

## Механизм действия и клиническая эффективность нового алкилирующего препарата бендамустин при хроническом лимфолейкозе

В.В. Стругов<sup>1</sup>, Е.А. Стадник<sup>1,2</sup>, А.Ю. Зарицкий<sup>1,2</sup>

### РЕФЕРАТ

#### Mechanism of action and clinical activity of a new alkylating agent bendamustine in chronic lymphocytic leukemia

V.V. Strugov<sup>1</sup>, E.A. Stadnik<sup>1,2</sup>, A.Yu. Zaritsky<sup>1,2</sup>

#### SUMMARY

Bendamustine, a nitrogen mustard derivative, is a new chemotherapeutic agent with marked activity in lymphoproliferative neoplasms. This review highlights action mechanism of the drug and its clinical effectiveness in chronic lymphocytic leukemia. Special attention is paid to toxicity as the majority of CLL patients are frail elderly people. An attempt to estimate activity in prognostically unfavourable group of patients with deletion of TP53 or known resistance to fludarabine is made.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia, treatment, bendamustine.

<sup>1</sup> Federal Almazov Heart, Blood and Endocrinology Centre, St. Petersburg

<sup>2</sup> Pavlov State Medical University, St. Petersburg

Контакты: vladimir.strugov@almazovcentre.ru

Принято в печать: 30 сентября 2011 г.

Бендамустин — новый цитостатический препарат из группы производных азотистого иприта, обладающий высокой активностью при злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях. Обзор посвящен механизмам действия препарата и его клинической эффективности при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ). Поскольку основной контингент больных ХЛЛ — пожилые люди, особое внимание уделено потенциальной токсичности препарата. Сделана попытка оценить возможность использования бендамустина в группах больных с неблагоприятным прогнозом, в частности с наличием делеции гена TP53, резистентности/рефрактерности к флударабину.

#### Ключевые слова:

хронический лимфолейкоз, лечение, бендамустин.

### ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — наиболее распространенный вид лейкоза в Западном полушарии. Заболевание встречается в основном у лиц пожилого возраста. Для этой возрастной группы характерно наличие сочетанной сопутствующей патологии, снижение функциональных резервов и ослабление защитных механизмов организма. Однако значительная часть пациентов имеет достаточно сохраненный соматический статус. Отчасти это связано с расширением доступности проточной цитометрии, позволяющей диагностировать ХЛЛ на ранних стадиях и, соответственно, в относительно молодом возрасте.

Для ХЛЛ характерно гетерогенное клиническое течение. Ряд пациентов могут не нуждаться в терапии в течение многих лет. В иных случаях, особенно при наличии del17p13.1 и/или мутации гена TP53 в опухолевом клоне, заболевание носит агрессивный характер. Другие биологические факторы, в частности мутационный статус IgVH-генов, уровень экспрессии CD38 и Zap-70, концентрация  $\beta_2$ -микроглобулина

в сыворотке, также могут использоваться для прогнозирования. В то же время, согласно международным рекомендациям, срок начала терапии определяется клиническими, а не биологическими факторами [1].

Несмотря на существенный прогресс в терапии, ХЛЛ остается неизлечимым заболеванием. Целью лечения на современном этапе служит максимальное увеличение продолжительности общей (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП) при минимально допустимом уровне токсичности. Во многих исследованиях доказана корреляция показателей выживаемости с числом полных ремиссий, но в них включались, как правило, молодые с удовлетворительным общим состоянием пациенты. Однако есть данные о том, что у пожилых больных, которые получали менее агрессивную терапию, полнота ответа не была связана с увеличением продолжительности жизни [2]. Использование в качестве цели терапии при ХЛЛ эрадикации минимальной остаточной болезни весьма перспективно, но у пожилых пациентов с многими сопутствующими заболеваниями интенсификация терапии

<sup>1</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

может привести не к увеличению, а напротив, к уменьшению показателей выживаемости. Исследований по изучению роли минимальной остаточной болезни, особенно в разных возрастных подгруппах пациентов с ХЛЛ, к настоящему времени еще недостаточно.

В последние годы в терапии ХЛЛ активно используется режим FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб). В исследованиях, проведенных Онкологическим центром М.Д. Anderson (MDACC) [3] и германской группой по изучению ХЛЛ [4], с помощью этой химиотерапевтической комбинации были достигнуты беспрецедентно высокие показатели частоты ответа и продолжительности выживаемости. Аллогенная трансплантация костного мозга с немиелоаблативными режимами кондиционирования, которая позиционируется как единственный радикальный метод терапии ХЛЛ, используется лишь в отдельных случаях из-за тяжелых осложнений и высокой летальности [5].

Серьезной проблемой в терапии ХЛЛ остается рефрактерность/резистентность к флударабину, которая ассоциируется с резистентностью к другим цитостатикам и низкой медианой ОВ, не превышающей 1–2 лет. [6] Использование у таких больных алемтузумаба существенно не продлевает ВБП, а также ограничено частыми инфекционными осложнениями и низкой эффективностью при массивной лимфаденопатии. Поскольку в 44 % случаев рефрактерность связана с повреждениями гена TP53 и еще в 19 % — делецией гена ATM [7], существует потребность в новых препаратах, активность которых не зависит от этих факторов.

В 2008 г. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) одобрило в качестве монотерапии первой линии у больных ХЛЛ и в случаях резистентности к ритуксимабу у пациентов с индолентными В-клеточными неходжкинскими лимфомами (НХЛ) новый алкилирующий препарат бендамустин.

Полученный в начале 1960-х годов в ГДР (Институт микробиологии и экспериментальной терапии, г. Йена) W. Ozegowski и D. Krebs [8, 9] вместе с рядом других алкилирующих соединений и изученный в 1970-е годы, он в течение нескольких десятилетий успешно применялся в Восточной, а позднее и в объединенной Германии для терапии солидных опухолей и самых разных гематологических заболеваний, включая лимфому Ходжкина и НХЛ, ХЛЛ, множественную миелому. С началом систематизированного изучения препарата (конец 1990-х годов) появились новые данные о его высокой эффективности при ХЛЛ и НХЛ.

Настоящий обзор посвящен исследованию активности бендамустина при ХЛЛ. Мы постарались обобщить имеющиеся клинические и биологические данные и определить потенциальную область для препарата в лечении этого заболевания. Методом работы стал анализ литературы, доступной по ключевым словам «bendamustine», «treanda», «IMET 3393», «cytostasan», «ribomustine» и «SDX-105» в базе данных Pubmed и сборниках рефератов ежегодных съездов ASCO, EHA и ASH.

## СТРУКТУРА И ФАРМАКОКИНЕТИКА

Химически бендамустин представляет собой 4-[5-(бис-2-хлорэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-бутановую кислоту и имеет наибольшее структурное сходство с хлорамбуцилом: общая бифункциональная мехлорэтаминовая группа определяет алкилирующие свойства этих препаратов и их положение в группе производных азотистого иприта, а остаток бутановой кислоты — водорастворимость. Существенное различие заключается в ароматическом ядре: позицию

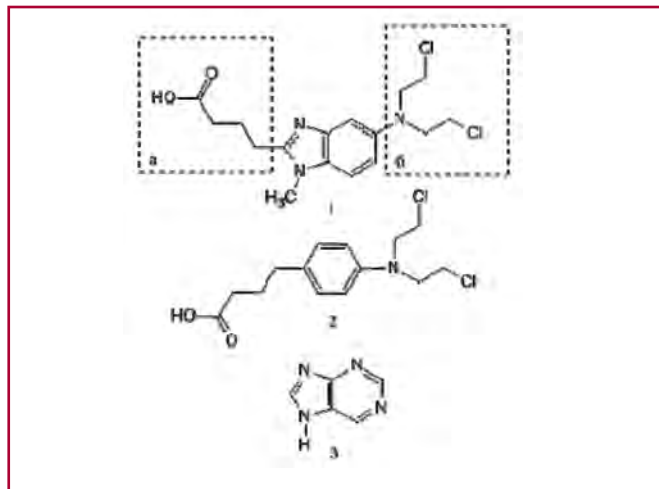


Рис. 1. Химическая структура:

1 — бендамустин: а) остаток бутановой кислоты, б) мехлорэтаминовая (N-lost) группа; 2 — хлорамбуцил; 3 — пурин

бензольного кольца в бендамустине занимает 1-метилбензимидазол. Последний напоминает своим строением другой известный гетероцикл — пурин (рис. 1).

Фармакокинетика препарата при внутривенном введении характеризуется быстрым (< 1 ч) достижением максимальной концентрации в плазме (около 8 мкг/мл [10]), быстрым ее снижением, интенсивным связыванием с белками (95 %), CYP1A2-зависимым метаболизмом и преимущественно (90 %) кишечной экскрецией с временем полувыведения 32–41 мин [11]. Биодоступность бендамустина при пероральном применении высока (от 57 [12] до 100 % [13]), но для него характерен эффект первичного прохождения (при приеме внутрь он практически полностью метаболизируется в печени и выводится с желчью). Два основных метаболита,  $\gamma$ -гидроксибендамустин (M3) и N-десметилбендамустин (M4), попадающие в кровь, имеют низкую концентрацию в плазме (около 10 % для M3 и 1 % для M4) и незначительную суммарную активность по сравнению с исходным веществом. В популяционных исследованиях легкое нарушение печеночной функции и легкое/умеренное снижение почечной функции не коррелировали со временем элиминации бендамустина [14]. Официальные рекомендации запрещают использование препарата при снижении клиренса креатинина менее 40 мл/мин, однако казуистические наблюдения указывают на отсутствие изменения фармакокинетических показателей у пациентов со снижением фильтрационной функции почек до уровня хронической болезни почек IV–V стадии [15].

