanismů účinku, které jsou na NF- $\kappa$ B nezávislé – zvýšená exprese p53, jež vede ke zvýšené expresi proapoptického proteinu Noxa [55], indukce stresu endoplazmatického retikula, který vede k uvolnění intracelulárního vázaného kalcia do cytoplazmy, jeho vychytávání mitochondriemi opět spouští apoptotickou kaskádu [56], či suprese HIF-1 $\alpha$ , který následně vede k utlumení PI3K/AKT/mTOR dráhy [57]. Kromě toho byl prokázán i vliv bortezo-

mibu na aktivaci protinádorových imunologických mechanismů [58].

Spekulace, že bortezomib potlačuje dráhu NF- $\kappa$ B, která je konstitučně aktivována u ABC podtypu DLBCL, vedla ke zkoumání mechanismu jeho účinku. Ve studii Dunleavyho et al [59] byl pacientům s relabovaným či refrakterním DLBCL podáván nejprve samotný bortezomib a posléze bortezomib v kombinaci s DA-EPOCH-R. Bylo zjištěno, že pacienti s ABC DLBCL mají skutečně větší procento celkové odpovědi než pacienti s GCB subtypem (83 vs. 13 %), stejně jako zlepšené OS (10,8 vs. 3,4 měsíce). Zlepšení předpokládané klinické odpovědi bylo zaznamenáno i v následné klinické studii R-CHOP s bortezomibem. Podobně jako lenalidomid i bortezomib ve spojení s R-CHOP dokázal smazat nepříznivý prognostický účinek ABC fenotypu [60]. I přes neznalost přesného mechanismu účinku bortezomibu u DLBCL vedly tyto klinické výsledky k zahájení několika randomizovaných studií chemoimunoterapie s bortezomibem vs. samotná chemoimunoterapie (např. NCT00931918 pro nově diagnostikované, NCT02542111 pro relabované pacienty s non-GC fenotypem). Vedle bortezomibu je v klinických zkouškách i nový inhibitor proteazomu, carfilzomib (NCT02073097).

### Dráha B buněčného receptoru (BCR)

Signalizace pomocí buněčného receptoru (BCR) je základní mechanismus přežití normálních i nádorových B buněk. U značného počtu DLBCL je tento receptor konstitučně aktivován, a to opět více u ABC než u GCB podtypu. Aktivace dráhy BCR vede v konečném důsledku jednak opět k aktivaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B, jednak k aktivaci mTOR pomocí dráhy PI3K/AKT/mTOR, což aktivuje několik cílů důležitých pro regulaci proteosyntézy [61].

BCR signální dráha je velmi komplikovaná, a přestože zde existuje několik molekul, které je možno farmakologicky zablokovat, nádorové buňky si mohou vytvořit únikový mechanismus přes jiné komponenty BCR dráhy. Kromě toho mutace v některých genech (např. *CARD11*, mutovaný v 10 % lymfomů GCB

i ABC fenotypu) způsobují rezistenci na blokátory BCR signální dráhy [62].

Z BCR blokátorů jsou zatím v klinické praxi u různých druhů lymfomů užívány čtyři – blokátor Syk kinázy fostamatinib, blokátor Brutonovy kinázy (BTK) ibrutinib (dříve PCI-32765), blokátor PI3-kinázy idelalisib a blokátor mTOR temsirolimus. U DLBCL se z těchto jeví nejperspektivnější ibrutinib.

Průkaz účinnosti ibrutinibu u relabovaných/refrakterních DLBCL byl podán ve studii [63], kde byla zjištěna jeho preferenční aktivita u ABC podtypu. V následné studii Ib se potvrdila jeho schůdnost podávání s R-CHOP [64] a v současné době probíhá randomizovaná studie R-CHOP vs. R-CHOP s ibrutinibem u ABC podtypu DLBCL (NCT01855750). Byla též zjištěna synergie mechanismu ibrutinibu s bortezomibem [65], která je rovněž zkoumána v klinických studiích, ovšem u pacientů s lymfomem z plášťových buněk (NCT02356458).

