



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83628 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/522 (2006.01)

A61K 31/675

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЗАХИСТУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ ТА ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИН ПІД ЧАС ТРАНСПЛАНТАЦІЇ АЛОГЕННИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН

1

2

(21) 20041109654

(22) 02.06.2003

(24) 11.08.2008

(86) PCT/EP03/05753, 02.06.2003

(31) 60/384,114

(32) 31.05.2002

(33) US

(31) 60/387,438

(32) 11.06.2002

(33) US

(46) 11.08.2008, Бюл.№ 15, 2008 р.

(72) АЙССНЕР ГЮНТЕР, ГОЛЛЕР ЕРНСТ

(73) КЛІНІКУМ ДЕР УНІВЕРЗИТЕТ РЕГЕНСБУРГ

(56) BAIREY OSNAT ET AL: "Clinical severe hepatic venoocclusive disease during induction treatment of acute monoblastic leukemia managed with defibrotide." AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY, vol. 69, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 281-284, XP008022853 April, 2002

RICHARDSON P G ET AL: "Multi-institutional phase II, randomized dose finding study of defibrotide (DF) in patients (pts) with severe veno-occlusive disease (VOD) and multi-system organ failure (MOF) post stem cell transplantation (SCT): Promising response rate without significant toxicity in a high risk population." BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 853a XP008022856 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Part 1;Orlando, Florida, USA; December 07-11, 2001, November 16, 2001

MIRANDA N ET AL: "Treatment of hepatic veno-occlusive disease (VOD) with defibrotide: Results in 5 stem cell transplant recipients." BLOOD, vol. 94, no. 10 SUPPL. 1 PART 2, 15 November 1999 (1999-11-15), page 359b XP008022854 Forty-first Annual Meeting of the American Society of Hematology;New Orleans, Louisiana, USA; December 3-7, 1999

SHAW B E ET AL: "The use of defibrotide in the management of vascular endothelial complications (VOD/HUS/TTP) of stem cell transplantation." BLOOD, vol. 94, no. 10 SUPPL. 1 PART 1, 15 November 1999 (1999-11-15), page 608a XP008022855 Forty-first Annual Meeting of the American Society of Hematology;New Orleans, Louisiana, USA; December 3-7, 1999

SAYER H G ET AL: "Hepatic veno-occlusive disease (VOD) with complete occlusion of liver venules after tandem autologous stem cell transplantation: Successful treatment with high-dose methylprednisolone and defibrotide." JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, vol. 128, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 148-152, XP002256487

(57) 1. Застосування захисного олігодезоксирибонуклеотиду для виробництва медикаменту для захисту епітеліальних та/або ендотеліальних клітин від апоптозу та/або активації, викликаних застосуванням імунопригнічувача під час трансплантації алогенних стовбурових клітин у пацієнтів, у яких не діагностовано венооклюзивне захворювання або мультиорганна недостатність, де вказаний захисний олігодезоксирибонуклеотид є дефібротидом, і його вводять під час передтрансплантаційного кондиціонування, та імунопригнічувач являє собою флударабін.

2. Застосування за п.1, де етап введення захисного олігодезоксинуклеотиду відбувається одночасно, після або до введення імунопригнічувача пацієнту.

3. Застосування за п.2, де етап введення захисного олігодезоксинуклеотиду відбувається після введення імунопригнічувача пацієнту.

4. Застосування за п.3, де проміжок часу між введенням захисного олігодезоксинуклеотиду та введенням імунопригнічувача пацієнту становить від однієї години до двох тижнів, переважно від двох до семи днів.

5. Застосування за п.2, де етап введення захисного олігодезоксинуклеотиду відбувається перед введенням імунопригнічувача пацієнту.

6. Застосування за п.5, де різниця у часі між етапом введення захисного олігодезоксинуклеотиду та застосуванням імунопригнічувача до пацієнта становить від одного дня до двох тижнів, переважно від двох до семи днів.

7. Застосування за будь-яким з пп.1-6, де дозу дефібротиду, що вводиться, вибрано таким чином, щоб досягти рівня в крові від 100мкг/мл до 0,1мкг/мл, переважно від 10мкг/мл до 100мкг/мл.

(13) C2

(11) 83628

(19) UA

8. Застосування за п.7, де дозу дефібротиду, що вводиться, вибрано таким чином, щоб досягти рівня в крові 10мкг/мл.

9. Застосування за будь-яким з пп.1-8, де доза дефібротиду, що вводиться, становить від 100мг/кг ваги пацієнта до 0,01мг/кг ваги пацієнта, переважно від 20мг/кг ваги пацієнта до 0,1мг/кг ваги пацієнта.

10. Застосування за п.9, де доза дефібротиду, що вводиться, становить від 15мг/кг ваги пацієнта до 1 мг/кг ваги пацієнта, переважно 12мг/кг ваги пацієнта.

11. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де активація включає посилену експресію ICAM-1.

Винахід належить до галузі застосування радіаційної та/або хіміотерапії. Більш конкретно, винахід стосується способів полегшення побічних ефектів пов'язаних із таким лікуванням.

Трансплантація алогенних стовбурових клітин (SCT) є добре відомим способом для лікування гематологічних неоплазій та зростаючої кількості інших злоякісних розладів. SCT переважно складається з двох послідовних кроків: кондиціювання претрансплантату, яке класично полягає у загальному опроміненні тіла (TBI) та хіміотерапії, що призводить до мінімізації залишкового захворювання та імунопригнічення реципієнту як першого кроку, та перенесення алогенних стовбурових клітин, котрі мають здійснювати лікування на другому етапі. Однак, з причини невідповідності у основних (MHC) та вторинних (mHAg) антигенах тканинної сумісності, все ж таки можуть зустрічатися на різних етапах після трансплантації деякі запальні реакції, включаючи гостре захворювання „трансплантат проти господаря“ (GvHD). Базуючись на дослідженнях винахідників¹ та деяких інших дослідників^{2,3}, є загально прийнятим те, що кондиціювання сприяє через неспецифічне запалення цим ускладненням пов'язаним із трансплантатом (TRC) До того ж, також було продемонстровано пряму токсичність особливо TBI Це привело до сучасної різноманітності режимів кондиціювання, які зараз досліджуються. До того ж, нові способи претрансплантатної терапії дозволяють розширити лікувальні протоколи та відбір пацієнтів. Одна речовина з цих нових концептів є флударабін, немісцобластивий імунопригнічувач, котрий спочатку використовувався для лікування хронічної лімфатичної лейкемії⁶. Флударабін в комбінації із, наприклад, BCNU та мелфаланом, циклофосфамідом або іншими агентами може замінити TBI або використовуватися разом із TBI при режимі зниженої дозою^{7,8}. Отримані на сьогодні клінічні дані, свідчать про порівняно низьку бічну дію та специфічність до гемопоетичних та імунних клітин у флударабіну⁹. Однак, вплив цієї сполуки на негемопоетичні клітини, такі як ендотеліальні або епітеліальні клітини, ще не був об'єктом дослідження.

Фактично усі TRC є пов'язаними з ендотеліальною дисфункцією та uszkodженням¹⁰. Винахідники та інші продемонстрували, що ендотелій є мішенню, претрансплантатного кондиціювання *in vitro* та *in vivo*. Іонізуюча радіація індукуює програмовану клітинну смерть (апоптоз) у ендотеліаль-

них клітинах^{11,14}. В той же час ендотелій є активованим на основі експресії адгезивної молекули призводить до збільшення лейкоцито-ендотеліальних взаємодій як передумови запального процесу^{15,16}. Ці ефекти є значно підсилені бактеріальним ендотоксином (ліпополісахарид, LPS), котрий може транслокуватися через uszkodжені слизові бар'єри з кишково-шлункового тракту¹⁷. До того ж, було продемонстровано, що LPS збільшує антигенність ендотеліальних клітин до алогенних CD8+цитотоксичних Т-лімфоцитів¹⁸.

Одержані зараз клінічні результати режимів із флударабіном та зниженою інтенсивністю кондиціювання (RIC) ясно демонструють негативну регуляцію токсичності зумовленої кондиюванням без впливу імунної реконституції²⁵. Випадки гострого GvHD у пацієнтів, які одержували RIC, є порівняно або значно менші ніж такі у пацієнтів, котрі отримували класичні режими кондиювання²⁶. Однак, повідомлення про дещо або значне збільшення віддалених ефектів, таких як остеонекроз²⁷, легеневі ускладнення²⁸ та збільшення випадків хронічного GvHD²⁹ ясно демонструють можливість серйозних побічних ефектів пов'язаних із застосуванням флударабіну.

Винахід базується на відкритті того, що флударабін активує та ушкоджує ендотеліальні та епітеліальні клітини. Активація клітин призводить до ушкодження при лікувальній ситуації, коли використовується флударабін, наприклад, коли лікуються злоякісні утворення з використанням SCT. Епітеліальні та ендотеліальні клітини можуть бути захищені від цієї активації та ушкодження застосуванням дефібротиду. Це застосування може полягати в тому, що конкомітант або дефібротид може бути даний перед застосуванням флударабіну або після нього.

Скорочення та визначення

SCT: Трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин.

Імунопригнічувач: речовина, котра негативно регулює імунну відповідь суб'єкту при застосуванні. Імунопригнічувачі застосовуються при пригніченні імунної системи у пацієнтів які проходять терапію стовбуровими клітинами. Приклади імунопригнічувачів включають флударабін, циклофосфамід, BCNU, циклоспорин, сіролімус, такролімус та мелфалан. Переважним, в контексті даного винаходу, є флударабін (також відомий як 2-фторо-9-β-D-арабінофуранозиладенін).

Захисний олігодезоксирибонуклеотид: буде означати, в контексті цієї заявки, як олігодезоксирибонуклеотиди, як визначено в [патенті US 5,646,268] та і полідезоксирибонуклеотиди, як визначено в [патенті US 5,223,609], котрі включено тут повністю через посилання.

