



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.03.31(22) Дата подачи заявки  
2013.11.15(51) Int. Cl. A61K 31/7088 (2006.01)  
A61K 31/7125 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)  
A61P 7/00 (2006.01)  
A61P 7/06 (2006.01)

## (54) ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ И МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НЕОПЛАЗМ

(31) 61/734,941; 61/799,069; 13/841,711;  
61/900,347(32) 2012.12.07; 2013.03.15; 2013.03.15;  
2013.11.05

(33) US

(62) 201990799; 2013.11.15

(71) Заявитель:  
ДЖЕРОН КОРПОРЕЙШН (US)

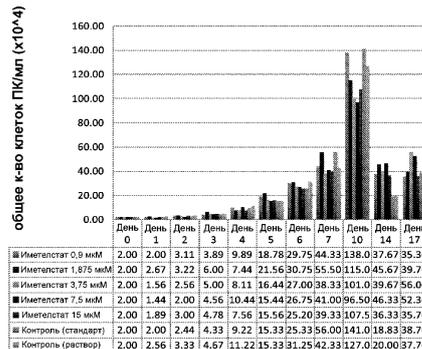
(72) Изобретатель:

Стюарт Моник Дж., Келси Стивен  
(US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В изобретении предлагаются способы уменьшения пролиферации неопластических клеток-предшественников и облегчения ассоциированных симптомов у индивидуумов с диагнозом или с подозрением на миелопролиферативные нарушения, такие как эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ). Также, в данном документе предлагаются способы использования ингибиторов теломеразы для поддержания количества тромбоцитов крови в относительно нормальных пределах в крови у индивидуумов с диагнозом или подозрением на миелопролиферативные нарушения, такие как ЭТ.



# **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ТЕЛОМЕРАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ И МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НЕОПЛАЗМ**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

**[0001]** В данной заявке заявлен приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/734941, поданной 7 декабря 2012 года; предварительной заявке на патент США № 61/799069, поданной 15 марта 2013 года; заявке на патент США № 13/841711, поданной 15 марта 2013 года, и предварительной заявке на патент США № 61/900347, поданной 5 ноября 2013 года; описание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

## **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0002]** Настоящее изобретение относится к способам использования соединений ингибиторов теломеразы для лечения или предотвращения симптомов, ассоциированных с миелопролиферативными нарушениями или неоплазмами, такими как Эссенциальная Тромбоцитемия (ЭТ).

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**[0003]** Гематологические злокачественные опухоли представляют собой формы рака, который начинается в клетках кроветворной ткани, таких как костный мозг, или в клетках иммунной системы. Примеры гематологического рака представляют собой острые и хронические лейкозы, лимфомы, множественную миелому и миелодиспластические синдромы.

**[0004]** Миелопролиферативные неоплазмы, или МПН, представляют собой гематологические неоплазмы, которые возникают из неопластических гемопоэтических миелоидных клеток-предшественников в костном мозге, таких как клетки-предшественники эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов. Пролиферация неопластических клеток-предшественников приводит к гиперпродукции любой комбинации лейкоцитов, эритроцитов и /или тромбоцитов, в зависимости от заболевания.

Эти гиперпродуцирующие клетки также могут быть атипичными, что приводит к дополнительным клиническим осложнениям. Существуют различные типы хронических миелопролиферативных нарушений. Спектр МПН заболеваний включает эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), истинную полицитемию (ИП), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), миелофиброз (МФ), хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз и острый миелогенный лейкоз (ОМЛ). Миелодиспластический синдром (МДС) представляет собой группу симптомов, включающих рак крови и костного мозга. Миелодиспластические синдромы (МДС) включают заболевания, такие как рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией, рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией и хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

#### *Эссенциальная тромбоцитемия*

**[0005]** Циркулирующие тромбоциты крови не имеют ядра, хотя они сохраняют небольшие количества мРНК, происходящих от мегакариоцитов, и полностью функциональную активность для биосинтеза белков (Gnatenko et al., *Blood* 101, 2285-2293 (2003)). Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) представляет собой подтип миелопролиферативного нарушения, характеризующийся увеличенной неопластической пролиферацией мегакариоцитов, повышенным числом циркулирующих тромбоцитов и значительными тромбгеморрагическими событиями, нередко неврологическими (Nimer, *Blood* 93, 415-416 (1999)). ЭТ встречается с одинаковой частотой у мужчин и женщин, хотя дополнительное пиковое значение заболеваемости у женщин в возрасте 30 лет может объяснять кажущуюся более высокую распространенность болезни у женщин после этого возраста. Молекулярная основа ЭТ еще не установлена, хотя исторически она рассматривалась как «клональное» нарушение (El-Kassar et al., *Blood* 89, 128 (1997); "Evidence that ET is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell" PJ Fialkow, *Blood* 1981 58: 916-919). Помимо явного чрезмерного количества тромбоцитов в субпопуляции ЭТ тромбоцитов, клетки остаются морфологически неотличимы от своих нормальных аналогов. В настоящее время функциональные или диагностические тесты не доступны для ЭТ, и ее диагностируют путем исключения других возможных гематологических нарушений. Оценки заболеваемости 2-3 случая на 100000 человек в год согласуются с другими типами лейкозов, но уровни распространения, по меньшей мере, в десять раз выше из-за низких уровней смертности, связанных с ЭТ.

[0006] Современные методы терапии для ЭТ сосредоточены в первую очередь на предотвращении тромбозного/геморрагического проявления и включают неспецифическое снижение уровней тромбоцитов крови. Однако ни один из этих существующих методов терапии не сосредоточен конкретно на неопластических клетках-предшественниках, стимулирующих злокачественность, ответственную за протекание болезни. Например, лечение ЭТ путем цитотоксической химиотерапии сокращает количество неопластических клеток, хотя оставляет остаточные клетки-предшественники на месте. Это приводит к появлению новых неопластических клеток, возникающих из клеток-предшественников, и к продолжению протекания болезни. Кроме того, у многих людей с ЭТ развивается устойчивость к терапиям первой линии, таким как гидроксимочевина, или они в целом прекращают использование этих лекарственных препаратов из-за неблагоприятных побочных эффектов.

#### *Истинная полицитемия*

[0007] У пациентов с истинной полицитемией (ИП) отмечалось увеличение образования эритроцитов. Лечение направлено на снижение чрезмерного количества эритроцитов. ИП может развиваться в поздней фазе своего течения, которое напоминает первичный миелофиброз с цитопенией и гипоплазией и фиброз костного мозга. У большинства пациентов с ИП обнаружена мутация гена янус-киназы 2 (JAK2), расположенного на 9-й хромосоме, которая приводит к увеличению пролиферации и выживания гемопоэтических предшественников *in vitro*. У пациентов с ИП повышается риск сердечно-сосудистых и тромбозных случаев и преобразования в острый миелогенный лейкоз или первичный миелофиброз. Лечение ИП включает кратковременную хроническую флеботомию для поддержания гематокрита на уровне ниже 45% у мужчин и 40% у женщин. Другие возможные методы лечения включают применение гидроксимочевины, интерферона альфа и низких доз аспирина.

#### *Миелофиброз*

[0008] Миелофиброз или МФ, или первичный миелофиброз представляет собой миелопролиферативную неоплазму того же спектра заболеваний, как и ЭТ. У пациентов с МФ часто наблюдается мутация JAK2 V617F в костном мозге. Время от времени ЭТ

развивается в МФ. В настоящее время ингибирование JAK2 считается стандартом лечения МФ в странах, где санкционирован руксолитиниб (Jakafi®), ингибитор янус-киназы. Но отсутствуют доказательства того, что ингибиторы JAK2, такие как Jakafi®, селективно подавляют пролиферацию лейкозного клона, отвечающего за болезнь, и, таким образом, они не могут «модифицировать заболевание».

### *Острый миелогенный лейкоз*

**[0009]** Острый миелогенный лейкоз (ОМЛ) представляет собой рак миелоидной линии клеток крови. ОМЛ представляет собой наиболее распространенный острый лейкоз, поражающий взрослых. Пациенты с ОМЛ имеют быстрый рост атипичных лейкоцитов, которые накапливаются в костном мозге и препятствуют образованию нормальных клеток крови. Замена нормального костного мозга на лейкозные клетки вызывает снижение эритроцитов, тромбоцитов и нормальных лейкоцитов. Симптомы ОМЛ включают утомляемость, одышку, легкие кровоподтеки и кровотечения и повышенный риск инфицирования. Как острый лейкоз, ОМЛ быстро прогрессирует и, как правило, приводит к смертельному исходу в течение недель или месяцев, если не проводить лечение. Стандартное лечение ОМЛ представляет собой лечение химиотерапией, направленной на индукцию ремиссии; дополнительно, пациентам могут быть пересажены гемопоэтические стволовые клетки.

### *Миелодиспластический синдром*

**[0010]** Миелодиспластический синдром (МДС) представляет собой группу симптомов, включающих рак крови и костного мозга. Миелодиспластические синдромы (МДС) включают в себя такие заболевания, как рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией, рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией и хронический миеломоноцитарный лейкоз. Незрелые стволовые клетки крови (бласты) не становятся здоровыми эритроцитами, лейкоцитами или тромбоцитами. Бласты погибают в костном мозге или вскоре после того, как попадают в кровь. Это уменьшает пространство для формирования здоровых лейкоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов в костном мозге.

**[0011]** Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой совокупность гематологических заболеваний, которые включают неэффективное образование

миелоидного класса клеток крови. У пациентов с МДС часто развивается тяжелая анемия и им требуются частые переливания крови. Кровотечения и риск инфицирования также возникают из-за малого количества или дисфункциональности тромбоцитов и нейтрофилов, соответственно. В некоторых случаях заболевание осложняется, и у пациента развиваются цитопении (низкие показатели крови), вызванные прогрессирующей недостаточностью костного мозга. В некоторых случаях заболевание переходит в острый миелогенный лейкоз (ОМЛ). Если общий процент миелобластов костного мозга повышается выше определенной отметки (20% для ВОЗ и 30% для FAB), то говорят, что произошло преобразование в острый миелогенный лейкоз (ОМЛ).

**[0012]** Следовательно, необходимы новые методы лечения миелодиспластических пролиферативных нарушений или неоплазм, таких как ЭТ, ИП, МФ, ХМЛ и ОМЛ, и миелодиспластического синдрома, которые воздействуют на неопластические клетки-предшественники, отвечающие за злокачественный фенотип заболевания, особенно у людей, которые нечувствительны к общепринятым терапиям первой линии данного нарушения или испытывают побочные явления в результате них.

**[0013]** По всему данному описанию изобретения имеются ссылки на различные патенты, патентные заявки и другие типы публикаций (например, статьи в журналах). Описание всех патентов, патентных заявок и публикаций, цитируемых в данном документе, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0014]** Изобретение, предложенное в данном документе, описывает, в том числе, способы использования соединений ингибиторов теломеразы для лечения и облегчения симптомов, ассоциированных с миелопролиферативными неоплазмами, такими как эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), истинная полицитемия (ИП), миелофиброз (МФ) и острый миелогенный лейкоз (ОМЛ) путем воздействия на непластические клетки-предшественники, характерные для этих заболеваний. Изобретение, предложенное в данном документе, описывает, в том числе, способы использования соединений ингибиторов теломеразы для лечения и облегчения симптомов, ассоциированных с миелодиспластическими синдромами (МДС), такими как, например, рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная цитопения с

мультилинейной дисплазией, рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией и хронический миеломоноцитарный лейкоз, путем воздействия на неопластические клетки-предшественники, ответственные за образование атипично высокого количества клеток, характерное для этих заболеваний.

**[0015]** Соответственно, в одном аспекте, в данном документе, предлагаются способы облегчения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с миелопролиферативными неоплазмами, у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое облегчает, по меньшей мере, один симптом, ассоциированный с миелопролиферативными неоплазмами. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом включает головную боль, головокружение или предобморочное состояние, боль в груди, слабость, обморок, изменение зрения, онемение или покалывание в конечностях, покраснение, пульсирующую или жгучую боль в конечностях (эритромелалгию), увеличение селезенки, кровотечения из носа, кровоподтеки, кровотечение изо рта или десен, кровавый стул или инсульт. В некоторых вариантах реализации изобретения миелопролиферативные неоплазмы представляют собой, например, эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), истинную полицитемию (ИП), миелофиброз (МФ) и острый миелогенный лейкоз (ОМЛ). В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе, ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну N3' → P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из

вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицириновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутриворшинного, интраназального, ингаляционного или внутривязного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе индивидуум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения введение

ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег (CFU-Mega). В некоторых вариантах реализации изобретения подавление КОЕ-Мег не зависит от уменьшения аллельной нагрузки JAK2. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0016]** Соответственно, в одном аспекте, в данном документе предлагаются способы облегчения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с эссенциальной тромбоцитемией у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое облегчает, по меньшей мере, один симптом, ассоциированный с эссенциальной тромбоцитемией. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом включает головную боль, головокружение или предобморочное состояние, боль в груди, слабость, обморок, изменение зрения, онемение или покалывание в конечностях, покраснение, пульсирующую или жгучую боль в конечностях (эритромелалгию), увеличение селезенки, кровотечения из носа, кровоподтеки, кровотечение изо рта или десен, кровавый стул или инсульт. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну N3' → P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3' →

P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5' - и/или 3' - концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5' - и/или 3' - концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора

теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе индивидуум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. В некоторых вариантах реализации изобретения подавление КОЕ-Мег не зависит от уменьшения аллельной нагрузки JAK2. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения предшествующий метод лечения, не основанный на ингибировании теломеразы, представляет собой применение гидроксимочевины, анагрелида или интерферона  $\alpha$ -2B. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0017]** В другом аспекте в данном документе предлагаются способы уменьшения пролиферации неопластических клеток-предшественников у индивидуума с диагнозом или с подозрением на миелопролиферативные неоплазмы или миелодиспластический синдром, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, причем введение ингибитора теломеразы уменьшает пролиферацию неопластических клеток-предшественников у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения миелопролиферативные неоплазмы представляют собой, например, эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), истинную полицитемию (ИП), миелофиброз (МФ) и острый миелогенный лейкоз (ОМЛ). В некоторых вариантах реализации изобретения для ЭТ уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников дает результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $600 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников дает результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в

данном документе индивидуум не испытывает тромбоэмболического осложнения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе уменьшение пролиферации неопластических клеток, дающее результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума, происходит в течение 2 месяцев или менее после начала введения ингибитора теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе уменьшение пролиферации неопластических клеток, дающее результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума, происходит в течение 1 месяца или менее после начала введения ингибитора теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения таких как для МФ, уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников давало результаты по количеству тромбоцитов более чем около  $100 \times 10^9$  / л в крови индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения, таких как для МФ, уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников давало в результате изменение уровня гемоглобина, по меньшей мере, до 90 г/л или 100 г/л, или 110 г/л, или 120 г/л. В некоторых вариантах реализации изобретения, таких как для МФ, уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников давало в результате изменение абсолютного числа нейтрофилов, по меньшей мере, до  $1,0 \times 10^9$  / л или, по меньшей мере, до  $2,0 \times 10^9$  / л. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе, ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну N3' → P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе

олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в

данном документе индивидуум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. В некоторых вариантах реализации изобретения подавление КОЕ-Мег не зависит от уменьшения аллельной нагрузки JAK2. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0018]** В другом аспекте, в данном документе предлагаются способы уменьшения пролиферации неопластических клеток-предшественников у индивидуума с диагнозом или с подозрением на эссенциальную тромбоцитемию, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое уменьшает пролиферацию неопластических клеток-предшественников у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников дает результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $600 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников дает результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе индивидуум не испытывает тромбоэмболического осложнения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе уменьшение пролиферации неопластических клеток, дающее результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума, происходит в течение 2 месяцев или менее после начала введения ингибитора теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе уменьшение пролиферации неопластических клеток, дающее результаты по количеству тромбоцитов менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума, происходит в течение 1 месяца или менее после начала введения ингибитора теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения

индивидуум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения предшествующий метод лечения, не основанный на ингибировании теломеразы, представляет собой применение гидроксимочевины, анагрелида или интерферона  $\alpha$ -2B. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе, ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну N3'  $\rightarrow$  P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3'  $\rightarrow$  P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5'- и/или 3'-концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутривнутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из

вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе индивидум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. В некоторых вариантах реализации изобретения подавление КОЕ-Мег не зависит от уменьшения аллельной нагрузки JAK2. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидум является человеком.