Проникновение в клетку бендамустина осуществляется по механизму пассивной диффузии, а также за счет переносчика органических анионов 3 (OAT3) [16] и не зависит от транспортеров аминокислот.

## АКТИВНОСТЬ IN VITRO

Противоопухолевая активность производных азотистого иприта, к которым относятся бендамустин, хлорамбуцил, циклофосфамид и мелфалан, основана на их способности образовывать ковалентные сшивки в молекуле ДНК за счет последовательного алкилирования двух нуклеофильных центров в пуриновых остатках комплементарных цепей [17].

В наиболее типичном случае алкилирование происходит по атому азота в позиции N<sup>7</sup> гуанинового остатка. Образование межцепочечных связей между атомами азота в положении 7 пуринового кольца (N<sup>7</sup>–N<sup>7</sup> связи) — относительно

редкое (около 5% реакций), но потенциально губительное для клетки событие, цитотоксический эффект которого не зависит от фазы клеточного цикла. Функционально это объясняется тем, что межцепочечная сшивка осуществляет несколько функций: 1) останавливает трансляцию; 2) блокирует формирование репликационной вилки; 3) приводит к деформации молекулы ДНК, затрудняющей взаимодействие последней с белками.

Помимо сшивок в структуре ДНК алкилирующие препараты могут индуцировать образование ДНК-протеиновых связей в результате нуклеофильной атаки на остаток цистеина, однако значение этого механизма не до конца ясно [18].

В ответ на обширное повреждение ДНК в клетке активируются механизмы ее репарации. Так, элиминация N<sup>7</sup>-метилгуаниновых остатков осуществляется за счет механизмов эксцизии оснований (base excision repair — BER) [19]. В деалкилировании и удалении остатков O<sup>6</sup>-метилгуанина значительную роль играет белок O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) и путь репарации неспаренных оснований (mismatch repair — MMR) [20, 21]. Удаление межцепочечных сшивок представляется более сложным потенциально мутагенным процессом, который приводит к образованию одно- и двухцепочечных разрывов ДНК, в котором участвуют механизмы, связанные (гомологичная рекомбинация, HR) и несвязанные (эксцизия нуклеотидов, NER) с репликацией.

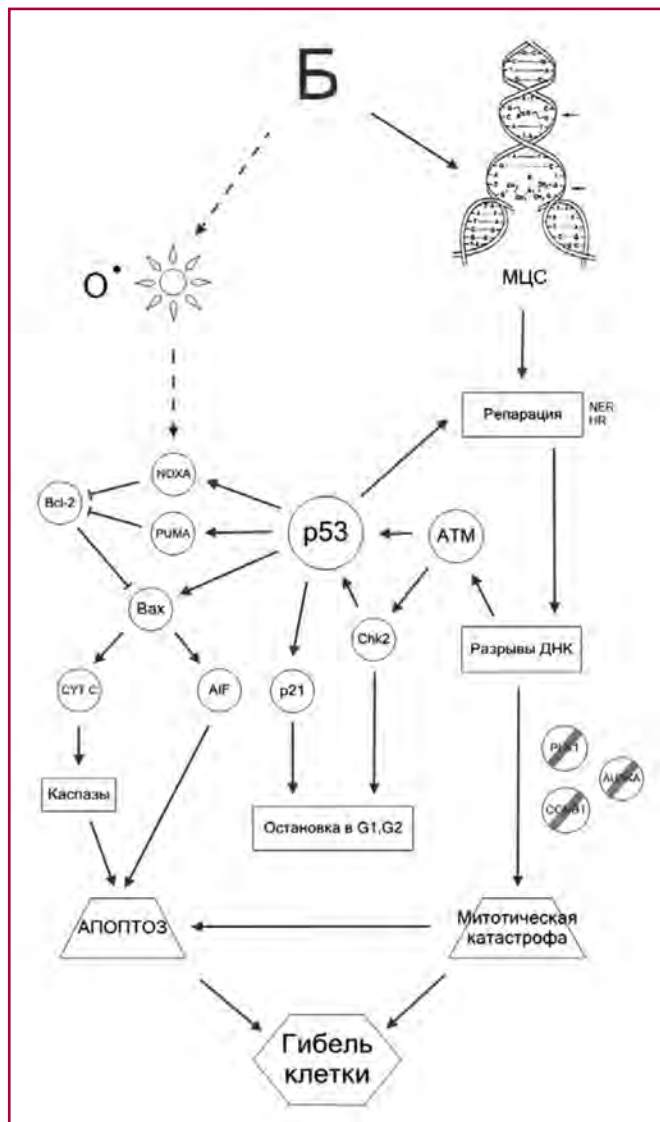
Репарация сопряжена с формированием одно- и двухцепочечных разрывов ДНК и играет неоднозначную роль в активности алкилирующих препаратов: с одной стороны, она участвует в развитии резистентности, а с другой — ее неэффективность приводит к амплификации поврежденных генома.

### Механизмы действия

Еще до синтеза бендамустина в экспериментах на животных была продемонстрирована необычно высокая противоопухолевая активность бензимидазолсодержащих производных бис-2-хлорэтиламина [22]. Эмпирически, с учетом накопленных данных о механизмах действия бензимидазола и его соединений [23], эта активность связывалась с антиметаболическим эффектом подобных конъюгатов, однако надлежащего экспериментального обоснования эта теория не получила.

Предположения о том, что бендамустин обладает свойствами пуринового аналога, часто основаны на результатах эксперимента с модуляцией накопления цитозин-арабинозидтрифосфата (ara-CTP) в бластных клетках [24]. Механистически аккумуляция ara-CTP ассоциируется с активацией деоксицитидинкиназы (dCK) в ответ на ингибирование рибонуклеотидредуктазы (RNR). Действительно, способностью ингибировать RNR обладают, в частности, пуриновые аналоги. Однако химическое строение бендамустина существенно отличается от пуриновых аналогов отсутствием остатков пентозы и фосфорной кислоты, возможность присоединения которых *in vivo* сомнительна [25]. К тому же в недавно опубликованной работе не было показано повышения активности dCK под действием препарата [26].

В целом имеющиеся данные указывают на то, что механизм действия бендамустина принципиально не отличается от других алкилирующих препаратов и связан с лигированием цепей ДНК [27]. Однако ответ клетки на эти повреждения в случае использования именно этого препарата имеет некоторые особенности, по-видимому обусловленные структурой и свойствами образуемых сшивок.



**Рис. 2.** Механизм действия. Межцепочечные сшивки (МЦС) в структуре ДНК удаляются в основном за счет механизмов нуклеотидной эксцизии (NER) и гомологичной рекомбинации (HR). Эти процессы сопряжены с формированием двухцепочечных разрывов ДНК, детектором которых служит ATM. Стабилизация и активация p53 под действием ATM приводят к остановке роста клетки (через белок p21), усилению репарации и, при неэффективности последней, запуску апоптоза. Дополнительным триггером может служить накопление реактивных форм кислорода. Каспазазависимый путь апоптоза инициируется высвобождением цитохрома С. Альтернативный механизм связан с выходом AIF, транслокация которого в ядро приводит к конденсации и фрагментации хроматина. Накопление разрывов ДНК при нарушении регуляции контрольных точек клеточного цикла, вызванном снижением экспрессии PLK1, CCNB1, AURKA, приводит к митотической катастрофе

Основными сенсорами повреждений ДНК в клетке служат пути ATM/Chk2 и ATR/Chk1, задействованные соответственно в детекции двухцепочечных разрывов ДНК и нарушений, вызывающих коллапс репликационной вилки [28]. В эффекторном звене этих путей существенную роль играет транскрипционный фактор p53, активация которого приводит к остановке клеточного цикла, попытке интенсификации репарации и, при неуспехе последней, инициации апоптоза (рис. 2).

В миеломных линиях NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 и U266 препарат активировал преимущественно путь ATM/Chk2/Cdc25A, что проявлялось в фосфорилировании Ser1981 ATM и Ser15 p53, «аресте» клеток в G<sub>2</sub>-фазе и запуске апоптотического каскада [29].

Активация p53 под действием препарата в клеточной линии SU-DHL-1 была более выражена в сравнении с хлорамбуцилом и циклофосфамидом и ассоциировалась

с повышением экспрессии p21, BAX и NOXA [30]. Логическим продолжением этих событий служит деполяризация митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома С и AIF с активацией зависимых и независимых от каспаз механизмов апоптоза [31].

Важная особенность препарата бендамустин — способность индуцировать ряд путей инициации клеточной гибели, в которых не принимает участие ген TP53.

Так, активация медиаторов внутреннего пути апоптоза наблюдалась в части клеток ХЛЛ и лимфомы зоны мантии (ЛЗМ) с дефектами гена TP53, что связывается с достаточно хорошо изученным феноменом p53-независимой активации NOXA [32]. В клетках с интактным p53 отмечалось параллельное с NOXA повышение экспрессии другого представителя семейства Bcl-2 — PUMA.

Частичное снижение цитотоксичности бендамустина и менее выраженная активация NOXA при добавлении антиоксидантов глутатиона (GSH) и N-ацетилцистеина косвенно свидетельствуют о роли активных форм кислорода в действии препарата, тем более что способностью индуцировать оксидантный стресс обладает хлорамбуцил [33, 34] и циклофосфамид [35, 36].

