

去纤苷—单链脱氧寡核苷酸生化药

惠长野¹ 张希² 黄胜和³

¹ (深圳市职业病防治院 深圳 518001)

² (中国科学院上海药物研究所 上海 201203)

³ (美国南加州大学洛杉矶儿童医院 洛杉矶 90027)

摘要 去纤苷是单链脱氧寡核苷酸混合物衍生的生化药, 主要作用于内皮细胞并产生多种生物学效应, 临床研究主要是围绕心血管功能紊乱的适应症来开展的。临床实验证实去纤苷可以有效预防及治疗肝小静脉闭塞症。最近, 在一些动物实验中, 去纤苷表现出了抗肿瘤及抗血管新生的活性。相关的研究一直在深入开展。

关键词 去纤苷; 内皮细胞; 静脉闭塞性疾病; 多发性骨髓瘤

Defibrotide Derived from Mammalian Polydeoxyribonucleotide

HUI Chang-ye¹ ZHANG Xi² HUANG Sheng-he³

¹ (Shenzhen Prevention and Treatment Center for Occupational Disease, Shenzhen 518001, China)

² (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

³ (Children's Hospital Los Angeles, University of Southern California, CA 90027, USA)

Abstract Defibrotide is a polydisperse oligonucleotide with multiple effects on endothelial cells, which has been developed for the treatment of different vascular disorders. Defibrotide has been used effectively in the treatment and prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease. Recent animal models have clearly suggested an antiangiogenic effect and an anticancer activity. Further *in vitro* and *in vivo* investigations are needed.

Keywords defibrotide; endothelium; veno-occlusive disease; multiple myeloma

1 引言

去纤苷 (Defibrotide, DF) 是意大利Gentium SpA公司开发的多组分生化药, 是由猪小肠黏膜基因组DNA, 通过控制解聚制得。DF的化学本质是分子量集中在15~30 kDa的单链脱氧寡核苷酸钠盐的混合物, 嘌呤嘧啶比大于0.85。

DF可以通过静脉注射及口服两种方式给药, 静脉注射给药可以迅速达到最大血药浓度 C_{max} , 口服30 min后可达到 C_{max} 。鉴于消化道核酸酶水解失活、DF小肠吸收效率及肝脏首过效应等因素, 口服生物利用度只有58~71%。注射给药DF的半衰期约10~30 min, 而口服给药DF的清除需要数小时, 主要通过尿液及粪便排

出体外^[1]。DF可以缓慢而持续发挥药效是口服给药的优势。

多种生物学活性是DF最突出的特点, 体外和体内研究表明DF具有抗动脉粥样硬化、抗炎、抗心肌缺血、纤溶和抗血栓的活性, DF在抗肿瘤方面的应用前景最近也引起了学者的关注^[2]。DF的详细作用机制目前还未完全阐明, 一方面和DF多聚阴离子的特性有关; 另一方面, DF作为单链脱氧寡核苷酸混合物, 其分子内存在碱基的互补配对, 构成了DF序列多样性和空间构象多样性的基础, 这些与DF的生物学活性多样性直接相关。DF被证实主要是通过与血管内皮细胞反应来发挥生物学功能, 如DF可以提高纤溶相关因子的活性, 并抑制凝血相关因子的活性, 体外证实DF是纤溶酶的激动剂, 并可以增加肝素的抗凝活性。大

量的临床研究是针对DF可以选择性抗凝，并降低出血风险的特性展开的^[2-4]。目前，针对肝小静脉闭塞症（Veno-occlusive Disease, VOD）治疗的临床实验已经开展了 I~III 期，DF 用于预防 VOD 进行了 II~III 期临床实验。用于肿瘤的辅助治疗是 DF 研发近年来的又一突破，用于多发性骨髓瘤的治疗已经进入了 I~II 期临床实验阶段。

