

FLUDARABIN V LÉČBĚ FOLIKULÁRNÍCH LYMFOMŮ

FLUDARABINE IN TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA

OBOŘILOVÁ A., ŠÁLEK D., MAYER J.

INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO-BOHUNICE

Souhrn: Folikulární lymfom je znám jako nosologická jednotka více než šest desetiletí, ale navzdory velkým pokrokům v protinádorové léčbě se dosud nepodařilo zásadně ovlivnit prognózu pacientů s rozvinutým onemocněním. Choroba je dobře senzitivní na terapii, ale téměř vždy dochází k relapsům. Naděje jsou proto vkládány do nových léků. Jedním z nich je fludarabin monofosfát, který má vyšší selektivní afinitu pro lymfoidní buňky a kromě inhibice proliferace indukuje apoptózu. Fludarabin vykazuje synergismus s řadou látek, proto jej lze s výhodou kombinovat s jinými cytostatiky i s monoklonální protilátkou rituximabem. Fludarabin v monoterapii dosahuje v indikaci folikulárních lymfomů celkové odpovědi u 31-84% nemocných s 9-60% kompletních remisí (CR). Kombinované režimy s fludarabinem a antracyklinem (typ FM, FND) vykazují průměrnou celkovou účinnost 86% s dosažením průměrně 45% kompletních remisí. Režimy fludarabinu s cyklofosfamidem (typ FluCy, FluCyD) dosahují celkové odpovědi průměrně u 91% nemocných s dosažením kolem 58% CR. Režimy s fludarabinem a rituximabem vykazují celkovou účinnost mezi 70-95% léčebných odpovědí. Účinnost fludarabinových režimů se jeví velmi slibně, ale vliv na prodloužení celkového přežití pacientů s folikulárním lymfomem zatím nelze definovat. Fludarabin má také nezanedbatelné toxické účinky. Dominující je myelotoxicita (vyskytuje se v 5-33%), toxicita v kompartmentu progenitorových buněk a výrazná a dlouhodobá imunotoxicita, která bývá vyjádřena nejvíce v subpopulaci CD4+ buněk a která je sledována výskytem oportunních infekcí.

Klíčová slova: folikulární lymfom, fludarabin

Summary: Follicular lymphoma belongs to the group of low grade B non-Hodgkin's lymphomas. Since more six decades it has been known as a nosologic unit, but in spite of huge advance in anticancer therapy the prognosis of patients with developed disease can not be influenced so far. The disease is well therapy-sensitive, but perhaps regularly relapses. Therefore hopes lay on new drugs. One of them is fludarabine monophosphate. It has a higher selective affinity to lymphoid cells and except the inhibition of proliferation induces the apoptosis. Fludarabine shows synergism with several other drugs and for all that there is suitable for combining with other cytostatics and with monoclonal antibody rituximab as well. The efficacy of fludarabine is documented by several studies mostly of phase II. In monotherapy it achieves the overall response in 31-84% patients with 9-60% complete remissions (CR) in the indication of follicular lymphoma. Fludarabine-anthracycline combined regimens (type FM, FND) show average overall efficacy about 86% with achievement about 45% complete remissions. Regimens based on fludarabine and cyclophosphamide (type FluCy, FluCyD) reach the overall average response in 91% patients with achievement about 58% CR. Regimens containing fludarabine and rituximab show total efficacy in range 70-95%. Results of fludarabine containing regimens are very encouraging, however is impossible to say, if they project into the extension of overall survival in follicular lymphoma patients. On the other hand fludarabine shows considerable toxic effects. The myelotoxicity is dominating (in 5-33% cases), but the toxicity of the compartment of progenitor cells occurs often. Severe and long-term immunotoxicity is expressed most strongly at the subpopulation of CD4+ cells and followed by the occurrence of opportunistic infections.

Keywords: follicular lymphoma, fludarabine

ÚVOD

Folikulární lymfom vzniká maligní transformací buněk folikulárního centra a řadí se mezi B ne-Hodgkinovy lymfomy (NHL). Lymfomy této skupiny se vyznačují relativně dlouhým mediánem přežití (mezi 5-10 lety) a indolentním průběhem s pomalou progresí. Výjimečně se mohou vyskytnout i spontánní remise (1). Jejich charakteristickým znakem je, že odpovídají obvykle velmi dobře na iniciační léčbu. Pravidelně však relabují a jsou tudíž jen zřídka vyléčitelné (2, 3). S délkou léčby vzrůstá i pravděpodobnost histologické transformace do agresivních typů lymfomů (1, 3, 4).

Za uplynulá tři desetiletí, zejména díky uplatnění chemoterapie a radioterapie, se podařilo zvýšit 5-leté přežívání pacientů s NHL z 31% na 52% (5). Některé typy lymfomů jsou dokonce potenciálně vyléčitelné. Nicméně toto tvrzení neplatí pro folikulární lymfom, kde zůstává účinnost léčby stále velmi málo uspokojivá. V léčbě se zkoušejí nejrůznější přístupy od strategie „watch and wait“ až po alogenní transplantace kost-

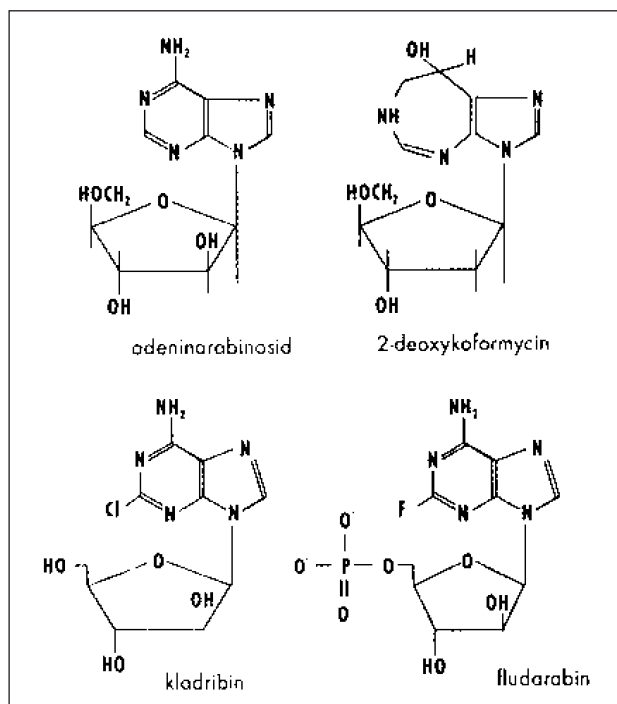
ní dřeně. Přes veškeré úsilí se nepodařilo zatím dosáhnout podstatného zlepšení prognózy nemocných. Naopak použití agresivní léčby vede často ke komplikacím a tím k výraznému zhoršení kvality života (3).

Neúspěchy v dosavadní léčbě pacientů s folikulárním lymfomem vyvolávají potřebu zavádění nových léčebných prostředků. Jedním z nadějných léků, který se v protinádorové léčbě začal uplatňovat od počátku 90. let 20. století, je fludarabin monofosfát (2F-Ara-AMP). Tento nový purinový analog se úspěšně prosazuje zejména v léčbě níže maligních lymfoproliferací zejména díky své selektivní afinitě k lymfoidním buňkám a schopnosti indukovat apoptózu. Tato práce podává přehled základních farmakologických vlastností fludarabinu, včetně synergismu a popsání typických i vzácnějších toxických účinků. Účinnost fludarabinu v indikaci folikulárního lymfomu je dokumentována přehledy nejvýznamnějších studií fludarabinu v monoterapii i v kombinované léčbě.