Не последним по важности механизмом действия препарата служит активация митотической катастрофы [37]. Это p53-независимый путь клеточной гибели, отличающийся от апоптоза и некроза. Он не имеет специфических маркеров, за исключением стереотипного изменения морфологии клетки. Считается, что митотическая катастрофа инициируется переходом клетки с обширными повреждениями генома в митотический цикл до завершения процессов репарации ДНК [38]. Этот путь может запускаться также нарушениями в сборке и организации веретена деления, например, под действием винкаалкалоидов и таксанов. Из производных азотистого иприта способностью активировать митотическую катастрофу обладает, в частности, мелфалан [39]. В эксперименте с бендамустином в присутствии ингибитора каспаз zVAD-fmk в полирезистентной клеточной линии MCF-7/ADR и дефектной по гену p53 линии RKO-E6 препарат индуцировал типичные для митотической катастрофы морфологические изменения примерно в 26 % клеток, в отличие от около 6 % в контроле. Активность бендамустина в данном случае может объясняться подавлением экспрессии генов PLK-1, Aurora A и Cyclin B. Ферменты PLK1 и Aurora A участвуют в регуляции контрольных точек клеточного цикла и не дают клетке начать митоз до завершения репарации. Известно, что ингибирование этих генов на уровне РНК или белка потенцирует действие цитостатиков за счет активации в части клеток митотической катастрофы.

### Репарационный профиль

В эквивалентных с циклофосфамидом и кармустином концентрациях бендамустин вызывает образование большего числа двухцепочечных разрывов ДНК в клетках линии рака молочной железы. По сравнению с другими алкилирующими препаратами степень фрагментированности ДНК в клетках, подвергшихся воздействию бендамустина, мало изменялась через 24 ч после экспозиции. Это указывает на наличие особенностей репарации повреждений, индуцируемых препаратом [40].

Аккумуляция клеток в S-фазе клеточного цикла, характерная для бендамустина, могла бы способствовать активации гомологичной рекомбинации, однако регуляция этого процесса в ответ на воздействие препарата не изучена. В то же время известно, что бендамустин сильнее хлорамбуцила и фосфорамидиприта индуцирует экспрессию экзонуклеазы I (Exo1). Этот фермент, традиционно ассоциируемый с пу-

тем репарации неспаренных оснований (MMR), необходим для отдельных стадий рекомбинации [41]. Интересно, что второе по величине повышение экспрессии Exo1 вызывает хлорамбуцил, резистентность к которому при ХЛЛ сопряжена с интенсификацией гомологичной рекомбинации [42].

В отличие от фосфорамидиприта цитотоксический эффект бендамустина не потенцировался специфическим ингибитором MGMT в клеточных линиях Raji и SU-DHL-1. Это указывает на то, что алкилтрансферазный механизм репарации ДНК, активация которого вызывает опухолевую резистентность, не ослабляет действие препарата. В то же время роль MGMT в репарации повреждений, индуцируемых N<sup>7</sup>-алкилирующими агентами, невелика.

Относительно большой вклад BER в модуляцию цитотоксичности препарата был продемонстрирован в эксперименте с ингибированием ключевого фермента этого пути — апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы I (Ape1). Блокировка BER коррелировала с 4–6-кратным снижением летальной концентрации (LC<sub>50</sub>) препарата и не влияла на аналогичный показатель фосфорамидиприта. Зависимость от BER может быть слабым звеном, поскольку повышение активности Ape1 коррелирует с химиорезистентностью ряда солидных опухолей [43, 44].

Недостаточно изучено место в репарационном профиле препарата механизмов эксцизии нуклеотидов (NER) и соединения негомологичных концов (NHEJ). Известна роль этих путей в формировании устойчивости к монотерапии алкилирующими средствами: повышенная экспрессия ERCC-1 и DNA-РК при ХЛЛ определяет химиорезистентность [45–47].

### Цитотоксический профиль

Определение противоопухолевой активности химических соединений проводится с помощью стандартной панели NCI IVCLSP (In Vitro Cell Line Screening Project), в состав которой входит 60 клеточных линий различных опухолей человека [48]. Поскольку часть клеточных линий может обладать той или иной степенью резистентности к тестируемому соединению, оценка показателей цитотоксичности (LD<sub>50</sub>, GI<sub>50</sub>, TGI) во всех 60 линиях позволяет получить уникальный профиль активности вещества. Путем сопоставления этого профиля с другими известными соединениями, в свою очередь, можно прогнозировать механизм действия препарата.

В отличие от хлорамбуцила, мелфалана и активных метаболитов циклофосфамида, которые имеют сходный с другими алкилирующими препаратами профиль активности и высокий коэффициент корреляции друг с другом (0,76–0,93), бендамустин демонстрирует значимую корреляцию только с дакарбазином (0,792, LC<sub>50</sub>, вероятность идентичного механизма действия более 50 %) и небольшую корреляцию с ингибитором топоизомеразы I (0,619, TGI) и производным антрациклина N,N-дибензилдауномицином (0,574, TGI). Обращает на себя внимание отсутствие связи с другими производными азотистого иприта, за исключением субпороговой для мелфалана (0,550, GI<sub>50</sub>).

Бендамустин индуцирует отличный от хлорамбуцила и фосфорамидиприта профиль генной экспрессии. В частности, это проявляется в активации группы генов, участвующих в метаболизме нуклеотидов и контроле клеточного цикла.

В эксперименте на лимфомной линии SU-DHL-1 значимое снижение жизнеспособности, инактивация PARP и фосфорилирование Ser<sup>139</sup> гистона H2AX наблюдались после относительно кратковременного (30 мин) воздействия бендамустина [49]. Для достижения аналогичного результата требовалась более продолжительная (≥ 4 ч) экспозиция хлорамбуцила, мелфалана и фосфорамидиприта.

Бендамустин показал лишь частичную перекрестную резистентность с алкилирующими препаратами в устойчивых к цисплатину и доксорубину клеточных линиях [40]. При *ex vivo* оценке чувствительности клеток, полученных от пациентов с НХЛ (DiSC assay), препарат был эффективен в ряде случаев с резистентностью к 4-гидроксициклофосфамиду. Интересно, что две клеточные линии, целенаправленно длительная экспозиция препарата в которых привела к развитию резистентности, сохранили чувствительность к хлорамбуцилу и фосфорамидиприту [50]. Бендамустин был активен в лимфоцитах у больных ХЛЛ, имевших в анамнезе терапию хлорамбуцил- и флударабинсодержащими режимами, причем летальная доза ( $LD_{50}$ ) препарата была выше в группе нелеченных больных (4,3 vs 7,4 мкг/мл) [51].

Ряд экспериментов демонстрирует эффективность бендамустина *in vitro* в опухолевых клетках с инактивированным в результате мутации или del17p13.1 белком p53. Так, при *ex vivo* культивировании клеток, полученных от пациентов с ХЛЛ и ЛЗМ, не было зарегистрировано зависимости  $LD_{50}$  препарата от функционального состояния гена TP53 [31]. Аналогичный результат был получен при количественной оценке индукции апоптоза (44,6 и 37,1 %;  $p = 0,14$ ) в другом эксперименте [26].

Избирательность действия бендамустина иллюстрируется уровнем  $LD_{40}$  в нормальных клетках (21,8 мкг/мл) и лимфоцитах при ХЛЛ (2,5–4,3 мкг/мл) [51], а также наибольшей активностью в лимфоидном ростке [52]. В сравнении с флударабином *in vitro* препарат значительно менее токсичен для гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и клоногенных предшественников [53]. *In vivo* эти данные подтверждаются успешностью афереза ГСК после терапии бендамустином [54]. Концепция использования препарата для мобилизации ГСК проходит клинические испытания [55].

Поскольку резистентность к цитостатикам при ХЛЛ отчасти связана с протективным действием клеточного микроокружения [56–58] и повышением экспрессии ингибиторов апоптоза Bcl-2 [59] и Mcl-1 [60], значительный интерес представляет исследование влияния этих факторов на активность бендамустина. Работ, посвященных этой теме, нами не обнаружено.

#### ***In vitro* исследования комбинаций с другими препаратами**

Ритуксимаб — химерное моноклональное антитело к поверхностному антигену CD20 В-лимфоцитов, имеет уникальное соотношение противоопухолевой активности и токсичности. В последние годы он активно применяется в комбинированных схемах терапии В-клеточных НХЛ и ХЛЛ. Особенность этого препарата заключается в его способности потенцировать действие многих цитостатиков. В отличие от механизмов действия обычных химиопрепаратов, противоопухолевая активность ритуксимаба в той или иной степени опосредуется прямой индукцией апоптоза, комплемент- и антителозависимой цитотоксичностью [61]. Однако, несмотря на разные механизмы противоопухолевой активности, в эксперименте описано развитие устойчивости к цитостатикам клеточных линий, резистентных к ритуксимабу [62].

Увеличение противоопухолевой активности бендамустина при комбинации его с ритуксимабом *in vitro* было показано на фолликулярных линиях DONN-2 и WSU-NHL и мононуклеарах у больных ХЛЛ [63]. В эксперименте наблюдалось двукратное снижение  $LC_{30}$  и  $LC_{50}$  бендамустина в линиях и уменьшение  $LC_{50}$  на  $1/3$  в клетках ХЛЛ [64]. Этот эффект не усиливался добавлением компонентов комплемента.