2 去纤苷的质量控制

DF 的制备早在上世纪 80 年代就申请了专利，后来 1991 年 Gentium SpA 公司又更新了制备专利。此后的 20 年间，虽然生化制药技术不断创新及设备不断改良，Gentium SpA 再未对制备专利进行更新，相信 DF 的制备已取得了很大的改进。无论工艺如何改进，DF 的制备都可简单分为两个阶段。第一阶段为猪小肠黏膜基因组大分子双链 DNA 的制备，主要是通过酶解释放基因组 DNA，并进行多步提纯来获取高纯度 DNA；第二阶段是双链 DNA 的控制解聚，在高离子强度的酸性溶液中控制水解双链 DNA 至合适的分子大小，热变性 DNA 使其呈单链分子状态，即获得满足 DF 质量要求的单链寡脱氧核苷酸混合物。早期 DF 质量标准的建立就是依据其单链寡脱氧核苷酸混合物的化学本质，主要从分子量分布、DNA 含量、碱基比来限定 DF 的分子特性。另外很重要的一点是，DF 虽然是单链寡 DNA，但其分子内存在部分碱基配对，这种局部双链结构约占 10%，形成了类似于发夹的结构（见图 1）。研究表明，分子内的部分双链结构比例的增加或降低都会导致 DF 生物学活性降低。测定 DF 分子内部分双链 DNA 的可逆增色值，成为了早期控制解聚及 DF 质量控制的最重要标准之一。

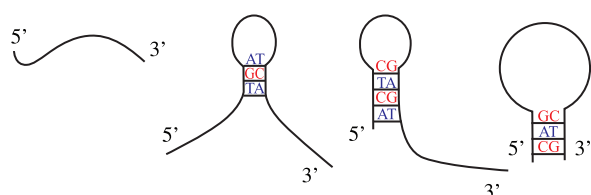


图1 单链寡核苷酸去纤苷可能的空间构象

在实际工作中，我们发现 DF 可逆增色值的测定影响因素很多，波动范围较大，尤其不能直观地反映 DF 的分子量分布。电泳及分子筛 HPLC 在这方面优势明显，和市售的几种 DNA 原料或试剂相比，DF 在 2% 琼脂糖凝胶电泳中条带最接近阳极端，电泳条带与 DF 理论分子大小 45~90 nt 相符（图 2（A）泳道 1）。分子筛 HPLC 可以更加精确地反映 DF 的分子量分布，DF 在 TSK-

GEL-4000SW 柱上呈单一峰，保留时间 t_R 在 13~17 min，分子量呈近正态分布。

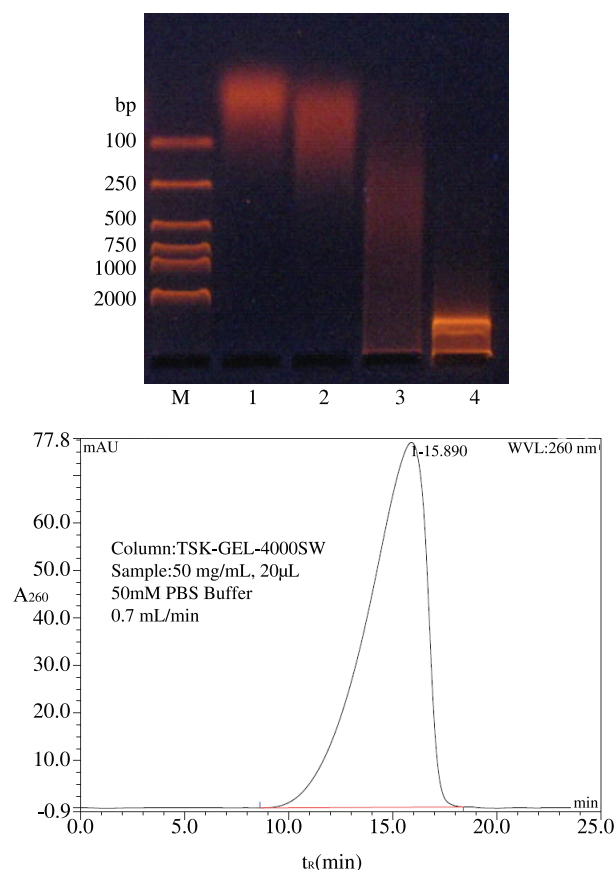


图2 (A) 去纤苷 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。泳道 M: DL2000 分子量标准；泳道 1: 去纤苷；泳道 2: 鲑鱼精 DNA；泳道 3: 猪小肠黏膜基因组 DNA；泳道 4: 小牛胸腺 DNA (Sigma D1501)。(B) 去纤苷凝胶过滤 HPLC 分析图谱。