**[0019]** В другом аспекте, в данном документе предлагаются способы поддержания количества тромбоцитов крови на уровне менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума с диагнозом или с подозрением на эссенциальную тромбоцитемию, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы

индивидууму, которое поддерживает количество тромбоцитов крови на уровне менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл у индивидуума. В некоторых аспектах ингибитор теломеразы вводят не чаще чем один раз в две недели. В других аспектах ингибитор теломеразы вводят для поддержания количества тромбоцитов крови в диапазоне от около  $150 \times 10^3$  / мкл до около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе, ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит  $N3' \rightarrow P5'$  тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с  $5'$ - и/или  $3'$ -концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с  $5'$ - и/или  $3'$ -концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутривнутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из

вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе индивидуум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. В некоторых вариантах реализации изобретения подавление КОЕ-Мег не зависит от уменьшения аллельной нагрузки JAK2. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения предшествующий метод лечения, не основанный на ингибировании теломеразы, представляет собой применение гидроксимочевины, анагрелида или интерферона  $\alpha$ -2B. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0020]** Соответственно, в одном аспекте, в данном документе предлагаются способы для облегчения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с истинной полицитемией (ИП) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое облегчает по меньшей мере один симптом, ассоциированный с истинной полицитемией. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом включает головную боль, головокружение или предобморочное состояние, боль в груди, слабость, обмороки, изменение зрения, онемение или покалывание в конечностях, отдышку, слабость или чувство усталости, увеличение селезенки, кровотечения из носа, кровоподтеки, кровотечение изо рта или десен или кровавый стул. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе, ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну N3' → P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5' - и/или 3' - концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5' - и/или 3' - концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицириновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоилловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с

фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует эритроидному росту. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-эритроид (CFU-эритроид). В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе индивидум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидума. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидум является человеком.

[0021] Соответственно, в одном аспекте, в данном документе предлагаются способы для облегчения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с миелофиброзом у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое облегчает по меньшей мере один симптом, ассоциированный с миелофиброзом. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом включает увеличение селезенки и боль в селезенке, чувство быстрого насыщения, анемию, боль в костях, усталость, лихорадку, ночную потливость, потерю веса, слабость, обмороки, кровотечения из носа, кровоподтеки, кровотечение изо рта и десен, кровавый стул или инсульт. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну N3' → P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации

изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутривнутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе индивидум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. В некоторых вариантах реализации изобретения подавление КОЕ-Мег не зависит от уменьшения аллельной нагрузки JAK2. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на

ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0022]** В другом аспекте, в данном документе предлагаются способы уменьшения фиброза костного мозга у индивидуума с диагнозом или с подозрением на миелопролиферативную неоплазму или миелодиспластический синдром, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое уменьшает фиброз костного мозга у индивидуума. В другом аспекте, в данном документе предлагаются способы поддержания у пациентов с МФ количества тромбоцитов на уровне более чем около  $100 \times 10^9 / \text{л}$  в крови индивидуума, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое увеличивает количество тромбоцитов. В другом аспекте, в данном документе предлагаются способы поддержания у пациентов с МФ уровня гемоглобина на уровне по меньшей мере  $90 \text{ г/л}$  или  $100 \text{ г/л}$ , или  $110 \text{ г/л}$ , или  $120 \text{ г/л}$ , включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое увеличивает уровень гемоглобина. В другом аспекте, в данном документе предлагаются способы поддержания у пациентов с МФ абсолютного числа нейтрофилов по меньшей мере,  $1,0 \times 10^9 / \text{л}$  или по меньшей мере  $2,0 \times 10^9 / \text{л}$ , включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое увеличивает число нейтрофилов. В некоторых аспектах ингибитор теломеразы вводят не чаще чем один раз в две недели. В других аспектах ингибитор теломеразы вводят для поддержания количества тромбоцитов крови в диапазоне от около  $150 \times 10^3 / \text{мкл}$  до около  $400 \times 10^3 / \text{мкл}$  в крови индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе, ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну  $\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$  тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит  $\text{N}3' \rightarrow$

P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг.

**[0023]** Соответственно, в одном аспекте, в данном документе предлагаются способы облегчения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с острым миелоидным лейкозом у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое облегчает, по меньшей мере, один симптом, ассоциированный с острым миелоидным лейкозом. В некоторых вариантах реализации изобретения симптомы включают увеличение селезенки и боль в селезенке, анемию, боль в костях, усталость, лихорадку, ночную потливость, потерю веса, слабость, обмороки, кровотечения из носа, кровоподтеки, кровотечение изо рта и десен, кровавый стул или инсульт. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну N3' → P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации

изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутривнутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе индивидуум несет V617F мутацию, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. В некоторых вариантах реализации изобретения подавление КОЕ-Мег не зависит от уменьшения аллельной нагрузки JAK2. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0024]** Соответственно, в одном аспекте, в данном документе предлагаются способы для облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с миелодиспластическим синдромом, таким как, например, рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией, рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией и хронический миеломоноцитарный лейкоз у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое облегчает, по меньшей мере, один симптом, ассоциированный с миелодиспластическим синдромом. В некоторых вариантах реализации изобретения симптомы включают отдышку, усталость, слабость, обмороки, кровотечения из носа, кровоподтеки, кровотечение изо рта и десен, кровавый стул, петехии или инсульт. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе, ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид является комплементарным РНК компоненту теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения длина олигонуклеотида равна 10-20 парам оснований. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну N3' → P5' тиофосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе олигонуклеотид дополнительно содержит липидный компонент, связанный с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент связан с 5'- и/или 3'- концом олигонуклеотида посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой глицерин или аминоклицериновый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы

представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы вводят с фармацевтически приемлемым наполнителем. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе ингибитор теломеразы разработан для перорального, внутривенного, подкожного, внутримышечного, топического, внутривнутрибрюшинного, интраназального, ингаляционного или внутриглазного введения. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение терапевтически эффективного количества ингибитора теломеразы включает контактирование одной или более неопластических клеток-предшественников с ингибитором теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективные количества ингибитора теломеразы составляют от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения любого из вариантов реализации изобретения в данном документе введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум является человеком.

#### ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0025] Фигуры 1А и 1В** иллюстрируют влияние иметелстата на рост и дифференциацию мегакариоцитов.

**[0026] Фигура 2** иллюстрирует дозозависимые кривые для колониеобразующих единиц мегакариоцитов (КОЕ-Мег).

[0027] **Фигура 3** иллюстрирует результаты для первичной задачи исследования (гематологического ответа) на II фазе клинических испытаний с целью оценить активность иметелстата (GRN163L) для пациентов с эссенциальной тромбоцитемией, нуждающихся в циторедукции, но на кого не подействовал предшествующий метод лечения, или тех, кто его не переносит, или тех, кто отказался от стандартного метода лечения (II фаза исследований иметелстата на ЭТ). ПО – полный ответ; ЧО – частичный ответ. Время до первого появления количества тромбоцитов  $\leq 400 \times 10^3 / \text{мкл}$  изображено в виде ромбов, а время до полного ответа показано в виде окружностей.

[0028] **Фигуры 4А и 4В** иллюстрируют результаты II фазы ЭТ исследования иметелстата для вторичного исследования конечного критерия оценки (аллельной нагрузки JAK2 V617F). ЧО – частичный ответ. Фигура 4А иллюстрирует % аллельной нагрузки JAK2 V617F, как функцию от времени в месяцах от исходной временной точки. Фигура 4В иллюстрирует среднее значение аллельной нагрузки (%), как функцию от времени от исходной временной точки.

[0029] **Фигура 5** иллюстрирует результаты поисковой конечной точки (КОЕ-Мег) II фазы исследования влияния иметелстата на ЭТ.

[0030] **Фигура 6** иллюстрирует процент роста клеток в культуре после обработки *in vitro* иметелстатом клеток CD34+, полученных от здорового донора, и клеток CD34+ пациента с ОМЛ, на 5-й день, 7-й день и 9-й день.

[0031] **Фигура 7** показывает влияние иметелстата на рост и дифференциацию мегакариоцитов, полученных от пациента с первичным миелофиброзом.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0032] В настоящем изобретении предложены, в частности, способы уменьшения пролиферации неопластических клеток-предшественников и облегчение симптомов у индивидуумов. Изобретение, предложенное в данном документе, описывает, в частности, способы использования соединений ингибиторов теломеразы для лечения и облегчения симптомов, ассоциированных с миелопролиферативными неоплазмами (МПН), такими как эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), истинная полицитемия, миелофиброз и острый миелогенный лейкоз, путем воздействия на неопластические клетки-предшественники,

характерные для этих заболеваний. Изобретение, предложенное в данном документе, описывает также, в том числе, способы использования соединений ингибиторов теломеразы для лечения и облегчения симптомов, ассоциированных с миелодиспластическими синдромами (МДС) такими как, например, рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией, рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией и хронический миеломоноцитарный лейкоз, путем воздействия на неопластические клетки-предшественники, ответственные за образование атипично высокого количества клеток, характерное для этих заболеваний. Изобретатели сделали неожиданное открытие, что ингибиторы теломеразы (такие, как иметелстат) могут эффективно уменьшать уровни тромбоцитов, циркулирующих в крови, у пациентов с МПН или МДС. Кроме того, это уменьшение уровней тромбоцитов наблюдается независимо от распространенной мутации, ассоциированной с ЭТ, в гене янус-киназы 2 (JAK2; наблюдается приблизительно в 50% случаев ЭТ) и является эффективным у индивидуумов, которые были ранее устойчивы к лечению гидроксимочевинной, что является общепринятой терапией первой линии для ЭТ. Также, в данном документе предлагаются способы использования ингибиторов теломеразы (например, иметелстата) для поддержания количества тромбоцитов крови в относительно нормальных пределах в крови у индивидуумов с диагнозом или подозрением на ЭТ. Не привязываясь к теории и в отличие от других общепринятых способов лечения МПН или МДС, соединения ингибиторов теломеразы, использованные в способах данного изобретения, по-видимому, специфично подавляют неопластические клетки-предшественники, стимулирующие злокачественность, отвечающую за это состояние.

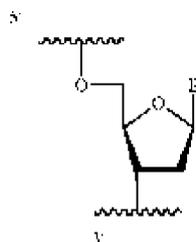
## **I. Общие технологии**

**[0033]** Если не указано иное, практическое применение данного изобретения будет включать общепринятые технологии в химии нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, второе издание (Sambrook et al., 1989) и *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, третье издание (Sambrook and Russel, 2001), (совместно именуемые в дальнейшем как “Sambrook”); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, включая дополнения

от 2001 года); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994). Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы *in vitro* с помощью хорошо известных методов химического синтеза, как описано, например, в Carruthers (1982) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47:411-418; Adams (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:661; Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 5 25:3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33:7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859; Komberg and Baker, *DNA Replication*, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992); Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, New York, 1980); Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584, 1990.

## II. Определения

**[0034]** Термином «нуклеозид» называется фрагмент, имеющий общую структуру, представленную ниже, в которой В представляет собой нуклеиновое основание, а 2' атом углерода может быть замещен, как описано ниже. При включении в олигомер или полимер, 3' атом углерода дополнительно связывается с атомом кислорода или азота.



**[0035]** Эта структура включает в себя 2'-дезоксидеокси и 2'-гидроксильную (*m.e.* дезоксирибозу и рибозу) формы и аналоги. Реже 5'-NH группа может замещать 5'-кислород. Термин «аналоги», по отношению к нуклеозидам, включает синтетические нуклеозиды, имеющие модифицированные фрагменты нуклеиновых оснований (см. определение «нуклеиновое основание» ниже) и/или модифицированные молекулы сахаров, такие как 2'-фтор сахара и дополнительные аналоги. Такие аналоги, как правило, разрабатывают, чтобы повлиять на связывающие свойства, например, стабильность, специфичность или тому подобные. Термин нуклеозид включает природные нуклеозиды, в том числе 2'-дезоксидеокси и 2'-гидроксильную формы, например, как описано у Komberg and Baker, *DNA Replication*, 2-е изд. (Freeman, San Francisco, 1992), и аналогах. Термин «аналоги», по отношению к нуклеозидам, включает синтетические нуклеозиды, имеющие

модифицированные нуклеиновые основания (см. определение «нуклеиновое основание» ниже) и/или модифицированные молекулы сахаров, например, как описано, в общем у Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, New York, 1980). Такие аналоги включают синтетические нуклеозиды, разработанные для усиления связывающих свойств, например, стабильности, специфичности или тому подобных, как описано у Uhlmann and Peyman (*Chemical Reviews* 90:543-584, 1990). Олигонуклеотид, содержащий такие нуклеозиды, и который, как правило, содержит синтетические межнуклеозидные связи, устойчивые к нуклеазам, может сам по себе называться «аналогом».

**[0036]** «Полинуклеотидом» или «олигонуклеотидом» называется полимер или олигомер, состоящий из рибозных и/или дезоксирибозных нуклеозидных субъединиц и имеющий от около 2 до около 200 последовательных субъединиц. Нуклеозидные субъединицы могут соединяться с помощью различных межсубъединичных связей, включая, но не ограничиваясь ими, фосфодиэфирную, фосфотриэфирную, метилфосфонатную, P3'→N5' фосфорамидатную, N3'→P5' фосфорамидатную, N3'→P5' тиофосфорамидатную и тиофосфатную связи. Термин также включает, например, полимеры или олигомеры, имеющие модификации, известные специалистам в данной области техники, сахара (например, 2' замещения), основания (см. определение «нуклеозид» выше) и 3' и 5' концы. В вариантах реализации изобретения, в которых олигонуклеотидная молекула включает множество межсубъединичных связей, каждая связь может быть образована с использованием того же химического состава или может быть использовано сочетание химических связей. Когда олигонуклеотид описывается в виде последовательности букв, например, «ATGUCCTG», следует понимать, что нуклеотиды представлены в порядке 5'→3' слева направо. Такое описание последовательности оснований олигонуклеотида не подразумевает использование какого-либо отдельного типа межнуклеозидной субъединицы в олигонуклеотиде.

**[0037]** «Нуклеиновое основание» включает (i) нуклеиновые основания нативных ДНК и РНК (урацил, тимин, аденин, гуанин и цитозин), (ii) модифицированные нуклеиновые основания или аналоги нуклеиновых оснований (например, 5-метилцитозин, 5-бром урацил или инозин) и (iii) аналоги нуклеиновых оснований. Аналог нуклеинового основания представляет собой соединение, молекулярная структура которого имитирует основание, типичное для ДНК или РНК.

**[0038]** Термин «липид» используется в широком смысле в данном документе для того, чтобы охватить вещества, растворимые в органических растворителях, но плохо растворимые или не растворимые в воде. Термин «липид» включает, но не ограничивается этим, углеводороды, масла, жиры (такие как жирные кислоты и глицериды), стерины, стероиды и производные формы этих соединений. В некоторых вариантах реализации изобретения липиды представляют собой жирные кислоты и их производные, углеводороды и их производные, и стерины, такие как холестерин. Жирные кислоты обычно содержат четное число атомов углерода в неразветвленной цепи (обычно 12-24 атома углерода) и могут быть насыщенным или ненасыщенным, и могут содержать, или быть модифицированными с этой целью, различные замещающие группы. Для простоты термин «жирная кислота» также охватывает производные жирных кислот, такие как жиры или сложные эфиры. В некоторых вариантах реализации изобретения термин «липид» также включает амфипатические соединения, содержащие как липидный, так и гидрофильный компонент.

**[0039]** «Ингибитор теломеразы» представляет собой соединение, способное к уменьшению или ингибированию активности фермента обратной транскриптазы теломеразы в клетке млекопитающего. Такой ингибитор может быть низкомолекулярным соединением, как описано в данном документе или hTR-матричным ингибитором, включающим олигонуклеотид, как описано в данном документе. В одном аспекте ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или иметелстат натрия. В другом аспекте ингибитор теломеразы представляет собой GRN163L.

**[0040]** «hTR-матричный ингибитор» представляет собой соединение, которое блокирует матричную область РНК-компонента теломеразы человека, ингибируя таким образом активность фермента. Ингибитор, как правило, представляет собой олигонуклеотид, способный гибридизироваться с этой областью. В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид включает последовательность, способную гибридизироваться с более специфичным участком этой области, имеющим последовательность 5'-CUAACCCUAAC-3'.

**[0041]** Считается, что соединение «ингибирует пролиферацию клеток», если пролиферация клеток в присутствии соединения меньше, чем в его отсутствии. То есть, пролиферация клеток либо замедляется, либо прекращается в присутствии соединения.

Ингибирование пролиферации раковых клеток может быть подтверждено, например, уменьшением числа клеток или скорости роста клеток, уменьшением массы опухоли или скорости роста опухоли или увеличением показателя выживаемости субъекта, проходящего лечение.

**[0042]** Под олигонуклеотидом, имеющим «связи, устойчивые к нуклеазам», понимается олигонуклеотид, основа которого имеет субъединичные связи, существенно устойчивые к расщеплению, в негибридизованной или гибридизованной форме, обычными внеклеточными и внутриклеточными нуклеазами организма; то есть олигонуклеотид демонстрирует незначительное расщепление нуклеазами или его отсутствие при нормальных условиях для работы нуклеаз в организме, в котором олигонуклеотид находится. N3' → P5' фосфорамидатная (NP) или N3' → P5' тиофосфорамидатная (NPS) связи, описанные ниже, представляют собой связи, устойчивые к действию нуклеаз.