В онкологии широко используется синергизм алкилирующих препаратов и нуклеотидных аналогов. Так, известны

комбинации гемцитабина с оксалиплатином (GEM-OX), цитарабина с цисплатином (DHAP, EDAP) и мелфаланом (BEAM), флударабина и пентостатина с циклофосфамидом (FCR, PCR). Эффективность этих сочетаний обоснована независимым от фазы клеточного цикла усилением включения нуклеотидных аналогов в ДНК в результате активации репаративных процессов под действием алкилирующих средств. Внедрение модифицированных нуклеотидов в структуру ДНК приводит, в свою очередь, к ингибированию репарации [65, 66].

Гемцитабин усиливает активность бендамустина в клетках ЛЗМ [31].

Значительный синергизм бендамустина с флударабином (95%-й доверительный интервал [95% ДИ] 0,74–0,26 в зависимости от концентрации) наблюдался в мононуклеарах у 22 из 24 пациентов с ХЛЛ и не зависел от стадии заболевания [51]. В работе других авторов были получены аналогичные результаты, причем закономерность сохранялась в резистентных к флударабину и дефектных по p53 случаях [31].

Синергичный цитотоксический эффект характерен для комбинаций бендамустина с кладрибином. В мононуклеарах у больных НХЛ и ХЛЛ этот эффект был выражен при относительно низких концентрациях бендамустина (25 и 50 мкг/мл) и не проявлялся при более высоких [67]. Сочетание препаратов приводило к высвобождению цитохрома С и Smac/DIABLO и снижению экспрессии ингибиторов апоптоза XIAP и cIAP1 в линии DONN-2 [68].

Антагонизм бендамустина с пиримидиновым аналогом цитарабином (Ara-C) был продемонстрирован в миелоидных линиях HL60 и HEL как при последовательном, так и одновременном воздействии соединений [69]. Эти данные согласуются с неспособностью бендамустина активировать деоксицитидинкиназу.

Бендамустин демонстрирует нетипичный для алкилирующих препаратов антагонизм с доксорубицином [70] и митоксантроном [67]. Последовательная активация BER и топоизомеразы II в ходе процессинга апуриновых/апиримидиновых сайтов приводит к образованию двухцепочечных разрывов ДНК [71, 72]. В этой связи можно предположить, что инактивирование топоизомеразы II уменьшает цитостатическое действие бендамустина. Альтернативным объяснением может служить повышение экспрессии Ape1 [73].

Другие перспективные комбинации препарата (с антимитотическими агентами, ингибиторами контрольных точек митоза; см. обзор [74]) не исследованы.

#### **ОБЗОР КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Клинические исследования, опубликованные в 1970–1980-е годы в Германии, не соответствуют современным диагностическим, этическим и методологическим стандартам. Главным их недостатком представляется включение нозологически неоднородного контингента больных и эмпирический выбор дозировок. После возрождения интереса к бендамустину в конце 1990-х годов изучение препарата началось фактически с чистого листа.

Для большинства больных ХЛЛ характерно наличие недостаточности кроветворения, обусловленной опухолевой инфильтрацией костного мозга, и значительное снижение иммунитета. Эти факторы лимитируют допустимую токсичность новых методов терапии и объясняют необходимость тщательного титрования доз в клинических исследованиях. Отчасти из-за этого большая часть опубликованных на данный момент работ по бендамустину представляет собой исследования I–II фазы.

К сожалению, лишь в нескольких современных работах анализируется распределение неблагоприятных прогностических факторов, что затрудняет интерпретацию данных, полученных в сравнительных исследованиях, и не позволяет сопоставлять результаты отдельных публикаций. В ряде работ использованы нестандартные критерии оценки ответа и токсичности. Принимая во внимание все эти ограничения, мы постарались, тем не менее, сделать некоторые общие выводы и уделить внимание активности препарата в клинически сложных случаях.

### **Исследования терапии первой линии**

#### **Монотерапия**

Самое раннее исследование активности препарата в первой линии терапии при ХЛЛ относится к 1975 г., когда G. Anger и соавт. [75] проспективно рандомизировали 70 пациентов на терапию бендамустином и циклофосфамидом. Авторы описали ответ у 82 % пациентов, получавших бендамустин, и только у 32 % в группе циклофосфамида.

Важным этапом в клинической апробации препарата стало открытое многоцентровое рандомизированное исследование III фазы эффективности бендамустина в сравнении с хлорамбуцилом [76], результаты которого послужили поводом для разрешения использования препарата в первой линии терапии ХЛЛ в США. В две группы протокола было включено соответственно 162 и 157 больных с достаточно сбалансированным распределением по возрасту, стадии заболевания, наличию В-симптомов и активности лактатдегидрогеназы. Доза бендамустина составила 100 мг/м<sup>2</sup> в течение 2 дней, хлорамбуцила — 0,8 мг/кг идеальной массы тела по Вгоса в 1-й и 15-й дни. Общий ответ у пациентов, получавших бендамустин, составил 68 %, а у пациентов, получавших хлорамбуцил, — 31 %. Число полных ремиссий (ПР) составило 31 и 2 % соответственно. Медиана ВБП также показала преимущество бендамустина (21,8 vs 8 мес.). Разница в показателях ОВ требует более длительного наблюдения и по состоянию на 2009 г. еще не была подтверждена (медиана не достигнута в подгруппе бендамустина и составила 65,4 мес. в подгруппе хлорамбуцила;  $p = 0,16$ ). Гематологическая токсичность III–IV степени чаще отмечалась в подгруппе бендамустина (40 vs 19 %). Инфекционные осложнения также были более характерны для этого препарата (8 vs 3 %). 36 % пациентов получали антиэметики в подгруппе бендамустина и только 4 % — в подгруппе хлорамбуцила. Критика дизайна этого протокола сосредоточена на заведомо выигрышном выборе препарата сравнения, субоптимальной дозе хлорамбуцила и отсутствии цитогенетического анализа в подгруппах больных.

Таким образом, у пациентов с ХЛЛ, не получавших ранее лечения, препарат имеет эффективность, сравнимую с результатами использования флударабина в монотерапии или в комбинации с циклофосфамидом, однако уступает по эффективности режиму FCR. Благоприятный токсический профиль препарата открывает возможности для его сочетания с другими цитостатиками и антителами.

#### **Комбинации**

Накопленный опыт использования ритуксимаба при ХЛЛ и исследования *in vitro* указывали на рациональность комбинации бендамустина с этим антителом, результатом чего стал германский протокол CLL2M [77]. В этом исследовании бендамустин назначался в дозе 90 мг/м<sup>2</sup> в 1–2-й день, ритуксимаб — 375 мг/м<sup>2</sup> в первом курсе и 500 мг/м<sup>2</sup> в последующих. Медиана возраста 117 включенных пациентов составила 64 года, 47,9 % имели стадию С по Binet и 11,1 % — стадию А. Общий ответ на терапию составил 90,9 % с 36 (32,7 %) ПР, 3 (2,7 %) нодулярными частичными

и 61 (55,5 %) частичной ремиссиями (ЧР). Еще у 10 (9,1 %) пациентов была зарегистрирована стабилизация заболевания (СЗ). При определении уровня минимальной остаточной болезни в крови отрицательный результат был получен у 29 из 50 пациентов, в костном мозге — у 7 из 25. В исследование вошел 21 пациент с del11q; интересным наблюдением стало то, что ответ на лечение у них был не хуже, чем в общей популяции: достигнуто 9 (43 %) ПР и 10 (47,5 %) ЧР. Однако среди 7 пациентов с del17p только у 3 (42,9 %) была получена ЧР. Хорошие результаты были достигнуты в другой прогностически неблагоприятной подгруппе: 88,9 % пациентов с немутированными VH-генами ответили на лечение. Примечательно, что при времени наблюдения 18 мес. медиана ВБП не была достигнута, поскольку 75,8 % пациентов оставались в ремиссии. Такие хорошие результаты лечения были достигнуты при относительно низкой токсичности режима. Лейкопения III–IV степени отмечалась в 14,6 % из 583 курсов терапии, нейтропения III–IV степени — в 6,5 % и тромбоцитопения III–IV степени — в 6,1 %. В исследовании было 29 эпизодов инфекционных осложнений III–IV степени (5,1 % всех курсов) с 2 летальными исходами (пневмония и сепсис).

Продолжением этой работы служит начатое в 2008 г. многоцентровое открытое рандомизированное исследование III фазы CLL10, в котором комбинация BR сравнивается со стандартом терапии первой линии FCR. Авторами формулируется гипотеза, что при не уступающей режиму FCR эффективности у пациентов без del17p режим BR обладает меньшей токсичностью и лучшей переносимостью. Основным оцениваемым показателем в протоколе принята ВБП через 24 мес. В исследование планируется включить 550 пациентов до 2012 г.

### **Исследования терапии второй линии**

#### **Монотерапия**

Среди 102 пациентов, включенных в исследование II фазы K. Веггер и соавт. [78], было 15 пациентов с ХЛЛ, получавших лечение ранее. Медиана числа примененных предшествующих режимов равнялась 5, 4 пациента получали флударабин и не имели резистентности к нему. Медиана возраста составила 72 года (диапазон 46–81 год). Препарат назначался в дозе 60 мг/м<sup>2</sup> в сутки с 1-го по 5-й день 4-недельного цикла (при развитии цитопении допускался перерыв в лечении до 2 нед.). Авторы руководствовались стандартами оценки ответа, предложенными для НХЛ [79]. Согласно этим критериям, были получены 1 (6,7 %) ПР, 13 (86,7 %) ЧР и 1 (6,7 %) СЗ. После медианы наблюдения 29 мес. медиана ВБП еще не была достигнута, а медиана ОВ составила 32 мес. Отдельного анализа токсичности у больных ХЛЛ не проводилось. Только у 39 пациентов удавалось придерживаться 4-недельного режима терапии. Среди всех пациентов лейкопения III степени и выше наблюдалась у 25 % больных, в то же время инфекционных осложнений зарегистрировано не было. Авторы подчеркнули хорошую переносимость и высокую эффективность препарата, особенно в подгруппе пациентов с ХЛЛ.