#### Venetoclax (ABT-199, GSC-0199)

Zvýšená exprese antiapoptotického proteinu bcl-2 je přítomna zhruba u 50 % DLBCL, pokud je zkoumána imunohistochemicky, záleží ovšem na způsobu hodnocení. I přes problémy s kvantifikací imunohistochemického stanovení je tento způsob vyšetření u DLBCL výhodný vzhledem k tomu, že bcl-2 může být exprimováno několika mechanismy, které se liší u GCB a ABC subtypu [66]: zatímco u GCB lymfomů je to většinou t(14;18), u ABC subtypu jde o amplifikaci genového lokusu.

Bcl-2 patří do skupiny antiapoptotických proteinů (spolu s Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W či A1), které jsou lokalizovány na buněčné membráně. Současně s nimi jsou na témže místě lokalizovány i molekulárně příbuzné antiapoptotické proteiny (Bad, Bax, Bim, Puma, Noxa), které se vážou na proteiny bcl-2 skupiny, umožňují jejich degradaci, a tím obnovují citlivost buněk k apoptóze [67].

Ohledně prognostického významu bcl-2 u DLBCL se dlouho vedly spory. V současné době panuje shoda, že zvýšená exprese bcl-2 sama o sobě neznamená horší prognózu, ale v kombinaci s některými dalšími faktory ano. Tímto

faktorem je především koexprese c-myc. Dvojitá exprese bcl-2 a je přítomna u 23–31 % pacientů s DLBCL [32,68] a je až 2krát častější u ABC než u GCB subtypu [69]. Oproti tomu dvojitá přestavba *BCL2* a *MYC* onkogenu je mezi předpokládanými DLBCL přítomna v méně než 10 % případů, v současné době jsou ovšem tyto lymfomy řazeny do skupiny blíže nespécifikovaných NHL s rysy intermediárními mezi DLBCL a Burkittovým lymfomem (tab. 1).

Vývoj inhibitorů bcl-2 probíhá už řadu let. První lék, blokující *BCL2* na genové úrovni, oblimersen, se přes určité léčebné úspěchy u chronické lymfatické leukemie a indolentních lymfomů [70,71] do praxe neprosadil. Úspěšněji si zatím vedou inhibitory bcl-2 proteinu, tzv. BH3 mimetika. Molekuly ABT-737 a jeho perorální verze ABT-263 (navitoclax) prokázaly svou efektivitu především v léčbě chronické lymfatické leukemie [72], ale měly poměrně signifikantní nežádoucí účinky (např. trombopenii), vyplývající z toho, že zároveň inhibovaly Bcl-X<sub>L</sub>. ABT-199 (GDC-0199 či venetoclax) je selektivním inhibitorem bcl-2 proteinu, nepůsobí trombopenii, a je proto možné ho kombinovat s chemoterapií. Předpokládá se, že by mohl zlepšit prognózu především v případech dvojitě exprese bcl-2 a c-myc [73].

Schůdnost podávání venetoclaxu spolu s chemoimunoterapií (bendamustin a rituximab) u relabovaných a refrakterních lymfomů byla prokázána ve studii prezentované na sjezdu Americké hematologické společnosti v roce 2014 [74]. V současné době je připravována studie fáze Ib/II u pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL, která bude zkoumat schůdnost a účinnost venetoclaxu v kombinaci R-CHOP nebo obinutuzumab-CHOP. Tato studie poběží i v ČR.