FLUDARABIN

STRUKTURA, VLASTNOSTI A FARMAKOKINETIKA
Fludarabin (9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenin-5'-mono-fosfát, 2F-Ara-AMP, synonymum fludarabin-5'-dihydro-genfosfát) je fluorovaný purinový analog, ve vodě dobře rozpustný, o molekulové váze 365,2. Poprvé byl syntetizován Montgomery a Hewsonem v roce 1969 (6). Substituce fluorem na pozici 2 molekuly adeninu zajišťuje stabilitu tohoto nukleotidu vůči adenosindeaminázám (viz obrázek). Fludarabin monofosfát (2F-Ara-A) je v organismu rychle defosforylován na fludarabin (2F-Ara-A) (7, 8). Plazmatické koncentrace po podání krátkodobé či dlouhodobé infuze vykazují dvoufázový, po bolusové injekci až třífázový průběh. První fáze s krátkým průběhem kolem 5 minut (je patrná jen po bolusu), druhá fáze s poločasem 1-2 hodiny a třetí s poločasem trvání kolem 10-30 hodin (9). Plazmatické hladiny jsou lineárně závislé na dávce fludarabinu, ale poločas, plazmatická clearance a distribuční objemy jsou spíše individuální, na dávce nezávislé (7, 10). Fludarabin je vylučován hlavně ledvinami, přičemž kolem 60% bolusové podané dávky je takto eliminováno již během 24 hodin (9). Defosforylovaný fludarabin (2F-Ara-A) je z plazmy aktivně nasáván zejména do leukemických a lymfoidních buněk. Intracelulárně je potom znovu refosforylován na vlastní účinný trifosfát (2F-Ara-ATP), který je zodpovědný za cytotoxické účinky (11, 12).

Obr. A: Přehled struktury purinových analogů. Původní molekula adeninaribosidu od které byly odvozeny fludarabin a jeho nejbližší analoga kladribin a 2-deoxykoformycin.



FARMAKODYNAMIKA

Vlastní účinný metabolit 2F-Ara-ATP blokuje syntézu DNA a také aktivuje apoptózu (13, 14). Blokáda syntézy DNA se děje pravděpodobně inhibicí hned několika enzymů. Blokádu ribonukleotidreduktázy dochází k inhibici syntézy deoxyribonukleotidů, následkem čehož vzniká nedostatek metabolitů pro replikaci a reparaci DNA (15). 2F-Ara-ATP soutěží navíc s redukováným množstvím přirozených substrátů o vazbu na DNA-polymerázu. Nejvýznamnějším farmakodynamickým účinkem fludarabinu je zřejmě inhibice DNA-syntézy. Molekuly 2F-Ara-ATP inkorporované do řetězce DNA představují místo inhibice DNA-polymerázy (15). Vestavba

fludarabinových nukleotidů do DNA rovněž brání zahájení „primingu“ syntézy DNA, elongaci řetězce DNA, spojování fragmentů DNA a opravného čtení DNA (16). Vestavba 2F-Ara-ATP do RNA-primerů blokuje DNA-primázu a tím i spojování tzv. Okazakiho fragmentů (17). Správné dokončení replikace a reparace vyžaduje spojení dvou vláken DNA do dvojšroubovice, což zajišťuje DNA-ligáza (18). Pokud ale fragment DNA končí fludarabinovým nukleotidem, je v tomto místě aktivita DNA-ligázy inhibována a tím i reparace a replikace DNA (19).

Blokádou DNA lze dobře vysvětlit cytotoxicitu fludarabinu u aktivně se dělících buněk. Avšak jeho nesporná účinnost u lymfocytů v klidové fázi (jako jsou například buňky níže maligních lymfomů a chronické lymfatické leukemie) má pravděpodobně odlišný mechanismus. Fludarabin (jako jediný z purinových analogů) má schopnost vestavět se i do mRNA, což vede k předčasnému ukončení syntézy RNA-transkriptu, který slouží jako matrice proteosyntézy (20).

Dalším diskutovaným mechanismem cytotoxicity fludarabinu je aktivace programované buněčné smrti (14, 21). Tato hypotéza je podporována pozorováním DNA-fragmentace, jako zjevného průkazu apoptózy, u buněk inkubovaných s fludarabinem (22). Přesný způsob aktivace apoptózy je předmětem intenzivního výzkumu. Jsou doklady o přímém ovlivnění kaspázového systému a jeho inhibitorů (22, 23).

SPECIFITA

Fludarabin je vychytáván zejména v lymfocytech a lymfoidních blastických buňkách. Mechanismus tohoto jevu není přesně objasněn, ale předpokládá se zvýšený selektivní transport fludarabinu do lymfocytů, nebo jeho zvýšená intracelulární fosforylace na cytotoxické metabolity (24, 25). Naopak poměrně pomalý intracelulární transport fludarabinu mají buňky sliznice gastrointestinálního traktu. Takto je možné vysvětlit dobrou toleranci fludarabinu s minimem zvracení a mukozitid.

SYNERGIZMUS

Studie in vitro testovaly synergismus fludarabinu s řadou cytostatik (cytarabinem, cisplatinou, mitoxantronem, nitrátem galia apod.). Významný synergistický efekt byl potvrzen in vitro u leukemických buněk inkubovaných s fludarabinem před podáním cytarabinu. U takto inkubovaných buněk byla pozorována zvýšená absorpce a akumulace aktivního trifosfátového metabolitu ARA-CTP (26).

Výrazný synergismus byl popsán po fludarabinu a monoklonální protilátce rituximabu. Proti nádorový účinek rituximabu se děje dominantně jako CDC (complement-dependent cytotoxicity) a ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity). CDC je úzce závislá na současné ligaci receptorů CD55 a CD95, které působí jako inhibitory komplementu (27, 28, 29). In vitro, na primárně rituximab-rezistentních kmenech folikulárního lymfomu, se podařilo rezistenci buněk překonat současným podáním fludarabinu s rituximabem. Zdá se, že synergismus spočívá ve schopnosti fludarabinu (ale nikoli jiných testovaných cytostatik) snížit expresi CD55 a CD95 receptorů a umožnit tak uplatnění CDC (30).

TOXICITA FLUDARABINU MYELOTOXICITA

Myelosuprese je nejzávažnějším nežádoucím účinkem fludarabinu. Velká nekomparativní studie pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) uvádí hematologickou toxicitu stupně IV (zejména anémii a trombocytopenii) u 43% pacientů léčených fludarabinem v monoterapii (31). V jiné studii byla v průběhu 479 cyklů u 96 pacientů s CLL pozorována granulocytopenie v 19%, trombocytopenie ve 14% a anémie v 7% (32). Pokud se týká myelotoxicity u folikulárních lymfomů údaje pochází z několika menších studií a jsou v podstatě srovnatelné s údaji popsány u CLL. Hematologická toxicita stupně III-IV zde kolísala od 5% do 33% (33, 34, 35).

Dlouhodobá myelotoxicita se projevuje v kompartmentu progenitorových buněk, která je pravděpodobně příčinou neúspěšných pokusů o sběr periferních kmenových buněk u pacientů léčených fludarabinem (36, 37, 38). Pravděpodobnost neúspěšné mobilizace vzrůstá s počtem podaných cyklů fludarabinu a je nepřímo úměrná době uplynulé od ukončení terapie. Zvláště vysoké riziko vzniká po podání více než 6 cyklů a v době kratší než 2 měsíce od ukončení posledního cyklu léčby (37).