[US 5,646,268] розкриває спосіб одержання олігодезоксирибонуклеотиду, який має наступні фізико-хімічні та хімічні характеристики:

Молекулярна маса 4000-10000

h : <10

$A+T/C+G \cdot 1.100-1.455$

$A+G/C+T \cdot 0.800-1.160$

Специфічне обертання: $+30^\circ - +48^\circ$

*молярна концентрація основ

h = параметр гіперхромності

Спосіб одержання такого олігодезоксирибонуклеотиду включає: преципітацію 0,8М водних розчинів ацетату натрію натрієвої солі полідезоксирибонуклеотиду при 20°C додаванням алкілового спирту вибраного з групи, яка включає етиловий, пропіловий та ізопропіловий спирт.

[Патент US 5,223,609] розкриває дефібротид котрий виконує має певну фармакологічну або терапевтичну властивості і, таким чином є частково придатним, якщо нуклеотидні фракції утворюють в стехіометричному узгодженні із наступною полідезоксирибонуклеотидною формулою випадкової послідовності:

P1-5, (dAp)12-24, (dGp)10-20, (dTp) 13-26, (dCp)10-20,

Де

P= фосфорний радикал

dAp= дезоксиаденіловий мономер

dGp= дезоксигуаніловий мономер

dTp= дезокситимідиловий мономер

dCp= дезоксцитидиловий мономер

Дефібротид, що відповідає цій формулі крім того демонструє наступні хіміко-фізичні властивості: електрофорез= гомогенна анодна мобільність; коефіцієнт екстинкції, $E_{1\text{cm}}1\%$ при $260 \pm 1 \text{ nm}$ $= 220 \pm 10$; співвідношення екстинкції, $E_{230}/E_{260} = 0.45 \pm 0.04$; коефіцієнт молярної екстинкції (по відношенню до фосфору), $\alpha(P) = 7.750 \pm 500$; сила обертання $[\alpha]_D^{20} = 53^\circ \pm 6$; реверсивна гіперхромність, вказана як % в нативній ДНК, $h = 15 \pm 5$.

Переважаючим захисним олігодезоксирибонуклеотидом є Дефібротид [Реєстраційний номер CAS: 83712-60-1], полінуклеотид добре відомий особі досвідченій в цій галузі, котрий зазвичай визначається як полідезоксирибонуклеотид отриманий екстракцією [US 3,770,720 та US 3,899,481] з тваринної або рослинної тканини; цей полідезоксирибонуклеотид є нормально застосовним у формі солі лужного металу, зазвичай натрію, та зазвичай, має молекулярну масу приблизно 45 - 50 кДа. Дефібротид використовується принципово задля його антитромботичної активності [US 3,829,567], хоча він може бути використаний у різних застосуваннях, таких як, наприклад, лікування гострої ниркової недостатності [US 4,694,134] та лікування гострої міокардіальної ішемії [US 4,693,995]. [Патенти US 4,985,552 та US 5,223,609] описують способи одержання дефібротиду, котрі роблять можливими одержання продукту, котрий є

стабільним та має добре визначувані фізико-хімічними характеристики та не має жодних небажаних бічних ефектів.

Винахід відноситься до способу лікування пацієнтів, котрі проходять лікування імунопригнічувачами, котре включає етап застосування ефективної дози захисного олігодезоксирибонуклеотиду пацієнту. Лікування імунопригнічувачами, переважно, зустрічається при SCT. Імунопригнічувач, переважно, вибирається з групи, яка включає антиметаболіти (наприклад, 5-фторурацил (5-FU), метотрексат (MTX), флударабін), атнимікротрубочні агенти (наприклад, вінкрістин, вінбластин, таксани (такі як паклітаксел та доцетаксел)), алкілюючі агенти (наприклад, циклофосфамід, мелфалан, бісхлоретилнітрозсечовина (BCNU)), платинові агенти (наприклад, цисплатин (також названий cDDP), карбоплатин, оксалиплатин, JM-216, CI-973), антрацикліни (наприклад, доксорубіцин, даунорубіцин), антибіотичні агенти, включаючи мітоміцин-C, інгібітори топомерази (наприклад, етопозид, камптотецин), циклоспорин, такролімус, сіролімус, та інші цитотоксичні агенти, котрі діють на пригнічення імунної системи. Огляд таких агентів, котрі широко застосовуються при лікування злویкісних утворень можуть бути знайдений в [Gonzales et al., *Alergol. Immunol. Clin.* 15, 161-181, 2000], котрий включено сюди через посилання. Переважні імунопригнічувачі є нуклеозидами (наприклад, глікозиди, отримані видаленням фосфатної групи від нуклеотиду), як приклад, флударабін, між іншим, є переважним імунопригнічувачем для цілей даного винаходу.

Захисний олігодезоксирибонуклеотид може застосовуватися одночасно, сумісно або разом із імунопригнічувачем. Переважною комбінацією є сумісне застосування дефібротиду та флударабіну.

Етап застосування захисного олігодезоксирибонуклеотиду, переважно, виконується одночасно, супутньо, сумісно, після або до введення імунопригнічувача пацієнту.

У переважному втіленні винаходу, етап введення захисного олігодезоксирибонуклеотиду виконується після введення імунопригнічувача пацієнту. В наступному бажаному втіленні винаходу, часовий проміжок між етапом застосування протектора та введенням імунопригнічувача пацієнту становить від приблизно однієї години до приблизно двох тижнів. Часовий проміжок між етапом застосування захищувача та введенням імунопригнічувача пацієнту, переважно становить від приблизно двох днів до приблизно семи днів.

В наступному переважному втіленні винаходу, етап застосування захисного олігодезоксирибонуклеотиду має місце перед введенням імунопригнічувача пацієнту. Переважно, різниця у часі між етапом застосування протектора та введенням імунопригнічувача пацієнту становить від приблизно однієї години до приблизно двох тижнів. Більш переважно, різниця у часі між етапом застосування протектора та введенням імунопригнічувача пацієнту, переважно становить від приблизно двох годин до приблизно двох днів.

Переважає захисним олігодезоксирибонуклеотидом є дефібротид, хоча, інші речовини, як було згадано раніше, також можуть застосовуватися. Наступні втілення визначають переважні дози дефібротиду; однак, подібні дози можуть використовуватися тоді, коли захисним олігодезоксирибонуклеотид не є дефібротид. Оптимальна доза будь-якого захисного олігодезоксирибонуклеотиду буде визначена лікуючим лікарем. Описані далі експерименти показують захисні дії дефібротиду. Ефективна доза визначена в таких експериментах може бути використана як керівництво для визначення ефективної дози для лікування.

Дефібротид переважно вводиться орально або ін'єктується внутрішньовенно.

Переважаючою дозою дефібротиду є вибрана таким чином щоб досягти рівня в крові приблизно 100мкг/мл до 0,1мкг/мл. Більш переважно, доза дефібротиду вибирається таким чином, щоб досягти рівня в крові приблизно 10мкг/мл до 100мкг/мл. Найбільш переважно, доза дефібротиду вибирається таким чином, щоб досягти рівня в крові приблизно 100мкг/мл.

В переважному втіленні винаходу дефібротид вводиться в дозі від приблизно 100мг/кг маси тіла пацієнта до приблизно 0,01мг/кг маси тіла. Переважно, доза дефібротиду, що вводиться становить від приблизно 20мг/кг маси тіла пацієнта до приблизно 0,1мг/кг маси тіла. Більш переважно, доза дефібротиду, що вводиться становить від приблизно 15мг/кг маси тіла пацієнта до приблизно 1мг/кг маси тіла. Ще більш переважно, доза дефібротиду, що вводиться становить від приблизно 12мг до приблизно 1мг на кг маси тіла пацієнта. Найбільш переважно, доза дефібротиду, що вводиться становить від приблизно 12мг/кг маси тіла пацієнта.

Переважно, введення захисного олігодезоксирибонуклеотиду, згідно даного винаходу здатне захистити ендотеліальні клітини та епітеліальні клітини від дії імунопригнічувачів. Імунопригнічувач, переважно активує епітеліальні клітини та ендотеліальні клітини та викликає їх апоптоз. Отже, в переважному втіленні, захисний олігодезоксинуклеотид захищає епітеліальні та/або ендотеліальні клітини від апоптозу та/або активації імунопригнічувачем. Імунопригнічувач є, переважно, флударабіном. Захисним олігодезоксирибонуклеотидом є, переважно, дефібротид.

Активация включає посилену експресію молекул ICAM-1 та МНС класу I. Посилення експресії, є, переважно, значним. Також, переважно, імунопригнічувач індукує прозапальну активацію ендотеліальних клітин та/або епітеліальних клітин у пацієнта. Клітини, є переважно, мікросудинними ендотеліальними клітинами (НМЕС) та/або дермальними та/або альвеолярними епітеліальними клітинами. Ушкодження, переважно зустрічаються коли ендотеліальні та/або епітеліальні клітини пацієнта піддаються дії імунопригнічувача на протязі від приблизно 1 години до приблизно 1 тижня або більше. Більш переважно, вказані ушкодження зустрічаються коли вказані клітини піддаються дії на протязі приблизно 5 годин до приблизно 72 годин. Ще більш переважно, тривалість такого впливу є між 20 годинами та 72 годинами. Най-

більш переважно, тривалість такого впливу є більшою за 48 годин.

Лікування імунопригнічувачем, переважно має місце при трансплантації гематопоетичних стовбурових клітин. Трансплантація гематопоетичних стовбурових клітин є, переважно, алогенною трансплантацією гематопоетичних стовбурових клітин.

Винахід, також відноситься до фармацевтичної композиції, яка включає принаймні один захисний олігодезоксинуклеотид, для лікування пацієнта, який цього потребує, коли пацієнт проходить лікування імунопригнічувачем. Введення вказаної фармацевтичної композиції зменшує ураження або захищає від побічної дії викликані імунопригнічувачем або імунопригнічувачем та трансплантатом. Трансплантат є, переважно, трансплантатом кісткового мозку або гематопоетичних стовбурових клітин. Більш переважно, трансплантат є алогенним трансплантатом кісткового мозку або гематопоетичних стовбурових клітин.