DF 作为多组分生化药，分子量分布、理化参数虽是其必要的质量控制手段，但不能完全代替生物学效价的测定。DF 是纤溶酶的直接激动剂，激活强度与 DF 分子片断大小正相关，利用这一点建立了 DF 的体外效价测定方法^[5]。实际研究中我们发现，DF 的体外活性并不直接等同于其体内活性。在 Gentium SpA 早期开展的抗血栓方面的临床实验中可见一斑，针对不同批号的 DF，在用于临床研究前都要先经过动物体内实验活性测定，选择效价大于一定值的 DF 才可应用于临床研究。DF 作为多组分生物制品，其各组分脱氧核酸片断的大小、序列及含量是不可能通过实验测定而详细给出，只能通过一系列理化参数来表征 DF 这一混合物，但体内活性的差异仍不可避免，这给竞争对手仿制 DF 及 DF 的研究开发带来了极大的挑战。迄今，DF 的研发周期已近 30 年，大大超过了一般的研发周期。即便如此，DF 仍是一个非常具有潜力的生化制药品

种, Gentium SpA依靠DF吸引了大量风险投资, 有关DF的临床实验正在大规模展开。

3 去纤苷作用机制

研究表明DF主要通过影响血管内皮细胞应答和血小板活性来发挥多种生物学功能。DF中存在可与腺苷A1及A2受体相互作用的核酸适配体, 进而减低内皮细胞对损伤的应答, 起到保护血管内皮的作用^[6]。体外实验和动物体内实验已经证实, DF可以刺激前列环素PGI₂的释放, PGI₂主要是由血管内皮和血小板合成分泌, 通过增加cAMP的水平来起到舒张血管和抑制血小板聚集的作用^[7]。PGI₂的升高也可抑制脂氧合酶途径来减少白三烯LTB₄的生成, 减少缺血对组织的损伤。和大血管相比, DF一系列生物学活性主要是针对小血管产生的。促纤溶和抗凝活性被认为是通过提高血管内皮组织纤溶酶原激活剂tPA的表达, 同时降低抑制因子PAI和因子TF分泌来产生的^[8]。表1总结了近年来研究推测的DF作用机制^[1]。DF可以抑制血管内皮细胞凋亡的发生, 并抑制免疫效应细胞透过内皮细胞进入组织, 减少炎症损伤的发生^[9]。DF被证实可以下调细胞黏附分子CAMs的表达, 而CAMs与炎症反应及造血干细胞动员有关^[10]。肿瘤组织周围多发新生血管,

DF具有抗新生血管生成的作用, 被认为可能是其抗肿瘤的作用基础^[11,12]。有研究表明DF是通过影响血管生成肽的生成来对血管内皮稳定及再生产生作用, 针对不同的血管组织, DF表现出了复杂的药理学特征^[13]。体外实验表明, DF可以提高肿瘤细胞的化疗敏感性, 这些都表明DF在抗肿瘤治疗方面有广阔的开拓前景^[14]。

DF体外活性有时能很好地支持DF体内药理学活性, 如DF是纤溶酶的激动剂^[5], DF可以提高tPA的体外活性^[5], 这些都很好地支持了DF体内促纤溶的活性。DF中存在可以抑制凝血酶活性的核酸适配体^[15], 推测DF中存在可以抑制炎症酶cathepsin G活性的核酸片断^[16], 这些支持DF体内抗凝及抗炎的活性。但有时DF体外活性却与DF体内药理学活性相驳, 我们实验中发现, 尽管DF中存在抑制凝血酶的成分, DF整体组分对凝血酶表现的却是激动效应; DF可以拮抗体内炎症酶抑制剂alpha(1)PI, ACT, MPI与cathepsin G, proteinase 3的结合, 从而有助于炎症反应的发生^[17]。DF体内复杂的作用机制的阐明还有待于进一步研究。