IMUNOTOXICITA

Fludarabin vyvolává významnou a dlouhodobou lymfopenii, která se dostavuje velmi brzy. Obvykle je již patrná po prvním cyklu a nejvíce postihuje T-lymfocyty, které klesají až na 1/10 původních hodnot, zatímco B-lymfocyty jen asi na 1/2 (39). Nejvýznaměji se lymfototoxicita projevuje v subpopulaci CD4+ a CD8+ buněk (40, 41). Tento pokles je dobře patrný ještě za 11-13 měsíců po ukončení chemoterapie fludarabinem (41). I když většina uvedených dat pochází ze studií pacientů s chronickou lymfatickou leukémií, podobné výsledky byly pozorovány i u pacientů s folikulárními lymfomy (42).

INFEKČNÍ KOMPLIKACE

Dlouhodobá lymfopenie bude zřejmě hlavní příčinou častých infekčních komplikací pozorovaných po fludarabinu (40, 41, 43). Při standardním dávkování fludarabinu (25mg/m²/den, po dobu 5 dní) byl popsán výskyt těžkých oportunních infekcí u 7/17 nemocných (41), jiní autoři uvádějí až 22/70 těžkých infekčních komplikací s 14/70 úmrtí v důsledku sepse. Příčinou fatálních sepsí byla 4x *Pneumocystis carinii*, 3x *Aspergillus fumigatus*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex virus*, *Varicella zoster virus* (40). Ve studii s 402 pacienty s CLL byl pozorován zvýšený výskyt zejména těžkých oportunních infekcí jako listeriózy, pneumocystózy, mykobakteriálních, plísňových a virových infekcí (44). V randomizovaných studiích nebyly však pozorovány žádné signifikantní rozdíly ve výskytu infekčních komplikací mezi pacienty léčenými fludarabinem ve srovnání s chlorambucilem, nebo s režimem CAP a CHOP (33, 45, 46).

Pokud jde o kombinované režimy s fludarabinem (FluCy, FND, FluCyD atd.) prevalence infekčních komplikací je velmi různá. V některých studiích se pohybuje kolem 10-15% (47, 48, 49), jiní autoři uvádějí přes 23% infekčních komplikací (50). Riziko infekčních komplikací bývá vyšší u starších a předléčených nemocných (43, 44, 50).

Ve snaze omezit infekční komplikace používají mnozí autoři s úspěchem po celou dobu léčby fludarabinem profylaxi oportunních infekcí. Nejčastěji se jedná o pneumocystovou profylaxi cotrimoxazolem (2x960mg/den), plísňovou profylaxi flucanazolem (200-400mg/den) nebo itraconazolem (200mg/den) a antivirovou profylaxi acyklovirem (3x400mg/den) (47, 49, 51). Z důvodu zkrácení doby kritické neutropenie bývají součástí některých režimů i růstové faktory (52, 53).

AUTOIMUNITNÍ REAKCE

Mezi nejvýznamnější autoimunitní projevy uváděné v souvislosti s fludarabinem patří autoimunitní hemolytická anémie (AIHA). Zhoršení hemolýzy, nebo její vznik byl pozorován opakovaně u pacientů s CLL léčených fludarabinem (54, 55). I když fenomén autoimunitní hemolýzy může být zapříčiněn také vlastní lymfoproliferací, je nutné o tomto potenciálu fludarabinu uvažovat. Případy AIHA byly popsány výhradně u pacientů s CLL. Pokud jde o pacienty s folikulárními lymfomy, máme k dispozici pouze vlastní zkušenosti, přičemž jsme opakovaně zastihli projevy AIHA po podání režimu s fludarabinem - FND (dosud nepublikováno).

Vzácně jsou popisovány po fludarabinu i případy idiopatické trombocytopenické purpury (56).

JINÁ TOXICITA

Neurotoxita byla popsána zejména po vysokých dávkách fludarabinu (90-120mg/m²) s klinickými projevy ztráty zraku,

komatu a encefalopatie (57, 58). Nicméně neurotoxita se s incidencí kolem 0,5% vyskytuje i po podání takzvaných standardních dávek (18-25mg/m²). Nejčastěji jde progresivní multifokální leukoencefalitidu, ale může být nalezena i difúzní demyelinizace, infekce JC-virem apod. (59).

Přímá pneumotoxita může mít různou klinickou symptomatologii, většinou charakteru intersticiální pneumonitidy (60, 61). V léčbě se osvědčily kortikoidy, ale často odezní i spontánně po ukončení léčby fludarabinem (61, 62). Incidence pneumotoxicity se pohybuje mezi 8-9% a zdá se být častější u CLL, než u jiných diagnóz (61).

Jsou data o zvýšeném výskytu sekundárních malignit, či časné transformaci po léčbě fludarabinovými režimy (63, 64).

ÚČINNOST FLUDARABINU V LÉČBĚ FOLIKULÁRNÍHO LYMFOMU

Fludarabin se v léčbě nízce maligních lymfomů začal uplatňovat přibližně od roku 1990. Účinnost monoterapie fludarabinem u folikulárních lymfomů kolísá v různých studiích od 31% do 84% celkových odpovědí (OR) s dosažením 9% až 60% kompletních remisí (CR). Odpověď se zdá být lepší u nepředléčených pacientů (OR v průměru 70%, CR 48%) oproti předléčeným nemocným (OR průměrně 58%, CR 23%). Výsledky je třeba hodnotit velmi opatrně, neboť ve většině případů se jedná o nekomparativní studie fáze II s relativně malým počtem pacientů a krátkým sledováním. Publikovány byly pouze 2 větší randomizované prospektivní studie srovnávající fludarabin v monoterapii (25mg/m² 5 dní a 28 dní) s jiným režimem. Jednou z nich je studie GELA u pacientů s folikulárním lymfomem věku 59-76 let, srovnávající účinnost fludarabinu v monoterapii (25mg/m² 5 dní a 28 dní; 6 cyklů) versus CHVP+IFNα (cyklofosamid 600mg/m² den 1, doxorubicin 25mg/m² den 1, teniposid 60mg/m² den 1 a prednisolon 40mg/m² den 1-5, a 28 dní; 12 cyklů, IFNα 18 měsíců). Celkem bylo zařazeno 131 pacientů; 70 dostalo CHVP+IFNα a 61 bylo léčeno fludarabinem. Léčebná odpověď byla lepší po CHVP+IFNα (71% vs 59%) a rovněž i progresí bylo méně po režimu CHVP (49% vs 56%). TTF (doba do progresu) byla delší po CHVP (ve 2 letech 63% vs 49%). Vliv na celkové přežití v této studii hodnocen nebyl. Těžké neutropenie byly pozorovány častěji po CHVP, avšak bez zvýšení počtu infekcí či febrilních stavů (33).

Druhá publikovaná randomizovaná studie srovnávala fludarabin (25mg/m² 5 dní a 28 dní; 6 cyklů) s režimem CVP (cyklofosamid 750mg/m² den 1, vinkristin 1,2mg/m² den 1, prednisolon 40mg/m² den 1-5; a 21 dní 8 cyklů). 91 pacientů s nízce maligním NHL bylo léčeno fludarabinem a 44 CVP. V léčebné odpovědi nebyl signifikantní rozdíl mezi fludarabinem a CVP (64% versus 52%). Doba do progresu choroby byla zde sice delší po fludarabinu, ale bez efektu na celkové přežití. Tři pacienti zemřeli po léčbě fludarabinem na infekční komplikace, ale po CVP žádný (65). Přehled studií s fludarabinem v monoterapii je uveden v tabulce 1.