**[0043]** «Индивидуумом» может быть млекопитающее, например, любой распространенный лабораторный модельный организм. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, людей и нечеловекообразных приматов, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, мышей, крыс и других грызунов. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум представляет собой человека.

**[0044]** «Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество», или «клинически эффективное количество» означает количество терапевтического соединения, например, ингибитора теломеразы, вводимого млекопитающему либо в виде разовой дозы, либо как часть серии доз, которое является эффективным для получения желаемого терапевтического эффекта.

**[0045]** В контексте данного документа «неопластическими клетками» называют клетки, которые проявляют относительно автономный рост, и, таким образом, проявляют нарушенный фенотип роста, характеризующийся значительной потерей контроля над клеточной пролиферацией. Неопластические клетки включают клетки, которые могут активно реплицироваться или временно находиться в нерепликативном состоянии покоя ( $G_1$  или  $G_0$ ); аналогичным образом, неопластические клетки могут включать клетки, которые имеют хорошо дифференцированный фенотип, слабо дифференцированный фенотип или смесь обоих типов клеток. Таким образом, не все неопластические клетки

являются репликативными в определенный момент времени. «Неоπλαстические клетки» охватывают, например, клетки доброкачественных новообразований и клетки злокачественных новообразований.

**[0046]** В контексте данного документа «неопластическими клетками-предшественниками» называют клетки клеточной композиции, обладающие способностью становиться неопластическими.

**[0047]** В контексте данного документа термином «неоплазма» или «неоплазия», или «неопластический» называется атипичный рост новых клеток. В отличие от гиперплазии, неопластическая пролиферация продолжает существовать даже при отсутствии первоначального стимула.

**[0048]** В контексте данного документа определения в единственном числе означают также и множественное число, если не указано иное.

**[0049]** Необходимо понимать, что аспекты и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, включают «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу» аспекты и варианты реализации изобретения.

**[0050]** Предполагается, что каждое максимальное численное ограничение, указанное по всему данному описанию изобретения, включает каждый нижний численный предел, как если бы такие нижние численные пределы были четко указаны в данном документе. Каждое минимальное численное ограничение, указанное по всему данному описанию изобретения, будет включать каждый верхний численный предел, как если бы такие верхние численные пределы были четко указаны в данном документе. Каждый числовой диапазон, указанный по всему данному описанию изобретения, будет включать каждый ограничивающий числовой диапазон, попадающий в пределы такого более широкого числового диапазона, как если бы ограничивающие числовые диапазоны были четко указаны в данном документе.

### **III. Соединения ингибиторов теломеразы**

**[0051]** Теломераза представляет собой рибонуклеопротеин, катализирующий добавление теломерных повторяющихся последовательностей (имеющих последовательность 5'-TTAGGG-3' у людей) к концам хромосом. См., например,

Blackburn, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:113-129. Фермент экспрессируется в большинстве раковых клеток, в отличие от зрелых соматических клеток. Потеря теломерной ДНК может играть роль в запуске клеточного старения; см. Harley, 1991, *Mutation Research* 256:271-282. Было показано, что множество раковых клеток являются теломеразо-положительными, включая клетки рака кожи, соединительной ткани, жировой, молочной железы, легкого, желудка, поджелудочной железы, яичника, шейки матки, матки, почки, мочевого пузыря, толстой кишки, предстательной железы, центральной нервной системы (ЦНС), сетчатки и гематологических опухолей (таких как миелома, лейкоз и лимфома). Воздействие на теломеразу может быть эффективным в применении методов лечения, которые в высокой степени различают злокачественные и нормальные клетки, позволяя избежать множества вредных побочных эффектов, которые могут сопутствовать химиотерапевтическим схемам лечения, которые не избирательно воздействуют на делящиеся клетки.

**[0052]** Ингибиторы теломеразы, идентифицированные на сегодняшний день, включают олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды, имеющие связи, устойчивые к действию нуклеаз), а также низкомолекулярные соединения. Дополнительную информацию относительно соединений ингибиторов теломеразы можно найти в патенте США № 7998938, описание которого включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

#### А. Низкомолекулярные соединения

**[0053]** Низкомолекулярные ингибиторы теломеразы включают, например, BRACO19 ((9-(4-(N, N-диметиламино)фениламино)-3,6-би(3-пирролидино пропионамидо) акридин (см. *Mol. Pharmacol.* 61(5):1154-62, 2002); DODC (диэтилоксидикарбоцианин) и теломестатин. Эти соединения могут действовать как G-квардро стабилизаторы, которые усиливают формирование неактивной G-квардро конфигурации в РНК-компоненте теломеразы. Другие низкомолекулярные ингибиторы теломеразы включают VIBR1532 (2-[(E)-3-нафтен-2-ил бут-2-эноиламино]бензойную кислоту) (см. Ward & Autexier, *Mol. Pharmacol.* 68:779-786, 2005; также *J. Biol. Chem.* 277(18):15566-72, 2002); AZT и другие аналоги нуклеозидов, такие как ddG и ara-G (см., например, патенты США №№ 5695932 и 6368789) и некоторые производные тиопиридина, бензо[b]тиофена и пиридо[b]тиофена, описанные в Gaeta et al. в патентах США №№ 5767278, 5770613, 5863936, 5656638 и

5760062, описание которых включено в данный документ посредством ссылки. Другой пример представляет собой 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбокси-2'-[(2,5-дихлорфенил amino)тиа]гидразин, описанный в патенте США № 5760062 и включенный в данный документ посредством ссылки.

В. Ингибиторы теломеразы, базирующиеся на олигонуклеотидах:  
последовательность и состав

**[0054]** Гены, кодирующие как белковый, так и РНК компонент теломеразы человека, клонированы и секвенированы (см. патенты США №№ 6261836 и 5583016, соответственно, оба из которых включены в данный документ посредством ссылки). Олигонуклеотиды могут быть направлены на мРНК, кодирующую белковый компонент теломеразы (человеческого типа, известный как обратная транскриптаза теломеразы человека, или hTERT), или РНК-компонент голофермента теломеразы (человеческого типа, известного как РНК-теломераза человека, или hTR).

**[0055]** Нуклеотидная последовательность РНК-компонента теломеразы человека (hTR) приведена ниже в списке последовательностей (SEQ ID NO: 1), в направлении 5'→3'. Последовательность показана с использованием стандартных сокращений для рибонуклеотидов; специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательность также означает последовательность кДНК, в которой рибонуклеотиды заменены на дезоксирибонуклеотиды, с заменой уридина (U) на тимидин (T). Матричная последовательность РНК-компонента находится в пределах области, определяемой нуклеотидами 46-56 (5'-CUAACCCUAAC-3'), которая комплементарна теломерным последовательностям, составляющим около одной и двух третей повторяющихся теломерных единиц. Матричная область выполняет функции спецификации последовательности теломерных повторов, которые теломераза добавляет к концам хромосом, и имеет важное значение для активности фермента теломеразы (см., например, Chen et al., *Cell* 100: 503-514, 2000; Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (14):7982-7987, 2001). Разработка антисмысловых, рибозимных или малых интерферирующих РНК (миРНК) молекул для ингибирования или причинения разрушения мРНК хорошо известна (см., например, Lebedeva, I, et al. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 41: 403-419, April 2001; Macejak, D, et al., *Journal of Virology*, Vol. 73 (9): 7745-7751, September 1999, and Zeng, Y. et al., *PNAS* Vol. 100 (17) p.

9779-9784, Aug. 19, 2003) и такие молекулы могут быть разработаны для воздействия на мРНК hTERT и тем самым на ингибирование выработки белка hTERT в клетках-мишенях, таких как раковая клетка (см., например, патенты США №№ 6444650 и 6331399).

**[0056]** Олигонуклеотиды, воздействующие на hTR (то есть, на РНК-компонент фермента), действуют как ингибиторы активности фермента теломеразы путем блокирования или препятствования иным образом взаимодействию hTR с hTERT белком, такое взаимодействие необходимо для функционирования теломеразы (см., например, Villeponteau et al., патент США № 6548298).

**[0057]** Предпочтительная область воздействия у hTR представляет собой матричную область, охватывающую нуклеотиды 30-67 из SEQ ID № 1

(GGGUUGC GGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUU  
UUUGUCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCC  
GCGCGCUGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUG  
CCGCCUCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGC  
CCGUUCGCCUCCCGGGGACCUGCGGGCGGGUCGCCUGCCCAGCCCCCGAAC  
CCCGCCUGGAGCCGCGGUCGGCCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGC  
CACCGCGAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGG  
CGAGGUUCACCGUUUCAGGCCGCAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCC  
GCGGGCGCAUUCUCCUGAGCUGUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACA  
CAUGCAGUUCGCUUCCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCC  
GUCACCCCUCGCCGGCAGUGGGGGGCUUGUGAACCCCAAACCUGACUGAC  
UGGGCCAGUGUGCU). Олигонуклеотиды, воздействующие на эту область, в

дальнейшем именуется в данном документе «hTR матричные ингибиторы» (см., например, Herbert et al., *Oncogene* 21 (4):638-42 (2002).) Предпочтительно, такой олигонуклеотид включает последовательность, комплементарную или почти комплементарную некоторому участку области из 11-ти нуклеотидов, имеющую последовательность 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID № 23).

**[0058]** Другая предпочтительная область воздействия представляет собой область, охватывающую нуклеотиды 137-179 hTR (см. Pruzan et al., *Nucl. Acids Research*, 30:559-568, 2002). В пределах этой области последовательность, охватывающая нуклеотиды 141-153, представляет собой предпочтительную мишень. РСТ публикация WO 98/28442

описывает использование олигонуклеотидов, по меньшей мере, 7 нуклеотидов в длину для ингибирования теломеразы, где олигонуклеотиды были разработаны так, чтобы быть комплементарными к доступным участкам последовательности hTR за пределами матричной области, включающим нуклеотиды 137-196, 290 -319 и 350-380 hTR. Предпочтительная hTR последовательность для воздействия приведена ниже и обозначена как SEQ ID №№ 2-22.

**[0059]** Область терапевтического олигонуклеотида, воздействующего на последовательность hTR, предпочтительно в точности комплементарна соответствующей последовательности hTR. Хотя в некоторых случаях могут допускаться несоответствия, ожидается, что они уменьшат специфичность и активность конечного конъюгата олигонуклеотида. В конкретных вариантах реализации изобретения базовая последовательность олигонуклеотида подобрана таким образом, чтобы включать последовательность, по меньшей мере, с 5-ю нуклеотидами, в точности комплементарными hTR-мишени, и усиленное ингибирование теломеразы может быть получено, если применить увеличение длины комплементарной последовательности, например по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13 или по меньшей мере 15 нуклеотидов, в точности комплементарных hTR-мишени. В других вариантах реализации изобретения последовательность олигонуклеотида включает последовательность по меньшей мере от 5 до 20, по меньшей мере от 8 до 20, по меньшей мере от 10 до 20 или по меньшей мере от 10 до 15 нуклеотидов, в точности комплементарных hTR целевой последовательности.

**[0060]** Оптимальная активность, ингибирующая теломеразу, может быть получена, когда полноразмерный олигонуклеотид подобран таким образом, чтобы быть комплементарным к hTR целевой последовательности. Однако необязательно, чтобы полноразмерный олигонуклеотид был в точности комплементарным целевой последовательности, и олигонуклеотидная последовательность может включать области, которые не комплементарны целевой последовательности. Такие области могут быть добавлены, например, чтобы придать соединению другие свойства, например, последовательности могут облегчать очистку. В альтернативном варианте олигонуклеотид может включать множественные повторы последовательности, комплементарной hTR целевой последовательности.

[0061] Если олигонуклеотид должен включать области, которые не комплементарны целевой последовательности, то такие области, как правило, расположены на одном или обоих 5'- или 3'-концах. Примеры последовательностей, воздействующих на РНК-теломеразы человека (hTR), включают следующие:

Целевая последовательность hTR	участок SEQ ID № 1	SEQ ID №
ACATTTTATTATTCTCTCTAG	140-179	2
CGTCTAGAAATGAAAGGCTGAAAGGCGGACAGG	137-166	3
GTGAGAGGCTGGCAGG	137-151	4
GGAAAGCGCGGAGCG	137-149	5
GTGAGAGGCTGGCAGG	139-151	6
GTGAGAGGCTGGC	141-151	7
CGGTGAAAGGCGG	141-153	8
ACGCTGAGAGGCGG	142-154	9
AAAGGCTGAAAGGCGG	142-154	10
ATGAGAGGCTGAGAGGCGG	144-158	11
TAGGCTTAGACAA	42-54	12
CAGTTAGGCTTAG	46-58	13
TAGGCTTAGACAA	42-53	14
TAGGCTTAGAC	42-52	15
GTTAGGCTTAG	46-57	16
GTTAGGCTTAGAC	44-56	17
GTTAGGCTTAGACAA	42-54	18
GGCTTAGAC	44-52	19
CAGTTAGG	50-58	20
CGCTGCTGAGT	54-65	21
CGCCCTTCTCAG	56-67	22

[0062] Межнуклеозидные связи в олигонуклеотиде могут включать любую из доступных олигонуклеотидных химических связей, например, фосфодиэфирную, фосфотриэфирную, метилфосфонатную, P3'→N5' фосфорамидатную, N3'→P5' фосфорамидатную, N3'→P5' тиофосфорамидатную и тиофосфатную. Как правило, но не обязательно, все межнуклеозидные связи внутри олигонуклеотида будут одного типа,

хотя олигонуклеотидный компонент может быть синтезирован с использованием смеси различных связей.

**[0063]** В некоторых вариантах реализации изобретения олигонуклеотид имеет, по меньшей мере, одну N3'→P5' фосфорамидатную (NP) или N3'→P5' тиофосфорамидатную (NPS) связь, соединение которой может быть представлено структурой: 3'-(-NH--P(=O)(--XR)--O)-5', где X представляет собой O или S, а R выбран из группы, состоящей из водорода, алкила и арила и их фармацевтически приемлемых солей, тогда как XR представляет собой OH или SH. В других вариантах реализации изобретения олигонуклеотид включает все NP или, в некоторых вариантах реализации изобретения, все NPS связи.

**[0064]** В одном варианте реализации изобретения последовательность для олигонуклеотида ингибитора hTR-матрицы представляет собой последовательность, комплементарную нуклеотидам 42-54 из SEQ ID № 1, описанной выше. Олигонуклеотид, имеющий такую последовательность (TAGGGTTAGACAA; SEQ ID NO:12) и N3'→P5' тиофосфорамидатные (NPS) связи, обозначается в данном документе как GRN163. Например, см. Asai et al., *Cancer Research* 63:3931-3939 (2003) and Gryaznov et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22(5-8):577-81 (2003).

**[0065]** Олигонуклеотид GRN163, вводимый самостоятельно, показал ингибиторную активность *in vitro* в культуре клеток, включающей клетки эпидермоидной карциномы, эпителия груди, почечной карциномы, почечной аденокарциномы, клетки рака поджелудочной железы, головного мозга, толстой кишки, предстательной железы, лейкоза, лимфомы, миеломы, эпидермиса, шейки матки, яичников и печени.

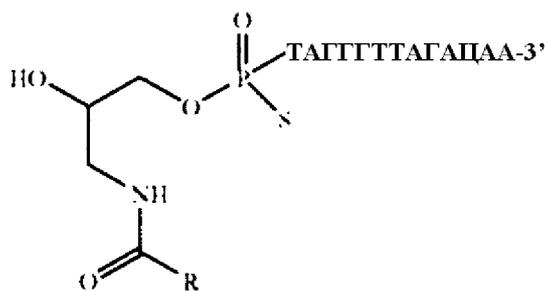
**[0066]** Терапевтическая эффективность олигонуклеотида GRN163 также была испытана и подтверждена в различных моделях опухолей животных, включая рак яичников и легких, как мелкоклеточный, так и не мелкоклеточный (см., например, патент США № 7998938, описание которого включено посредством ссылки).

### С. *Липидно-олигонуклеотидные конъюгаты*

**[0067]** В некоторых аспектах ингибиторы теломеразы, основанные на олигонуклеотидах, описанные в данном документе, включают в себя, по меньшей мере,

одну ковалентно связанную липидную группу (см. публикацию США № 2005/0113325, которая включена в данный документ посредством ссылки). Такая модификация обеспечивает превосходные свойства для введения в клетку, за счет чего равносильный биологический эффект может быть получен с использованием меньшего количества конъюгированного олигонуклеотида по сравнению с немодифицированной формой. Применимо к показаниям лечения человека, это может привести к снижению рисков токсичности и экономии средств.