4 去纤苷用于预防和治疗肝静脉闭塞症

肝静脉闭塞性疾病VOD是大剂量化疗及造血干细

表1 Defibrotide的作用机制

药理学活性	推测的作用机制
抗心肌缺血	促进 PGI ₂ 和 PGE ₂ 的合成和释放; 提高平滑肌胞内 cAMP 水平, 促血管舒张;
促纤溶	拮抗内皮素-1 一方面降低 PAI-1 水平; 另一方面提高 tPA 水平
抗栓	促进血栓调节蛋白 TM 释放, 进而激活蛋白 C 和蛋白 S; 调节组织因子的表达
抗血小板	促 PGI ₂ 和 PGE ₂ 的合成, 产生直接抗血小板活性; 干扰血小板与内皮细胞之间的反应;
抗炎	下调白细胞释放 cathepsin G 水平 抑制自由基的生成; 降低炎症酶 cathepsin G 的产生; 干扰炎症细胞迁移
抗新生血管稳定内皮细胞	降低 p70S6 激酶的激活, 进而干扰 PI3K/AKT/mTOR 信号通路; 阻止树突状细胞分化成血管内皮细胞
干细胞动员	促进造血干细胞动员
抗肿瘤	抗新生血管; 提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性

肝移植常见的并发症，出现肝窦内皮细胞和肝细胞的受损，并伴随进行性的小静脉闭塞，最终导致肝细胞坏死^[18]。VOD通常在移植后30天左右发生，平均发生率达14%^[19]。部分VOD患者症状轻微，严重VOD患者可出现多器官衰竭(Multi-organ Failure, MOF)，100天生存率不到15%^[19]。VOD一直缺乏有效的预防和治疗手段，DF很有可能填补VOD治疗方面的空缺。研究表明DF可以与肝素结合蛋白如碱性成纤维细胞生长因子bFGF结合，也可与I型胶原蛋白表现出高度亲合，进而促进内皮细胞有丝分裂和管样结构的生成^[13]。Palomo等人的研究对干细胞移植后DF保护血管内皮提供了新的证据^[20]。化疗和移植导致血管闭塞的发生，闭塞引起内皮细胞激活是一种常见的病理损伤。在大血管细胞模型中，内皮激活的特征就是黏附受体

ICAM-1的表达上调，同时伴随p38和Akt激酶的活化，这些都是与炎症及压力应激相关的信号蛋白。此外，在异体移植过程中，带有vWF因子的细胞外基质在血管壁大量富集会致血小板的黏附，进而引发血栓。在Palomo的实验设计中，内皮细胞事先与DF孵育，可下调ICAM-1的表达并阻断p38和AKT的激活，进而防止内皮细胞激活所造成的组织损伤^[20]。DF体外抗炎、抗凝及保护血管内皮的实验数据支持了DF临床应用于移植患者，有效预防和治疗VOD。

DF用于治疗VOD的回顾性临床实验分析见表2，入组病例都符合严重VOD标准，部分患者有MOF倾向，甚至已发生器官衰竭，应用DF治疗后都表现出显著疗效。部分VOD患者取得了完全缓解的治疗效果，百日生存率也得到了大幅提高。

表2 DF用于移植引发VOD治疗的临床实验数据

入组病例及特征	DF 剂量 mg/kg/day	完全缓解率 (%)	百日生存率 (%)	参考文献
MOF 高风险病人(19 例)	5-60 i. v.	42	32	[21]
高风险病人 28 例 (40 例)	10-40 i. v.	总 55, 高风险 36	42	[22]
高风险或 MOF 病人(88 例)	5-60 i. v.	46	35	[23]
累及三个器官系统的病人 64 例(149 例)	25 vs 40 i. v.	46 vs 42 (无统计学差异)	44 vs 39 (无统计学差异)	[24]
高风险病人(102 例) vs MOF 病人(32 例)	25 i. v.	24 vs 9 (有统计学意义)	38 vs 25 (有统计学意义)	[1]
干细胞移植病人 (269 例) vs 历史对照	25 i. v.	32 vs 9 (有统计学意义)	46 vs 25 (有统计学意义)	[25]

DF用于预防干细胞移植患者这一类VOD高危人群的临床实验也已大规模开展，并取得了可喜的进展(表3)。肝素用于预防VOD这类疾病的同时，大大增加了出血的风险，而DF单用或与肝素联用副作用发生率很低，且取得了较好的预防VOD效果。最近在欧洲

完成的III期多中心随机临床实验中，共招募了356名干细胞移植患者，对比移植后30天VOD的发生率，DF组180例患者中22人发生VOD，占12%；对照组176例35人发生VOD，占20%^[26]。