Побічні ефекти є, переважно, пов'язаними із ендотеліальними та/або епітеліальними клітинами та/або тканинами пацієнта. Переважно, вказані побічні ефекти включають апоптоз вказаних клітин та/або активацію вказаних клітин. Активация, переважно, включає посилену експресію молекул МНС класу I та/або молекул міжклітинної адгезії - 1(ICAM-1).

Вказані побічні ефекти ушкоджують мікросудинні ендотеліальні клітини (НМЕС) так само як, переважно, дермальні та альвеолярні епітеліальні клітини лінії після 48 годин культури, коли використовують в фармакологічно релевантних концентраціях (межі: 10мкг/мл до 1мкг/мл).

Бічні ефекти, в загальному включає ушкодження цільових тканин трансплантату, ускладнення пов'язані із трансплантатом та стимульовані алогенні імунні відповіді.

Побічні ефекти, переважно включають значну позитивну регуляцію молекул міжклітинної адгезії 1(ICAM-1) та МНС класу I, ендотеліальні клітини та/або епітеліальні клітини пацієнта, зокрема в альвеолярних ендотеліальних клітинах. Побічні ефекти також включають прозапальну активацію мікросудинних ендотеліальних клітин. Побічні ефекти переважно включають посилений лізис таких клітин цитотоксичними Т-лімфоцитами обмеженими на МНС класу I_h одержаними з трансплантату.

Введення захисного олігодезоксинуклеотиду, переважно, захищає від побічних ефектів спричинених імунопригнічувачем, включаючи апоптоз та алоактивацію.

Фармацевтична композиція, котра включає імунопригнічувач даного винаходу, котрий може бути поєднаний у лікарській формі із наповнювачами, носіями загально прийнятого та добре відомого типу для введення як орально так і ін'єкцією, зокрема внутрішньовенним шляхом. Дозування активних інгредієнтів в композиції, згідно даного винаходу, знаходиться в межах між 50 та 1500мг для єдиної дози, де для досягнення бажаних результатів рекомендується денне введення від 10 до 40мг/кг. Способи одержання препаратів дефіб-

ротиду можуть бути знайдені в [US 4,985,552 та US 5,223,609], котрі включені сюди повністю через посилання.

Винахід, також відноситься до фармацевтичної композиції, котра містить терапевтично ефективну дозу імунопригнічувача та захисного олігодезоксирибонуклеотиду. Імунопригнічувач, переважно, є флударабіном. Захисний олігодезоксирибонуклеотид, переважно, є дефібротидом.

Стислий опис фігур

Фіг.1. Флударабін індукує програмовану клітинну смерть в мікроеваскулярних ендотеліальних клітинах (HMEC). HMEC або залишали інтактними або інкубували із 2-фтор-9-β-D-арабінофуранозиладеніном (в подальшому буде позначатися як F-Ara, метаболізована форма флударабіну) у спадаючих концентраціях на протязі 48 годин та піддано поточному цитометричному аналізу (A) або мікроскопуванню із пофарбуванням DAPI. A: Контурні графіки картина бічного світлорозсіювання (SSC) (вісь x) клітин негативних за йодидом пропідію (PI) розташованих у залежності за зображенням прямого світлорозсіювання (вісь y) як параметром клітинної гранулярності порівняно із розміром клітин. B: Кількісна флуоресцентна мікроскопія ендотеліальних клітин, пофарбованих DAPI. Результати подано як % апоптозних HMEC (% апоптозних клітин) із стандартним відхиленням (із n=10 мікроскопічних ділянок із, в середньому, 70 клітинами на ділянку). Приведено репрезентативність, принаймні п'яти незалежних експериментів.

*: p<0.001 необробленого контролю проти F-Ara (10пг/мл) оброблених клітин.

Фіг.2: Дефібротид (D) інгібує апоптоз в HMEC індукований F-Ara, очевидність внутрішньоклітинного антагонізму. F-Ara: 10мкг/мл. D: 100мкг/мл. Поточно-цитометричний аналіз SSC-картини PI-негативних клітин. A: відтворювана індукція апоптозу за допомогою F-Ara. B: Залежне від дози інгібування апоптозу індукованого F-Ara за допомогою D. C: лівий графік: інкубація HMEC із F-Ara на протязі 1 години, наступна інкубація із D на протязі 48 годин після відмивання. Правий графік: інкубація HMEC із D на протязі 1 години, наступна інкубація із F-Ara на протязі 48 годин після відмивання. Для деталей експерименту дивіться підпис до Фіг.1 та Матеріали та Способи. Приведено один представник із трьох незалежних експериментів.

Фіг.3: F-Ara індукує апоптоз в кератиноцитах та альвеолярних епітеліальних клітинах, але не в кишкових або бронхіальних епітеліальних клітинах; захисна дія Дефібротиду. F-Ara 10мкг/мл. D: 100мкг/мл. Поточно-цитометричний аналіз SSC-картини PI-негативних клітин (Фіг.3A) й аналіз апоптозних клітин за допомогою DAPI (Фіг.3B). Результати наведено як середнє % апоптозних клітин із стандартним відхиленням з трьох різних експериментів. HaCaT: клітинна лінія кератиноцитів людини. SW 480: лінія кишкових епітеліальних клітин. A 549: лінія клітин легеневої карциноми з альвеолярного епітелію. BEAS-2B: клітинна лінія епітеліальних клітин. Первинні бронхіальні епітеліальні клітини були одержані бронхоскопічною

процедурою. Фіг.3A: *: p=0.005 клітин HaCaT оброблених F-Ara- проти F-Ara+D.

** : p=0.116 клітини A 549 оброблені F-Ara- проти F-Ara+D. -: відсутність індукції апоптозу. Фіг.3B: +: p=0.026 клітин HaCaT оброблених F-Ara- проти F-Ara+D. ++: p=0.001 клітини A 549 оброблені F-Ara-проти F-Ara+D. Для деталей експерименту дивіться підпис до Фіг.1 та Матеріали та Способи. Три репрезентативні експерименти просумовані за кожною клітинною лінією.

Фіг.4: Дефібротид (D) не пов'язаний із антилейкімічною та анти-PBMC дією F-Ara. F-Ara: 10мкг/мл. D: 100мкг/мл. A: пофарбування йодидом пропідію клітин первинної гострої мієлоїдної лейкемії (AML) одержаних від пацієнта із бластною кризою (70% бластів загального результату PBMC). Результати наведено як середній % виживання в трьох незалежних експериментах.

*: p=0.008 контроль проти клітин AML оброблених F-Ara. B: Поточно-цитометричний аналіз SSC-картини PI-негативних PBMC. Приведено один репрезентативний з п'яти незалежних експериментів із різними донорами крові.

Фіг.5: F-Ara індукує експресію ICAM-1 в HMEC, захисна дія Дефібротиду (D). Поточно-цитометричний аналіз клітин, позитивних на ICAM-1. HMEC або залишали необробленими або інкубували із F-Ara (10мкг/мл, або зменшували концентрації в B) в присутності або відсутності концентрації D. A: Гістограма експресії ICAM-1 з репрезентативного експерименту. Точкова лінія: фоновий контроль (нульовий контроль); тонка лінія: експресія ICAM-1 необроблених контрольних клітин; потовщена лінія: експресія ICAM-1 в клітинах оброблених F-Ara. B: Залежна від дози індукція експресії ICAM-1 за допомогою F-Ara. Підсумок трьох незалежних експериментів. Результати приведено як середній % ICAM-1 позитивних клітин із стандартним відхиленням.

*: p=0.075 F-Ara- проти необроблених контрольних клітин. C: Залежне від дози інгібування Дефібротидом (D) експресії ICAM-1 індукованої F-Ara. Результати наведено як середній % ICAM-1 позитивних клітин із стандартним відхиленням.

** : p=0.004 F-Ara- проти F-Ara+D-оброблені HMEC.

Фіг.6: F-Ara збільшує алогенність HMEC до CD8-позитивних цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL), захисна дія Дефібротиду. A: PBMC були стимульовані опроміненими HMEC в присутності інтерлейкіну 2 (50Од/мл) на протязі 7 днів й пройшли випробовування на вивільнення 51Cr із необробленим (Контроль) та F-Ara (10мкг/мл)-обробленими HMEC (24 годинне інкубування) як клітини-мішені. B-LCL: аутологічні (ефекторні) В-лімфобластоїдні клітини EBV-трансформовані K 562: клітини-мішені для природних клітин-кілерів (NK). Результати приведено як % специфічного лізису як описано в Матеріалах та Способах.

* _: специфічний лізис F-Ara оброблених HMEC в присутності антитіл w6/32 до MHC класу I. E/T співвідношення: співвідношення ефектор/мішень. B: Негативна регуляція F-Ara-індукованої алогенності HMEC до CD8-позитивних CTL Дефібротидом (D). CD8-позитивні PBMC були негативно се-

лектовані (видалено не-CD8+клітини) за допомогою сепарації магнітними кульками. Для деталей експерименту дивись підпис до Фіг.6 А.

Фіг.7: F-Ara збільшує аогенність НМЕС до клітин NK, посилення лізису блокадою МНС класу 1. Клітини NK були негативно селектовані (видалено не -NK-клітини) за допомогою сепарації магнітними кульками та стимульовано опроміненими НМЕС в присутності IL-2 (50Од/мл) на протязі 4 днів та потім пройшли випробовування на вивільнення 51Cr як описано для Фіг.6. Таблиця нижче графіку: Поточно-цитометричний аналіз популяції ефекторних клітин до та після стимуляції НМЕС. Клітини NK були охарактеризовані як CD3-/CD16+CD56+. % Специфічного лізису клітин К 562 при співвідношенні Е/Т 20:1.

Таблиця 1

Антиендотеліальні CTL
виявляють Тс1-подібний фенотип

Ефектор	IFN- γ	IL-4
PBMC	319 \pm 176	0
CD8+	524 \pm 174	0

ELISA для одержання інтерферону гамма (IFN- γ) та інтерлейкину-4 (IL-4) в супернатантах стимульованих ефекторних клітин (7 днів, опромінені НМЕС, 50Од/мл IL-2). PBMC або була залишені несепарованими або негативно селектовані за CD8+ Т-клітинами як показано в експериментах у Фіг.6. Результати подано як середньомкг/мл цитокінстандартне відхилення 3-х незалежних експериментів.