#### Závěr

V tomto článku jsme představili současný vývoj molekulární diagnostiky a na ní založené léčby pacientů s DLBCL. Vzhledem k počtu léků, které jsou v současné době v preklinickém i klinickém zkoumání, je velmi pravděpodobné, že některý z nich se dostane do běžné klinické praxe. To si vyžádá rozšíření našich rutinálních diagnostických metod o postupy,

kteří jsou v současné míře stále experimentální. Imunohistochemické stanovení exprese bcl-2 a c-myc nebude představovat zvláštní technické ani finanční nároky. Na druhé straně stanovení COO na molekulární úrovni bude vyžadovat alespoň zpočátku náročné technické vybavení, které patrně nebude k dispozici ani ve všech specializovaných hematologických centrech. I když je stále jistá naděje na to, že pro určení pacientů vhodných k léčbě na základě COO subtypu bude stačit imunohistochemie (jako v pilotních studiích s lenalidomidem), nedá se na to spoléhat. Kromě toho bude i z takto definovaných podskupin nutné vyloučit pacienty, kteří z určitých léčebných postupů nebudou moci mít přínos (např. 10 % nemocných s mutací CARD11). Určení specifických aktivačních či inhibičních genetických mutací bude vyžadovat NGS platformy, opět technicky i finančně náročné. Na tyto nezbytné úkoly by jistě bylo vhodné se s předstihem připravit.

#### Literatura

1. Winter JN, Variakojis D, Epstein AL. Phenotypic analysis of established diffuse histiocytic lymphoma cell lines utilizing monoclonal antibodies and cytochemical techniques. *Blood* 1984; 63(1): 140–146.
2. Shawler DL, Wormsley SB, Dillman RO et al. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry to detect peripheral blood and bone marrow involvement of a diffuse, poorly differentiated lymphoma. *Int J Immunopharmacol* 1985; 7(4): 423–432.
3. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403(6769): 503–511.
4. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8(1): 68–74.
5. Monti S, Savage KJ, Kutok JL et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005; 105(5): 1851–1861.
6. Tirado CA, Chen W, Garcia R et al. Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: a review of the literature. *J Hematol Oncol* 2012; 5: 54. doi: 10.1186/1756-8722-5-54.
7. Nedomova R, Papajik T, Prochazka V et al. Cytogenetics and molecular cytogenetics in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013; 157(3): 239–247.
8. Jardin F. Next generation sequencing and the management of diffuse large B-cell lymphoma: from whole exome analysis to targeted therapy. *Discov Med* 2014; 18(97): 51–65.
9. Scott DW, Mottok A, Ennishi D et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol* 2015; 33(26): 2848–2856. doi: 10.1200/JCO.2014.60.2383.