表3 DF用于预防移植引发VOD的临床实验数据

病例数	DF 剂量(mg/kg/day)	VOD 发生率	参考文献
9	10-25 i. v.	1/9	[27]
58	10 i. v.	0	[28]
47	20 i. v.	1/47	[29]
57	40 口服给药	1/57	[30]
DF 组 180 vs 对照组 176	25 i. v.	12 vs 20(有显著差异)	[26]

目前积累的临床数据显示，DF治疗病人耐受性很好。在最近的一个临床实验中，与DF相关的3-4级副反应发生率为7%，主要是低血压、肺及消化道出血、

腹部绞痛，因副反应停止治疗的患者仅为4%，无DF用药直接导致患者死亡的报导^[25]。在III期临床实验中，DF治疗组出血的风险与历史对照组相近，18%的患者

因DF的相关毒性导致治疗终止^[1]。DF针对VOD的预防和治疗临床疗效显著,耐受性好,DF针对VOD这一适应症成功上市相信为期不远。

5 去纤苷用于多发性骨髓瘤的治疗

肿瘤患者静脉血栓栓塞的发生风险较正常人提高4~6倍,DF应用于VOD的治疗安全有效,研究者最初想到用DF减低肿瘤患者治疗过程中血栓栓塞并发症的风险^[14]。近来越来越多的实验数据显示DF拥有抗肿瘤活性,尽管相关机制并不十分清楚,但相信与抗新生血管生成有关,新生血管对肿瘤细胞生长、侵袭及转移至关重要。有研究表明,抗血管生成类药物并不一定直接诱导肿瘤血管内皮损伤和栓塞,也可能稳定血管内皮细胞,防止其恶性增生和向肿瘤组织芽生出新生小血管^[31]。研究表明DF抗血管生成的机制可能属于后者,DF可以拮抗VEGF, bFGF, IL-8和血小板衍生生长因子PDGF,进而导致血管内皮细胞黏附及迁移能力的下降;DF降低PI3K/AKT/mTOR/p70S6信号通路的磷酸化水平,进而引起血管内皮细胞增殖和活化能力下降^[11]。胃癌细胞株植入裸鼠,静脉给予450 mg/kg的DF可以有效防止肿瘤新生血管^[12]。目前的研究认为肿瘤细胞所处的微环境对肿瘤增殖、存活及耐药性的产生有关。尤其在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者中,恶性浆细胞黏附于骨髓基质干细胞可以明显降低其对传统化疗药物的敏感性,这个研究被认为是典型的肿瘤细胞与微环境相互作用的模型^[32]。正是因为认识到这点,新开发的免疫调节药物沙利度胺和蛋白酶抑制剂bortezomib都是同时靶向恶性浆细胞和骨髓基质干细胞的,增加疗效的同时也加大了副反应^[33]。DF对恶性浆细胞有轻微的直接抑制效应,最重要的是,DF可以作用于肿瘤微环境,增强浆细胞对化疗的敏感性。DF与肝素分子特性相似,都是多聚阴离子,DF被证实与某些肝素结合生长因子(bFGF, PDGF)有高亲和力,并可抑制恶性浆细胞heparanases的酶活性,这些由微环境细胞产生的血管生成正调控因子都可以被DF拮抗^[34]。DF虽然没有直接或间接的抗肿瘤活性,但当恶性浆细胞与骨髓基质干细胞共同孵育培养时,DF与化疗药物联用后大大提高了对肿瘤细胞的杀伤活性,这点在细胞模型和动物实验中都得到了证实^[14]。

恶性浆细胞可以引起血管内皮细胞tPA的下调及PAI-1分泌水平的增加,尤其是在沙利度胺治疗时这

种效应被加强。浆细胞与内皮细胞共同培养时,DF的加入可以上调tPA并下调PAI-1,抵消了沙利度胺对内皮细胞的这种效应,增加了沙利度胺对浆细胞特异性的细胞毒作用^[35]。DF用来预防沙利度胺治疗的MM患者深度静脉栓塞并发症的I/II期临床实验已经开展,24例复发的MM患者入组接受抗肿瘤药物与DF联合用药,1年无进展生存期及总生存期均得到了提高,只有一例患者出现了深度静脉栓塞,同时出血副反应的发生率很低^[36]。