Приклади

Способи

Клітинна культура та реагенти

Дермальна мікроваскулярна ендотеліальна клітинна лінія CDC/EU-НМЕС-1 людини (далі позначається як НМЕС) була люб'язно надана центрами Контролю та Попередження Захворювань (Atlanta, Georgia, USA) та була стабілізована як описано вище 19. НМЕС була культивована на середовищі MCDB131, із додаванням 15% зародкової телячої сироватки (FCS), 1мкг/мл гідрокортизону (Sigma, Deisenhofen, Germany), 10нг/мл епідермального фактору росту (Collaborative Biochemical Products, Bedford, MA, USA) та антибіотиків. Усі реагенти клітинних культур були придбані у Gibco BRL (Karlsruhe, Germany) якщо інше не зазначено. 2-фтораденін 9-бета-D-арабінофуранозид (F-Ara) було одержано від Sigma, Deisenhofen, Germany, флакони із Дефіб-розидом були придбані у Procidide, Crinos, Como, Italy.

Досліди апоптозу

Загальноприйняті способи виявлення апоптозу в ендотеліальних клітинах людини були виконані як описано раніше²⁰ з використанням проточної цитометрії (програми забезпечення FACScanTM та CellQuestTM, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Ендотеліальні та епітеліальні клітини або залишали інтактними або інкубували із F-Ara у спадаючих концентраціях (діапазон:10мкг/мл до

0.1мкг/мл) в присутності або відсутності Дефіб-розиду на протязі 48 годин. Після цього клітини відмивали в PBS/10% FCS та пофарбовані йодидом пропідію, барвником, що виявляє некроз (PI, 0.2мкг/мл, Sigma, Deisenhofen, Germany).

Апоптозні клітини були ідентифіковані за допомогою PI-негативного пофарбовування та характерною картиною бічного розсіювання, котре відрізнялося від неапоптозних клітин. Було проведено, принаймні, три експерименти на кожний тип клітин.

Іншим способом для визначення апоптозу був мікроскопічний аналіз ДНК флуоресцентно мічених клітин. Було посіяно 1 \times 105/чашку ендотеліальних клітин в 35мм чашки Петрі (Nunc, Wiesbaden, Germany). Клітини було оброблено як показано вище та послідовно зафіксовано в метанол/ацетоні (1:1) на протязі 2хв., одноразово відмито в PBS та пофарбовано 4,6-Діамідіно-2-феніліндолі (DAPI) (0.5мкг/мл, Sigma, Deisenhofen, Germany), розведено в 20% гліцерин/PBS. Зразки було заключено та досліджено під мікроскопом. Ядерна конденсація, як було виявлено за допомогою пофарбовування DAPI за відсутності вбирання трипану синього є прийнятою ознакою апоптозу на відміну від некрозу²¹. Кількісний аналіз, який включав підрахунок кількості апоптозних порівняно до всіх клітин, які могли бути ідентифіковані з, принаймні 10 мікроскопічних ділянок, із в середньому 70 клітин на ділянку.

Для ясності даної роботи результати пофарбування DAPI приведено лише для експериментів із ендотеліальними клітинами та NaCaT, а також клітинами A549.

Аналіз поверхні клітин

Експресія на поверхні клітин НМЕС молекул ICAM-1 (Becton Dickinson/Pharmingen, Heidelberg, Germany) та МНС класу I (w6/32, супернатант гібридомі, ATCC, Manassas, VA, USA) було оцінено способом непрямої імуофлуоресценції та наступною проточною цитометрією з використанням проточного цитометру FACScanTM та аналітичної програми CellQuest (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Ендотеліальні клітини було оброблено як показано та після інкубації зібрано у трипсин/EDTA (Gibco), одноразово відмито в холодному PBS/10% FCS та інкубовано на протязі 1 години в льоду із 5мкг/мл моноклональних антитіл до антиадгезивних молекул. Клітини були знову відмиті та інкубовані із козячим антимишачим IgG-FITC, кон'югованим із фрагментом антитіла F(ab)₂ (Dako, Hamburg, Germany) на протязі 45 хвилин в льоду. Клітини було відмито в PBS/10% FCS та проаналізовано. Вживаність клітин визначалася за конкурентним пофарбуванням йодидом пропідію (0.2мкг/мл, Sigma, Deisenhofen, Germany). Пропускаючи перше антитіло, яке слугувало негативним контролем для визначення неспецифічної флуоресценції. Цей підхід, замість використання ізотипових контрольних антитіл, довів у попередніх спостереженнях, що ендотеліальні клітини не мають Fc-рецепторів²². От чому, неспецифічне зв'язування антитіл їхніми Fc-частинами має бути виключений.

НМЕС алостимуляція периферичних кров'яних клітин

Периферичні моноклеарні клітини крові (PBMC) були отримані з гепаринізованої (Novo Nordisk, Mainz, Germany) крові здорових людей-волонтерів або лейкоцитних плівків від Баварського Червоного Хреста, згідно стандартного протоколу з використанням центрифугування в градієнті щільності Ficoll-hypaque (Pharmacia, Freiburg, Germany). Потім клітини були стимульовані у співвідношенні 1:1 та 2:1 опроміненими (20 Gy) HMEC на протязі 7 днів в присутності інтерлейкіну 2 (500 Од/мл) та 10% сироватки АВ людини (Sigma, Deisenhofen, Germany).

Також, PBMC були селектовані до CD8+ Т-клітин та природних клітин-кілерів (NK) з використанням набору для виділення клітин згідно інструкцій виробника (MACSTM, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) ґрунтуючись на видаленні He-CD8+ та He-NK-клітин, відповідно. Стимуляція селектованих клітин була ідентичною до такої в усіх культурах PBMC, за виключенням NK-клітин котрі були стимульовані лише 3 дні.

Аналіз цитотоксичності

Цитотоксичність опосередкована Т-клітинами та NK-клітинами була оцінена згідно добре відомого протоколу²³ з використанням радіоізотопної методики із ⁵¹Cr. HMEC, котрі були або інтактними або інкубованими із F-Ara (10мкг/мл) на протязі ночі, використовувалися як клітини-мішені, для мічення 0.4 mCi Na²⁵¹CrO₄ на протязі 2 годин. Після триразового відмивання, клітини-мішені були доведені до 104клітин/мл та сумісно інкубовані із PBMC, CD8+ або NK ефекторними клітинами при спадаючих співвідношеннях ефектор до мішені на протязі наступних 4 годин. Супернатанти були перенесені на цинтиляційні пластинки й підраховані в γ-лічильнику (все від Canberra Packard, Darmstadt, Germany). Аутологічні (ефекторні) В-лімфобластоїдні клітинні лінії (B-LCL) та K562 як NK-чутливі клітини були взяті як додаткові контрольні мішені. Відсоток специфічного лізису оброблювався як: [(експериментальне вивільнення-спонтанне вивільнення)/(максимальне вивільнення-спонтанне вивільнення)]×100. Спонтанне вивільнення в усіх експериментах завжди було меншим за 20%.

Імуносорбентний ферментний аналіз (ELISA)

ELISA для визначення інтерлейкіну 4 (IL-4, Tc2 відповідь) та інтерферону (IFN-γ, Tc1 відповідь), IL-1 та IL-10 в супернатантах алогенних ефекторних Т-клітинах (див. нижче) були виконані виключно згідно інструкції виробника набору (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Статистичний аналіз

Значущість різниці між експериментальними значеннями були оцінені за допомогою значення t-тесту Стьюдента.

Приклад 1

F-Ara індукує апоптоз (програмовану клітинну смерть) в мікроеваскулярних ендотеліальних клітинах людини (HMEC).

Для того щоб оцінити вплив F-Ara на виживання культивованих ендотеліальних клітин, HMEC були інкубовані із спадаючими фармакологічно релевантними концентраціями (10мкг/мл до 0.1мкг/мл) 2-фтораденін 9-бета-D-

арабінофуранозиду як метаболізованої форми флударабіну. Медіанний внутрішньоклітинний рівень активного (цитотоксичного) флударабіну трифосфату в клітинах-мішенях є 20мкМ, що відповідає концентрації 5,8мкг/мл (medac SCHERING, інструкції виробника). Після 48 годин інкубації HMEC були піддані апоптозним аналізам, з використанням детектування клітинної гранулярності клітин негативних за йодидом пропідію (картина бічного розсіювання (SSC) при проточній цитометрії) та мікроскопічним аналізам клітин пофарблених DAPI, відповідно. Незалежні від системи аналізу, Фіг.1А та В ясно демонструють, що F-Ara спричиняє апоптоз в HMEC в концентраціях від 10 до 5мкг/мл, тоді як 1мкг/мл вже не була ефективною. Критичний поріг цитотоксичності у F-Ara був між 2 та 3мкг/мл. Апоптоз, викликаний F-Ara, визначався вже через 24 години, хоча й раніше також (дані не наведено).

Приклад 2

Дефібротид захищає HMEC від апоптозу індукованого F-Ara

HMEC або залишали інтактними або обробляли F-Ara в присутності або відсутності Дефібротиду в різних концентраціях (100мкг/мл до 0,1мкг/мл) та оцінювали програмовану клітинну смерть через 48 годин за допомогою поточного цитометричного аналізу картини SSC, як описано на Фіг.1А та Фіг.2А (середній контурний графік) показує, що Дефібротид окремо як другий контроль не впливав на виживаність ендотеліальних клітин. Апоптозний ефект F-Ara відображено на Фіг.2А (правий контурний графік), тоді як Фіг.2В демонструє залежний від дози захист Дефібротиду клітинної смерті індукованої F-Ara. Для виключення неспецифічної штучної зовнішньоклітинної взаємодії F-Ara та Дефібротиду in vitro HMEC були попередньо оброблені Дефібротидом на протязі 1 години та потім, після 3 етапів відмивання, інкубували із F-Ara на протязі наступних 48 годин та навпаки. Фіг.2С (правий контурний графік) показує, що попередня обробка HMEC на протязі 1 години була достатньою щоб захистити клітини від апоптозу викликаного F-Ara. Подібним чином, попередня обробка HMEC F-Ara на протязі 1 години (Фіг.2С лівий контурний графік) та наступна інкубація із Дефібротидом не призводила до ендотеліальної програмованої клітинної смерті.