Vzhledem k experimentálně prokázanému synergizmu fludarabinu s řadou jiných cytostatik bylo nasnadě využít těchto vlastností v klinické praxi. Variant kombinací režimů fludarabinu s jinými cytostatiky bylo publikováno velké množství. Nejčastěji se objevují kombinace s antracykliny, cyklofosamidem, kortikoidy a interferonem alfa.

Účinnost režimů obsahujících fludarabin, antracykliny a případně dexamethazon se pohybuje všeobecně mezi 69-97% (průměrně 86%) s dosažením kompletní remise (CR) mezi 20-76% (průměrně 45%). U nepředléčených pacientů jsou výsledky příznivější s celkovou odpovědí průměrně 90% a s 54% dosažených CR. K dispozici je pouze jediná srovnávací studie testující polychemoterapii FND (fludarabin 25mg/m² den 1-3, mitoxantron 10mg/m² den 1, dexamethazon 20mg 5 dní, 8 cyklů) s ATT (alternující triple terapie: CHOP+Bleo, ESHAP, NOPP). Zhodnoceno bylo celkem 112 nemocných, 54 bylo léčeno FND a 58 nemocných dostalo ATT. Celková

odpověď byla po obou režimech shodně 97%, CR bylo pozorováno více po FND (49% vs 41%). 5-leté přežití pacientů s folikulárními lymfomy po FND bylo 83% a po ATT 82%. Nebyl prokázán žádný rozdíl mezi oběma režimy v celkovém přežití. Faktory, které korelovaly s kratším celkovým přežitím a kratším trváním léčebné odpovědi byly: věk nad 60 let, IPI skóre nad 2 a absence bcl-2 přestavby (66). Pokud jde o postavení dexamethazonu v těchto režimech zdá se, že jeho podání nemá překvapivě zvláštní význam. Po režimech pouze s fludarabinem a s antracyklinem se celková odpověď pohybovala kolem 88% (84-94%), zatímco u režimů typu FND kolem 84% (69-97%). Podobně tomu bylo v dosažení celkových remisí kolem 50% (40-76%) bez dexamethazonu a zhruba 39% (20-67%) po FND. Podrobnější přehled studií s režimy kombinující fludarabin, antracyclin a případně dexamethazon uvádí tabulka 2.

Fludarabin s cyklofosfamidem a eventuálně s dexamethazonem je rovněž velmi rozšířená kombinace. Celková účinnost se ve větších studiích pohybovala průměrně kolem 91% (72-100%) s dosažením kompletní remise kolem 58% (32-89%). Ani zde se nezdá mít dexamethazon zásadní přínos ve zvýšení účinnosti léčby. Kombinace fludarabin, cyklofosfamid, mitoxantron dokonce přinesla horší výsledky než pouze fludarabin s cyklofosfamidem. Rozdíl v účinnosti mezi předléčenými a nepředléčenými pacienty není ze studií patrný. Dosud nebyla publikována žádná randomizovaná studie. Přehled nejvýznamnějších studií uvádí tabulka 3.

Mezi méně používané kombinace patří fludarabin s IFN α . Publikované práce uvádějí celkovou účinnost 48% až 76%, což se blíží účinnosti fludarabinu v monoterapii, jak bylo uvedeno výše (OR 31% až 84%).

Vzhledem k dlouhodobé myelotoxicitě fludarabinu a obtížném sběru periferních kmenových buněk se objevují tendence využít snížený počet fludarabinových cyklů v kombinaci s jinou méně myelotoxickou chemoterapií. V současné době byly publikovány dvě práce využívající látek s nezkříženou rezistencí v sekvenční léčbě s fludarabinovým režimem. Celková účinnost

Tabulka č. 1: Přehled studií s fludarabinem v monoterapii.

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předléčenost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
Whelan ⁸⁰ (1991)	Flu 25mg/m ² 5 dní (med 3 cykly; 1-10)	fáze II	ano	23	22/48%	?	?
Redman ⁸¹ (1992)	Flu 25mg/m ² 5 dní	fáze II	ano	67 (28 FL)	?/80%	?	?
Hidde ³⁴ (1993)	Flu 25mg/m ² 5 dní (6 cyklů) 20 pts (FL), 23 pts (imunocytom), 1 pt T-lymfom, 1 pt lymfocyt.lymfom	fáze II	ano	38	13/31%	?	12 měs
Klasa ⁶⁵ (2002)	Flu 25mg/m ² 5 dní 6 cyklů vs CVP	random	ano	91 vs 44 (47 FL)	9/ 64%	11 měs	42 měs
Tondini ⁸² (2000)	Flu 25mg/m ² 5 dní vs Cd 0,14mg/kg 5 dní	random	ano	58 (26 Cd)	48/68%	?	?
Belanger ⁸³ , Solal-Cé ³⁵ (1996, 1997)	Flu25mg/m ² 5 dní (až 9 cyklů)	fáze II	ne	49	37/65%	PFS 13,6	50 měs
Hagenbeek ⁸⁴ (1998)	Flu 25mg/m ² 5 dní (6 cyklů)	nekomp	ne	194	39/69%	PFS 16,5 měs	??
Coiffier ³³ (1999)	Flu 25mg/m ² 5 dní 6x vs CHVP 12 cyklů + IFN α Věk 59-76 let	random	ne	131 (61)	20/59%	49% ve 2 letech	22 měs
Zinzani ⁵¹ (2000)	Flu 25mg/m ² 5 dní vs Flu 25mg/m ² 5 dní +Ida 12mg/m ² 3 dny (6 cyklů)	random	ne	60 vs 43	60/87% vs 40/84%	?	19 měs

Legenda k tabulce č. 1: Flu-fludarabin, Cd-cladribin, CVP (cyklofosfamid, vinkristin, prednison), CHVP (cyklofosfamid, doxorubicin, teniposid, prednisolon), Ida- idarubicin, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, pt –pacient, Random- randomizovaná studie

Tabulka č. 2: Přehled studií s kombinovanými režimy fludarabin, antracyklin +/- dexamethazon.

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předléčenost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
McLaughlin ⁴⁹ (1996)	FND: Flu 25mg/m ² /den 1-3 +Mitox 10mg/m ² /den 1 +Dex 20mg/den 1-5 (8 cyklů)	nekomp	ano	51 (33 FL)	44/91%	PFS (CR) 21 měs	25 měs
Zinzani ⁵⁰ (1997)	Flu 25mg/m ² /den 1-3 +Mitox 10mg/m ² /den 1 +Pred 40mg/den 1-5 (6 cyklů)	nekomp	ano	48 (22 FL)	27/81%	OS 67% v 33 měs PFS 32%	33 měs
Crawley ⁸⁵ (2000)	FND:Flu+Mitox+Dex (8 cyklů)	fáze II	ano	54	20/69%	??	??
Velasquez ⁸⁸ (1999)	Flu 25mg/m ² /den 1-3 +Mitox 10mg/m ² /den 1 (8 cyklů)	fáze II	ne	67	43/91%	OS 93% Ve 2 letech	??
Dimopoulos ²² (2002)	Flu 25mg/m ² /den 1-3 +Mitox 10mg/m ² /den 1 (6 cyklů)	fáze II	mix	25 (10 FL)	44 / 84%	OS 75% po 3 letech	33 měs
Zinzani ⁶⁷ (2000)	Flu 25mg/m ² 5 dní vs Flu 25mg/m ² 5 dní +Ida 12mg/m ² 3 dny (6 cyklů)	random	ne	60 vs 43	60/87% vs 40/84%	??	19 měs
Zinzani ⁵¹ (2000)	Flu 25mg/m ² /den 1-3 +Mitox 10mg/m ² /den 1	nekomp	ne	27 (17 FL)	76 / 94% (FL)	OS 92% ve2 letech	??
Tsimberidou ⁶⁶ (2002)	8 cyklů FND vs ATT	random	ne	54 vs 58	67/97% vs 59/97%	OS v 5 letech 83 vs 82%	5,9 roku