Похожее исследование, в котором бендамустин применялся в режиме монотерапии, было проведено R. Kath и соавт. [80] у 23 пациентов с III–IV стадией ХЛЛ по Rai; 11 из них получали химиотерапию ранее (в среднем 2 режима). Медиана возраста включенных больных была 62 года. Бендамустин назначался в дозе 60 или 50 мг/м<sup>2</sup> (у пациентов старше 70 лет) в сутки в каждые 5 дней 4-недельного цикла. После 1-го курса терапии 3 (13 %) пациента умерли в результате инфекционных осложнений на фоне выраженной миелосупрессии. Только один из них до этого

не лечился. Наиболее значимым нежелательным явлением была лейкопения (III–IV степени в 38 из 74 курсов, 51 %). Из 20 больных, получавших терапию, у 6 (30 %) была получена ПР, у 9 (45 %) — ЧР, у 5 (25 %) — СЗ по критериям Национального института рака США (NCI) 1996 г. Общий ответ в группе лечения несколько хуже, чем в группе контроля (66 и 82 % соответственно). Медиана ОВ всех больных составила 13,6 мес. Пациент с монотерапией флударабином в анамнезе после 6 курсов бендамустина достиг ПР, которая сохранялась в течение 18 мес.

Руководствуясь опытом этих исследований, M. Aivado и соавт. [81] включили 23 пациента с рефрактерным ХЛЛ или рецидивом заболевания в исследование, предусматривавшее введение бендамустина в дозе 100 мг/м<sup>2</sup> в сутки в первые 2 дня 4-недельного цикла. Лечение проводилось до достижения ремиссии, максимально 6 курсов. Среднее количество предшествующих режимов химиотерапии также составило 2; 10 (43,5 %) пациентов получали монотерапию флударабином, у 5 больных отмечена рефрактерность к нему. В исследуемой популяции преобладали пациенты с поздними стадиями заболевания (у 4 — III стадия по Rai, у 17 — IV стадия по Rai), медиана возраста составляла 69 лет. Окончательному анализу были доступны данные 21 пациента, из них у 14 (67 %) был получен ответ, у 6 (29 %) — ПР и у 8 (38 %) — ЧР. Важно отметить, что авторами использовались нестандартные критерии оценки ответа: анализировалась динамика гематологических и клинических показателей без учета лимфаденопатии и органомегалии. Медиана ВБП составила 6 мес. (диапазон 4–19 мес.), у 8 (38 %) пациентов гематологическая ремиссия сохранялась через 19 мес. наблюдения. Из 5 пациентов с рефрактерностью к флударабину у 1 (20 %) отмечена полная гематологическая ремиссия, которая сохранялась в течение 10 мес. наблюдения, у 1 (20 %) — ЧР и у 3 (60 %) — СЗ (судьба этих больных не описана). Токсичность была преимущественно гематологическая, умеренная (лейкопения IV степени в 5 из 62 курсов, тромбоцитопения IV степени — в 6), хотя терапия откладывалась из-за развития цитопении у половины больных.

T. Lissitschkov и соавт. включили 15 пациентов с ХЛЛ, предварительно получавших лечение, в одноцентровое открытое исследование. Одним из условий включения было отсутствие пуриновых аналогов в предшествующей терапии. Начальная доза бендамустина составила 100 мг/м<sup>2</sup>. Препарат вводился в первые 2 дня каждого 3-недельного цикла. Сразу после начала исследования цикл был увеличен до 4 нед., т. к. у большинства пациентов не успевало окончательно восстановиться кроветворение. Редукцию доз не проводили. Максимально переносимая доза была 110 мг/м<sup>2</sup>. Летальных исходов не было. У 2 пациентов развилась дозолimitирующая гематологическая токсичность, у 6 — клинически значимая гипербилирубинемия. Общий ответ составил 60 %. Через 15 мес. ремиссия сохранялась у 5 пациентов [82].

Германская группа по изучению ХЛЛ провела свое исследование I–II фазы у 16 леченных ранее пациентов [83]. Отличие этой работы — действительно «залеченный» контингент больных: медиана предшествующих режимов терапии составила 3; 8 (50 %) больных получали лечение флударабином и 4 были резистентны к нему, 13 (81 %) больных имели резистентность к хлорамбуцилу. Средний возраст составил 67 лет (диапазон 57–83 года), у большинства пациентов (10, или 62,5 %) была стадия С по Binet. Доза бендамустина составила 100 мг/м<sup>2</sup> в первые 2 дня каждые 3–4 нед. Однако выраженная токсичность (преимущественно гематологическая) потребовала снижения дозы до 70 мг/м<sup>2</sup>. За 53 курса терапии было зафиксировано 7 слу-

чаев инфекции, 8 — лейкопении, 4 — тромбоцитопении и 6 — анемии III–IV степени.

При использовании дозы 80 мг/м<sup>2</sup> было зарегистрировано 3 (19 %) летальных исхода после 1-го курса терапии. Все 3 пациента имели в анамнезе резистентность к флударабину и не ответили на лечение, у 1 больного цитогенетическое исследование выявило del11q. Непосредственной причиной смерти стали инфекционные осложнения. 6 пациентам не удалось провести более 3 курсов терапии, и они были исключены из анализа. Уровень общего ответа составил 70 %. Медиана продолжительности ответа составила 42,7 мес. (диапазон 7–43,6 мес.). Медиана ОВ для всех пациентов — 45,6 мес. (95 % ДИ 33,6–57,5 мес.). Наилучшие показатели выживаемости отмечены у 2 пациентов, не имеющих в анамнезе резистентности к хлорамбуцилу и флударабину. Наименьшая продолжительность ответа (7 мес.) зарегистрирована у пациента с резистентностью к флударабину.

N. Niederle и соавт. сравнили эффективность бендамустина и флударабина во второй линии терапии у 89 пациентов, не получавших ранее флударабин. Бендамустин назначался в дозе 100 мг/м<sup>2</sup> в 1–2-й день, флударабин — 25 мг/м<sup>2</sup> в 1–5-й день. Распределение клинических факторов по подгруппам было достаточно однородным с некоторым преобладанием благоприятного функционального статуса у пациентов, получавших бендамустин (47, или 29 %). Общий ответ для бендамустина и флударабина составил соответственно 78 и 65 %, полный ответ — 29 и 10 %, хотя медианы ВБП между режимами статистически значимо не различались (19 vs 15 мес.;  $p = 0,35$ ). Гематологическая токсичность была несколько выше в группе бендамустина при одинаковом уровне инфекционных осложнений (15 %) [84].

Обобщая результаты этих небольших одноцентровых нерандомизированных исследований, можно сделать вывод о том, что оптимальная доза бендамустина для пациентов, получавших терапию ранее, составляет 70 мг/м<sup>2</sup> 2 раза в сутки, однако может быть повышена до 100 мг/м<sup>2</sup> 2 раза в сутки у отдельных больных с удовлетворительным общим состоянием (в частности, не получавших до этого лечение флударабином). Монотерапия бендамустином во второй линии несколько проигрывает по эффективности режиму FCR [85] у нерезистентных к флударабину больных и точно не служит терапией выбора для пациентов с резистентностью к этому препарату. Количество инфекционных осложнений и летальных исходов прямо пропорционально объему полученного лечения и выраженности снижения иммунитета.

### Комбинации

Несмотря на антагонизм бендамустина и митоксантрона *in vitro*, H. Koppler и соавт. [86], руководствуясь собственным опытом лечения НХЛ, провели испытание комбинации этих препаратов во второй линии терапии у больных ХЛЛ. В исследование I–II фазы было включено 22 пациента с медианой возраста 71 год, получившие до этого в среднем один режим терапии. У 16 (73 %) пациентов была стадия С по Binet. Планировалась эскалация курсовой дозы бендамустина с 80 до 240 мг/м<sup>2</sup> и дозы митоксантрона с 8 до 10 мг/м<sup>2</sup>. Из-за дозозависимых инфекционных осложнений авторы рекомендовали использовать дозу 50 мг/м<sup>2</sup> бендамустина в 1–3-й день и 10 мг/м<sup>2</sup> митоксантрона в 1-й день 4-недельного курса. Однако при использовании этих доз у 3 из 8 пациентов развилась лейкопения IV степени, у 4 — лейкопения III степени, у 3 — анемия III степени, у 4 — тромбоцитопения III степени и у 2 — инфекции III степени. В целом у 14 (63 %) участников исследования была отмечена лейкопения III–IV степени и у 6 (27 %) — фебрильная нейтропения. Из 5 локализованных инфекций

преобладали пневмонии, в т. ч. 1 пневмоцистная. Из 22 пациентов на лечение ответило 19 (86 %) с 6 (27 %) ПР и 13 (59 %) ЧР. При медиане срока наблюдения 20 мес. медиана ВБП составила 10 мес. (диапазон 4–22 мес.), медиана ОВ — 39 мес. (диапазон 6–50 мес.).