Приклад 3

Дія F-Ara на різні епітеліальні клітинні лінії, зачисна дія Дефібротиду

Шкіра, шлунково-кишковий тракт (ШКТ) та скоріш за все легені знаходяться серед найперших мішеней GvHD. Отже, було резонним перевірити вплив F-Ara на клітинні лінії, які мають походження з цих органів. Клітини з кератиноцитної (HaCaT), ШКТ (SW 480), альвеолярної (A549) та бронхіальної епітеліальної (BEAS-2B) клітинних ліній так само як первинні бронхіальні епітеліальні клітини були інкубовані з F-Ara (10мкг/мл) що показано на Фіг.1 та 2 та досліджено за допомогою поточної цитометричної методики через 48 годин після оброблення. Фіг.3А підсумовує, що кишкові та бронхіальні епітеліальні клітини виявилися резистентними до апоптозного стимулу F-Ara, тоді як

кератиноцити (HaCaT) та альвеолярні епітеліальні клітини (A549) виявляли ознаки апоптозу, як визначено проточною цитометрією SSC картини ($34.0[\pm 1.0]\%$ апоптозних клітин у HaCaT та $42.9[\pm 26.7]\%$ у A549, відповідно). Також було оцінено захисний потенціал Дефібротиду (100мкг/мл). HaCaT ($4.3[\pm 3.0]\%$) та A 549 ($5.4[\pm 2.9]\%$) були повністю захищені від програмованої смерті після сумісної обробки F-Ara та Дефібротидом Фіг.3А, вставлені прямокутні графі). Для підтвердження цих результатів, на HaCaT (Фіг.3В, ліві колонки) та A 549 (Фіг.3В, праві колонки) були проведені апоптозні тести із пофарбуванням DAPI.

Як показано для ендотеліальних клітин, Дефібротид сам по собі не впливає на кількість апоптозних клітин в усіх клітинних лініях (дані не наведено).

Приклад 4

Дефібротид не впливає на антилейкемічну та анти-PBMC дію F-Ara

Наступним після бажаної захисної здатності по відношенню до ендотеліальних клітин проти апоптозу індукованого F-Ara було важливим дослідити чи не впливає Дефібротид також на антилейкемічні властивості F-Ara. Для відповіді на це питання, було одержано мієлоїдні лейкемічні (AML) клітини з первинної периферичної крові з кількістю бластів близько 70% було розморожено, й підтримувалося в культурі на протязі 24 годин й потім було оброблено F-Ara в присутності або відсутності Дефібротиду на протязі наступних 48 годин. Фіг.4А демонструє, що вже більше 50% клітин загинуло спонтанно від некротичної клітинної смерті. Тим не менш F-Ara індукувало клітинну смерть в майже 80% клітин. На відміну від цього ефекту на ендотеліальні та епітеліальні клітини, Дефібротид був нездатний захистити клітини AML від токсичності опосередкованої F-Ara. Слід зауважити, що на Фіг.4А описано % виживаності клітин, а не % апоптозних клітин, завдячуючи тому факту, що F-Ara прямо спричиняє некроз, аніж апоптоз клітин AML. Це може спостерігатися одразу після 24 годин інкубації. Також, Фіг.4А ясно демонструє, що Дефібротид не перешкоджає бажаній токсичності F-Ara спрямованої на лейкемічні клітини. Ми ще раз поставили питання про можливість модулювання Дефібротидом дії F-Ara проти нормальних гематопоетичних клітин та виконали апоптозні тести (SSC-картина) із PBMC з нормальної донорської крові людини. Як може стати зрозумілим з репрезентативного експерименту відображеного на Фіг.4В F-Ara індукує апоптоз в 40,5% клітин, порівняно із 5,1% апоптозних клітин в інтактному контролі. Також, Дефібротид не перешкоджає апоптозній дії F-Ara проти PBMC (43,1% апоптозних клітин), що говорить про те, що імуніпрігніруючі властивості F-Ara не погіршуються через сумісне застосування із Дефібротидом.

Приклад 5

F-Ara позитивно регулює міжклітинну молекулу адгезії 1(ICAM-1) у HMEC із антагоністичною дією Дефібротиду

Грунтуючись на попередніх спостереженнях, що претрансплантаційне кондиціювання не лише ушкоджує, але й призводить до прозапальної ак-

тивації ендотеліальних клітин, шляхом індукції молекули адгезії¹⁵, в подальшому ми дослідили експресію ICAM-1 під впливом F-Ara. Як зображено на Фіг.5А та В, поточним цитометричним аналізом показано, що F-Ara, після 24 годин інкубації, значно підсилює експресію HMEC у залежний від дози спосіб, подібно до того, що спостерігалось при індукції апоптозу. Концентрації F-Ara аж до 1мкг/мл були ефективними для індукції ICAM-1. Далі ми задалися питанням чи може Дефібротид також бути дієвим як антагоніст F-Ara за цих експериментальних умов. HMEC було оброблено F-Ara, як показано, та інкубовано в присутності або відсутності знижуваних концентрацій Дефібротиду. Фіг.5С підсумовує 3 незалежні експерименти, котрі показують, що Дефібротид фактично антагонізував експресію ICAM-1 індуковану F-Ara в концентраціях від 100мкг/мл до 10мкг/мл . Слід зауважити, що Дефібротид сам по собі не активував ендотеліальні клітини, експресія ICAM-1 залишалася незмінною за всіх концентрацій, що перевірялися (дані не наведено).

Оскільки, прозапальну активність клітин-мішеней часто пов'язують із збільшеною експресією головних антигенів гістосумісності (MHC) класів I та II, ми також виконали поточні цитометричні тести цих антигенів після інкубації із F-Ara в різних концентраціях на протязі 24 годин. Не зважаючи на свої добре описані імуніпрігніруючі властивості, F-Ara неочікувано індукував молекули MHC класу I на HMEC у залежним від дози чином ($1,5$ разова індукція середньої інтенсивності флуоресценції при 10мкг/мл , $1,3$ разова індукція при 5мкг/мл) тоді як MHC класу II залишилися незмінними (дані не приведено).

Приклад 6

F-Ara збільшує антигенність ендотеліальних клітин до алогенних периферичних клітин крові, захист Дефібротидом

Індукція молекул MHC класу I на HMEC за допомогою F-Ara підказує нам, що треба перевірити чи F-Ara також може підсилювати здатність HMEC стимулювати алотоксичні реакції. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) як ефектори, були також одержані з гепаринізованої крові здорових людей волонтерів з препаратів лейкоцитарних плівок, стимульованих опроміненими (20 Gy) HMEC в присутності 50Од/мл інтерлейкіну 2 (IL-2) на протязі 7 днів й потім проведено стандартний аналіз на вивільнення $\text{Cr}51$ (деталі дивись Матеріали та Способи). На день -1 свіжі HMEC як мішені або залишили інтактними або інкубували із F-Ara (10мкг/мл) в присутності або відсутності анти-MHC нейтралізуючих антитіл класу I ($w6/32$). Аутологічні ефекторні трансформовані вірусом Епштейна-Бара В-лімфобластоїдні клітинні лінії (B-LCL) та клітини K562 як класичні природні клітини-кілери (NK) слугували контролем. Фіг.6А демонструє, що F-Ara дійсно збільшував антигенність HMEC до алогенних PBMC в усіх перевірених співвідношеннях Eff. Відсутність специфічного лізису K562 та аутологічного ефектору B-LCL підтвердила включення обмежених MHC цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL). Також, лізис як інтактних або оброблених F-Ara HMEC може майже повністю

бути блокованим після сумісного інкубування цих клітин із антитілами до МНС класу I w6/32 (Фіг.6A,*_{__}). Для подальшого підтвердження, що CTL CD8+ були відповідальними за антиендотеліальну цитотоксичну активність, РВМС було селектовано на CD8+ та CD4+ Т-клітини (не-CD8 та Не-CD4-depleted РВМС, відповідно) за допомогою сепарації на магнітній підложці наборами підложок MACSTM. Чистота препаратів була >93% в усіх випадках із повною відсутністю популяцій інших клітин (не показано). Сепаровані Т-клітини були стимульовані НМЕС та ІЛ-2, точно як описано для селектованих РВМС (дивись вище). Як показано на Фіг.6В, лізис НМЕС оброблених F-Ara клітинами CTL CD8+ було відмічено знову, значно більше ніж в контрольних НМЕС. Також, попередня обробка мішеней-НМЕС за допомогою F-Ara та дефібротиду (F-Ara+D) негативно регулювало специфічний лізис навіть нижче контрольних рівнів, підтверджує, що Дефібротид також захищає ендотеліальні клітини від лізису алогенних ефекторних лімфоцитів. CD4+ Т-клітини, стимульовані НМЕС не проявляли будь-яких ознак цитотоксичної активності в цих експериментальних параметрах (дані не приведено). Поточний цитометричний аналіз F-Ara порівняно із F-Ara+D обробленими НМЕС показав значну негативну регуляцію молекул МНС класу I Дефібротидом, може вказувати на те, що експресія МНС класу I є критичним елементом в регулюванні цитотоксичної відповіді індукованої F-Ara (дані не приведено).

Приклад 7

Антиендотеліальні CTL мають Тс1-подібний фенотип

Для одержання інформації про природу антиендотеліальних CTL, РВМС та CD8+ Т-клітини було стимульовано як показано вище, й сепаранти було зібрано для визначення інтерферону гамма (IFN- γ) та інтерлейкіну 4 (ІЛ-4), за допомогою способу ELISA.

Як показано в Таблиці 1, стимуляція НМЕС та ІЛ-2 очевидно призводить до розвитку Тс1-подібних Т-клітин як може бути визначено з унікальної експресії IFN- γ , тоді як ІЛ-4 не вироблявся.