**[0068]** Липидная группа L представляет собой, как правило, алифатический углеводород или жирную кислоту, включая производные углеводов и жирных кислот, примерами являются соединения с насыщенной неразветвленной цепью, имеющей 14-20 атомов углерода, такие как миристиновая (тетрадекановая) кислота, пальмитиновая (гексадекановая) кислота и стеариновая (октадекановая) кислота, и их соответствующие алифатические углеводородные формы, тетрадекан, гексадекан и октадекан. Примеры других подходящих групп липидов, которые могут быть использованы, представляют собой стерин, такие как холестерин, и замещенные жирные кислоты и углеводороды, в частности, полифторированные формы этих групп. Спектр липидных групп L включает производные, такие как амины, амиды, сложные эфиры и карбаматные производные. Тип производного часто определяется по способу связывания с олигонуклеотидом, как приведено в примере ниже:



когда —R представляет собой —(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub> (пальмитоил). Это соединение обозначается в данном документе как GRN163L (иметелстат).

**[0069]** В одной типовой структуре липидный компонент представляет собой пальмитоил амид (производное пальмитиновой кислоты), соединенный посредством аминоклициринового линкера с 5' тиофосфатной группой олигонуклеотида, имеющего NPS-связь. NPS олигонуклеотид, имеющий последовательность, показанную для GRN163

и соединенный таким образом (как показано ниже) обозначается в данном документе как GRN163L (иметелстат). Во второй типовой структуре липид, как, например, пальмитоил амид, присоединяется через концевую 3' аминокгруппу олигонуклеотида, имеющего NPS-связь.

#### D. Фармацевтические композиции

**[0070]** В некоторых аспектах по данному изобретению при использовании в качестве фармацевтического препарата, соединения ингибиторов теломеразы, описанные в данном документе, могут быть приготовлены в сочетании с фармацевтически приемлемым наполнителем или носителем в качестве фармацевтической композиции.

**[0071]** При использовании в качестве фармацевтического препарата, соединения ингибиторов теломеразы могут вводиться в форме фармацевтических композиций. Эти соединения могут вводиться различными путями, включая пероральный, ректальный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутримышечный и интраназальный. Эти соединения являются эффективными как для инъекционных, так и для пероральных композиций. Такие композиции получают способом, хорошо известным в фармацевтической области техники, и включают по меньшей мере одно активное соединение. При использовании в качестве пероральных композиций соединения ингибиторов теломеразы, описанные в данном документе, защищены от кислотного расщепления в желудке посредством фармацевтически приемлемых протекторов.

**[0072]** Данное изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие в качестве активного ингредиента ингибитор теломеразы, ассоциированный с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями или носителями. При изготовлении композиций по данному изобретению, активный ингредиент обычно смешивают с наполнителем или носителем, разбавляют наполнителем или носителем или заключают внутри такого наполнителя или носителя, который может быть в форме капсулы, саше, листа бумаги или другой емкости. Когда наполнитель или носитель служит разбавителем, он может быть твердым, полутвердым или жидким материалом, который действует как связывающее вещество, носитель или среда для активного ингредиента. Таким образом, композиции могут быть в форме таблеток, пилюль, порошков, пастилок, саше, крахмальных капсул, эликсиров, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей (как твердое вещество или в жидкой среде), мазей,

содержащих, например, до 10% по весу активного соединения, мягких и твердых желатиновых капсул, суппозиторий, стерильных растворов для инъекций и стерильных упакованных порошков.

**[0073]** При получении лекарственной формы может понадобиться измельчать активную лиофилизированную составляющую, чтобы обеспечить подходящий размер частиц до соединения с другими ингредиентами. Если активная составляющая в основном нерастворима, ее обычно измельчают до размера частиц менее чем 200 меш. Если активная составляющая в основном водорастворима, размер частиц обычно доводят измельчением, чтобы обеспечить в основном равномерное распределение в лекарственной форме, например, около 40 меш.

**[0074]** Удобнее и желательнее подготовить, очистить и/или обработать соответствующую соль активного соединения, например, фармацевтически приемлемую соль. Примеры фармацевтически приемлемых солей обсуждаются в Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," *J. Pharm. Sci.*, Vol. 66, pp. 1-19. Например, если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может быть -COO<sup>-</sup>), тогда соль может быть образована с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются этим, Na<sup>+</sup>. Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (т.е., NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) и замещенные ионы аммония (например, NH<sub>3</sub>R<sup>+</sup>, NH<sub>2</sub>R<sub>2</sub><sup>+</sup>, NHR<sub>3</sub><sup>+</sup>, NR<sub>4</sub><sup>+</sup>).

**[0075]** Некоторые примеры подходящих наполнителей или носителей включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, аравийскую камедь, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, стерильную воду, сироп и метилцеллюлозу. Лекарственные формы могут дополнительно включать: смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; смачивающие агенты; эмульгирующие и суспендирующие агенты; консервирующие агенты, такие как метил- и пропилгидроксibenзоаты; подслащивающие агенты и вкусовые агенты. Композиции по изобретению могут быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечить быстрое, длительное или замедленное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту с использованием процедур, известных в данной области техники.

**[0076]** Композиции могут быть приготовлены в лекарственной форме с однократной дозировкой, причем каждая доза может содержать от около 5 мг до около 100 мг или более, любая из от около 1 мг до около 5 мг, от 1 мг до около 10 мг, от около 1 мг до около 20 мг, от около 1 мг до около 30 мг, от около 1 мг до около 40 мг, от около 1 мг до около 50 мг, от около 1 мг до около 60 мг, от около 1 мг до около 70 мг, от около 1 мг до около 80 мг или от около 1 мг до около 90 мг включительно, включая любой диапазон между этими значениями активного ингредиента. Термин «формы с однократной дозировкой» относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для индивидуумов, причем каждая единица содержит predetermined количество активного материала, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с подходящим фармацевтическим наполнителем или носителем.

**[0077]** Соединения ингибиторов теломеразы эффективны в широком диапазоне доз и, как правило, вводятся в терапевтически эффективном количестве. Следует понимать, однако, что количество соединений ингибиторов теломеразы, вводимое в действительности, будет определяться врачом в свете соответствующих обстоятельств, включая состояние, подлежащее лечению, выбранный путь введения, конкретное вводимое соединение, возраст, вес и реакцию конкретного пациента, тяжесть симптомов у пациента и тому подобное.

**[0078]** Для получения твердых композиций, таких как таблетки, основной активный ингредиент соединение ингибитора теломеразы, смешивают с фармацевтическим наполнителем или носителем для образования твердой предлекарственной композиции, содержащей гомогенную смесь соединения по данному изобретению. Что касается этих предлекарственных композиций как гомогенных, то это означает, что активный ингредиент диспергирован равномерно по всей композиции, так что композицию можно легко разделить на равно эффективные формы с однократной дозировкой, такие как таблетки, пилюли и капсулы.

**[0079]** Таблетки или пилюли по данному изобретению могут быть покрыты или составлены иным образом, чтобы обеспечить лекарственную форму, преимущественно пролонгированного действия, и предохранить соединения ингибиторов теломеразы от кислотного гидролиза в желудке. Например, таблетка или пилюля может содержать

внутренний дозированный и наружный дозированный компонент, причем последний находится в виде оболочки поверх первого. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который служит для того, чтобы противостоять разрушению в желудке и позволить внутреннему компоненту проходить неповрежденным в двенадцатиперстную кишку или быть задержанным в выпуске. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий могут быть использованы различные материалы, например, материалы, включающие ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

**[0080]** Жидкие формы, в которые новые композиции по данному изобретению могут быть включены для введения перорально или путем инъекции, включают водные растворы, соответствующим образом ароматизированные сиропы, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии с пищевыми маслами, такими как кукурузное масло, хлопковое масло, кунжутное масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также эликсиры и аналогичные фармацевтические растворители.

**[0081]** Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смеси и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые наполнители, как описано выше. Композиции могут вводиться пероральным или назальным респираторным путем для местного или системного эффекта. Композиции в фармацевтически приемлемых растворителях могут распыляться с использованием инертных газов. Распыленные растворы можно вдыхать непосредственно из распыляющего устройства, или распыляющее устройство может быть присоединено к лицевой маске или дыхательному аппарату с перемежающимся положительным давлением. Раствор, суспензия или порошковые композиции могут также вводиться перорально или назально из устройств, которые вводят лекарственную форму подходящим образом.

#### ***IV. Способы изобретения***

**[0082]** Соединения ингибиторов теломеразы (например, в фармацевтических композициях), предложенные в данном документе, представляются полезными для модулирования болезненных состояний. В некоторых вариантах реализации изобретения нарушение пролиферации клеток ассоциировано с повышенной экспрессией или

активностью теломеразы или клеточным ростом (например, неопластические клетки-предшественники ассоциированы с атипичной продукцией тромбоцитов при эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ)), или с тем и другим.

**[0083]** В некоторых аспектах в данном документе предложены способы облегчения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с МПН, у индивидуума, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах в данном документе предложены способы облегчения по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с МДС, у индивидуума, нуждающегося в этом. Также в данном документе предложены способы уменьшения пролиферации неопластических клеток-предшественников у пациентов с МПН и МДС, а также способы для поддержания концентрации тромбоцитов крови и/или концентрации эритроцитов и/или концентрации лейкоцитов на нормальном уровне у индивидуумов с диагнозом или с подозрением на МПН или МДС.

**[0084]** Миелопролиферативные неоплазмы, или МПН, представляют собой гематологический рак, который возникает из злокачественных гемопоэтических миелоидных клеток-предшественников в костном мозге, таких как клетки-предшественники эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов. Пролиферация злокачественных клеток-предшественников приводит к гиперпродукции любой комбинации лейкоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов, в зависимости от заболевания. Эти гиперпродуцирующие клетки также могут быть атипичными, что приводит к дополнительным клиническим осложнениям. Существуют различные типы хронических миелопролиферативных нарушений. В спектр МПН заболеваний входят эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), истинная полицитемия (ИП) и хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), миелофиброз (МФ), хронический нейтрофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз и острый миелогенный лейкоз (ОМЛ).

**[0085]** Миелодиспластический синдром (МДС) представляет собой группу симптомов, включающих рак крови и костного мозга. Миелодиспластические синдромы (МДС) включают в себя такие заболевания, как рефрактерная анемия, рефрактерная анемия с избытком бластов, рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией, рефрактерная цитопения с однолинейной дисплазией и хронический миеломоноцитарный лейкоз. Незрелые стволовые клетки крови (бласты) не становятся здоровыми эритроцитами, лейкоцитами или тромбоцитами. Бласты погибают в костном мозге или вскоре после того,

как попадают в кровь. Это уменьшает пространство для формирования здоровых лейкоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов в костном мозге.

#### А. Эссенциальная тромбоцитемия

**[0086]** Мегакариоцит представляет собой клетку костного мозга, ответственную за образование тромбоцитов крови (тромбоцитов), необходимых для нормального свертывания крови. Мегакариоциты обычно составляют 1 на 10000 клеток костного мозга, но это число может увеличиться почти в 10 раз в ходе некоторых заболеваний.

**[0087]** Мегакариоциты происходят от гемопоэтических стволовых клеток-предшественников в костном мозге. Как только клетка завершила дифференциацию и превратилась в зрелый мегакариоцит, она начинает процесс образования тромбоцитов. В то время как многие цитокины предположительно играют роль в стимулировании мегакариоцитов к образованию тромбоцитов, существует цитокин тромбопоэтин, который стимулирует мегакариоциты к формированию малых прото-тромбоцитарных отростков. Тромбоциты удерживаются в пределах этих внутренних мембран в цитоплазме мегакариоцитов. Каждый из этих прото-тромбоцитарных отростков может произвести до 2000-5000 новых тромбоцитов после разрыва. В целом, 2/3 из этих вновь образовавшихся тромбоцитов останутся в кровообращении, а 1/3 будет изолирована селезенкой.

**[0088]** Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) представляет собой хроническое нарушение, связанное с повышенным или атипичным образованием тромбоцитов крови.

Формирование тромбоцитов при ЭТ происходит цитокин-независимым образом из мегакариоцитов, образующих тромбоциты нерегулируемым способом. Поскольку тромбоциты участвуют в процессе свертывания крови, атипичное образование может привести к неуместному формированию тромбов или кровотечению, что приводит к увеличению риска желудочно-кишечного кровотечения, инфаркта и инсульта.

**[0089]** Зачастую, у многих пациентов ЭТ протекает бессимптомно; диагностирование, как правило, происходит после анализа крови, в рамках обычного обследования, выявившего высокое количество тромбоцитов. В случае наличия ЭТ симптомов, они могут включать усталость или могут быть связаны с повреждениями малых или крупных сосудов или кровотечением. Повреждения малых сосудов (часто считающиеся вазомоторными по природе) могут привести к головной боли, нарушению зрения или

латентным мигреням, головокружению или предобморочному состоянию, похолоданию или посинению пальцев рук или ног, или к жжению, покраснению и боли в руках и ногах ([www.mpnresearchfoundation.org/Essential-Thrombocythemia](http://www.mpnresearchfoundation.org/Essential-Thrombocythemia)). Тромботические осложнения могут быть достаточно серьезными и приводить к инсульту, транзиторной ишемической атаке (ТИА), инфаркту, тромбозу глубоких вен или легочной эмболии (тромб в легких). Кровотечение может проявляться в виде легких кровоподтеков, кровотечения из носа, меноррагий, желудочно-кишечного кровотечения или крови в моче ([www.mpnresearchfoundation.org/Essential-Thrombocythemia](http://www.mpnresearchfoundation.org/Essential-Thrombocythemia)). У незначительного количества людей с ЭТ впоследствии может развиваться острый лейкоз или миелофиброз, оба из которых могут быть опасными для жизни. Острый миелогенный лейкоз представляет собой один из видов рака крови и костного мозга, который быстро прогрессирует. Миелофиброз представляет собой прогрессирующее нарушение костного мозга, которое приводит к рубцеванию костного мозга, тяжелой анемии и увеличению печени и селезенки.

**[0090]** Согласно данным Всемирной организации здравоохранения для диагностирования ЭТ требуется, чтобы были выполнены критерии A1-A4: (A1) устойчивое количество тромбоцитов на уровне  $> 450 \times 10^9/\text{л}$ ; (A2) в костном мозге наблюдается возрастание числа увеличенных зрелых мегакариоцитов и нет существенного увеличения сдвига влево гранулопоэза или эритропоэза; (A3) не выполняются критерии ВОЗ для полицитемии, первичного миелофиброза, хронического миелоидного лейкоза, миелодиспластического синдрома или других миелоидных неоплазм; и (A4) имеется приобретенная мутация или клональный маркер или нет факторов, дающих реакцию тромбоцитоза (Swedlow, et al., (2008) *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Lyon, IARC Press). При диагностировании ЭТ некоторые практикующие врачи используют критерии британского Комитета по стандартам в гематологии (опубликовано в 2010 году), которые аналогичны критериям ВОЗ 2008, но отличаются в нескольких существенных отношениях (Beer, et al., (2010) *Blood* 117(5): 1472-1482).

**[0091]** Тесты, которые могут быть выполнены для диагностирования ЭТ, включают: (1) анализы крови, чтобы исключить другие причины высокого количества тромбоцитов, в том числе тесты на недостаточность железа и показатели воспаления (другие заболевания, имитирующие заболевания крови также исключаются); (2) тесты на мутации в JAK2 гене

(встречающиеся примерно в 50% случаев) или MPL (встречающиеся в до 5% случаев); (3) биопсии костного мозга для поиска классических признаков ЭТ, включая увеличение предшественников тромбоцитов. Дополнительную информацию, связанную с диагностированием ЭТ, можно найти в публикации заявки на патент США № 2006/0166221, которая включена в данное описание посредством ссылки.

**[0092]** Как правило, ЭТ лечат путем использования модификации факторов риска сердечнососудистых заболеваний, антитромбоцитарной терапии и циторедуктивной терапии (Beer, et al., *Blood* 117(5): 1472-1482; в дальнейшем (Beer et al., 2010). Касательно сердечнососудистых факторов риска, пациентов обследуют на наличие гипертонии, диабета, курения, гиперхолестеринемии и ожирения, и, в случае выявления заболеваний, лечат согласно надлежащими руководствам для этих заболеваний (Beer et al., 2010). Антитромбоцитарная терапия включает, но не ограничивается этим, аспирин, если он не противопоказан, и антитромбоцитарные агенты, такие как клопидогрель. Пациенты с ЭТ могут быть разделены на основании тромбозного риска; пациенты с высоким риском представляют собой людей в возрасте старше 60 лет, имевшие прежде тромбозные случаи, или людей с количеством тромбоцитов более чем  $1500 \times 10^9/\text{л}$ ; для этих пациентов высокого риска, скорее всего, будет полезна циторедуктивная терапия (Beer et al., 2010).

**[0093]** Несмотря на возможный повышенный риск преобразования в лейкозы в случае лечения пациентов с ЭТ гидроксикарбамидом (гидроксимочевиной), она остается терапией первой линии для большинства пациентов, нуждающихся в лечении (Beer et al., 2010). Другие методы лечения включают, но не ограничиваются ими, интерферон, анагрелид, пипоброман, бусульфан и облучение радиоактивным фосфором.