Legenda k tabulce č. 2: Flu-fludarabin, Mitox-mitoxantron, Dex-dexamethazon, Ida-idarubicin, FND (fludarabin, mitoxantron, dexamethazon), ATT – alternující triple terapie (CHOPBleo, ESHAP, NOPP), PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, FL-folikulární lymfom, pts- pacient, nekomp-nekompárovatelná studie, random- randomizovaná studie.

se pohybuje mezi 95-97%, což odpovídá účinnosti i jiných kombinovaných fludarabinových režimů. Předpokládané snížení dlouhodobé myelotoxicity nebylo v těchto studiích uvedeno. Přehled studií s různými kombinovanými režimy s fludarabinem je uveden v tabulce 4.

Tabulka č. 3: Přehled studií s kombinovanými režimy s fludarabinem a cyklofosfamidem.

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předlé-čenost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
Lazzarino ⁴⁸ (1999)	Flu 25mg/m ² /den, CFA 50mg/m ² /den, Dex 20mg/den, 3 dny, 6 cyklů	nekomp	ano	25 (14 FL)	32/72% v 18 měs	PFS 53%	21 měs
Santini ⁸⁸ (2001)	Flu + CFA vs Flu +CFA+ Mitox	random	ano	13 vs 21	69/100% vs 57/86%	??	??
Hochster ⁴⁷ (2000)	Flu 20mg/m2 5 dní + CFA 0,6-1,0g/m2 den 1	fáze I	ne	23	89/100%	PFS 53% v 5 letech	61 měs
Flinn ⁵² (2000)	Flu 20mg/m ² /den 1-5 + CFA 600mg/m2/den 1 +G-CSF 5µg/kg/d	nekomp	ne	60 (20 FL)	60/92%	??	??
Eucker ²⁴ (2002)	Flu 30mg/m ² /den + CFA 250mg/m ² /den, den 1-3, 6 cyklů	nekomp	mix	27	41/ 89%	??	??

Legenda k tabulce č. 3: Flu-fludarabin, Mitox-mitoxantron, Dex-dexamethazon, Ida-idarubicin, CFA- cyklofosfamid, G-CSF- granulocytární růstové faktory, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, FL-folikulární lymfom, pts- pacienti, nekomp - nekomparativní studie, random - randomizovaná studie

Tabulka č. 4: Přehled ostatních kombinací fludarabinových režimů.

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předlé-čenost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
Lynch ⁹⁰ (2002)	Flu 25mg/m ² 5 dní + IFNα 10 ⁶ U/m ² den 22-26, 8 cyklů + IFN 6 měs udrž	Fáze II	ano	21	25 / 76%	PFS 12 měs	55 měs
Zinzani ⁹¹ (1997)	Flu 25mg/m ² 5 dní 6 cyklů + IFNα 3x10UI/ týden	Nekomp.	ano	60 LG-NHL	?/48%	PFS 30% ve 2 letech	22 měs
Rohatgi ⁹² (2002)	Flu 25mg/m ² /d 5 dní 3 cykly + CNOP 6-8 cyklů	Fáze II	ne	27	67/97%	PFS 34 měs	50 měs
Wilder ⁹³ (2002)	FND altern CHOP	Nekomp	mix	87	?/95%	PFS 29 měs	41 měs

Legenda k tabulce č. 4: Flu-fludarabin, Dex-dexamethazon, CHOP- cyklofosfamid, adriamycin, vinkristin, prenison, CNOP-cyklofosfamid, mitoxantron, vinkristin, prednison, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, pts- pacient, nekomp- nekomparativní studie

Tabulka č. 5: Přehled studií s fludarabinem a rituximabem.

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předlé-čenost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF	Medián sledování
Czuczman ⁴² (2002)	Flu 25mg/m ² 5 dní (3 dny), R 7x375mg/m ²	fáze II	ano	30 LG-NHL	80/93%	med PFS 14 měs	26 měs
McLaughlin ⁹⁴ (2000)	Flu 25mg/m ² /den 1-3 +Mitox 10mg/m ² /den 1 +Dex 20mg/den 1-5, 8 cyklů + R 8x375mg/m ² +IFNα 12 měs	random	ano	78 LG-NHL	??/??	??	??
Hiddemann ⁹⁵ (2002)	(FCM) Flu 25mg/m ² den 1-3 + Mitox 8mg/m ² den 1 +CFA 200mg/m ² den 1-3, 4 cykly vs 4 xFCM +R 4x375mg/m ²	random	ano	147 93 (FL)	13/58% vs 35/83%	??	??
Zinzani ⁶⁷ (2002)	FM+R vs CHOP+R Flu 25mg/m ² /den 1-3 +Mitox 10mg/m ² /den 1	random	ne	69	31/95% vs 28/70%	??	??

Legenda k tabulce č. 5: Flu-fludarabin, Dex-dexamethazon, Mitox-mitoxantron, R-rituximab, CFA-cyklofosfamid CHOP- cyklofosfamid, adriamycin, vinkristin, prenison, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, LG-NHL – níže maligní neHodgkinovy lymfomy, FL-folikulární lymfom, random- randomizovaná studie

Na základě experimentálních důkazů o in vitro synergizmu fludarabinu s monoklonální protilátkou anti-CD20 (rituximab) se zkouší nejrůznější schémata s rituximabem a fludarabinem (30).

Czuczman a kol. prezentovali výsledky léčby pacientů s níže maligním lymfomem léčených fludarabinem s rituximabem. Fludarabin zde byl podáván v 6 cyklech v dávce 25mg/m²/den po dobu 5 dní v 28-denním intervalu a rituximab také v 6 cyklech v jednotlivé dávce 375mg/m². Celková odpověď byla 90% s dosažením 83% kompletních remisí (42). Tyto výsledky jsou plně srovnatelné s výsledky režimu CHOP/rituximab po stránce účinnosti i po stránce toxicity. Jinou imunochemoterapii srovnával s CHOP režimem Zinzani. Do studie byly zařazeni pacienti s folikulárním lymfomem a pozitivní přestavbou bcl-2/IgH. Tito nemocní dostávali randomizovaně buď fludarabin s mitoxantronem (FM) nebo CHOP. Pacienti s přetrvávající PCR pozitivitou a alespoň parciální klinickou odpovědí byli dále léčeni 4 dávkami rituximabu. FM režim byl účinnější s dosažením 95% vs 70% celkových odpovědí a s 64% vs 42% CR. Po FM/rituximab bylo pozorováno také vyšší procento molekulárních odpovědí 34% vs 10% ve srovnání s CHOP/rituximab (67). Hiddemann a spolupracovníci prospektivně randomizovali pacienty s relabovanými indolentními lymfomy, kterým podali režim FCM (fludarabin, cyklofosfamid, mitoxantron) nebo FCM s rituximabem. Předběžně bylo zhodnoceno 80 z 147 randomizovaných. Lepší účinnost vykazoval režim FCM+rituximab s 89% vs 53% celkových odpovědí, přičemž 36% vs 15% bylo kompletních remisí (68). Recentní studie pod vedením McLaughlina testuje v kombinaci s rituximabem velmi účinný režim FND (fludarabin, mitoxantron, dexamethazon). První předběžné výsledky hodnotí pouze toleranci a toxicitu léčby, které jsou srovnatelné s pouhým FND (49). Uvedené studie se tedy vyznačují celkovou účinností mezi 70% a 95% při nezvýšené toxicitě léčby (49). Přehled kombinovaných režimů s fludarabinem a rituximabem přináší tabulka 5. U folikulárního lymfomu se popisuje charakteristická přestavba t(14;18), která je identifikovatelná molekulárně biologickými metodami v 45 až 85 % případech onemocnění. Přesný biologický význam t(14;18) je zatím nejasný (69). Tato přestavba není výlučně specifická

Tabulka č. 6: Molekulární odpověď po fludarabinových režimech.