6 结 语

DF提取的生物材料来源和可控降解手段与低分子肝素类似,低分子肝素是由二糖交替连接组成的多聚体,DF是由四种脱氧核苷酸排列组合而成的多聚体。同为多组分生化药,DF质量控制难度大于低分子肝素。DF具有多种生物学活性推测与其分子大小、碱基序列及空间构象等有关,这些都构成了DF的质量控制要素。有不少研究尝试用核酸适配体的理论去证明或解释DF的各种生物学活性,但结果不能令人十分满意,DF复杂的作用机制研究还需进一步深入开展。针对VOD预防及治疗的实验及临床研究开展得最多,也最有可能针对这一领域率先获得美国FDA批准上市。用于肿瘤的辅助治疗是近几年来DF应用领域上新的突破,尤其是在多发性骨髓瘤治疗方面的进展,将可能改变DF作为罕用药治疗VOD这一尴尬的市场定位,极大地拓宽了DF的市场前景。

参 考 文 献

- [1] Richardson P, Linden E, Revta C, et al. Use of defibrotide in the treatment and prevention of veno-occlusive disease [J]. *Expert Review of Hematology*, 2009, 2(4): 365-376.
- [2] Larocca A, Cavallo F, Magarotto V, et al. Defibrotide: a review on clinical use and future development [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2008, 8(8): 1201-1212.
- [3] Morabito F, Gentile M, Gay F, et al. Insights into defibrotide: an updated review [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2009, 9(6): 763-772.
- [4] Guglielmelli T, Bringhen S, Palumbo A. Update on the use of defibrotide [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2012, 12(3): 353-361.
- [5] Echert C L, Graziadio B, Somaini S, et al. The fibrinolytic mechanism of defibrotide: effect of defibrotide on plasmin activity [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2009, 20(8): 627-634.

- [6] Bianchi G, Barone D, Lanzarotti E, et al. Defibrotide, a single-stranded polydeoxyribonucleotide acting as an adenosine receptor agonist [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1993, 238(2-3): 327-334.
- [7] Hohlfeld T, Strobach H, Schror K. Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1993, 264(1): 397-405.
- [8] Falanga A, Vignoli A, Marchetti M, et al. Defibrotide reduces procoagulant activity and increases fibrinolytic properties of endothelial cells [J]. *Leukemia*, 2003, 17(8): 1636-1642.
- [9] Eissner G, Multhoff G, Gerbitz A, et al. Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide [J]. *Blood*, 2002, 100(1): 334-340.
- [10] Carlo-Stella C, Di Nicola M, Magni M, et al. Defibrotide in combination with granulocyte colony-stimulating factor significantly enhances the mobilization of primitive and committed peripheral blood progenitor cells in mice [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(21): 6152-6157.
- [11] Gottfried E, Kreutz M, Haffner S, et al. Differentiation of human tumour-associated dendritic cells into endothelial-like cells: an alternative pathway of tumour angiogenesis [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2007, 65(4): 329-335.
- [12] Koehl G E, Geissler E K, Iacobelli M, et al. Defibrotide: an endothelium protecting and stabilizing drug, has an anti-angiogenic potential in vitro and in vivo [J]. *Cancer Biology Therapy*, 2007, 6(5): 686-690.
- [13] Benimetskaya L, Wu S, Voskresenskiy A M, et al. Angiogenesis alteration by defibrotide: implications for its mechanism of action in severe hepatic veno-occlusive disease [J]. *Blood*, 2008, 112(10): 4343-4352.
- [14] Mitsiades C S, Rouleau C, Echart C, et al. Preclinical studies in support of defibrotide for the treatment of multiple myeloma and other neoplasias [J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(4): 1210-1221.
- [15] Bracht F, Schror K. Isolation and identification of aptamers from defibrotide that act as thrombin antagonists in vitro [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994, 200(2): 933-937.
- [16] Belorgey D, Bieth J G. Effect of polynucleotides on the inhibition of neutrophil elastase by mucus proteinase inhibitor and alpha 1-proteinase inhibitor [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(46): 16416-16422.
- [17] Durant J, Boudier C, Belorgey D, et al. DNA strongly impairs the inhibition of cathepsin G by alpha(1)-antichymotrypsin and alpha(1)-proteinase inhibitor [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(6): 3787-3792.
- [18] Copelan E A. Hematopoietic stem-cell transplantation [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2006, 354(17): 1813-1826.
- [19] Coppell J A, Richardson P G, Soiffer R, et al. Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: incidence, clinical course, and outcome [J]. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2010, 16(2): 157-168.
- [20] Palomo M, Diaz-Ricart M, Rovira M, et al. Defibrotide prevents the activation of macrovascular and microvascular endothelia caused by soluble factors released to blood by autologous hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2011, 17(4): 497-506.
- [21] Richardson P G, Elias a D, Krishnan A, et al. Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide: compassionate use results in response without significant toxicity in a high-risk population [J]. *Blood*, 1998, 92(3): 737-744.
- [22] Chopra R, Eaton J D, Grassi A, et al. Defibrotide for the treatment of hepatic veno-occlusive disease: results of the European compassionate-use study [J]. *British Journal of Haematology*, 2000, 111(4): 1122-1129.
- [23] Richardson P G, Murakami C, Jin Z, et al. Multi-institutional use of defibrotide in 88 patients after stem cell transplantation with severe veno-occlusive disease and multisystem organ failure: response without significant toxicity in a high-risk population and factors predictive of outcome [J]. *Blood*, 2002, 100(13): 4337-4343.
- [24] Richardson P G, Soiffer R J, Antin J H, et al. Defibrotide for the treatment of severe hepatic veno-occlusive disease and multiorgan failure after stem cell transplantation: a multicenter, randomized, dose-finding trial [J]. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2010, 16(7): 1005-1017.
- [25] Richardson P G, Grupp S a, Defibrotide in the treatment of hepatic veno-occlusive disease in stem cell transplant and non-SCT patients . early intervention improves outcome-Updated results of a treatment IND expanded access protocol [J]. *Blood*, 2011, 118(21): 487.
- [26] Corbacioglu S, Cesaro S, Faraci M, et al. Defibrotide for prophylaxis of hepatic veno-occlusive disease in paediatric haemopoietic stem-cell transplantation: an open-label, phase 3, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2012, 379(9823): 1301-1309.
- [27] Corbacioglu S, Honig M, Lahr G, et al. Stem cell transplantation in children with infantile osteopetrosis is associated with a high incidence of VOD, which could be prevented with defibrotide [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2006, 38(8): 547-553.
- [28] Dignan F, Gujral D, Ethell M, et al. Prophylactic defibrotide in allogeneic stem cell transplantation: minimal morbidity and zero mortality from veno-occlusive disease [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 40(1): 79-82.
- [29] Qureshi A, Marshall L, Lancaster D. Defibrotide in the prevention and treatment of veno-occlusive disease in