**[0094]** Современная лекарственная терапия для ЭТ не обладает целебными свойствами, и существует мало доказательств того, что она вызывает благоприятное воздействие на выживаемость. Ни одна из этих настоящих стратегий не направлена ни на непосредственно мишени либо злокачественные клональные клетки, ответственные за заболевание, развитие болезни, ни на симптомы, которые испытывают пациенты и которые влияют на качество жизни. Целью современной терапии при ЭТ является предотвращение тромбогеморрагических осложнений. Значительный прогресс в выяснении патогенеза ЭТ был сделан с описанием в 2005 году соматической мутации JAK2 (V617F), которая присутствует у 50-60% больных ЭТ (James, et al. (2005) *Nature* 434:

1144-1148; Kralovics, et al. (2005) *N Engl J Med* 352: 1779-90; Baxter, et al. (2005) *Lancet* 365: 1054-61; Levine, et al. (2005) *Cancer Cell* 7: 387-97). Помимо наличия и аллельной нагрузки мутации JAK2/V617F, начальный лейкоцитоз был недавно признан новым фактором риска, связанным с заболеванием при ЭТ (Ziakas PD. (2008) *Haematologica* 93: 1412-1414; Carobbio et al., (2007) *Blood* 109: 2310-2313). Также существуют доказательства, что лейкоцитоз имеет прогностическое значение и может рассматриваться как причина сосудистых изменений (Barbui, et al., (2009) *Blood* 114: 759-63).

### В. Истинная полицитемия

**[0095]** У пациентов с истинной полицитемией (ИП) отмечалось увеличение образования эритроцитов. Лечение направлено на снижение чрезмерного количества эритроцитов. ИП может развиваться в поздней фазе своего течения, которое напоминает первичный миелофиброз с цитопенией и гипоплазией и фиброз костного мозга. У большинства пациентов с ИП обнаружена мутация гена янус-киназы 2 (JAK2), расположенного на 9-й хромосоме, которая приводит к увеличению пролиферации и выживания гемопоэтических предшественников *in vitro*. У пациентов с ИП повышается риск сердечнососудистых и тромбозных случаев и преобразования в острый миелогенный лейкоз или первичный миелофиброз. Лечение ИП включает кратковременную хроническую флеботомию для поддержания гематокрита ниже 45% у мужчин и 40% у женщин. Другие возможные методы лечения включают гидроксимочевину, интерферон альфа и низкие дозы аспирина.

### С. Миелофиброз

**[0096]** Миелофиброз или МФ представляет собой миелопролиферативную неоплазму того же спектра заболеваний, что и ЭТ. У пациентов с МФ часто наблюдается мутация JAK2 V617F в костном мозге. Время от времени ЭТ развивается в МФ. В настоящее время ингибирование JAK2 считается стандартом лечения МФ в странах, где санкционирован руксолитиниб (Jakafi®), ингибитор янус-киназы. Но отсутствуют доказательства того, что ингибиторы JAK2, такие как Jakafi®, селективно подавляют пролиферацию лейкозного клона, отвечающего за болезнь, и, таким образом, они не могут «модифицировать заболевание».

### Д. Острый миелогенный лейкоз

**[0097]** Острый миелогенный лейкоз (ОМЛ) представляет собой рак миелоидной линии клеток крови. ОМЛ представляет собой наиболее распространенный острый лейкоз, поражающий взрослых. Пациенты с ОМЛ имеют быстрый рост атипичных лейкоцитов, которые накапливаются в костном мозге и препятствуют образованию нормальных клеток крови. Замена нормального костного мозга на лейкозные клетки вызывает снижение эритроцитов, тромбоцитов и нормальных лейкоцитов. Симптомы ОМЛ включают утомляемость, одышку, легкие кровоподтеки и кровотечения и повышенный риск инфицирования. Как острый лейкоз, ОМЛ быстро прогрессирует и, как правило, приводит к смертельному исходу в течение недель или месяцев, если не проводить лечение. Стандартное лечение ОМЛ представляет собой лечение химиотерапией, направленной на индукцию ремиссии; дополнительно, пациентам могут быть пересажены гемопоэтические стволовые клетки.

#### Е. Миелодиспластический синдром

**[0098]** Миелодиспластический синдром (МДС) представляет собой группу симптомов, включающих рак крови и костного мозга. Незрелые стволовые клетки крови (бласты) не становятся здоровыми эритроцитами, лейкоцитами или тромбоцитами. Бласты погибают в костном мозге или вскоре после того, как попадают в кровь. Это уменьшает пространство для формирования здоровых лейкоцитов, эритроцитов и/или тромбоцитов в костном мозге.

**[0099]** Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой набор гематологических заболеваний, которые включают неэффективное образование миелоидного класса клеток крови. У пациентов с МДС часто развивается тяжелая анемия и им требуются частые переливания крови. В некоторых случаях заболевание осложняется, и у пациента развиваются цитопении (низкие показатели крови), вызванные прогрессирующей недостаточностью костного мозга. В некоторых случаях заболевание переходит в острый миелогенный лейкоз (ОМЛ). Если общий процент миелобластов костного мозга повышается выше определенной отметки (20% для ВОЗ и 30% для FAB), то говорят, что произошло преобразование в острый миелогенный лейкоз (ОМЛ).

#### Ф. Способы лечения МПН или МДС с использованием ингибиторов теломеразы

**[00100]** В данном документе предлагаются способы уменьшения пролиферации неопластических клеток-предшественников и облегчения сопутствующих симптомов, у индивидуумов с диагнозом или с подозрением на МПН или МДС посредством введения ингибиторов теломеразы (таких, как любой из ингибиторов теломеразы, описанный в данном документе).

**[0100]** Эти способы могут быть использоваться при адьювантной терапии.

«Адьювантной терапией» называется клиническая терапия, в которой индивидуум имеет историю пролиферативного заболевания и, как правило, (но не обязательно) реагирует на терапию, которая включает, но не ограничивается этим, оперативное вмешательство (такое как хирургическая резекция), лучевая терапия и химиотерапия. Однако из-за истории их пролиферативного заболевания, считается, что эти индивидуумы подвержены риску развития заболевания. Лечение или введением в «адьювантную терапию» называется последующий метод лечения. Уровень риска (то есть, когда индивидуум при адьювантной терапии рассматривают как представителя группы «повышенного риска» или «низкого риска») зависит от нескольких факторов, наиболее часто от степени заболевания во времени первого воздействия.

**[0101]** Способы, предложенные в данном документе, также могут быть осуществлены в «неоадьювантной терапии», то есть, способ может проводиться перед первичной/радикальной терапией. В некоторых вариантах реализации изобретения, индивидуум предварительно подвергался лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум предварительно не подвергался лечению. В некоторых вариантах реализации изобретения, лечение представляет собой терапию первой линии.

### **1. Способы облегчения симптомов миелопролиферативных неоплазм и миелодиспластических синдромов**

**[0102]** В некоторых аспектах данное изобретение относится к способам ингибирования симптомов или заболеваний (недееспособностей, патологий), ассоциированных с миелопролиферативными неоплазмами, как подробно описано выше. По существу, не требуется, чтобы все эффекты заболеваний были полностью предотвращены или изменены, хотя воздействие описанных в данном документе способов, скорее всего, оказывает значительную терапевтическую пользу для пациента. По существу, терапевтическая польза не обязательно состоит в полном предотвращении или

вылечивании конкретного заболевания, произошедшего в результате миелопролиферативных неоплазм, но скорее, может заключать результат, включающий уменьшение или предотвращение симптомов, возникающих в результате нарушения клеточной пролиферации, уменьшение или предотвращение проявления таких симптомов (либо количественно, либо качественно), уменьшение тяжести таких симптомов или их физиологических эффектов и/или усиление восстановления индивидуума после испытывания симптомов миелопролиферативных неоплазм.

**[0103]** В некоторых аспектах данное изобретение относится к способам ингибирования симптомов или состояний (недееспособностей, патологий), ассоциированных с миелодиспластическим синдромом (МДС), как подробно описано выше. По существу, не требуется, чтобы все эффекты заболеваний были полностью предотвращены или изменены, хотя воздействие описанных в данном документе способов, скорее всего, оказывает значительную терапевтическую пользу для пациента. По существу, терапевтическая польза не обязательно состоит в полном предотвращении или излечении конкретного состояния, произошедшего в результате миелодиспластического синдрома, но скорее, может заключать результат, включающий уменьшение или предотвращение симптомов, возникающих в результате нарушения клеточной пролиферации, уменьшение или предотвращение проявления таких симптомов (либо количественно, либо качественно), уменьшение тяжести таких симптомов или их физиологических эффектов и/или усиление восстановления индивидуума после испытывания симптомов миелодиспластического синдрома.

**[0104]** В данном документе выражение «облегчение по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с» нарушением, заболеванием или состоянием (таким как МПН или МДС), обозначает изменение на противоположное, ингибирование развития или предотвращение нарушения или состояния, к которому такой термин применим, или изменение на противоположное, ингибирование развития или предотвращение одного или более симптомов нарушения или состояния, к которому такой термин применим. Более точно, композиция по данному изобретению (например, любое из соединений ингибиторов теломеразы, описанных в данном документе), при введении индивидууму может лечить или предотвращать один или несколько симптомов или состояний, ассоциированных с МПН или МДС, и/или уменьшать или облегчать симптомы или состояния, ассоциированные с этим нарушением. По существу, защита индивидуума от

воздействий или симптомов, возникающих в результате МПН или МДС, включает как предотвращение или уменьшение проявления и/или тяжести последствий нарушения, так и лечение пациента, у которого последствия нарушений уже происходят или начинают происходить. Положительный эффект может быть легко оценен обычным специалистом в данной области техники и/или квалифицированным врачом, который лечит пациента. Предпочтительно, имеется положительное или благотворное различие в тяжести или проявлении, по меньшей мере, одного клинического или биологического показателя, величины или критерия, используемых для оценивания таких пациентов среди тех, которых лечили способами по данному изобретению в сравнении с теми, которых не лечили.

**[0105]** Соответственно, в некоторых аспектах, предложенных в данном документе, предлагаются способы для облегчения, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с МПН или МДС, у индивидуума, нуждающегося в этом, включающие: введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое облегчает по меньшей мере один симптом, ассоциированный с МПН или МДС. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом включает головную боль, головокружение или предобморочное состояние, боль в груди, слабость, обморок, изменение зрения, онемение или покалывание в конечностях, покраснение, пульсирующую или жгучую боль в конечностях (эритромелалгию), увеличение селезенки, кровотечения из носа, кровоподтеки, кровотечение изо рта или десен, кровавый стул, инфаркт (инфаркт миокарда) или инсульт. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид, который может быть комплементарным РНК-компоненту теломеразы и в некоторых случаях может составлять между 10-20 парами оснований в длину. В одном варианте реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В других вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. Олигонуклеотид также может быть соединен с липидным компонентом либо на 5', либо 3' конце, иногда посредством линкера (такого, как глицерин или аминоглицериновый линкер). В некоторых вариантах реализации изобретения липидный компонент представляет собой пальмитоиловый (C16) компонент. Еще в одном варианте реализации изобретения ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора

теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В других вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. Еще в одном варианте реализации изобретения подавление КОЕ-Мег является независимым от уменьшения аллельной нагрузки JAK2 V617F. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум может быть устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы (включая, но не ограничиваясь ими, гидроксимочевину, анагрелид или интерферон альфа-2В). В другом варианте реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0106]** В некоторых аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимые пациенту, составляет от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В других аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В других аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы находится, по крайней мере, в пределах около любого из значений: 6,5 мг/кг, 6,6 мг/кг, 6,7 мг/кг, 6,8 мг/кг, 6,9 мг/кг, 7 мг/кг, 7,1 мг/кг, 7,2 мг/кг, 7,3 мг/кг, 7,4 мг/кг, 7,5 мг/кг, 7,6 мг/кг, 7,7 мг/кг, 7,8 мг/кг, 7,9 мг/кг, 8 мг/кг, 8,1 мг/кг, 8,2 мг/кг, 8,3 мг/кг, 8,4 мг/кг, 8,5 мг/кг, 8,6 мг/кг, 8,7 мг/кг, 8,8 мг/кг, 8,9 мг/кг, 9 мг/кг, 9,1 мг/кг, 9,2 мг/кг, 9,3 мг/кг, 9,4 мг/кг, 9,5 мг/кг, 9,6 мг/кг, 9,7 мг/кг, 9,8 мг/кг, 9,9 мг/кг, 10 мг/кг, 10,1 мг/кг, 10,2 мг/кг, 10,3 мг/кг, 10,4 мг/кг, 10,5 мг/кг, 10,6 мг/кг, 10,7 мг/кг, 10,8 мг/кг, 10,9 мг/кг, 11 мг/кг, 11,1 мг/кг, 11,2 мг/кг, 11,3 мг/кг, 11,4 мг/кг, 11,5 мг/кг, 11,6 мг/кг, 11,7 мг/кг, 11,8 мг/кг, 11,9 мг/кг, 12 мг/кг, 12,1 мг/кг, 12,2 мг/кг, 12,3 мг/кг, 12,4 мг/кг, 12,5 мг/кг, 12,6 мг/кг, 12,7 мг/кг, 12,8 мг/кг, 12,9 мг/кг или 13 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, не равняется 9,4 мг/кг.

[0107] В некоторых аспектах изобретения индивидуум с диагнозом или с подозрением на МПН несет мутацию V617F, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). Способы определения носительства индивидуумом этой мутации, а также определения аллельной нагрузки многочисленны и хорошо известны в данной области техники (см., например, заявки на патент США № 2009/0162849, 2007/0224598 и 2009/0162849, описание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки). В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума.

## **2. Способы уменьшения пролиферации неопластической клетки**

[0108] В другом аспекте в данном документе предлагаются способы уменьшения пролиферации неопластических клеток-предшественников у индивидуума с диагнозом или с подозрением на эссенциальную тромбоцитопению, включающие: введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое уменьшает пролиферацию неопластических клеток-предшественников у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид, который может быть комплементарным РНК-компоненту теломеразы и в некоторых случаях может составлять между 10-20 парами оснований в длину. В одном варианте реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACAA. В других вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. Олигонуклеотид также может быть соединен с липидным компонентом либо на 5', либо 3' конце, иногда посредством линкера (такого, как глицерин или аминоглицериновый линкер). В некоторых вариантах реализации изобретения липидный компонент представляет собой пальмитоилловый (C16) компонент. Еще в одном варианте реализации изобретения ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы не препятствует цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В других вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. Еще в одном варианте реализации изобретения подавление КОЕ-Мег является независимым от уменьшения аллельной нагрузки JAK2 V617F. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум может быть устойчивым или не переносящим

предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы (включая, но не ограничиваясь ими, гидроксимочевину, анагрелид или интерфеорн  $\alpha$ -2B). В другом варианте реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0109]** В некоторых аспектах изобретения уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников приводит к тому, что количество тромбоцитов становится меньше любого из значений около:  $600 \times 10^3$  / мкл,  $575 \times 10^3$  / мкл,  $550 \times 10^3$  / мкл,  $525 \times 10^3$  / мкл,  $500 \times 10^3$  / мкл,  $475 \times 10^3$  / мкл,  $450 \times 10^3$  / мкл,  $425 \times 10^3$  / мкл,  $400 \times 10^3$  / мкл,  $375 \times 10^3$  / мкл,  $350 \times 10^3$  / мкл,  $325 \times 10^3$  / мкл,  $300 \times 10^3$  / мкл,  $275 \times 10^3$  / мкл,  $250 \times 10^3$  / мкл,  $225 \times 10^3$  / мкл,  $200 \times 10^3$  / мкл,  $175 \times 10^3$  / мкл или  $150 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума, включая, в том числе, значения между этими числами. В других аспектах изобретения уменьшение пролиферации неопластических клеток-предшественников приводит к уменьшению количества тромбоцитов (и достижению одного из значений, описанных выше) в крови индивидуума в пределах около одного из указанных периодов: 24 недели, 23 недели, 22 недели, 21 неделя, 20 недель, 19 недель, 18 недель, 17 недель, 16 недель, 15 недель, 14 недель, 13 недель, 12 недель, 11 недель, 10 недель, 9 недель, 8 недель, 7 недель, 6 недель, 5 недель, 4 недель, 3 недели или 2 недели или менее после начала введения ингибитора теломеразы.