Autor	Schéma	Počet pts	CR/CR +PR	Molekulární odpověď
Czuczman ⁴² (2002)	8x R-CHOP vs 6x R-FND	30 (R-FND)	80 / 93%	PB 9/9 (100%) BM 6/7 (86%)
Tsimberidou ⁶⁶ (2002)	ATT vs 8xFND + udr. IFN α	142 73 (FND)	79 / 97%	PB 26/32 (81%)
Crawley ⁸⁵ (2000)	8x FND	54	20 / 69%	RQ-PCR OR 17/25 (68%) CR 8/25 (32%)

Legenda k tabulce č. 6: R-rituximab, R-CHOP- rituximab, cyklofosfamid, adriamycin, vinkristin, prednison, R-FND-rituximab, fludarabin, mitoxantron, dexamethazon, ATT-alternující triple terapie, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, RQ-PCR-real time PCR, PB-periferní krev, BM- kostní dřeň, pts- pacienti

pro folikulární lymfom. Byla popsána i u jiných typů lymfomů a rovněž i u podstatného procenta „zdravých“ lidí a pacientů s nemaligními onemocněními uzlin (70, 71, 72). Translokace t(14;18) (q32q21) zahrnuje jednak část pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH), který je za normálních okolností umístěn na lokusu 14q32 a jednak gen pro bcl-2 protein (B-cell leukemia/lymphoma-2 protein) na lokusu 18q21. Při translokaci dochází k přesunu genu pro bcl-2 z chromozomu 18 do oblasti promotoru pro těžký řetězec imunoglobulinu na chromozomu 14 (73). Vzniklý chimerický gen bcl-2/IgH má za následek trvalou expresi bcl-2 a tím syntézu proteinu bcl-2, který je znám jako silný inhibitor apoptózy. U buněk s overexpresí bcl-2 proteinu dochází k blokádě programované buněčné smrti a také k usnadnění další nádorové transformace (74, 75, 76).

Existují data, která uvádějí pozitivní korelaci mezi navozením „molekulární remise“ a příznivou prognózou choroby (72, 77). Na druhé straně někteří autoři tuto korelaci popírají (78, 79). I když jednoznačný význam molekulární odpovědi není dosud potvrzen, zdá se, že pacienti v dlouhodobé molekulární remisi mají mnohem příznivější prognózu než-li pacienti s trvalou

nebo kolísavou pozitivitou. Kriteriem účinné léčby folikulárního lymfomu je tedy dnes dosažení nejen klinické ale i molekulární remise. Fludarabinové režimy se zdají být účinné i v eliminaci detekovatelné přestavby t(14;18) z kostní dřeně a periferní krve. Tabulka 6 uvádí studie s fludarabinovými režimy a hodnocením molekulárních odpovědí.

SHRNUTÍ

Více než desetileté klinické zkušenosti s fludarabinem v léčbě folikulárních lymfomů jsou velmi povzbudivé. V tuto chvíli se ale nelze vyjádřit k efektu fludarabinu na celkové přežívání nemocných. Závěry nám brání učinit relativně krátká doba sledování léčených pacientů vzhledem k přirozenému mediánu tohoto indolentního lymfomu.

Pokud jde o prokázanou účinnost, lze říci, že fludarabin v monoterapii má srovnatelnou účinnost jako standardní režimy typu COP nebo CHOP. Efektivita kombinovaných fludarabinových režimů (FM, FND, FluCy) je znatelně lepší než monoterapie. Překvapivě efekt kortikoidů v kombinovaných režimech se nezdá být zvlášť významný. Kombinace fludarabinových režimů s rituximabem dosahují rovněž výborné výsledky a jeví se jako velmi perspektivní. V těchto režimech je využit příznivý synergismus fludarabinu s rituximabem při nezvýšené toxicitě léčby.

Fludarabin má ale také svůj toxický potenciál. Mezi dominující projevy patří dlouhodobá suprese T-buněčné imunity. Myelotoxicita v kompartmentu progenitorových buněk zase vede často k neúspěšné stimulaci a sběru periferních kmenových buněk. Tento fakt je obávaný a limituje do jisté míry podání fludarabinových režimů v primární léčbě. Výrazně horší výsledky po podání fludarabinových režimů jsou pravidelně pozorovány u nemocných nad 60 let a velmi předlečených pacientů. Příčina tkví především ve vyšším výskytu závažných infekčních komplikací.

V současné době se objevují léčebná schémata sekvenčního podání fludarabinových cyklů s jinou chemoterapií. Cílem je využít plně cytostatický potenciál fludarabinu za současného snížení toxických projevů.

Literatura

1. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initial untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-5.
2. Skarin AT, Dorfman DM. Non-Hodgkin's lymphomas: current classification and management. *CA Cancer J Clin*. 1997; 47: 351-72.
3. Horning SJ. Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol*. 1993; 20(suppl 5): 75-88.
4. Acker B, Hoppe RT, Colby TV et al. Histologic conversion in the non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol*. 1983; 1: 11-16.
5. Landis SH, Murray T, Bolden S, & Wingo PA. Cancer statistics. *CA: A cancer Journal for Clinicians*. 1999; 49: 8-31.
6. Montgomery JA and Hewson K. Nucleosides of 2-fluoroadenine. *J Med Chem* 1969; 12: 498-504.
7. Danhauser L, Plunkett W, Keating M, Cabanillas F. 9- β -arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate pharmacokinetics in plasma and tumor cells of patients with relapsed leukemia and lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986; 18: 1840-1847.
8. Danhauser L, Plunkett W, Lillemark J et al. Comparison between the plasma and intracellular pharmacology of 1- β -D-arabinosylcytosine and 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate in patients with relapsed leukemia. *Leukemia* 1987; 1: 638-643.
9. Malspeis L, Grever MR, Staubus AE, Young D. Pharmacokinetics of 2-F-Ara-A (9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate) in cancer patients during the phase I clinical investigation of fludarabine phosphate. *Semin Oncol* 1990; 17 (suppl 8): 18-32.
10. Hersh MR, Kuhn JG, Phillips JL et al. Pharmacokinetic study of fludarabine phosphate (NSC 312 887). *Cancer Chemother Pharmacol* 1986; 17: 277-280.
11. Brockman RW, Cheng YC, Schabel FM Jr, Montgomery JA. Metabolism and chemotherapeutic activity of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine against murine leukemia L1210 and evidence for its phosphorylation by deoxycytidine kinase. *Cancer Res* 1980; 40: 3610-3615.
12. Plunkett W, Chubb S, Alexander L et al. Comparison of the toxicity and metabolism of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9- β -D-arabino-furanosyladenine in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res* 1980; 40: 2349-2355.