10. Armitage JO, Corder MP, Leimert JT et al. Advanced diffuse histiocytic lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) without maintenance therapy. *Cancer Treat Rep* 1980; 64(4–5): 649–654.
11. Coiffier B, Lepage E, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346(4): 235–242.
12. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol* 2005; 23(22): 5027–5033.
13. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 2006; 7(5): 379–391.
14. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Semin Cancer Biol* 2013; 23(6): 410–421. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.09.001.
15. Majchrzak A, Witkowska M, Smolewski P. Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: current knowledge and clinical significance. *Molecules* 2014; 19(9): 14304–14315. doi: 10.3390/molecules190914304.
16. Lenz G, Wright G, Dave S et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008; 359(22): 2313–2323. doi: 10.1056/NEJMoa0802885.
17. Pohlreich D, Vacková B, Pytlík R et al. Záchraná léčba a role transplantací u lymfomů. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 3): 3S95–3S104. doi: 10.14735/amko20153S95.
18. Stein H, Varnke RA, Chan WC et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH et al (eds). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2008: 233–237.
19. Rosenwald A, Wright G, Leroy K et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003; 198(6): 851–862.
20. Dave SS, Fu K, Wright GW et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 2006; 354(23): 2431–2442.
21. Hummel M, Bentink S, Berger H et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 2006; 354(23): 2419–2430.
22. Malumbres R, Chen J, Tibshirani R et al. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood* 2008; 111(12): 5509–5514. doi: 10.1182/blood-2008-02-136374.
23. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103(1): 275–282.
24. Coutinho R, Clear AJ, Owen A et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 2013; 19(24): 6686–6695. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1482.
25. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunotherapy. *Blood* 2011; 117(18): 4836–4843.
26. Benesova K, Forsterova K, Votavova H et al. The Hans algorithm failed to predict outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Neoplasma* 2013; 60(1): 68–73. doi: 10.4149/neo\_2013\_010.
27. Kulkarni MM. Digital multiplexed gene expression analysis using the NanoString nCounter system. *Curr Protoc Mol Biol* 2011; chapter 25: unit25B.10. doi: 10.1002/0471142727.mb25b10s94.
28. Scott DW, Wright GW, Williams PM et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 2014; 123(8): 1214–1217. doi: 10.1182/blood-2013-11-536433.
29. Scott DW, Mottok A, Ennishi D et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol* 2015; 33(26): 2848–2856. doi: 10.1200/JCO.2014.60.2383.
30. Intlekofer AM, Younes A. Precision therapy for lymphoma – current state and future directions. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11(10): 585–596. doi: 10.1038/nrclinonc.2014.137.
31. Dunleavy K, Wilson WH. Appropriate management of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology (Williston Park)* 2014; 28(4): 326–334.
32. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012; 30(28): 3452–3459.
33. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329(14): 987–994.
34. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007; 109(5): 1857–1861.
35. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood* 2014; 123(6): 837–842. doi: 10.1182/blood-2013-09-524108.
36. Hamlin PA, Zelenetz AD, Kewalramani T et al. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 102(6): 1989–1996.
37. Advani RH, Chen H, Habermann TM et al. Comparison of conventional prognostic indices in patients older than 60 years with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP in the US Intergroup Study (ECOG 4494, CALGB 9793): consideration of age greater than 70 years in an elderly prognostic index (E-IPI). *Br J Haematol* 2010; 151(2): 143–151.
38. Procházka V, Pytlík R, Janíková A et al. A new prognostic score for elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: the prognostic role of blood monocyte and lymphocyte counts is absent. *PLoS One* 2014; 9(7): e102594. doi: 10.1371/journal.pone.0102594.
39. Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 2004; 104(3): 626–633.
40. Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 2004; 104(3): 634–641.
41. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet* 2013; 381(9880): 1817–1826. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60313-X.
42. Delarue R, Tilly H, Mounier N et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14(6): 525–533. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70122-0.
43. Pfreundschuh M, Nickening C, Kannourakis G et al. Rituximab as a „chemo-equalizer“ in the MInT (Mabthera International Trial Group) study: treatment results of CHOP-21, CHOEP-21, MACOP-B and PMitCEBO with and without rituximab in young good-prognosis patients with aggressive lymphomas. *Ann Oncol* 2005; 16 (Suppl 5): v98.
44. Vitolo U, Chiappella A, Brusamolino E et al. Randomized multicentre phase III study for first line treatment of young patients with high risk (aIPI 2–3) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): Rituximab (R) plus dose-dense chemotherapy CHOP14/MegaCHOP14 with or without intensified high-dose chemotherapy (HDC) and autologous stem cell transplantation (ASCT). Results of DLCL04 trial of Italian Lymphoma Foundation (FIL) [abstract]. *Ann Oncol* 2011; 22 (Suppl 4): iv106.
45. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M et al. Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: an open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncol* 2012; 13(12): 1250–1259. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70481-3.
46. Cortelazzo S, Tarella C, Gianni AM et al. Chemoimmunotherapy with R-CHOP or high dose sequential therapy (R-HDS) with autologous stem cell transplantation (ASCT) for high risk DLBCL patients: preliminary results of the randomized RHD50305 trial by Gruppo Italiano Terapie Innovative nei Linfomi (GITIL) [abstract]. *Hematol Oncol* 2013; 31 (Suppl 1): 136.
47. Stiff PJ, Unger JM, Cook R et al. Autologous transplantation as consolidation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2013; 369(18): 1681–1690. doi: 10.1056/NEJMoa1301077.
48. Wiernik PH, Lossos IS, Tuscano JM et al. Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(30): 4952–4957. doi: 10.1200/JCO.2007.15.3429.
49. Witzig TE, Vose JM, Zinzani PL et al. An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2011; 22(7): 1622–1627. doi: 10.1093/annonc/mdq626.
50. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T et al. Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* 2012; 26(11): 2326–2335. doi: 10.1038/leu.2012.119.
51. Zhang LH, Kosek J, Wang M et al. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *Br J Haematol* 2013; 160(4): 487–502. doi: 10.1111/bjh.12172.
52. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL et al. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer* 2011; 117(22): 5058–5066. doi: 10.1002/cncr.26135.
53. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 2015; 33(3): 251–257. doi: 10.1200/JCO.2014.55.5714.
54. Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(1): 17–26.



55. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 2005; 65(14): 6282–6293.
56. Landowski TH, Megli CJ, Nullmeyer KD et al. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca<sup>2+</sup> is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res* 2005; 65(9): 3828–3836.
57. Befani CD, Vlachostergios PJ, Hatzidaki E et al. Bortezomib represses HIF-1 $\alpha$  protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90(1): 45–54. doi: 10.1007/s00109-011-0805-8.
58. Pellom ST Jr, Dudimah DF, Thounaojam MC et al. Modulatory effects of bortezomib on host immune cell functions. *Immunotherapy*. In press 2015.
59. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2009; 113(24): 6069–6676. doi: 10.1182/blood-2009-01-199679.
60. Ruan J, Martin P, Furman R et al. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2011; 29(6): 690–697. doi: 10.1200/JCO.2010.31.1142.
61. Vajpayee N, Thakral C, Gopaluni S et al. Activation of mammalian target of rapamycin in diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathological study. *Leuk Res* 2012; 36(11): 1403–1409. doi: 10.1016/j.leukres.2012.07.016.
62. Balasubramanian S, Crowley R, Sirisawad M et al. The Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 inhibits growth of ABC DLBCL tumors in vivo and in vitro by preventing activation of pro-survival NF- $\kappa$ B pathways. *Blood* 2011; 118: abstr. 4969.
63. Wilson WH, Gerecitano JF, Goy A et al. 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.
64. Younes A, Thieblemont C, Morschhauser F et al. Combination of ibrutinib with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) for treatment-naïve patients with CD20-positive B-cell non-Hodgkin lymphoma: a non-randomised, phase 1b study. *Lancet Oncol* 2014; 15(9): 1019–1126. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70311-0.
65. Dasmahapatra G, Patel H, Dent P et al. The Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor PCI-32765 synergistically increases proteasome inhibitor activity in diffuse large-B cell lymphoma (DLBCL) and mantle cell lymphoma (MCL) cells sensitive or resistant to bortezomib. *Br J Haematol* 2013; 161(1): 43–56. doi: 10.1111/bjh.12206.
66. Dunleavy K, Wilson WH. Differential role of BCL2 in molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17(24): 7505–7507. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2372.
67. Zivny J, Klenner P Jr, Pytlík R et al. The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. *Curr Pharm Des* 2010; 16(1): 11–33.
68. Green TM, Young KH, Visco C et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012; 30(28): 3460–3467.
69. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013; 121(20): 4021–4031. doi: 10.1182/blood-2012-10-460063.
70. Pro B, Leber B, Smith M et al. Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 143(3): 355–360. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07353.x.
71. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5208–5212. doi: 10.1200/JCO.2009.22.5748.
72. Kipps TJ, Eradat H, Grosicki S et al. A phase 2 study of the BH3 mimetic BCL2 inhibitor navitoclax (ABT-263) with or without rituximab, in previously untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. In press 2015.
73. Johnson-Farley N, Veliz J, Bhagavathi S et al. ABT-199, a BH3 mimetic that specifically targets Bcl-2, enhances the antitumor activity of chemotherapy, bortezomib and JQ1 in „double hit” lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 2015; 56(7): 2146–2152. doi: 10.3109/10428194.2014.981172.
74. de Vos S, Flowers CR, Wang D et al. The BCL-2 inhibitor ABT-199 (GDC-0199) in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 2014; 124(21): abstr. 1722.