Приклад 8

F-Ara негативно регулює лізис НМЕС алогенними клітинами NK

Наступним цікавим питанням було, як модуляція експресії МНС класу I індукована F-Ara впливає на цитолітичну відповідь природних клітин-кілерів (NK) до ендотеліальних клітин. РВМС від здорових осіб були негативно селектовані до NK-клітин (збіднені на NK-клітини) та стимульовані на протязі 4 днів опроміненими НМЕС в присутності ІЛ-2, як це було описано в експерименті Фіг.6В. На 4-й день, НМЕС як клітини-мішені було залишено інтактними або оброблено F-Ara (10мкг/мл) на протязі 24 годин та проведено стандартний тест на вивільнення 51Cr із стимульованими клітинами NK як ефекторами. Фіг.7 показує, що F-Ara в значній мірі негативно регулює алогенність НМЕС до клітин NK. Як позитивний контроль активності клітин NK, можна спостерігати лізис клітин K562 негативних за МНС класу I (Фіг.7, *_{__}). Попередня обробка антитілами w6/32 до МНС класу I НМЕС стимулюва-

них F-Ara повністю знімала дію F-Ara й призводила до майже 100% лізису НМЕС (Фіг.7), може вказувати на те, що МНС класу I на поверхні НМЕС є, також, критичним перимикачем регуляції цитотоксичної відповіді клітин NK. Роль інгібіторних рецепторів клітин кілерів (KIR), котрі були знайдені як негативно регульовані високими рівнями експресії молекул МНС класу I²⁴, можуть бути відповідальними за знижену цитолітичну відповідь клітин NK

Обговорення

Одержані на сьогодні клінічні результати із режимами кондиціювання які містили знижену інтенсивність флударабіну вказують на чітку негативну регуляцію токсичності пов'язаної із кондиюванням без впливу імунної реконституції. Випадки гострої GvHD у пацієнтів, які отримували RIC є порівняними або значно меншими ніж у тих пацієнтів, котрі отримували класичний режим кондиювання²⁶. Однак, надходять повідомлення про дещо або значно підвищену кількість віддалених ефектів таких як остеонекроз²⁷, легеневі ускладнення²⁸, та більшу кількість хронічної GvHD²⁹. Не дивлячись на свої добре документовані імунопригнічуючі властивості флударабін, в нашому дослідженні, виявився активатором та ушкоджувачем ендотеліальних та епітеліальних клітин. Це спостереження може, принаймні, частково пояснити небажані бічні ефекти описані вище, так остеонекроз є проявом ендотеліальної дисфункції, та флударабін виявився токсичним до альвеолярних епітеліальних клітин. Цікаво відмітити, що шкідливі ефекти флударабіну на легеневі клітини виявляються специфічними до компартментів, а бронхіальні епітеліальні клітини не зазнають апоптозу у відповідь на імунопригнічувач. Факт, що кератиноцитна клітинна лінія (HaCaT) була також нечутлива до флударабіну дозволяє припустити, що вона може йти включена у шкірні розлади після SCT. Оскільки патогенез пізніх ускладнень є багатфакторним та також може бути під впливом зростаючого віку пацієнтів SCT та використання периферичних стовбурових клітин потрібна подальша оцінка клінічних досліджень легневих та дерматологічних ускладнень.

Оскільки в більшості претрансплантаційних процедурах використовується флударабін в комбінації з іонізуючим випромінюванням є важливим дослідити чи будуть ці дві речовини діяти разом на ендотеліальні клітини. Цікаво, ми не могли знайти будь-яких підсилень флударабіном клітинної смерті індукованої радіацією або навпаки (дані не наведено). Це припускає диференціальні механізми як апоптозний сигнал передається до ендотеліальних клітин.

Точний механізм індукції флударабіном апоптозу в ендотеліальних та епітеліальних клітинах ще має стати висвітленим. Може бути, що флударабін, як пуриновий аналог інтегрується в ДНК та спричиняє мутації які призводять до генетичної делеції подібної до вище описаної³⁰. Також можна припустити, що флударабін може взаємодіяти із цитохромом С та протеїновим фактором активації апоптозу-1 (APAF-1) в запуску апоптозного каспазного ланцюгу.

Флударабін збільшує аlogenність ендотеліальних клітин-мішеней до CD8+ Т-клітин. Також Флударабін значно негативно модулює ендотеліальний лізис алогенними клітинами NK. Експресія МНС класу I може бути критичною для регулювання різноманітних таких імунних відповідей, оскільки блокада класу I повністю зупиняє лізис CTL та надзвичайно позитивно регулює лізис клітин NK. Ці протилежні ефекти флударабіну тісно сполучаються із клінічними спостереженнями, що Флударабін проявляє менше гострої та порівняно або значно більше хронічної токсичності, ніж класичні режими кондиціювання призвели до стекуляцій, щодо здатності NK-клітин та CTL бути активними в різних фазах патофізіології GvHD, тобто NK-клітини будуть головним чином діяти на ранніх (пригнічені флударабіном) та CTL на пізніх стадіях (підсилені флударабіном) після трансплантації.

По відношенню до природи антиендотеліальних CTL цікавим питанням є, чи ці CTL ендотеліально- або просто алоспецифічні. Існування ендотеліально-специфічних ефекторних лімфоцитів було описано раніше³². На відміну від CTL, які ми описали як такі, що демонструють Tc1-подібний фенотип, повідомляється про багато клонів CTL, котрі демонструють мало IFN- γ та зазвичай експресують ліганд CD40 а також можуть підсилювати цитолітичну активність³³. Але ці дані не виключають існування додаткових алогенних CTL із специфічністю до негематопоетичних мішеней.

Дефібротид є добре переносимою речовиною успішно застосованою для лікування венооклюзивного захворювання як одного з головних печінкових ускладнень після SCT³⁴. До того ж, зростає кількість доклінічних та клінічних повідомлень які демонструють його ефективність в лікуванні ішемічних/реперфузійних ушкоджень та атеросклерозу, а також рецидивної тромбічної тромбоцитопенічної пурпури. Відомо, що дефібротид діє безпосередньо на ендотеліальні клітини без потреби в подальшому метаболізмі³³, й таким чином може бути використаний в дослідженнях *in vitro*. Дефібротид повністю захищає ендотеліальні та епітеліальні клітини від апоптозу опосередкованого дефібротидом. Потрібні додаткові дослідження для з'ясування точного механізму захисту котрим дефібротид антагонізує флударабін, але можна збагнути роль дефібротиду в інгібування інтеграції флударабіну в ДНК або раніше згадану каспазну активацію. Крім антиапоптозної дії, дефібротид був здатний негативно регулювати антиендотеліальні CTL-відповіді регулювання експресії МНС класу I. Також, дефібротид не заважав бажаній антилейкімічній дії флударабіну, що виявлялося відсутністю захисту клітин AML. Наступне важливе спостереження свідчить про те, що дефібротид не блокує апоптоз PBMC опосередкований флударабіном. Це може вказувати на те, що імунопригнічувальна дія флударабіну, призначувана при кондиціюванні не страждає від сумісного застосування із дефібротидом.

Слід зауважити, що дефібротид не захищає від індукованого радіацією ушкодження ендотеліальних клітин, може вказувати на те, що його дія є

специфічною для клітинних змін опосередкованих флударабіном (дані не приведені).

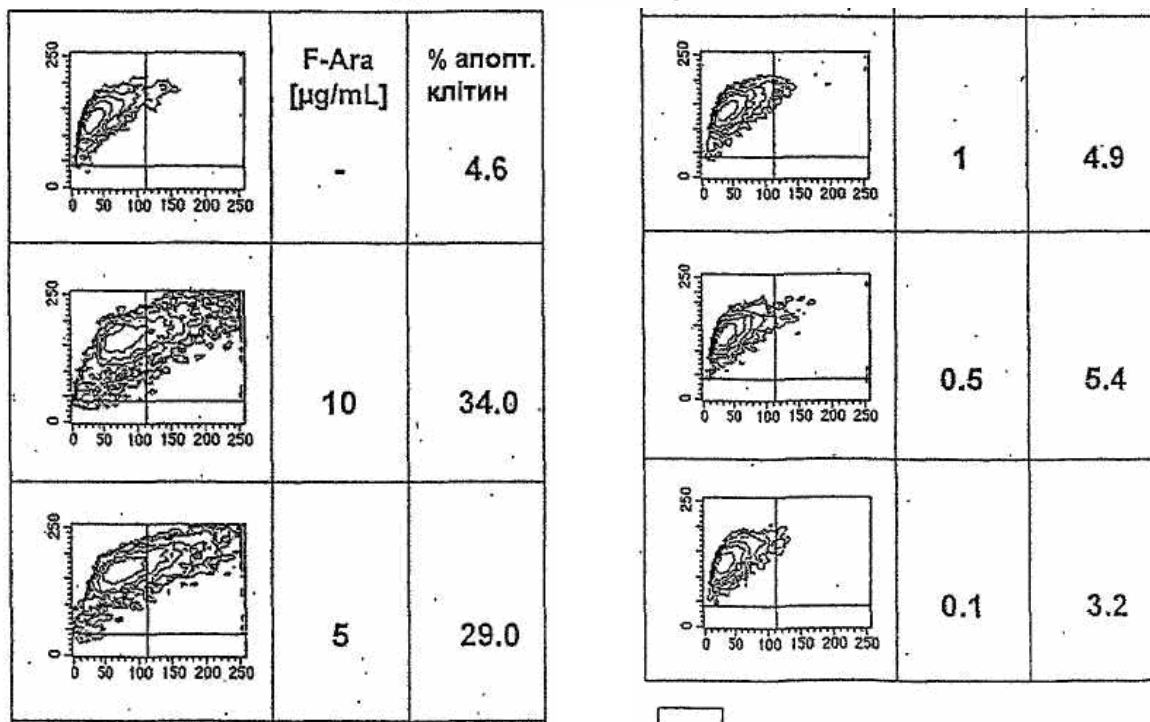
Грунтуючись на цих результатах та зважаючи на малу, якщо така має місце, бічну дію³⁹, ми заключаємо з нашого дослідження, що Дефібротид є гарним кандидатом на використання в комбінації із флударабіном при кондиціюванні, що передують SCT, особливо для пацієнтів із ризиком на VOD. Дослідження, в які аналізується ендотеліальний захист від інших агентів кондиціювання можуть з'ясувати чи може дефібротид використовуватися як широкий захисний агент.