13. Plunkett W, Huang P, Gandhi V et al. Metabolism and action of fludarabine phosphate. *Semin Oncol* 1990; 17 (suppl 7): 24-27.
14. Robertson LE, Chubb S, Meyn RE et al. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 1993; 81: 143-150.
15. White EL, Shaddix SC, Brockman RW et al. Comparison of the actions of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9- β -D-arabinofuranosyl-adenine on target enzymes from mouse tumor cells. *Cancer Res* 1982; 42: 2260-2264.
16. Huang P, Chubb S, Plunkett W et al. Termination of DNA synthesis by 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine: a mechanism of cytotoxicity. *J Biol Chem* 1990; 265: 16617-16625.
17. Catapano CV, Perrino FW, Fernandes DJ. Primer RNA chain termination induced by 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-triphosphate. A mechanism of DNA synthesis inhibition. *J Biol Chem* 1993; 268: 7179-7185.
18. Lindahl T and Barnes DE. Mammalian DNA ligases. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 251-281.
19. Rabkin CS, Ward MH, Manns A et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphomas. In: Magrath I. *The Non-Hodgkin's Lymphomas*. Arnold London; 1997: 171-186.
20. Spriggs D, Robbins G, Mitchell T, Kufe D. Incorporation of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine into HL-60 cellular RNA and DNA. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 247-252.
21. Consoli U, El-Tounsi I, Sandoval A et al. Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 91: 1742-8.
22. Stoetzer OJ, Pogrebniak A, Scholz M et al. Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1873-1880.
23. Sampath D, Plunkett W. The role of c-Jun kinase in the apoptotic response to nucleoside analogue-induced DNA damage. *Cancer Res* 2000; 60: 6408-15.
24. Barrueco JR, Jacobsen DM, Chang CH et al. Proposed mechanism of therapeutic selectivity for 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine against murine leukemia based upon lower capacities for transport and phosphorylation in proliferative intestinal epithelium compared to tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47: 700-706.

25. Sirotnak FM, Chello PL, Dorick DM et al. Specificity of systems mediating transport of adenosine, 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine, and other purine nucleoside analogues in L1210 cells. *Cancer Res* 1983; 43: 104-109.
26. Gandhi V, Nowak B, Keating M et al. Modulation of arabinosylcytosine metabolism by arabinosyl-2-fluoradenine in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for combination therapy. *Blood* 1989; 74: 2070-5.
27. Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001; 98: 2771-2777.
28. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD 20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD95 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000; 95: 3900-3908.
29. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell CLL: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001; 98: 3383-3389.
30. DiGaetano N, Xiao Y, Erba E et al. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *British J Haematol* 2001; 114: 800-809.
31. Sorensen JM, Vena DA, Fallavollita A et al. Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the Group protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report. *J Clin Oncol* 1997; 15: 458-65.
32. Johnson S, Smith AG, Loeffler H et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1996; 347: 1432-8.
33. Coiffier B, Neidhardt-Bérard E M, Tilly H et al. Fludarabine alone compared to CHVP plus interferon in elderly patients with follicular lymphoma and adverse prognostic parameters: A GELA study. *Ann of Oncol* 1999; 10: 1191-1197.
34. Hiddemann W, Unterhalt M, Pott Ch et al. Fludarabine single-agent therapy for relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphomas: A phase II study of the german low-grade non-Hodgkin's lymphoma study group. *Semin in Oncol* 1993; 20: 28-31.
35. Solal-Célgny P, Brice P, Brousse N et al. Phase II trial of fludarabine monophosphate as first line treatment in patients with advanced follicular lymphoma: a multicenter study by the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1996; 14: 514-519.
36. Laszlo D, Galieni P, Raspadori D et al. Fludarabine containing-regimens may adversely affect peripheral blood stem cell collection in low-grade Non-Hodgkin lymphoma patients. *Leukemia and Lymphoma* 2000; 37: 157-161.
37. Michallet M, Thiébaud A, Dreger P et al. Peripheral blood stem cell (PBSC) mobilization and transplantation after fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a report of the European Blood and Marrow Transplantation (EBMT) CLL subcommittee on behalf of the EBMT Chronic Leukaemias Working Party (CLWP). *Br J Haematol* 2000; 108: 595-601.
38. O'Donnell P, Loper K, Flinn G et al. Effect of fludarabine chemotherapy on peripheral blood stem cell transplantation (PBST). *Blood* 1998; 92 (suppl 1): 120a (abstr 487).
39. Boldt DH, Von Hoff DD, Kuhn JG et al. Effects on human peripheral lymphocytes of in vivo administration of 9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine-5'-monophosphate (NSC 312887) a new purine antimetabolite. *Cancer Res* 1984; 44: 4661-4666.
40. Fenchel K, Bergmann L, Wijermans P et al. Clinical experience with fludarabine and its immunosuppressive effects in pretreated chronic lymphocytic leukemias and low-grade lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 1995; 18: 485-492.
41. Wijermans PW, Gerrits WBJ, Haak HL. Severe immunodeficiency in patients treated with fludarabine monophosphate. *Eur J Haematol* 1993; 50: 292-296.
42. Czuczman MS, Fallon A, Mohr A et al. Rituximab in combination with CHOP or fludarabine in low-grade lymphoma. *Semin Oncol* 2002; 29 (suppl 1): 36-40.
43. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2431-2448.
44. Annassie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Int Med* 1998; 129: 559-566.
45. Leparrier M, Chevret S, Cazin B et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and CHOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001; 98: 2319-25.
46. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1750-1757.
47. Hochster H S, Oken M M, Winter J A et al. Phase I study of fludarabine plus cyclophosphamide in patients with previously untreated low-grade lymphoma: results and long-term follow up - a report from the Eastern Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2000; 18: 987-994.
48. Lazzarino M, Orlandi E, Montillo M et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and dexamethasone (FluCyD) combination is effective in pretreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann of Oncol* 1999; 10: 59-64.
49. McLaughlin P, Hagemeister FB, Romaguera JE et al. Fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone: an effective new regimen for indolent lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1262-1268.
50. Zinzani PL, Bendandi M, Magagnoli M et al. Fludarabine-mitoxantrone combination-containing regimen in recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann of Oncol* 1997; 8: 379-383.
51. Zinzani PL, Magagnoli M, Moretti L et al. Randomized trial of fludarabine versus fludarabine and idarubicin as frontline treatment in patients with indolent or mantle-cell lymphoma. *J of Clin Oncol* 2000; 18: 773-779.
52. Flinn I W, Byrd J C, Morrison C et al. Fludarabine and cyclophosphamide with filgrastim support in patients with previously untreated indolent lymphoid malignancy. *Blood* 2000; 96: 71-75.
53. Lossos IS, Paltiel O, Polliak A. Salvage chemotherapy using a combination of fludarabine and cyclophosphamide for refractory or relapsing indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 1999; 33: 155-160.
54. Mauro FR, Foa R, Cerretti R et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000; 96: 2786-2792.
55. Gonzales H, Leblond V, Azar N et al. Severe autoimmune hemolytic anemia in eight patients treated with fludarabine. *Hematol Cell Ther* 1998; 40: 113-8.
56. Bay JO, Fouassier M, Beal D et al. Autoimmune thrombocytopenia after six cycles of fludarabine phosphate in patient with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1997; 39: 209-12.
57. Cheson BD, Vena DA, Foss FM, Sorensen JM. Neurotoxicity of purine analogs: a review. *J Clin Oncol* 1994; 12: 216-28.
58. Grever M, Leiby J, Kraut E et al. A comprehensive phase I and II clinical investigation of fludarabine phosphate. *Semin Oncol* 1990; 17: 39-48.
59. Gonzales H, Bolger F, Leblond V. Progressive multifocal leukoencephalitis (PML) in three patients treated with standard-dose fludarabine (FAMP). *Hematology and Cell Therapy* 1999; 41: 183-6.
60. Garg S, Garg MS, Basraji N. Multiple pulmonary nodules: an unusual presentation of fludarabine pulmonary toxicity: case report and review of literature. *Am J Hematol* 2002; 70: 241-5.
61. Helman DL Jr, Byrd JC, Ales NC et al. Fludarabine-related pulmonary toxicity: a distinct clinical entity in chronic lymphoproliferative syndromes. *Chest* 2002; 122: 785-90.
62. Stoica GS, Greenberg HE, Rossoff LJ. Corticosteroid responsive fludarabine pulmonary toxicity. *Am J Clin Oncol* 2002; 4: 340-1.
63. Cheson BD, Vena DA, Barrett J, Freidlin B. Second malignancies as a consequence of nucleoside analog therapy for chronic lymphoid leukemias. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2454-2460.
64. Cohen Y, Da's N, Libster D et al. Large-cell transformation of chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma during or soon after treatment with fludarabine-rituximab-containing regimens: natural history or therapy-related complication? *Eur J Haematol* 2002; 68: 80-3.
65. Klasa R, Meyer RM, Shustik C et al. Randomized phase III study of fludarabine phosphate versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone in patients with recurrent low grade non-Hodgkin's lymphomas previously treated with an alkylating agent or alkylator-containing regimen. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4649-54.
66. Tsimberidou AM, McLaughlin P, Younes A et al. Fludarabine, mitoxantrone, dexamethasone (FND) compared with an alternating triple therapy (ATT) regimen in patients with stage IV indolent lymphoma. *Blood* 2002; 100: 4351-4357.
67. Zinzani PL, et al. A randomized trial of fludarabine and mitoxantrone plus rituximab vs CHOP plus rituximab as first-line treatment in patients with follicular lymphoma. *Oncology* 2002; 16 (suppl 2): 12 (abstr 3500).
68. Forstpointner R, Hanel A, Repp R et al. Increased response rate with rituximab in relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas - results of a prospective randomized study of the German low-grade lymphoma study group. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: 2253-8.
69. Viardot A, Möller P, Högel et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4523-4530.
70. Aster JC, Kobayashi Y, Shiota M et al. Detection of the t(14;18) at similar frequencies in hyperplastic lymphoid tissues from american and japanese patients. *Am J of Pathol.* 1992; 141: 291-299.
71. Dölke G, Illerhaus G, Hirt C et al. Bcl-2/J_H rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J of Clin Oncol.* 1996; 14: 1333-1344.
72. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81: 3449-3457.
73. Meijerink JPP. T (14;18), a journey to eternity. *Leukemia* 1997; 11: 2175-2187.
74. Liu YJ, Mason DY, Johnson GD et al. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol.* 1991; 21: 1905-1910.
75. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988; 335: 440-2.
76. Zhang L, Insel PA. Bcl-2 protects lymphoma cells from apoptosis but not growth arrest promoted by cAMP and dexamethasone. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281: C1642-C1647.
77. McLaughlin P, Hagemeister FB, Swan F et al. Intensive conventional-dose chemotherapy for stage IV low-grade lymphoma: high remission rates and reversion to negative of peripheral blood bcl-2 rearrangement. *Ann Oncol* 1994; 5 (suppl 2): 73-74.
78. López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F et al. Applicability of the international index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol.* 1994; 12: 1343-8.