**[0110]** В некоторых аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В других аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В другом аспекте изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективные количества ингибитора теломеразы включают, по крайней мере, около любого из значений: 6,5 мг/кг, 6,6 мг/кг, 6,7 мг/кг, 6,8 мг/кг, 6,9 мг/кг, 7 мг/кг, 7,1 мг/кг, 7,2 мг/кг, 7,3 мг/кг, 7,4 мг/кг, 7,5 мг/кг, 7,6 мг/кг, 7,7 мг/кг, 7,8 мг/кг, 7,9

мг/кг, 8 мг/кг, 8,1 мг/кг, 8,2 мг/кг, 8,3 мг/кг, 8,4 мг/кг, 8,5 мг/кг, 8,6 мг/кг, 8,7 мг/кг, 8,8 мг/кг, 8,9 мг/кг, 9 мг/кг, 9,1 мг/кг, 9,2 мг/кг, 9,3 мг/кг, 9,4 мг/кг, 9,5 мг/кг, 9,6 мг/кг, 9,7 мг/кг, 9,8 мг/кг, 9,9 мг/кг, 10 мг/кг, 10,1 мг/кг, 10,2 мг/кг, 10,3 мг/кг, 10,4 мг/кг, 10,5 мг/кг, 10,6 мг/кг, 10,7 мг/кг, 10,8 мг/кг, 10,9 мг/кг, 11 мг/кг, 11,1 мг/кг, 11,2 мг/кг, 11,3 мг/кг, 11,4 мг/кг, 11,5 мг/кг, 11,6 мг/кг, 11,7 мг/кг, 11,8 мг/кг, 11,9 мг/кг, 12 мг/кг, 12,1 мг/кг, 12,2 мг/кг, 12,3 мг/кг, 12,4 мг/кг, 12,5 мг/кг, 12,6 мг/кг, 12,7 мг/кг, 12,8 мг/кг, 12,9 мг/кг или 13 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, не равняется 9,4 мг/кг.

**[0111]** В некоторых аспектах изобретения индивидуум с диагнозом или с подозрением на ЭТ несет мутацию V617F, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума.

### **3. Способы поддержания нормальных уровней циркулирующих тромбоцитов**

**[0112]** В других аспектах изобретения в данном документе предложен способ поддержания количества тромбоцитов крови менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума с диагнозом или с подозрением на эссенциальную тромбоцитопению, включающий: введение клинически эффективного количества ингибитора теломеразы индивидууму, которое поддерживает количество тромбоцитов крови менее чем около  $400 \times 10^3$  / мкл у индивидуума. В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор теломеразы включает олигонуклеотид, который может быть комплементарным РНК-компоненту теломеразы и в некоторых случаях может составлять между 10-20 парами оснований в длину. В одном варианте реализации изобретения олигонуклеотид содержит последовательность TAGGGTTAGACA. В других вариантах реализации изобретения олигонуклеотид содержит N3' → P5' тиофосфорамидатные межнуклеозидные связи. Олигонуклеотид также может быть соединен с липидным компонентом либо на 5', либо 3' конце, иногда посредством линкера (такого, как глицерин или аминоклицириновый линкер). В некоторых вариантах реализации изобретения липидный компонент представляет собой пальмитоилловый (C16) компонент. Еще в одном варианте реализации изобретения ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы не препятствует

цитокин-зависимому росту мегакариоцитов. В других вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы препятствует цитокин-независимому росту мегакариоцитов. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибитора теломеразы подавляет КОЕ-Мег. Еще в одном варианте реализации изобретения подавление КОЕ-Мег является независимым от уменьшения аллельной нагрузки JAK2 V617F. В некоторых вариантах реализации изобретения индивидуум может быть устойчивым или не переносящим предшествующую терапию, которая не основана на ингибиторе теломеразы (включая, но не ограничиваясь ими, гидроксимочевину, анагрелид или интерфеорн  $\alpha$ -2B). В другом варианте реализации изобретения индивидуум является человеком.

**[0113]** В некоторых аспектах изобретения введение ингибиторов теломеразы (таких, как любой из ингибиторов теломеразы, описанных в данном документе) поддерживает количество тромбоцитов на физиологически нормальных уровнях. В некоторых вариантах реализации изобретения введение ингибиторов теломеразы поддерживает количество тромбоцитов ниже одного из указанных приблизительных значений:  $600 \times 10^3$  / мкл,  $575 \times 10^3$  / мкл,  $550 \times 10^3$  / мкл,  $525 \times 10^3$  / мкл,  $500 \times 10^3$  / мкл,  $475 \times 10^3$  / мкл,  $450 \times 10^3$  / мкл,  $425 \times 10^3$  / мкл,  $400 \times 10^3$  / мкл,  $375 \times 10^3$  / мкл,  $350 \times 10^3$  / мкл,  $325 \times 10^3$  / мкл,  $300 \times 10^3$  / мкл,  $275 \times 10^3$  / мкл,  $250 \times 10^3$  / мкл,  $225 \times 10^3$  / мкл,  $200 \times 10^3$  / мкл,  $175 \times 10^3$  / мкл или  $150 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума, включая, в том числе значения между этими числами. В других аспектах изобретения введение ингибиторов теломеразы поддерживает количество тромбоцитов между любыми из указанных приблизительных значений:  $100$ - $400 \times 10^3$  / мкл,  $150$ - $200 \times 10^3$  / мкл,  $150$ - $250 \times 10^3$  / мкл,  $150$ - $300 \times 10^3$  / мкл,  $150$ - $350 \times 10^3$  / мкл,  $150$ - $400 \times 10^3$  / мкл,  $200$ - $250 \times 10^3$  / мкл,  $200$ - $300 \times 10^3$  / мкл,  $200$ - $350 \times 10^3$  / мкл,  $200$ - $400 \times 10^3$  / мкл,  $250$ - $300 \times 10^3$  / мкл,  $250$ - $350 \times 10^3$  / мкл,  $250$ - $400 \times 10^3$  / мкл,  $300$ - $350 \times 10^3$  / мкл,  $300$ - $400 \times 10^3$  / мкл или от  $350$  до  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума.

**[0114]** Еще в одних аспектах изобретения поддержание количества тромбоцитов на физиологически нормальных уровнях требует введения ингибитора теломеразы не чаще, чем один раз в день, через день, каждые три дня, каждую неделю, каждые 11 дней, каждые две недели, каждые три недели, каждый месяц, каждые шесть недель, каждые два месяца или дольше, включая, в том числе, временные периоды между этими значениями.

[0115] В некоторых аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В других аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В других аспектах изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы находится, по крайней мере, в пределах около любого из значений: 6,5 мг/кг, 6,6 мг/кг, 6,7 мг/кг, 6,8 мг/кг, 6,9 мг/кг, 7 мг/кг, 7,1 мг/кг, 7,2 мг/кг, 7,3 мг/кг, 7,4 мг/кг, 7,5 мг/кг, 7,6 мг/кг, 7,7 мг/кг, 7,8 мг/кг, 7,9 мг/кг, 8 мг/кг, 8,1 мг/кг, 8,2 мг/кг, 8,3 мг/кг, 8,4 мг/кг, 8,5 мг/кг, 8,6 мг/кг, 8,7 мг/кг, 8,8 мг/кг, 8,9 мг/кг, 9 мг/кг, 9,1 мг/кг, 9,2 мг/кг, 9,3 мг/кг, 9,4 мг/кг, 9,5 мг/кг, 9,6 мг/кг, 9,7 мг/кг, 9,8 мг/кг, 9,9 мг/кг, 10 мг/кг, 10,1 мг/кг, 10,2 мг/кг, 10,3 мг/кг, 10,4 мг/кг, 10,5 мг/кг, 10,6 мг/кг, 10,7 мг/кг, 10,8 мг/кг, 10,9 мг/кг, 11 мг/кг, 11,1 мг/кг, 11,2 мг/кг, 11,3 мг/кг, 11,4 мг/кг, 11,5 мг/кг, 11,6 мг/кг, 11,7 мг/кг, 11,8 мг/кг, 11,9 мг/кг, 12 мг/кг, 12,1 мг/кг, 12,2 мг/кг, 12,3 мг/кг, 12,4 мг/кг, 12,5 мг/кг, 12,6 мг/кг, 12,7 мг/кг, 12,8 мг/кг, 12,9 мг/кг или 13 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, не равняется 9,4 мг/кг.

[0116] В некоторых аспектах изобретения индивидуум с диагнозом или с подозрением на ЭТ несет мутацию V617F, усиливающую функцию, в гене янус-киназы 2 (JAK2). В некоторых вариантах реализации изобретения, введение ингибитора теломеразы снижает процент аллельной нагрузки JAK2 V617F у индивидуума.

#### G. Введение ингибиторов теломеразы

[0117] В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор теломеразы (такой, как любое из соединений ингибиторов теломеразы, описанных в данном документе) вводят в форме инъекций. Инъекции могут содержать соединение в комбинации с водным инъекционным наполнителем или носителем. Обычным специалистам в данной области техники хорошо известно неограниченное количество примеров подходящих водных инъекционных наполнителей или носителей, и их, а также способы разработки лекарственных форм можно найти в таких стандартных ссылках, как Alfonso AR: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton Pa., 1985. Подходящие водные инъекционные наполнители или носители включают воду, водный солевой раствор, водный раствор декстрозы и тому подобное, которые дополнительно

могут содержать усилители растворимости, такие, как 10% маннитол или другие сахара, 10% глицин или другие аминокислоты. Композицию можно вводить подкожно, внутривенно или внутривенно.

**[0118]** В некоторых вариантах реализации изобретения используется внутривенное введение, и это может быть непрерывная внутривенная инфузия в течение от нескольких минут до часа или более, например, около пятнадцати минут. Вводимое количество может варьировать в широких пределах в зависимости от типа ингибитора теломеразы, размера однократной дозировки, вида наполнителей или носителей и других факторов, хорошо известных обычным специалистам в данной области техники. Ингибитор теломеразы может охватывать, например, от около 0,001% до около 10% (вес/вес), от около 0,01% до около 1%, от около 0,1% до около 0,8% или любое значение в этом диапазоне, а остаток занимает наполнитель(-и) или носитель(-и).

**[0119]** Для перорального введения ингибитор теломеразы может иметь форму, например, таблеток или капсул, полученных обычными способами с фармацевтически приемлемыми наполнителями или носителями, такими как связывающие агенты, наполнители, смазочные материалы, разрыхлители или смачивающие агенты. Жидкие препараты для перорального введения могут принимать форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть представлены в виде сухого продукта для смешивания с водой или другим подходящим растворителем перед использованием. Такие жидкие препараты могут быть получены обычными способами с фармацевтически приемлемыми добавками, такими, как суспендирующие агенты (например, сироп сорбита, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры), эмульгирующие агенты (например, лецитин или аравийская камедь); неводные растворители (например, масла, жирные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил- или пропил-р- гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Препараты могут также при необходимости содержать буферные соли, вкусовые агенты и красители.

**[0120]** В некоторых вариантах реализации изобретения ингибитор теломеразы можно вводить путем ингаляции посредством аэрозольного спрея или распылителя, который может включать подходящий пропеллент, такой как, например, дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторэтан, диоксид углерода или их комбинации. В одном

неограничивающем примере однократная дозировка для аэрозоля под давлением может вводиться посредством дозирующего клапана. В других вариантах реализации изобретения капсулы и картриджи из желатина, например, могут использоваться в качестве ингалятора и могут быть приготовлены в лекарственной форме, чтобы содержать порошкообразную смесь соединения с подходящей порошковой основой, такой как, например, крахмал или лактоза.

**[0121]** В некоторых вариантах реализации изобретения количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, включено в один из следующих диапазонов: от около 0,5 до около 5 мг, от около 5 до около 10 мг, от около 10 до около 15 мг, от около 15 до около 20 мг, от около 20 до около 25 мг, от около 20 до около 50 мг, от около 25 до около 50 мг, от около 50 до около 75 мг, от около 50 до около 100 мг, от около 75 до около 100 мг, от около 100 до около 125 мг, от около 125 до около 150 мг, от около 150 до около 175 мг, от около 175 до около 200 мг, от около 200 до около 225 мг, от около 225 до около 250 мг, от около 250 до около 300 мг, от около 300 до около 350 мг, от около 350 до около 400 мг, от около 400 до около 450 мг или от около 450 до около 500 мг. В некоторых вариантах реализации изобретения количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму в эффективном количестве (например, форма с однократной дозировкой), лежит в диапазоне от 5 мг до около 500 мг, например, от около 30 мг до около 300 мг или около 50 мг до около 200 мг. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрацию ингибитора теломеразы, вводимого индивидууму, разбавляют (около 0,1 мг/мл) или концентрируют (около 180 мг/мл), включая, например, любое значение из от около 0,1 до около 200 мг/мл, от около 0,1 до около 180 мг/мл, от около 0,1 до около 160 мг/мл, от около 0,1 до около 140 мг/мл, от около 0,1 до около 120 мг/мл, от около 0,1 до около 100 мг/мл, от около 0,1 до около 80 мг/мл, от около 0,1 до около 60 мг/мл, от около 0,1 до около 40 мг/мл, от около 0,1 до около 20 мг/мл, от около 0,1 до около 10 мг/мл, от около 2 до около 40 мг/мл, от около 4 до около 35 мг/мл, от около 6 до около 30 мг/мл, от около 8 до около 25 мг/мл, от около 10 до около 20 мг/мл, от около 12 до около 15 мг/мл, или любое значение из около 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1 мг/мл, 1,1 мг/мл, 1,2 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,4 мг/мл, 1,5 мг/мл, 1,6 мг/мл, 1,7 мг/мл, 1,8 мг/мл, 1,9 мг/мл, 2 мг/мл, 2,1 мг/мл, 2,2 мг/мл, 2,3 мг/мл, 2,4 мг/мл или 2,5 мг/мл. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация ингибитора теломеразы по меньшей мере приблизительно равна одному из

указанных значений: 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1,3 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл, 16 мг/мл, 17 мг/мл, 18 мг/мл, 19 мг/мл, 20 мг/мл, 21 мг/мл, 22 мг/мл, 23 мг/мл, 24 мг/мл, 25 мг/мл, 26 мг/мл, 27 мг/мл, 28 мг/мл, 29 мг/мл, 30 мг/мл, 31 мг/мл, 32 мг/мл, 33 мг/мл, 33,3 мг/мл, 34 мг/мл, 35 мг/мл, 36 мг/мл, 37 мг/мл, 38 мг/мл, 39 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл, 200 мг/мл, 210 мг/мл, 220 мг/мл, 230 мг/мл, 240 мг/мл или 250 мг/мл.

**[0122]** Примерные эффективные количества ингибитора теломеразы, вводимые индивидууму, включают, но не ограничиваются ими, по меньшей мере, около 25 мг/м<sup>2</sup>, 30 мг/м<sup>2</sup>, 50 мг/м<sup>2</sup>, 60 мг/м<sup>2</sup>, 75 мг/м<sup>2</sup>, 80 мг/м<sup>2</sup>, 90 мг/м<sup>2</sup>, 100 мг/м<sup>2</sup>, 120 мг/м<sup>2</sup>, 125 мг/м<sup>2</sup>, 150 мг/м<sup>2</sup>, 160 мг/м<sup>2</sup>, 175 мг/м<sup>2</sup>, 180 мг/м<sup>2</sup>, 200 мг/м<sup>2</sup>, 210 мг/м<sup>2</sup>, 220 мг/м<sup>2</sup>, 250 мг/м<sup>2</sup>, 260 мг/м<sup>2</sup>, 300 мг/м<sup>2</sup>, 350 мг/м<sup>2</sup>, 400 мг/м<sup>2</sup>, 500 мг/м<sup>2</sup>, 540 мг/м<sup>2</sup>, 750 мг/м<sup>2</sup>, 1000 мг/м<sup>2</sup> или 1080 мг/м<sup>2</sup>. В различных вариантах реализации изобретения количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, составляет менее, чем около 350 мг/м<sup>2</sup>, 300 мг/м<sup>2</sup>, 250 мг/м<sup>2</sup>, 200 мг/м<sup>2</sup>, 150 мг/м<sup>2</sup>, 120 мг/м<sup>2</sup>, 100 мг/м<sup>2</sup>, 90 мг/м<sup>2</sup>, 50 мг/м<sup>2</sup> или 30 мг/м<sup>2</sup> ингибитора теломеразы. В некоторых вариантах реализации изобретения количество ингибитора теломеразы на одно введение составляет менее чем около 25 мг/м<sup>2</sup>, 22 мг/м<sup>2</sup>, 20 мг/м<sup>2</sup>, 18 мг/м<sup>2</sup>, 15 мг/м<sup>2</sup>, 14 мг/м<sup>2</sup>, 13 мг/м<sup>2</sup>, 12 мг/м<sup>2</sup>, 11 мг/м<sup>2</sup>, 10 мг/м<sup>2</sup>, 9 мг/м<sup>2</sup>, 8 мг/м<sup>2</sup>, 7 мг/м<sup>2</sup>, 6 мг/м<sup>2</sup>, 5 мг/м<sup>2</sup>, 4 мг/м<sup>2</sup>, 3 мг/м<sup>2</sup>, 2 мг/м<sup>2</sup> или 1 мг/м<sup>2</sup>. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, входит в любой из следующих диапазонов: от около 1 до около 5 мг/м<sup>2</sup>, от около 5 до около 10 мг/м<sup>2</sup>, от около 10 до около 25 мг/м<sup>2</sup>, от около 25 до около 50 мг/м<sup>2</sup>, от около 50 до около 75 мг/м<sup>2</sup>, от около 75 до около 100 мг/м<sup>2</sup>, от около 100 до около 125 мг/м<sup>2</sup>, около от 125 до около 150 мг/м<sup>2</sup>, от около 150 до около 175 мг/м<sup>2</sup>, от около 175 до около 200 мг/м<sup>2</sup>, от около 200 до около 225 мг/м<sup>2</sup>, от около 225 до около 250 мг/м<sup>2</sup>, от около 250 до около 300 мг/м<sup>2</sup>, от около 300 до около 350 мг/м<sup>2</sup> или от около 350 до около 400 мг/м<sup>2</sup>. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, составляет от около 5 до около 300 мг/м<sup>2</sup>, например, от около 20 до около 300 мг/м<sup>2</sup>, от около 50 до около 250 мг/м<sup>2</sup>, от около 100 до около 150 мг/м<sup>2</sup>, около 120 мг/м<sup>2</sup> около 130 мг/м<sup>2</sup> или около 140 мг/м<sup>2</sup>, или около 260 мг/м<sup>2</sup>.