Посилання:

1. Holler E, Kolb HJ, Moller A et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor precede major complications of bone marrow transplantation. *Blood*. 1990; 75: 1011-1016.
2. Antin JH, Ferrara JLM. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1992; 80: 2964-2968.
3. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiological mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1999; 5: 347-356.
4. Xun CQ, Brown BA, Jennings CD, Henslee-Downey PJ, Thompson JS. Acute graft-versus-host-like diseases induced by transplantation of human activated natural killer cells into SCID mice. *Transplantation*. 1993; 56: 409-417.
5. Weiner RS, Bortin MM, Gale RP et al. Interstitial pneumonitis after bone marrow transplantation. Assessment of risk factors. *Ann Intern Med*. 1986; 104: 168-175.
6. Weiss MA. Novel treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2001; 3: 217-222.
7. Wasch R, Reisser S, Hahn J et al. Rapid achievement of complete donor chimerism and low regimen-related toxicity after reduced conditioning with fludarabine, carmustine, melphalan and allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 26: 243-250.
8. Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R. Mini-allografts: ongoing trials in humans. *Bone Marrow Transplant*. 2000; 25: 345-350.
9. Slavin S, Nagler A, Naparstek E et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*. 1998; 91: 756-763.
10. Holler E, Kolb HJ, Hiller E et al. Microangiopathy in patients on cyclosporine prophylaxis who developed acute graft-versus-host disease after HLA-identical bone marrow transplantation. *Blood*. 1989; 73: 2018-2024.
11. Eissner G, Kohlhuber F, Grell M et al. Critical involvement of transmembrane TNF- α in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood*. 1995; 86: 4184-4193.
12. Lindner H, Holler E, Ertl B et al. Peripheral blood mononuclear cells induce programmed cell death in human endothelial cells and may prevent repair-role of cytokines. *Blood*. 1997; 89: 1931-1938.

13. Haimovitz-Friedman A, Balaban N, Mccloughlin M et al. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation induced apoptosis. *Cancer Res.* 1994; 54: 2591-2597.
14. Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A et al. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 1994; 54: 2582-2590.
15. Eissner G, Lindner H, Behrends U et al. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo, protective role of IL-10. *Transplantation.* 1996; 62: 819-827.
16. Lindner H, Holler E, Gerbitz A, Johnson JP, Bornkamm GW, Eissner G. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: 2. IL-10 protects against transendothelial migration. *Transplantation.* 1997; 64: 1370-1973.
17. Beelen DW, Haralambie E, Brandt H et al. Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus host disease after sibling marrow transplantation. *Blood.* 1992; 80: 2668-2676.
18. Eissner G, Multhoff G, Holler E. Influence of bacterial endotoxin on the allogenicity of human endothelial cells. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21: 1286-1287.
19. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 1992; 99: 683-690.
20. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* 1992; 52: 997-1005.
21. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 1993; 54: 283-288.
22. Westphal JR, Tax WJ, Willems HW, Koene RA, Ruiter DJ, De-Waal RM. Accessory function of endothelial cells in anti-CD3-induced T-cell proliferation: synergism with monocytes. *Scand J Immunol.* 1992; 35: 449-457.
23. MacDonald HR, Engers HD, Cerrottini JC, Brunner KT. Generation of cytotoxic T lymphocytes in vitro. *J Exp Med.* 1974; 140: 718-722.
24. Long E. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 875-904.
25. Nagler A, Aker M, Or R et al. Low-intensity conditioning is sufficient to ensure engraftment in matched unrelated bone marrow transplantation. *Exp Hemato.* 2001; 29: 362-370.
26. Michallet M, Bilger K, Garban F et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation after nonmyeloablative preparative regimens: impact of pretransplantation and posttransplantation factors on outcome. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3340-3349.
27. Holler E, personal communication.
28. Hildebrandt G, Bertz H, Mestan A et al. Analysis of pulmonary function after allogeneic bone marrow transplantation (BMT) or blood stem cell transplantation (PBSCT) using conditioning regimens with total body irradiation (TBI) and conventional intensity compared to regimens without TBI with reduced intensity [abstract]. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27(Suppl. 1): S216.
29. Bornhauser M, Thiede C, Schuler U et al. Dose-reduced conditioning for allogeneic blood stem cell transplantation: durable engraftment without antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant.* 2000; 26: 119-125.
30. Huang P, Siciliano MJ, Plunkett W. Gene deletion, a mechanism of induced mutation by arabinosynucleosides. *Mutat Res.* 1989; 210: 291-301.
31. Genini D, Budihardjo, Plunkett W et al. Nucleotide requirements for the in vitro activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. *J Biol Chem.* 2000; 275: 29-34.
32. Biederman BC, Pober JS. human vascular endothelial cells favor clonal expansion of unusual alloreactive CTL. *J Immunol.* 1999; 162: 7022-7030.
33. Briscoe DM, Alexander AI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Op Immunol.* 1998; 10: 525-531.
34. Pegram AA, Kennedy LD. Prevention and treatment of veno-occlusive disease. *Ann Pharmacother.* 2001; 35: 935-942.
35. Rossini G, Pompilio G, Biglioli P et al. Protectant activity of defibrotide in cardioplegia followed by ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Card Surg.* 1999; 14: 334-341.
36. Rossini G, Berti F, Trento F et al. Defibrotide normalizes cardiovascular function hampered by established atherosclerosis in the rabbit. *Thromb Res.* 2000; 97: 29-38.
37. Pogliani EM, Perseghin P, Pama M, Pioltelli P, Corneo G. Defibrotide in recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2000; 6: 69-70.
38. San T, Moini H, Emerk K, Bilsel S. Protective effect of defibrotide on perfusion induced endothelial damage. *Throm Res.* 2000; 99: 335-341.
39. Chopra R, Eaton JD, Grassi A et al. Defibrotide for the treatment of hepatic venoocclusive disease: results of the European compassionate-use study. *Br J Haematol.* 2000; 111: 1122-1129.

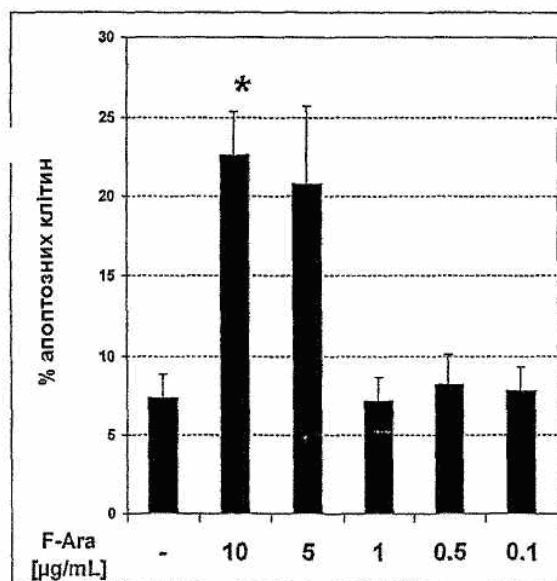
Апоптоз SSC- зображення



A

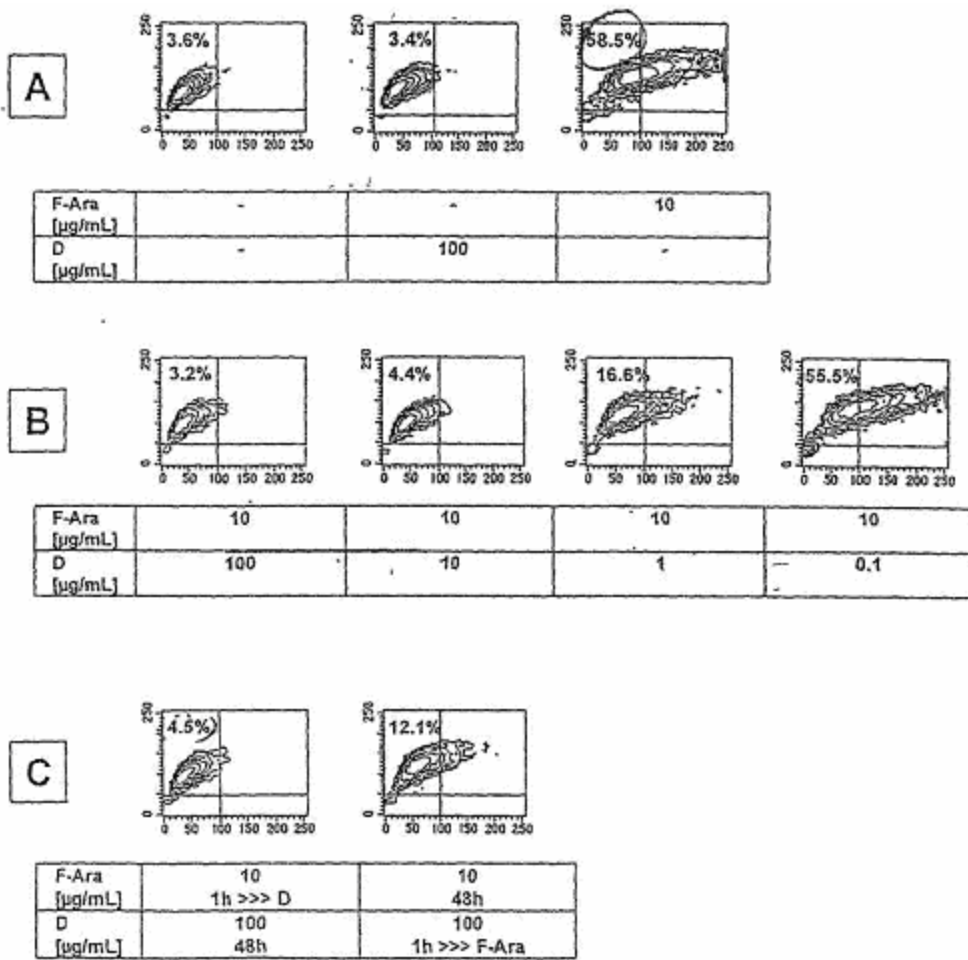
Фіг.1А

Апоптоз - DAPI пофарбування





B

Фіг.1В



Фиг.2

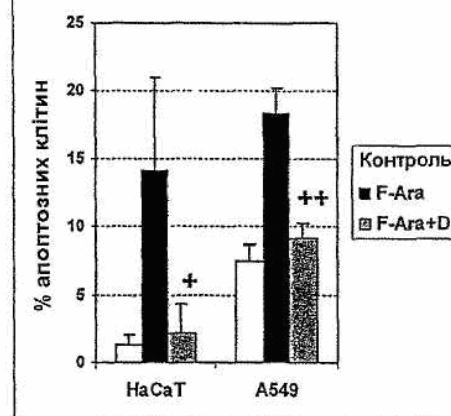
Апоптоз SSC- зображення

Клітинна лінія	Апоптоз F-Ara	Захист Дефіброзидом
HaCaT (шкіра)	+	 *
SW 480 (кишечник)	-	-
A 549 (Альв. епіт.)	+	 **
BEAS-2B (бронх. епіт.)	-	-
Первинний бронх. епіт.	-	-