На прошедшем в 2008 г. конгрессе Американского общества гематологии К. Fischer и соавт. [87] доложили результаты исследования по применению комбинации бендамустина и ритуксимаба у ранее леченных больных ХЛЛ (часть протокола CLL2M). Медиана числа предшествующих режимов терапии составила 2, медиана возраста — 66,7 года. Пациенты получали бендамустин 70 мг/м<sup>2</sup> в 1–2-й день и ритуксимаб в дозе 375 или 500 мг/м<sup>2</sup> в 1-й день 28-дневного курса. Для анализа были доступны данные 62 из 81 больного. Общий ответ составил 77,4 % с ПР у 9 (14,5 %) пациентов и ЧР — у 32 (62,9 %). СЗ была достигнута в 11 (17,7 %) случаях. У 13 пациентов с del11q уровень общего ответа составил 92,3 %. Пациентов с del17p было 9, у 4 (40 %) из них получена ЧР. При определении минимальной остаточной болезни только у 2 из 30 пациентов было менее 10<sup>-4</sup> опухолевых клеток в крови после завершения лечения. Показатели токсичности были сравнимы с режимом BR в первой линии. Лейкопения и/или нейтропения III–IV степени отмечались в 11,9 % из 328 курсов, тромбоцитопения III–IV степени — в 9,1 %. Всего было зарегистрировано 16 эпизодов инфекционных осложнений III–IV степени, из них 3 (3,7 %) — с летальным исходом.

Несколько лучшие показатели эффективности при использовании режима BR в качестве противорецидивной терапии получили итальянские исследователи [88]. Ими была проведена ретроспективная оценка частоты ответов на лечение и выживаемости у 110 пациентов, 22 (20 %) из которых получили терапию бендамустином в монорежиме (средняя доза 100 мг/м<sup>2</sup>) и 88 (80 %) — в режиме BR. Качество ответов было существенно выше у пациентов, получивших комбинированную (32,5 % ПР, 33,7 % ЧР), а не монотерапию (13,6 % ПР, 68,2 % ЧР). Медиана ВБП для всех пациентов была зафиксирована на уровне 16 мес., а медиана ОВ составила 16,8 мес. Длительность БПВ и ОВ коррелировала с качеством ремиссии. Терапия была менее эффективна в случаях с резистентностью к предшествующим режимам. Нейтропения, анемия и тромбоцитопения III–IV степени отмечались у 16–17 % больных. Инфекции III–IV степени осложнили 5 из 460 курсов терапии, 3 (2,7 %) пациентов умерли.

Наковец, P. Weide и соавт. [89] опубликовали результаты исследования I–II фазы по применению комбинации бендамустина, митоксантрона и ритуксимаба. В исследование был включен 21 больной ХЛЛ и 1 больной В-пролимфоцитарным лейкозом с медианой возраста 67,5 года (диапазон 46–81 год), медианой количества предшествующих курсов терапии 2,5 (6 пациентов получали флударабин). У 18 пациентов была стадия С по Binet. Бендамустин назначался в дозе 80 мг/м<sup>2</sup> в 1-й и 2-й дни, митоксантрон — 10 мг/м<sup>2</sup> в 1-й день и ритуксимаб — 375 мг/м<sup>2</sup> в 8, 15, 22 и 29-й дни первого курса. Второй курс проводился в режиме бендамустин + митоксантрон с 36-го дня, и далее цикл повторялся каждые 4 нед. Максимально допускались 1 курс бендамустин + митоксантрон + ритуксимаб (BMR) и 5 курсов бендамустин + митоксантрон (BM). Лечение проводилось амбулаторно и прекращалось после достижения ПР или ЧР. Только 1 пациент получил более 1 курса BMR и 3 курсов BM. Отдельного анализа токсичности у больных ХЛЛ проведено не было. В целом переносимость комбинации была удовлетворительная с гематологической токсичностью III–IV степени у 23 (43 %) пациентов без случаев госпитализации.

При оценке ответа авторы руководствовались устаревшими рекомендациями В. Cheson 1988 г. Из 22 на лечение ответил 21 (95 %) пациент с 5 (23 %) ПР и 16 (73 %) ЧР, еще у 1 пациента была зарегистрирована СЗ. Медиана времени до прогрессии составила 17 мес. (диапазон 1–34+).

В целом добавление митоксантрона к бендамустину не продемонстрировало существенного прироста эффективности в сравнении с монотерапией. Результаты более крупного исследования комбинации BM CLL2K, закончившегося в 2007 г., не опубликованы. Авторы не уделили внимания возможным кардиотоксическим осложнениям митоксантрона.

Сочетание бендамустина с ритуксимабом во второй линии терапии продемонстрировало низкий уровень токсичности, однако эффективность комбинации оказалась несколько меньше, чем у режима FCR. Возможности использования режима BR у пациентов с del17p требуют дополнительного изучения.

### Перспективы

В MDACC в настоящее время проводятся клинические исследования комбинации бендамустина, флударабина и ритуксимаба (FBR) у пациентов с рецидивом ХЛЛ [90]. Поскольку общая концепция использования сочетания алкилирующего препарата, пуринового аналога и ритуксимаба при ХЛЛ имеет доказанную эффективность и синергизм входящих в режим препаратов хорошо изучен *in vitro*, от протокола можно ожидать впечатляющих результатов. Однако этот режим может оказаться чрезмерно токсичным, особенно у пожилых пациентов.

Монотерапия леналидомидом позволяет получить общий ответ у 32–47 % пациентов с рецидивным/рефрактерным ХЛЛ [91, 92]. Точный механизм действия вещества окончательно не изучен, однако показано его влияние на опухолевое микроокружение и экспрессию ряда костимулирующих молекул в клетках ХЛЛ. Препарат обладает значимыми иммуномодулирующими свойствами, в частности изменяет уровень цитокинов и восстанавливает способность Т-клеток образовывать иммунные синапсы при ХЛЛ. У пациентов с резистентным/рецидивным ХЛЛ изучается комбинация бендамустина с леналидомидом и ритуксимабом (BLR) [93]. В дозе 5–10 мг/сут препарат рассматривается в качестве поддерживающей терапии после завершения режима BR [94].

В ряде центров Германии исследуется комбинация бендамустина с алемтузумабом у больных с рецидивом или рефрактерностью к терапии [95]. Добавление бендамустина, возможно, позволит преодолеть низкую активность алемтузумаба при массивной лимфаденопатии, но активное применение этого режима может быть ограничено избыточной токсичностью.

В 2009 г. FDA одобрило для лечения ХЛЛ в случаях резистентности к флударабину и алемтузумабу препарат офатумумаб — гуманизированные моноклональные антитела к CD20. Препарат связывается с альтернативным мембранно-проксимальным эпитопом на CD20, обладает высокой авидностью к этому антигену и вызывает более выраженный комплемент-опосредованный цитотоксический эффект по сравнению с ритуксимабом [96]. В настоящее время сочетание офатумумаба и бендамустина исследуется в терапии первой и второй линий при ХЛЛ [97, 98].

Своеобразным производным классических антител служит препарат TRU-016, который представляет собой одноцепочечный гуманизированный химерный белок, состоящий из CD37-специфичного паратопа и модифицированного Fc-фрагмента иммуноглобулина G1. Предполагается, что за счет меньшей молекулярной массы пре-



параты этого класса лучше антител проникают в лимфоузлы и костный мозг. *In vitro* TRU-016 способен индуцировать каспазанезависимый апоптоз в клетках ХЛЛ. По сравнению с ритуксимабом и алемтузумабом препарат сильнее активирует Fc-опосредованную клеточную цитотоксичность [99]. В исследовании I фазы монотерапия TRU-016 у больных с рецидивом ХЛЛ позволила получить 1 ЧР, у ряда пациентов отмечалось уменьшение лимфоцитоза (медиана 83 %), селезенки и периферических лимфоузлов [100]. Комбинация TRU-016 с бендамустином, возможно, даст более впечатляющие результаты [101].

Одним из путей передачи сигнала с В-клеточного рецептора и стромального микроокружения служит PI3K/Akt/mTOR. Он в значительной степени определяет рост и пролиферацию опухолевых клеток при ХЛЛ [102]. В этой связи ингибиторы ключевых ферментов данного пути представляются потенциальными кандидатами на роль таргетной терапии заболевания. CAL-101 — перорально доступный ингибитор  $\delta$ -изоформы p110 субъединицы PI3K. Поскольку p110 $\delta$  экспрессирована преимущественно на клетках гемопоэтического происхождения, препарат обладает достаточно высокой избирательностью действия. Клиническая эффективность вещества была продемонстрирована в исследовании I фазы, в котором у 23 % пациентов с рецидивным/резистентным ХЛЛ была достигнута ЧР [103]. Значительный интерес представляет исследование комбинации CAL-101 с бендамустином и ритуксимабом/офатумумабом, начатое в 2010 г. [104].

Один из наиболее перспективных низкомолекулярных ингибиторов белков семейства Bcl-2 — препарат АВТ-263, обладающий хорошей биодоступностью при приеме внутрь. Основная токсичность вещества связана с ингибированием Bcl-X<sub>L</sub> в циркулирующих тромбоцитах, которое приводит к развитию обратимой тромбоцитопении. АВТ-263 имеет доказанную, но достаточно низкую эффективность при ХЛЛ в качестве монотерапии: в исследованиях I–II фазы лишь у единичных пациентов была достигнута ЧР [105]. Фактором, ограничивающим эффективность препарата, служит отсутствие активности в отношении Mcl-1 и Bfl-1, опосредованное микроокружением, повышение экспрессии которых характерно для клеток ХЛЛ. Тем не менее возможность перорального приема и контролируемая токсичность позволяют использовать АВТ-263 в комбинациях с другими цитостатиками. В доказательство этой концепции компанией Abbot начато исследование режима АВТ-263 + BR или FCR у пациентов с рецидивом/резистентностью к химиотерапии [106].