**[00123]** В некоторых вариантах реализации любого из вышеупомянутых аспектов изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, включает по меньшей мере - приблизительно - 1 мг/кг, или 2,5 мг/кг, или 3,5 мг/кг, или 5 мг/кг, или 6,5 мг/кг, или 7,5 мг/кг, или 9,4 мг/кг, или 10 мг/кг, или 15 мг/кг или 20 мг/кг. В различных вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, включает менее чем - приблизительно - 350 мг/кг, или 300 мг/кг, или 250 мг/кг, или 200 мг/кг, или 150 мг/кг, или 100 мг/кг, или 50 мг/кг, или 30 мг/кг, или 25 мг/кг, или 20 мг/кг, или 10 мг/кг, или 7,5 мг/кг, или 6,5 мг/кг, или 5 мг/кг, или 3,5 мг/кг, или 2,5 мг/кг или 1 мг/кг ингибитора теломеразы. В других вариантах реализации любого из вышеупомянутых аспектов изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, включает по меньшей мере - приблизительно - 6,5 мг/кг, или 6,6 мг/кг, или 6,7 мг/кг, или 6,8 мг/кг, или 6,9 мг/кг, или 7 мг/кг, или 7,1 мг/кг, или 7,2 мг/кг, или 7,3 мг/кг, или 7,4 мг/кг, или 7,5 мг/кг, или 7,6 мг/кг, или 7,7 мг/кг, или 7,8 мг/кг, или 7,9 мг/кг, или 8 мг/кг, или 8,1 мг/кг, или 8,2 мг/кг, или 8,3 мг/кг, или 8,4 мг/кг, или 8,5 мг/кг, или 8,6 мг/кг, или 8,7 мг/кг, или 8,8 мг/кг, или 8,9 мг/кг, или 9 мг/кг, или 9,1 мг/кг, или 9,2 мг/кг, или 9,3 мг/кг, или 9,4 мг/кг, или 9,5 мг/кг, или 9,6 мг/кг, или 9,7 мг/кг, или 9,8 мг/кг, или 9,9 мг/кг, или 10 мг/кг, или 10,1 мг/кг, или 10,2 мг/кг, или 10,3 мг/кг, или 10,4 мг/кг, или 10,5 мг/кг, или 10,6 мг/кг, или 10,7 мг/кг, или 10,8 мг/кг, или 10,9 мг/кг, или 11 мг/кг, или 11,1 мг/кг, или 11,2 мг/кг, или 11,3 мг/кг, или 11,4 мг/кг, или 11,5 мг/кг, или 11,6 мг/кг, или 11,7 мг/кг, или 11,8 мг/кг, или 11,9 мг/кг, или 12 мг/кг, или 12,1 мг/кг, или 12,2 мг/кг, или 12,3 мг/кг, или 12,4 мг/кг, или 12,5 мг/кг, или 12,6 мг/кг, или 12,7 мг/кг, или 12,8 мг/кг, или 12,9 мг/кг или 13 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, не равняется 9,4 мг/кг. В других вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы, вводимое индивидууму, составляет от 7,5 мг/кг до 9,3 мг/кг. В другом варианте реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. Еще в одних вариантах реализации изобретения эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 9,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг. В некоторых вариантах реализации изобретения в данном документе эффективное количество ингибитора теломеразы составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг.

**[0124]** Примерные частоты дозирования фармацевтических композиций (например, фармацевтической композиции, содержащей любой из ингибиторов теломеразы, описанных в данном документе) включают, но не ограничиваются ими, ежедневный

прием, через день, дважды в неделю, трижды в неделю, еженедельно без перерыва, еженедельно три из четырех недель, один раз в три недели, один раз в две недели, еженедельно две из трех недель. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию вводят около одного раза в неделю, раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 6 недель или один раз в 8 недель. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию вводят, по меньшей мере, около 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 (то есть, ежедневно) раз в неделю, или трижды в день, или дважды в день. В некоторых вариантах реализации изобретения интервалы между каждым введением составляют менее чем около 6 месяцев, 3 месяцев, 1 месяца, 20 дней, 15 дней, 12 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня. В некоторых вариантах реализации изобретения интервалы между каждым введением составляют более, чем около 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 8 месяцев или 12 месяцев. В некоторых вариантах реализации изобретения в режиме дозирования отсутствует перерыв. В некоторых вариантах реализации изобретения интервал между каждым введением составляет не более чем около недели.

**[0125]** В других аспектах изобретения фармацевтическую композицию (например, фармацевтическую композицию, содержащую любой из ингибиторов теломеразы, описанных в данном документе) вводят для поддержания количества тромбоцитов крови на уровне между около  $150 \times 10^3$  / мкл и  $400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума с диагнозом или с подозрением на эссенциальную тромбоцитопению. При таких условиях интервалы между каждым введением могут быть еженедельные, каждые 2 недели, каждые 3 недели или каждые 4 недели или более. В некоторых вариантах реализации изобретения интервалы для введения ингибитора теломеразы могут быть уменьшены со временем, если количество тромбоцитов у индивидуума остается  $< 400 \times 10^3$  / мкл в крови индивидуума. В некоторых аспектах изобретения предусмотрен способ определения частоты введения ингибитора теломеразы для лечения ЭТ, включающий следующие этапы: а) измерение количества тромбоцитов в крови индивидуума любыми способами, известными в данной области техники, и б) введение ингибитора теломеразы, если количество тромбоцитов у индивидуума больше, чем  $400 \times 10^3$  / мкл.

**[0126]** Введение фармацевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей любой из ингибиторов теломеразы, описанных в данном

документе) может быть продолжено на длительный период времени (например, во время поддерживающей терапии), например, от около одного месяца вплоть до около семи лет. В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят в течение по крайней мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 или 84 месяцев. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция вводится до конца жизни индивидуума.

## ПРИМЕРЫ

Пример 1: Приготовление и соединение с липидом олигонуклеотидных N3'→P5' фосфорамидатов (NP) или N3'→P5' тиофосфорамидатов (NPS)

[0127] Этот пример показывает, как синтезировать олигонуклеотидные N3'→P5' фосфорамидаты (NP) или N3'→P5' тиофосфорамиды (NPS), соединенные с липидом.

### ***Материалы и способы***

#### *Исходные соединения*

[0128] Эти соединения могут быть получены, как описано, например, в McCurdy et al., *Tetrahedron Letters* 38: 207-210 (1997) или Pongracz & Gryaznov, *Tetrahedron Letters* 49: 7661-7664 (1999). Начальные мономеры 3'-амино нуклеозидов могут быть получены, как описано в Nelson et al., *J. Org. Chem.* 62: 7278-7287 (1997) или с помощью способов, описанных в Gryaznov et al., публикации заявки США № 2006/0009636.

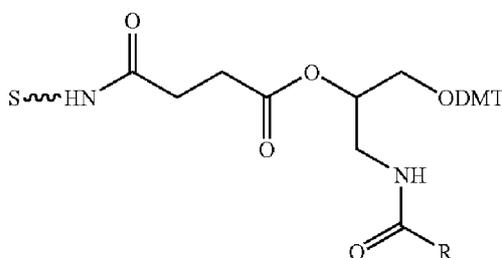
#### *Присоединение липида*

[0129] Для связывания олигонуклеотида с липидным фрагментом L может быть применен широкий спектр синтетических подходов в зависимости от характера выбранной связи; см., например, Mishra et al., *Biochim. et Biophys. Acta* 1264: 229-237 (1995), Shea et al., *Nucleic Acids Res.* 18: 3777-3783 (1995) или Rump et al., *Bioconj. Chem.* 9: 341-349 (1995). Как правило, связывание достигается за счет использования подходящей функциональной группы на конце олигонуклеотида. Например, для образования амидной связи 3'-аминогруппу, расположенную на 3'-конце олигонуклеотидов NP и NPS, можно подвергнуть взаимодействию с карбоновыми кислотами, хлоридами кислот, ангидридами и активными сложными эфирами с использованием подходящих катализаторов

связывания. В качестве функциональных групп также могут использоваться тиоловые группы (см. Kupihar et al., *Bioorg. Med. Chem.* 9: 1241-1247 (2001)). Для синтеза олигонуклеотидов коммерчески доступными являются различные модификаторы с разной длиной цепи, реагирующие с амино- и тиоловыми функциональными группами.

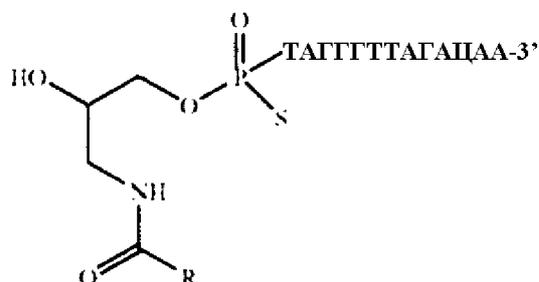
**[0130]** Специальные подходы для присоединения липидных групп к концам олигонуклеотидов NP или NPS описаны в патентной заявке США № 2005/0113325, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В дополнение к упомянутым выше амидным связям, например, липиды могут также быть присоединены к олигонуклеотидной цепи с использованием фосфорамидитного производного липида для образования фосфорамидатной или тиофосфорамидатной связи, которая соединяет липид и олигонуклеотид. Свободный 3'-амино-конец полностью защищенного олигонуклеотида, соединенного с носителем, может также быть подвержен взаимодействию с подходящим альдегидом липида с последующим восстановлением с помощью цианоборгидрида натрия, в результате чего создается аминная связь.

**[0131]** Для прикрепления липида к 5'-концу, как также описано в патентной заявке США № 2005/0113325, олигонуклеотид может быть синтезирован с использованием модифицированной липид-содержащей твердой подложки. Реакция 3'-амино-1,2-пропандиола с алифатическим хлорангидридом (RC(O)Cl) с последующим диметокситритилированием первичного спирта и сукцинированием вторичного спирта обеспечивает получение промежуточного соединения, которое затем связывается с твердым носителем через свободную сукцинил карбоксильную группу. Ниже приведен пример модифицированного носителя, где S- представляет собой носитель CPG, состоящий из длинной алкиламиновой цепочки, а R представляет собой липид.



**[0132]** Эта процедура выполняется путем синтеза олигонуклеотида в направлении от 5' к 3', как описано, например, в Pongracz & Gryaznov (1999), начиная с депротекции и

фосфитилирования -ODMT группы. Это позволяет, например, получить следующую структуру после отщепления от твердой подложки:



[0133] Вышеупомянутая структура, где —R представляет собой —(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub> (пальмитоил), обозначается в данном документе как GRN163L (иметелстат или иметелстат натрия).

#### Анализ FlashPlate™

[0134] Этот анализ проводили, по существу, как описано в Asai et al., *Cancer Research* 63: 3931-3939 (2003). Вкратце, анализ позволяет обнаружить и/или измерить активность теломеразы путем измерения добавления теломерных повторов TTAGGG в биотинилированном субстратном праймере теломеразы. Продукты биотинилирования задерживаются на покрытых стрептавидином микротитрационных плашках, и для измерения теломеразных продуктов используют олигонуклеотидную пробу, комплементарную 3,5 теломерным повторам, меченным <sup>33</sup>P. Несвязанную пробу удаляют путем промывки, а количество задержанных теломеразных продуктов определяют путем подсчета сцинтилляций.

Пример 2: Иметелстат ингибирует спонтанный рост КОЕ-Мег *in vitro*, полученных от пациентов, страдающих эссенциальной тромбоцитемией и миелофиброзом, но не от здоровых индивидуумов.

[0135] Данный пример иллюстрирует дозозависимое подавление колониеобразующих единиц мегакариоцитов (КОЕ-Мег) иметелстатом у пациентов, страдающих эссенциальной тромбоцитемией или миелофиброзом, независимо от мутационного статуса JAKV617F или циторедуктивной терапии, что указывает на специфичность иметелстата по отношению к злокачественным клеткам мегакариоцитов.

### *Материалы и способы*

**[0136]** Для определения влияния иметелстата на рост и дифференциацию мегакариоцитов были использованы следующие способы: (1) из клеток пуповинной крови (ПК) получали клетки, экспрессирующие CD34+, с помощью системы отрицательного разделения клеток; (2) клетки инкубировали с иметелстатом (1-15 мкМ) в бессывороточной жидкой среде StemSpan® SFEM, содержащей цитокиновую лекарственную форму, предназначенную для развития клеток-предшественников мегакариоцитов; (3) клетки пуповинной крови культивировали в течение в общей сложности 17 дней; и (4) в различные моменты времени с помощью проточной цитометрии определялось и оценивалось количество клеток и наличие маркеров дифференцировки (CD41) и теломеразной активности с помощью анализа TRAP.

**[0137]** Для определения кривых доза-эффект у КОЕ-Мег мононуклеарные клетки (МНК) 3 здоровых индивидуумов и 11 пациентов, страдающих ЭТ, и одного пациента, страдающего миелофиброзом (МФ) (диагностировано с использованием критериев ВОЗ 2009), были выделены из периферической крови и суспендированы в IMDM или высеяны на коллаген ± цитокины (TPO, IL3, IL6, SCF, EPO) и обработаны иметелстатом в концентрациях 0, 0,1, 1 и 10 мкМ или не комплементарным контролем, и инкубированы в течение нескольких часов (клеточные суспензии) или 10-12 дней (коллаген плюс 5% CO<sub>2</sub>) при 37°C. Мегакариоциты окрашивали и подсчитывали количество КОЕ-Мег. Для анализа доза-эффект использовали 4-параметрическую лог-логистическую модель для Log<sub>10</sub> (количество колоний) в дозе. Активность теломеразы в МНК измеряли с помощью TRAP анализа.

### *Результаты*

**[0138]** Как видно из фигур 1А и 1В, иметелстат не ингибирует рост или дифференцировку мегакариоцитов у здоровых доноров.

**[0139]** Таблица 1 иллюстрирует спонтанный рост КОЕ-Мег и ингибирование иметелстатом.

<b>Таблица 1: % КОЕ-Мег у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией</b>
--

№ пациента	0 мкМ [%]	0,1 мкМ [%] ± ст. откл. [%]	1 мкМ [%] ± ст. откл. [%]	10 мкМ [%] ± ст. откл. [%]
1*	100	138 ± 5,7	119 ± 3,8	46 ± 1,9
2*	100	106 ± 4,3	48 ± 4,3	39 ± 4,3
3*	100	104 ± 5,7	96 ± 11,3	44 ± 5,7
4*	100	77 ± -	3 ± -	14 ± -
5	100	138 ± 33,7	81 ± 23,6	52 ± 6,7
6	100	117 ± 4,9	52 ± -	45 ± 45,6
7	100	33 ± 5,9	29 ± 0,0	13 ± 2,9
8*	100	141 ± 9,6	49 ± 13,4	14 ± -
9*	100	80 ± 14,1	40 ± 7,1	40 ± -
10	100	130 ± 1,6	66 ± 8,1	3 ± 0,4
11*	100	114 ± 0	95 ± 34,4	49 ± 7,6
N = 11	100	107 ± 8,6	79 ± 11,8	33 ± 9,4
* JAK2 V617F-положительные				

[0140] Таблица 2 иллюстрирует цитокин-стимулированный рост КОЕ-Мег и отсутствие ингибирования иметелстатом.

<b>Таблица 2: КОЕ-Мег (%) у здоровых индивидуумов</b>				
№ донора	0 мкМ [%] C+	0,1 мкМ [%] ± ст. откл. [%] C+	1 мкМ [%] ± ст. откл. [%] C+	10 мкМ [%] ± ст. откл. [%] C+
1	100	93 ± 10	96 ± 5	86 ± 10
2	100	109 ± 58	109 ± 51	173 ± 13
3	100	111 ± 47	122 ± 20	78 ± 16
N=3	100	104 ± 38	109 ± 25	112 ± 13

[0141] Фигура 7 показывает, что иметелстат ингибирует рост или дифференцировку мегакариоцитов у пациентов с миелофиброзом.

[0142] Кривые доза-эффект на Фигуре 2 и результаты на Фигуре 7 показывают, что иметелстат снижает пролиферацию неопластических клеток-предшественников. КОЕ-Мег

из периферической крови показывают, что иметелстат ингибирует неопластический (спонтанный) рост мегакариоцитов у пациентов с ЭТ и МФ, но не ингибирует нормальный (цитокин-зависимый) рост мегакариоцитов у здоровых индивидуумов. Дозозависимое подавление иметелстатом формирования КОЕ-Мег у пациентов с ЭТ не зависит от мутационного статуса JAKV617F или цитоторедуктивной терапии.