A

Фиг.3А

Апоптоз - DAPI пофарбування



B

Фиг.3В

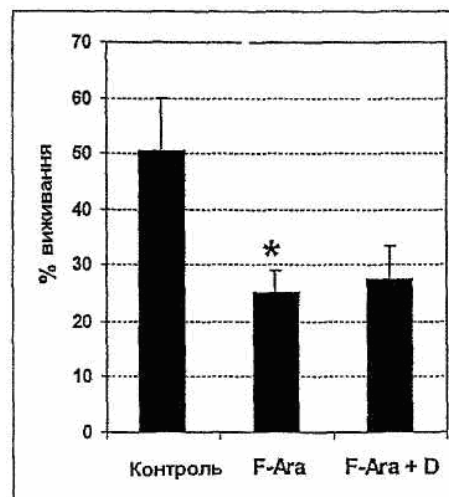
**A**

Fig.4A

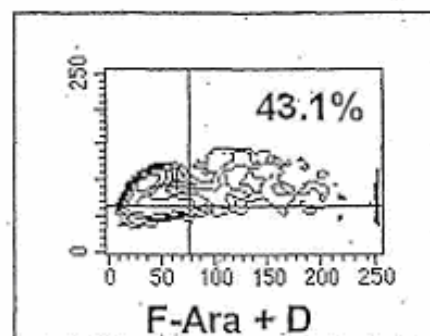
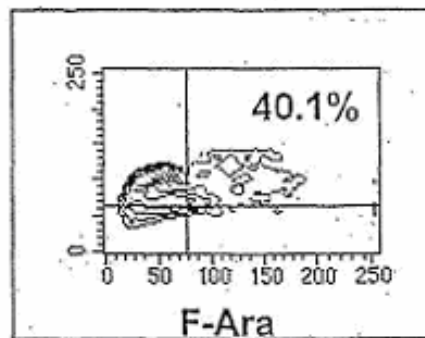
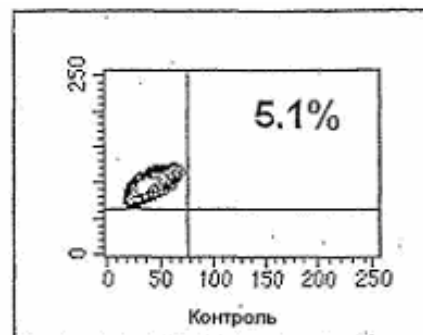
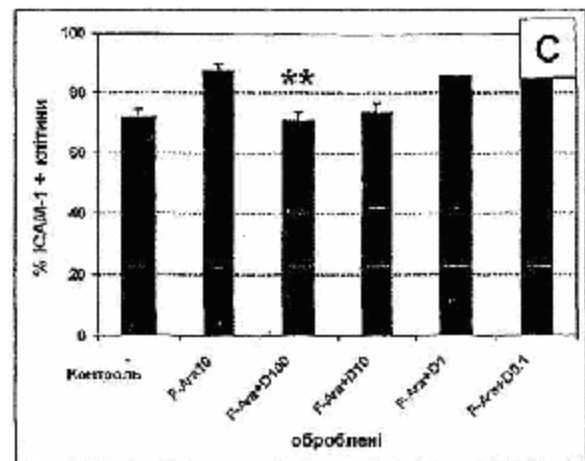
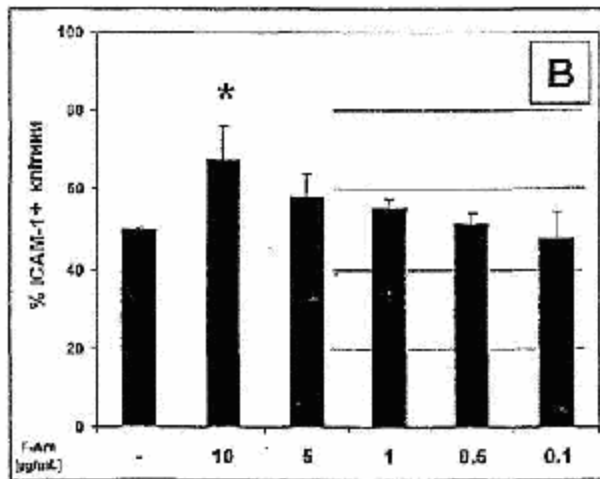
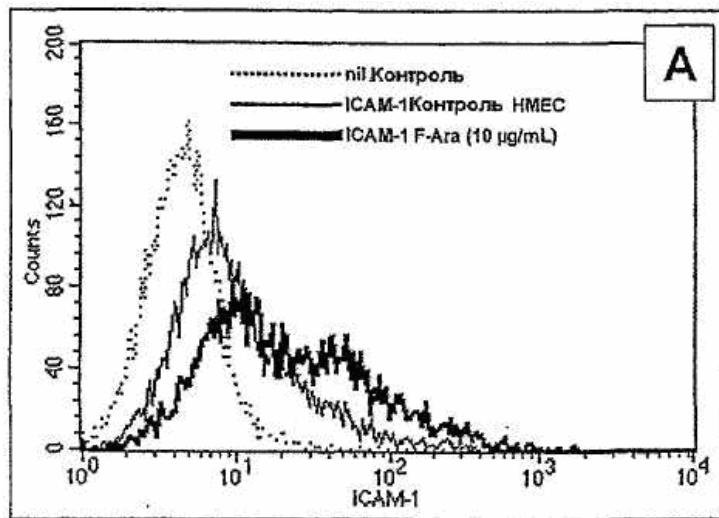
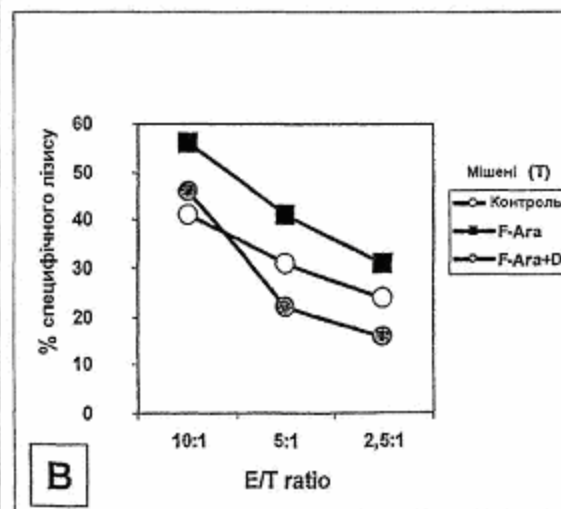
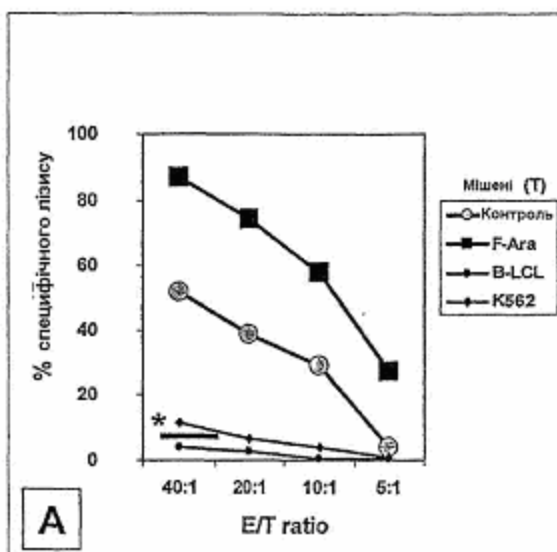
**B**

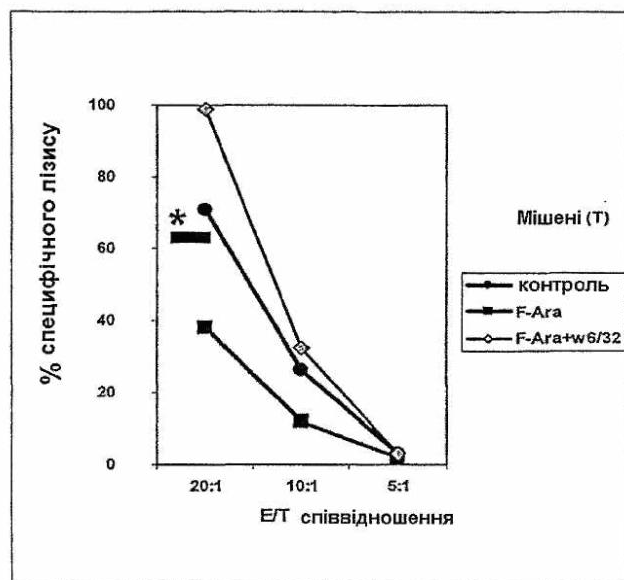
Fig.4B



Фиг.5



Фиг.6



	% позитивних клітин		
	CD4+ Т клітин	CD8+ Т клітин	NK клітин
Пре Стимуляція	5	6	77
Пост Стимуляція	7	8	73

Фіг.7