Хотя результаты данных исследований пока не опубликованы и далеко не все перечисленные препараты войдут в клиническую практику, включение бендамустина в экспериментальные протоколы указывает на значительный интерес к этому веществу.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что бендамустин был синтезирован еще в 1960-е годы, возможности препарата были открыты только по прошествии 40 лет. По данным маркетинговых исследований (Tandem, ноябрь 2009 г.), в США бендамустинсодержащие режимы в настоящее время активно замещают режимы, основанные на флударабине: использование их в первой линии терапии достигает 19 %, а у больных с рецидивом заболевания — 30 %. Объяснением этого явления может служить несколько факторов.

Во-первых, бендамустин обладает уникальным профилем цитотоксичности, отличным от типичных производных

азотистого иприта, и активен в некоторых полирезистентных клеточных линиях. Механизмы цитостатической активности препарата и молекулярные особенности ответа опухолевых клеток на его воздействие требуют дополнительного изучения.

Во-вторых, бендамустин — препарат выбора для пациентов с высоким риском инфекционных осложнений, наличием активной аутоиммунной анемии и массивной лимфаденопатии. В то же время препарат малоэффективен в качестве второй линии терапии при рефрактерности к флударабину. Несмотря на хорошую активность *in vitro* в отношении опухолевых клеток с наличием клональной del17p, клиническая эффективность бендамустина в данном контексте не до конца ясна.

В-третьих, наибольший потенциал бендамустина заключается в его благоприятном токсическом профиле, который позволяет использовать его в комбинированных схемах. Однако не стоит забывать о потенциальной миелотоксичности препарата, требующей назначения адекватной профилактической терапии.

Сравнительно высокая активность сочетания бендамустина с ритуксимабом делает режим BR кандидатом на терапию выбора в первой линии при ХЛЛ, однако окончательная роль этого режима определится после получения результатов сравнения с FCR (протокол CLL10). Изучить эффективность режима BR в отечественной гематологической практике позволит планируемое нами российское многоцентровое исследование у больных ХЛЛ, не получавших ранее лечения.

Дальнейшие перспективы использования бендамустина открываются при его сочетании с новыми терапевтическими агентами (леналидомид, офатумумаб, таргетная терапия).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Hallek M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111(12): 5446–56.
2. Eichhorst B.F. et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114(16): 3382–91.
3. Tam C.S. et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 112(4): 975–80.
4. Hallek M. et al. First-line treatment with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) improves overall survival (OS) in previously untreated patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of a randomized phase III Trial on behalf of an International Group of Investigators and the German CLL Study Group. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009; 114(22): 535.
5. Schetelig J. et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion: a retrospective European Group for Blood and Marrow Transplantation analysis. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(31): 5094–100.
6. Tsimberidou A.M., Keating M.J. Treatment of patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: need for new treatment options. *Leuk. Lymphoma* 2010; 51(7): 1188–99.
7. Zenz T. et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009; 114(13): 2589–97.
8. Schnabel R., Jungst W., Gutsche W. et al. Comparative studies of the cytostatic effect of a new N-Lost derivative "IMET 3393" and Endoxan in 3 experimental mice tumors (Ehrlich ascites carcinoma, sarcoma 180 solid, leukemia LAJ I). *Acta Biol. Med. Ger.* 1967; 19(4): 543–58.
9. Ozegowski W., Krebs D. IMET 3393, ein neues Zytostatikum aus der Reihe der Benzimidazol-Loste. *Zentralblatt für Pharmazie, Pharmakotherapie und Laboratoriumsdiagnostik* 1971; 110: 1013–20.
10. Ogura M. et al. Phase I and pharmacokinetic study of bendamustine hydrochloride in relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2010; 101(9): 2054–8.
11. Rasschaert M. et al. A phase I study of bendamustine hydrochloride administered day 1+2 every 3 weeks in patients with solid tumours. *Br. J. Cancer* 2007; 96(11): 1692–8.

12. Preiss R. et al. The pharmacokinetics of bendamustine (Cytostasane) in humans. *Pharmazie* 1985; 40: 782–4.
13. Matthias M. et al. Pharmacokinetics of bendamustine in patients with malignant tumors. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1995; 14: 458.
14. Owen J., Melhem M., D'Andrea D.E.A. Population pharmacokinetics of bendamustine and metabolites in patients with indolent non-Hodgkin lymphoma. *Pharmacol. Ther.* 2008; 83(Suppl. 1): S54.
15. Teichert J. et al. Influence of hepatic and renal function on the pharmacokinetics of bendamustine. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2003; 41: 564.
16. Hagos Y. et al. Impact of Organic Anion Transporter 3 (OAT3) on bendamustine uptake of lymphoma cells. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2007; 110(11): 4184.
17. Loeber R. et al. Cross-linking of the DNA repair protein Omcron6-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in the presence of antitumor nitrogen mustards. *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21(4): 787–95.
18. Muniandy P.A. et al. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2010; 45(1): 23–49.
19. De Alencar T.A., Leitao A.C., Lage C. Nitrogen mustard- and half-mustard-induced damage in *Escherichia coli* requires different DNA repair pathways. *Mutat. Res.* 2005; 582(1–2): 105–15.
20. Casorelli I., Russo M.T., Bignami M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2008; 8(4): 368–80.
21. Kaina B. et al. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* 2007; 6(8): 1079–99.
22. Hirschberg E., Gellhorn A., Gump W.S. Laboratory evaluation of a new nitrogen mustard, 2-[Di-(2-chloroethyl)aminomethyl]benzimidazole, and of other 2-chloroethyl compounds. *Cancer Res.* 1957; 17(9): 904–10.
23. Woolley D.W. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J. Biol. Chem.* 1944; 152: 225–32.
24. Staib P., Schinkothe T., Dimski T. In vitro modulation of ara-CTP accumulation in fresh AML cells by bendamustine in comparison with fludarabine, 2-CdA and gemcitabine. *Blood* 1999; 94(63a): Abstract.
25. Gandhi V., Burger J.A. Bendamustine in B-cell malignancies: The new 46-year-old kid on the block. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(24): 7456–61.
26. Alonso R. et al. Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood* 2009; 114(8): 1563–75.
27. Hartmann M., Zimmer C. Investigation of cross-link formation in DNA by the alkylating cytostatic IMET 3106, 3393 and 3943. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Nucleic Acids Protein Synth.* 1972; 287(3): 386–9.
28. Reinhardt H.C. et al. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 2007; 11(2): 175–89.
29. Gaul L. et al. Bendamustine induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells: the role of ATM-Chk2-Cdc25A and ATM-p53-p21-pathways. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008; 134(2): 245–53.
30. Leoni L.M. et al. Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(1): 309–17.
31. Roue G. et al. Bendamustine is effective in p53-deficient B-cell neoplasms and requires oxidative stress and caspase-independent signaling. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(21): 6907–15.
32. Shibue T., Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int. J. Cancer* 2006; 119(9): 2036–43.
33. Bacsí A. et al. Modulation of DNA-dependent protein kinase activity in chlorambucil-treated cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39(12): 1650–9.
34. Das G.C. et al. Enhanced gamma-glutamylcysteine synthetase activity decreases drug-induced oxidative stress levels and cytotoxicity. *Mol. Carcinog.* 2006; 45(9): 635–47.
35. Oboh G. et al. Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixa orellana*) seeds. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2010 [Epub ahead of print].
36. Tsai-Turton M. et al. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol. Sci.* 2007; 98(1): 216–30.
37. Niemeyer C. et al. Mitotic catastrophe induced in cells treated with SDX-105 (Treanda™). *AACR Meeting Abstracts* 2005; 2005(1): 538.
38. Portugal J., Mansilla S., Bataller M. Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16(1): 69–78.
39. Lee C.K. et al. HDAC inhibition synergistically enhances alkylator-induced DNA damage responses and apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Lett.* 2010; 296(2): 233–40.
40. Strumberg D. et al. Bendamustine hydrochloride activity against doxorubicin-resistant human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs* 1996; 7(4): 415–21.
41. Bolderson E. et al. Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(6): 1821–31.
42. Bello V.E. et al. Homologous recombinational repair vis-a-vis chlorambucil resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 63(9): 1585–8.
43. Wang D. et al. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. *Lung Cancer* 2009; 66(3): 298–304.
44. Zhang Y. et al. Alterations in the expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease-1/redox factor-1 (APE1/Ref-1) in human ovarian cancer and identification of the therapeutic potential of APE1/Ref-1 inhibitor. *Int. J. Oncol.* 2009; 35(5): 1069–79.
45. Geleziunas R. et al. Increased DNA synthesis and repair-enzyme expression in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia resistant to nitrogen mustards. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991; 83(8): 557–64.
46. Buschfort C. et al. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res.* 1997; 57(4): 651–8.
47. Willmore E. et al. DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(12): 3984–92.
48. Monks A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991; 83(11): 757–66.
49. Bendall H.H. et al. Brief exposure to SDX-105 (Treanda™) activates potent apoptosis and cell death in lymphoma and leukemia cells. *AACR Meeting Abstracts* 2005; 2005(1): 786.
50. Leoni L.M. et al. In vitro and ex vivo activity of SDX-105 (bendamustine) in drug-resistant lymphoma cells. *AACR Meeting Abstracts* 2004; 2004(1): 278-b.
51. Schwanen C. et al. In vitro evaluation of bendamustine induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16(10): 2096–105.
52. Konstantinov S.M. et al. Cytotoxic efficacy of bendamustine in human leukemia and breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002; 128(5): 271–8.
53. Schmidt-Hieber M. et al. Bendamustine, but not fludarabine, exhibits a low stem cell toxicity in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009; 135(2): 227–34.
54. Burchardt C.A. et al. Peripheral blood stem cell mobilization after bendamustine containing chemotherapy in indolent lymphomas is possible. Results from the phase III study of B-R vs. CHOP-R (NHL 1–2003 trial) of the StiL (Study Group Indolent Lymphomas, Germany). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009; 114(22): 2679.
55. Khouri I.F. Fludarabine, bendamustine and rituximab conditioning for patients with lymphoid malignancies. Available at: <http://www.clinicaltrials.gov>. #NCT00880815.
56. Panayiotidis P. et al. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br. J. Haematol.* 1996; 92(1): 97–103.
57. Balakrishnan K. et al. AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood* 2009; 113(1): 149–53.
58. Buchner M. et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010; 115(22): 4497–506.
59. McConkey D.J. et al. Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *J. Immunol.* 1996; 156(7): 2624–30.
60. Pepper C. et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008; 112(9): 3807–17.
61. Weiner G.J. Rituximab: mechanism of action. *Semin. Hematol.* 2010; 47(2): 115–23.
62. Jazirehi A.R., Vega M.I., Bonavida B. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res.* 2007; 67(3): 1270–81.
63. Chow K.U. et al. Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica* 2002; 87(1): 33–43.
64. Rummel M.J. et al. In vitro studies with bendamustine: enhanced activity in combination with rituximab. *Semin. Oncol.* 2002; 29(4 Suppl. 13): 12–4.
65. Sandoval A., Consoli U., Plunkett W. Fludarabine-mediated inhibition of nucleotide excision repair induces apoptosis in quiescent human lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2(10): 1731–41.
66. Yamauchi T. et al. DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7(11): 3580–9.
67. Chow K.U. et al. In vitro induction of apoptosis of neoplastic cells in low-grade non-Hodgkin's lymphomas using combinations of established cytotoxic drugs with bendamustine. *Haematologica* 2001; 86(5): 485–93.
68. Chow K.U. et al. Synergistic effects of chemotherapeutic drugs in lymphoma cells are associated with down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), prostate-apoptosis-response-gene 4 (Par-4), death-associated protein (Daxx) and with enforced caspase activation. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66(5): 711–24.
69. Chow K.U. et al. In AML cell lines Ara-C combined with purine analogues is able to exert synergistic as well as antagonistic effects on proliferation, apoptosis and disruption of mitochondrial membrane potential. *Leuk. Lymphoma* 2003; 44(1): 165–73.