- autologous and allogeneic stem cell transplantation in children [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, 50(4): 831-832.
- [30] Cappelli B, Chiesa R, Evangelio C, et al. Absence of VOD in paediatric thalassaemic HSCT recipients using defibrotide prophylaxis and intravenous Busulphan [J]. *British Journal of Haematology*, 2009, 147(4): 554-560.
- [31] Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, et al. Angiogenesis during primate placentation in health and disease [J]. *Reproduction*, 2003, 126(5): 569-577.
- [32] Bogdanos J, Karamanolakis D, Tenta R, et al. Endocrine/paracrine/autocrine survival factor activity of bone microenvironment participates in the development of androgen ablation and chemotherapy refractoriness of prostate cancer metastasis in skeleton [J]. *Endocrine-Related Cancer*, 2003, 10(2): 279-289.
- [33] Mitsiades C S, Mcmillin D W, Klippel S, et al. The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies [J]. *Hematology / Oncology Clinics of North America*, 2007, 21(6): 1007-1034, vii-viii.
- [34] Mitsiades Cs B I, Menon K,. Defibrotide, an orally bioavailable modulator of myeloma tumor microenvironment interactions: molecular sequelae and clinical implications [abstract] [J]. *Blood (ASH)*, 2006, 108(3523).
- [35] Echart C L, Somaini S, Distaso M, et al. Defibrotide blunts the prothrombotic effect of thalidomide on endothelial cells [J]. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2011, 18(1): 79-86.
- [36] Palumbo A, Larocca A, Genuardi M, et al. Melphalan, prednisone, thalidomide and defibrotide in relapsed/refractory multiple myeloma: results of a multicenter phase I/II trial [J]. *Haematologica*, 2010, 95(7): 1144-1149.