79. Mandingers CMPW, Meijerink JPP, Mensink EBJM et al. Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood* 2001; 98: 940-944.
80. Whelan JS, Davis CL, Rule S et al. Fludarabine phosphate for the treatment of low grade lymphoid malignancy. *Br J of Cancer* 1991; 64: 120-3.
81. Redman JR, Cabanillas F, Velasquez WS et al. Phase II trial of fludarabine phosphate in lymphoma: an effective new agent in low-grade lymphoma. *J of Clin Oncol* 1992; 10: 790-4.
82. Tondini C, Balzarotti M, Rampinelli I et al. Fludarabine and cladribine in relapsed/refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma: a phase II randomized study. *Ann of Oncol* 2000; 11: 231-233.
83. Belanger C, Solal-Céligny P, Neidhardt E M et al. Fludarabine monophosphate as first-line therapy for patients with advanced follicular lymphoma: updated analysis of and salvage treatment results from the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trial. *Blood* 1997; 90: S1 abstr 1534.
84. Hagenbeek A et al. Fludarabine versus conventional CVP chemotherapy in newly diagnosed patients with stages III and IV low grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. Preliminary results from a prospective, randomized, phase III clinical trial in 381 patients. *Blood* 1998; 92 suppl 1: 315a abstr 1294.
85. Crawley CR, Foran JM, Gupta RK et al. A phase II study to evaluate the combination of fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone (FMD) in patients with follicular lymphoma (FL). *Ann Oncol* 2000; 11: 861-865.
86. Velasquez W et al. SWOG 95-01: A phase II trial of a combination of fludarabine and mitoxantrone (FN) in untreated advanced low grade lymphoma. An effective, well tolerated therapy. *Proc ASCO* 1999; 18: 9a abstr 27.
87. Dimopoulos MA, Fountzilas G, Papageorgiou E et al. Primary treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with the combination of fludarabine and mitoxantrone: a phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 111-4.
88. Santini G, Nati S, Spriano M et al. Fludarabine in combination with cyclophosphamide or with cyclophosphamide with mitoxantrone for relapsed or refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2001; 86: 282-286.
89. Eucker J, Schille C, Schmid P et al. The combination of fludarabine and cyclophosphamide results in a high remission rate with moderate toxicity in low grade non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 907-13.
90. Lynch JW, Hei DL, Braylan RC et al. Phase II study of fludarabine combined with interferon-alpha-2a followed by maintenance therapy with interferon-alpha-2a in patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Oncol* 2002; 25: 391-7.
91. Zinzani PL, Bendandi M, Magagnoli M et al. Results of fludarabine induction and alpha-interferon maintenance protocol in pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 1997; 59: 82-8.
92. Rohatgi A, LaRocca RV, Bard V et al. Phase II trial of sequential therapy with fludarabine followed by cyclophosphamide, mitoxantrone, vincristine, and prednisone for low-grade follicular lymphomas. *Am J Haematol* 2002; 70: 181-185.
93. Wilder DD, Ogden JL, Jain VK. Efficacy of fludarabine/mitoxantrone/dexamethasone alternating with CHOP in bulky follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Clin lymphoma* 2002; 2: 229-37.
94. McLaughlin P, Hagemeister FB, Rodriguez MA et al. Safety of fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone combined with rituximab in the treatment of stage IV indolent lymphoma. *Sem Oncol* 2000; 27: 37-41.
95. Hiddemann W, Forstpointner R, Fiedler F et al. Combined immunochemotherapy (R-FCM) is superior to a fludarabine-containing chemotherapy (FCM) alone in recurrent follicular and mantle cell lymphoma – results of a prospective randomized comparison of the German low grade lymphoma study group. *Ann Oncol* 2002; suppl 2: abstr 186.