- 70.** Hirota H. *et al.* Interference with topoisomerase II $\alpha$  potentiates melphalan cytotoxicity. *Int. J. Oncol.* 2002; 20(2): 311–8.
- 71.** Wilstermann A.M., Osheroff N. Base excision repair intermediates as topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(49): 46290–6.
- 72.** Yan L. *et al.* Combined treatment with temozolomide and methoxyamine: blocking apurinic/pyrimidinic site repair coupled with targeting topoisomerase II $\alpha$ . *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(5): 1532–9.
- 73.** Minisini A. *et al.* Topoisomerase II $\alpha$  and APE/ref-1 are associated with pathologic response to primary anthracycline-based chemotherapy for breast cancer. *Cancer Lett.* 2005; 224(1): 133–9.
- 74.** Gandhi V. Metabolism and mechanisms of action of bendamustine: rationales for combination therapies. *Semin. Oncol.* 2002; 29(4 Suppl. 13): 4–11.
- 75.** Anger G., Fink R., Fleischer J. Vergleichsuntersuchungen zwischen Cytostasan und Cyclophosphamid bei der chronischen Lymphadenose, dem Plasmazytom, der Lymphogranulomatose und dem Bronchialkarzinom. *Dtsch Gesundheitswes* 1975; 30: 1280–5.
- 76.** Knauf W.U. *et al.* Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(26): 4378–84.
- 77.** Fischer K. *et al.* Bendamustine combined with rituximab (BR) in first-line therapy of advanced CLL: a multicenter phase II trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009; 114(22): 205.
- 78.** Bremer K. High rates of long-lasting remissions after 5-day bendamustine chemotherapy cycles in pre-treated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2002; 128(11): 603–9.
- 79.** Cheson B.D. *et al.* Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17(4): 1244.
- 80.** Kath R. *et al.* Bendamustine monotherapy in advanced and refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001; 127(1): 48–54.
- 81.** Aivado M. *et al.* Bendamustine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: results and future perspectives. *Semin. Oncol.* 2002; 29(4 Suppl. 13): 19–22.
- 82.** Lissitchkov T. *et al.* Phase-I/II study to evaluate dose limiting toxicity, maximum tolerated dose, and tolerability of bendamustine HCl in pre-treated patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (Binet stages B and C) requiring therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2006; 132(2): 99–104.
- 83.** Bergmann M.A. *et al.* Efficacy of bendamustine in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase I/II study of the German CLL Study Group. *Haematologica* 2005; 90(10): 1357–64.
- 84.** Niederle N., Balleisen L., Heit W. Bendamustine vs fludarabine as second-line treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia—first interim results of a randomized study. *Ann. Oncol.* 2008; 19(Suppl. 4): Abstract 379.
- 85.** Robak T. *et al.* Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(10): 1756–65.
- 86.** Koppler H. *et al.* Bendamustine plus mitoxantrone—a new effective treatment for advanced chronic lymphocytic leukaemia: results of a phase I/II study. *Leuk. Lymphoma* 2004; 45(5): 911–3.
- 87.** Fischer K. *et al.* Bendamustine in combination with rituximab (BR) for patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicentre phase II trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *ASH Annual Meeting Abstracts* 2008; 112(11): 330.
- 88.** Iannitto E. Bendamustine (B) in combination with rituximab (R) for patients with relapsed/resistant chronic lymphocytic leukemia (CLL): an Italian multicentre retrospective study. *EHA Annual Meeting Abstracts*. Available at: <http://www.eventure-online.com/eventure/publicAbstractView.do?id=135059&congressId=3446>, 2010.
- 89.** Weide R. *et al.* Bendamustine/Mitoxantrone/Rituximab (BMR): a very effective, well tolerated outpatient chemoimmunotherapy for relapsed and refractory CD20-positive indolent malignancies. Final results of a pilot study. *Leuk. Lymphoma* 2004; 45(12): 2445–9.
- 90.** Wierda W., Fludarabine, Bendamustine, and Rituximab (FBR) in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT01096992>.
- 91.** Ferrajoli A. *et al.* Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111(11): 5291–7.
- 92.** Chanan-Khan A. *et al.* Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24(34): 5343–9.
- 93.** Cheson B. Trial of bendamustine, lenalidomide and rituximab in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) (Phase I BLR). Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT00864942>.
- 94.** Chang J. Study of bendamustine/rituxan induction chemotherapy with revlimid maintenance for relapsed/refractory CLL and SLL. Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT00974233>.
- 95.** Greil R. Bendamustine combined with alemtuzumab in pretreated chronic lymphocytic leukemia (CLL). Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT00951457>.
- 96.** Cheson B.D. Ofatumumab, a novel anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(21): 3525–30.
- 97.** Foong K. Clinical protocol for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia with a combination of bendamustine and ofatumumab. Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT01125787>.
- 98.** Cheson B. Ofatumumab and bendamustine for previously treated chronic lymphocytic leukemia (CLL). Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT01010568>.
- 99.** Robak T., Robak P., Smolewski P. TRU-016, a humanized anti-CD37 IgG fusion protein for the potential treatment of B-cell malignancies. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2009; 10(12): 1383–90.
- 100.** Andritsos L. *et al.* A Phase 1 trial of TRU-016, an anti-CD37 Small Modular Immunopharmaceutical (SMIPTM) protein in relapsed and refractory CLL: early promising clinical activity. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009; 114(22): 3424.
- 101.** Stromatt S. Safety and efficacy study of TRU-016 plus bendamustine versus bendamustine alone in relapsed chronic lymphocytic leukemia. Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT01188681>.
- 102.** Niedermeier M. *et al.* Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood* 2009; 113(22): 5549–57.
- 103.** Furman R.R., Byrd J.C., Flinn I.W. Interim results from a phase I study of CAL-101, a selective oral inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\delta$  isoform, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(15s): Abstract 3032.
- 104.** Yu A. Study to investigate CAL-101 in combination with bendamustine and CD20 mAb in patients with relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma or chronic lymphocytic leukemia. Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT01088048>.
- 105.** Wilson W., O'Connor O., Roberts A. ABT-263 activity and safety in patients with relapsed or refractory lymphoid malignancies in particular chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL) [abstract]. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(Suppl.): Abstract 8574.
- 106.** D'Amico D. Study of ABT-263 when administered in combination with either fludarabine/cyclophosphamide/rituximab or bendamustine/rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. Available at: <http://www.clinicaltrials.gov/#NCT00868413>.