Пример 3: II фаза клинических испытаний с целью оценивания активности иметелстата (GRN163L) у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией, нуждающихся в циторедукции, но на кого не подействовала предварительная терапия или тех, кто ее не переносит, или тех, кто отказался от стандартной терапии (II фаза исследований иметелстата на ЭТ).

**[0143]** Этот пример демонстрирует, что иметелстат быстро вызывает и поддерживает значительные гематологические и молекулярные реакции у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ), которые были нечувствительными или не переносили предшествующую терапию.

## **Материалы и способы**

### Схема клинического испытания

**[0144]** Пациентам с ЭТ, которые не переносили, или на которых не подействовала по крайней мере одна из предшествующих терапий (или те, кто отказался от стандартной терапии), и которые нуждались в циторедукции, вводили иметелстат в концентрации 7,5 - 11,7 мг/кг в виде 2-х часового внутривенной инфузии раз в неделю, в дозах, определяемых по реакции тромбоцитов. Когда количество тромбоцитов достигало 250-300 x 10<sup>3</sup>/мкл, начинали поддерживающую дозировку иметелстата, с большей или меньшей дозой, исходя из реакции тромбоцитов и токсической реакции, с целью менее частого введения во время поддерживающей фазы.

**[0145]** ЭТ-специфические критерии включения пациентов были: (1) диагноз ЭТ, подтвержденный критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ); (2) пациент с ЭТ нуждался в циторедукции, но не переносил, или на него не подействовала по крайней мере одна предшествующая терапия (или отказался от стандартной терапии). Лабораторные критерии (в течение 14 дней первого введения исследуемого препарата) были: (1) тромбоциты > 600000/ мкл; (2) абсолютное число нейтрофилов (АЧН) ≥ 1500/ мкл; (3) гемоглобин ≥ 10 г/дл.

**[0146]** Общие критерии для всех пациентов были: (1) желание и способность подписать форму информированного согласия; (2) мужчина или женщина, в возрасте 18 лет или старше; (3) общее состояние согласно ECOG в пределах 0-2. Лабораторные критерии для всех пациентов были (в течение 14 дней первого введения исследуемого препарата): (1) INR (или PT) и aPTT < 1,5 верхней границы нормы (ВГН); (2) креатинин в сыворотке крови ≤ 2 мг/дл; (3) билирубин в сыворотке крови < 2,0 мг/дл (у пациентов с синдромом Жильбера: билирубин в сыворотке крови < 3 x ВГН); (4) AST (SGOT) и ALT (SGPT) ≤ 2,5 x ВГН; (5) щелочная фосфатаза < 2,5 ВГН; (6) любая клинически значимая токсическая реакция от предыдущих методов лечения рака и/или серьезной операции, должна быть восстановлена до уровня 0-1 до начала исследуемого лечения.

**[0147]** Пациенты, соответствующие хотя бы одному из следующих критериев были исключены из отбора и изучения: (1) беременные или кормящие женщины; (2) пациенты, перенесшие трансплантацию стволовых клеток; (3) клинические испытания в течение 4

недель до первого введения изучаемого препарата; (4) клинически значимые сердечнососудистые заболевания или состояния, в том числе: (а) неконтролируемая хроническая сердечная недостаточность (ХСН); (б) потребность в антиаритмической терапии желудочковой аритмии; (в) клинически значимое резкое нарушение проводимости, по усмотрению исследователя; (г) продолжающаяся стенокардия, требующая терапии; (д) сердечно-сосудистые заболевания класса II, III или IV по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (НКА); (е) известный положительный тест на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); (ж) серьезные сопутствующие патологические состояния, в том числе, активное или хронически рецидивирующее кровотечение, клинически значимая активная инфекция, цирроз печени и хронические обструктивные или хронические рестриктивные заболевания легких на усмотрение исследователя; или (з) любые другие тяжелые, острые или хронические медицинские или психические заболевания, отклонения лабораторных показателей от нормы или трудности соблюдения требований протокола, которые могут увеличить риск, связанный с участием в исследовании или изучением введения препарата, или могут повлиять на интерпретацию результатов исследования и, по мнению исследователя, сделает больного неподходящим для исследования.

**[0148]** Первостепенным результатом измерений была наилучшая общая гематологическая скорость реакции (СР) (полная реакция (ПР) + частичная реакция (ЧР)). Временной интервал рассчитывался от времени введения первой дозы (цикл 1, день 1) до конца исследования (12 месяцев после введения последней дозы последнему испытуемому).

**[0149]** Вторичной целью было определить продолжительность гематологической реакции, определить молекулярный ответ (у пациентов с JAK2 V617F / MPL W515<sup>мут.</sup>), и изучить безопасность и переносимость путем наблюдения некоторого количества пациентов с гематологической токсической реакцией, побочными эффектами (ПЭ) 3-й и 4-й степени, и геморрагическими осложнениями. Временной интервал рассчитывался от времени введения первой дозы (цикл 1, день 1) до конца исследования (12 месяцев после введения последней дозы последнему испытуемому). Поисковой целью было изучение спонтанного роста КОЕ-Мег (только выбранные участки).

[0150] В Таблице 3 приведены определения реакций, использованные в данном исследовании. Европейский критерий реакции на лейкоз был адаптирован согласно Barosi et al., *Blood* (2009). Гемовую реакцию считали, как последнюю за 4 недели.

<b>Таблица 3: Определения реакций</b>	
<b>Уровень гематологической реакции</b>	<b>Определение</b>
Полная реакция (ПР)	Нормализация тромбоцитов ( $\leq 400 \times 10^3/\text{мкл}$ ) сохранялась в течение по меньшей мере 4 недель подряд, при отсутствии тромбоэмболических осложнений.
Частичная реакция (ЧР)	Тромбоциты ( $\leq 600 \times 10^3/\text{мкл}$ ) или уменьшение количества тромбоцитов на 50% сохраняется в течение по меньшей мере 4 недель подряд, при отсутствии тромбоэмболических осложнений.
<b>Уровень молекулярной реакции</b>	<b>Определение</b>
Полная реакция (ПР)	Снижение какой-либо конкретной молекулярной патологии в неопределяемых уровнях.
Частичная реакция (ЧР)* *Применяется только для пациентов с исходным значением мутантной аллельной нагрузки $\geq 10\%$	1) Снижение на $\geq 50\%$ от исходного значения у пациентов с $< 50\%$ мутантной аллельной нагрузки в исходном значении ИЛИ 2) Снижение на $\geq 25\%$ от исходного значения у пациентов с $> 50\%$ мутантной аллельной нагрузки в исходном значении.
Реакция отсутствует (РО)	Любая реакция, не удовлетворяющая требованиям полной реакции или частичной реакции.

[0151] Демография пациентов представлена в Таблице 4 ниже.

<b>Таблица 4: Демография пациентов</b>	
<b>Средние характеристики (диапазон)</b>	<b>Всего (N = 14)</b>

Возраст	59,5 лет (21 - 83)
Лет с момента первоначального диагноза	5,8 (0,3 – 24,9)
Среднее исходное количество тромбоцитов	787,5 x 10 <sup>3</sup> /мкл (521 - 1359)
Среднее исходное количество лейкоцитов	6,6 x 10 <sup>3</sup> /мкл (3,0 - 14,6)
Пациенты с JAK2 V617F	7 (50%)
Пациенты с MPL515 <sup>mt</sup>	2 (14,3%)
Более одного курса предварительной терапии (анагредид +/- интерферон)* *Все 14 пациентов предварительное получали гидроксимочевину (6: не подействовала, 8: не переносили)	9 (64%)
По меньшей мере одна предварительная терапия не подействовала	7 (50%)
Не переносили или отказались по меньшей мере от одной терапии	11 (71%)

### **Результаты**

**[0152]** Как видно из Фигуры 3, общая гематологическая реакция в объеме 100% была достигнута у всех 14 пациентов с ЭТ, на которых не подействовали, или которые не переносили обычных терапий. Полная реакция была достигнута у 13 из 14 пациентов (92,9%) и частичная реакция у 1 из 14 пациентов (7,1%). Все пациенты, у которых наблюдалась гематологическая ПР, остаются на лечении. Данные показали, что время первого достижения числа тромбоцитов  $\leq 400 \times 10^3/\text{мкл}$  (отмечено для каждого пациента ромбом) составляло в среднем 3,1 недели (от 2,1 до 23,1 недели), а время полной реакции составляло в среднем 6,1 недель (от 5,1 до 14,1 недель) (Фигура 3).

**[0153]** В Таблице 5 ниже представлены данные о частоте применения препарата для 13 пациентов, которые имели гематологическую полную реакцию и начали проходить поддерживающую терапию. Частота принятия препарата в поддерживающих дозах, как правило, со временем уменьшалась (диапазон составлял от еженедельного приема до приема каждые 7 недель) у большинства (84,6% или 11/14) пациентов, получавших иметелстат каждые 2 недели или реже (в среднем). 85,7% пациентов (6/7), которые могли продолжать терапию после 1 года, продолжили поддерживающую терапию.

<b>Таблица 5: Частота принятия препарата в поддерживающих дозах</b>	
<b>Средняя частота терапии</b>	<b>N = 13</b>
Еженедельно	2 (15,4%)
Каждые 2 недели	3 (23,1%)
Каждые 3 недели	2 (15,4%)
Реже, чем каждые 3 недели	6 (46,1%)

**[0154]** Как показано на Фигуре 4А, процент аллельной нагрузки JAK2 V617F со временем уменьшался у всех пациентов, а молекулярная реакция (ЧР), как показано на Фигуре 4Б, была достигнута у 6 из 7 (85,7%) обследованных пациентов с JAK2 V617F в течении 3-6 месяцев.

**[0155]** В Таблице 6 показан результат касательно поисковой конечной точки (КОЕ-Мег). Снижение спонтанного роста КОЕ-Мег *ex-vivo* было продемонстрировано на двух обследованных пациентах (снижение на 93% и 96% по сравнению с исходным уровнем, соответственно), что подтверждает предварительные данные *ex vivo*.

<b>Таблица 6: Результаты для поисковой конечной точки – КОЕ-Мег</b>		
<b>№ пациента</b>	<b>Исходное значение</b>	<b>1 месяц</b>
4	22,7	1,7
8	8,0	0,3

**[0156]** Как видно из Фигуры 5, спонтанный рост КОЕ-Мег не соответствуют снижению аллельной нагрузки JAK2 у одного пациента (пациент №4).

**[0157]** Эти данные свидетельствуют о том, что иметелстат имеет относительно селективное ингибирующее действие на рост опухолевого(-ых) клона(-ов), которые индуцируют миелопролиферативные новообразования (МПН), такие как эссенциальная тромбоцитемия, и имеет потенциал для изменения биологических процессов, лежащих в основе заболевания.

**[0158]** В Таблице 7 представлены клинически значимые частые негематологические побочные эффекты.

<b>Таблица 7: Безопасность - клинически значимые частые негематологические побочные эффекты</b>		
<b>Частые негематологические побочные эффекты</b>	<b>Все уровни (N = 14)</b>	<b>Уровень 3 (N = 14)</b>
ЖК эффекты (тошнота/диарея/запор)	14 (100%)	0
Инфекции	12(85,7%)	1* (7,1%)
Усталость	9 (64,3%)	1 (7,1%)
Расстройства опорно-двигательного аппарата	9 (64,3%)	0
Кровотечения	8 (57,1%)	1** (7,1%)
Головная боль	7 (50%)	1 (7,1%)
Кашель	7 (50%)	0
Снижение аппетита	7 (50%)	0
Головокружение	6 (42,9%)	
Инфузионные реакции	4 (28,6%)	1*** (7,1%)
Один побочный эффект 4 уровня: трещина шейного позвонка, не связана с принятием иметелстата. Побочные эффекты или тромбоэмболические явления 5-го уровня не были зафиксированы.		
*Целлюлит/ раневая инфекция 3-го уровня		
**Послеоперационная постгеморрагическая анемия 3-го уровня		
***Обмороки 3-го уровня; пациент остается на лечении		

[0159] В Таблице 8 представлены отклонения лабораторных показателей от нормы:

<b>Таблица 8: Безопасность – отклонения лабораторных показателей от нормы</b>			
<b>Лабораторный показатель</b>	<b>Все уровни (N = 14)</b>	<b>Уровень 3 (N = 14)</b>	<b>Уровень 4</b>
АЛТ/АСТ (отклонение от исходного значения)	13 (92,9%)	2 (14,3%)	0
Нейтропения	11 (78,6%)	4 (28,6%)	2 (14,3%)

Анемия (отклонение от исходного значения)	9 (64,3%)	1 (7,1%)*	0
Тромбоцитопения	6 (42,9%)	0	0
Ни одного случая фебрильной нейтропении не было зафиксировано.			
*Послеоперационная геморрагическая анемия			

Пример 4: Пилотное немаскированное исследование эффективности и безопасности иметелстата (GRN163L) у пациентов из группы риска Intermediate-2 согласно модели DIPSS plus или группы высокого риска первичного миелофиброза (ПМФ), постполицитемического миелофиброза (ППМФ) или посттромбоцитемического миелофиброза (ПТМФ)

### **Материалы и способы**

#### Схема клинического испытания

**[0160]** Пациентам из группы риска Intermediate-2 согласно модели DIPSS plus или группы высокого риска первичного миелофиброза (ПМФ), постполицитемического миелофиброза (ППМФ) или посттромбоцитемического миелофиброза (ПТМФ), которые в данный момент не проходили стандартную терапию, вводили иметелстат в концентрации 9,4 мг/кг в виде 2-часового внутривенного вливания один раз в 21 день (группа А). В альтернативном варианте пациентам вводили иметелстат (9,4 мг/кг) в виде 2-часового внутривенного вливания один раз в неделю в течение 3 недель и после этого 1 раз в 21 день (группа Б). Пациенты могли проходить лечение в течение максимум 9 циклов. Пациенты могли продолжать лечение после 9 циклов.

**[0161]** Критерии отбора пациентов с ПМФ включали: (1) диагноз ЭТ, подтвержденный критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ); (2) распространение мегакариоцитов с атипией сопровождается фиброзом ретикулина и/или коллагена или (4) критерии ВОЗ для ХМЛ, ИП, МДС или других миелоидных неоплазм не удовлетворены или (5) реактивный фиброз костного мозга не подтвержден.

**[0162]** Критерии отбора пациентов с ППМФ включали: (1) диагноз ИТ, подтвержденный критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ); (2) фиброз костного мозга 2-3 степени (по шкале 0-3) или 3-4 степени (по шкале 0-4) и (3) два или более условия из: (а) анемия или устойчивая потеря потребности в кровопускании при отсутствии циторедуктивной терапии или (б) лейкоэритробластическая картина периферической крови или (в) увеличивающаяся спленомегалия, определенная как увеличение прощупываемой спленомегалии на 5 см и более или появление новых прощупываемых спленомегалий или (г) развитие одного или более из трех общих симптомов: потеря веса на 10% в течение 6 месяцев, ночная потливость, необъяснимая лихорадка (37,5°C).

**[0163]** Критерии отбора пациентов с ПТМФ включали: (1) диагноз ЭТ, подтвержденный критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ); (2) фиброз костного мозга 2-3 степени (по шкале 0-3) или 3-4 степени (по шкале 0-4) и (3) два или более условия из: (а) анемия и уменьшение уровня гемоглобина на 2 г/дл и более по сравнению с исходным уровнем или (б) лейкоэритробластическая картина периферической крови или (в) увеличивающаяся спленомегалия, определенная как увеличение прощупываемой спленомегалии на 5 см и более или появление новых прощупываемых спленомегалий или (г) повышение уровня кастат дегидрогеназы или (д) развитие одного или более из трех общих симптомов: потеря веса на 10% в течение 6 месяцев, ночная потливость, необъяснимая лихорадка (37,5°C).

**[0164]** Общие критерии для всех пациентов были: (1) желание и способность подписать форму информированного согласия; (2) мужчина или женщина в возрасте 18 лет или старше; (3) общее состояние согласно ECOG в пределах 0-2. Лабораторные критерии для всех пациентов были (в течение 14 дней первого введения исследуемого препарата): (1) AST (SGOT) и ALT (SGPT)  $\leq 2,5$  x ВГН; (2) креатин  $\leq 3$  мг/дл; (3) абсолютное число нейтрофилов  $\geq 1000$ /мкл; (4) количество тромбоцитов  $\geq 50000$ /мкл; (5) отсутствие активного лечения с системной антикоагуляцией, и исходный уровень ПВ и aPTT не превышает 1,5 x ВГН.

**[0165]** Пациенты, соответствующие хотя бы одному из следующих критериев, были исключены из отбора и изучения: (1) беременные и кормящие женщины; (2) любая химиотерапия, иммуномодулирующая медикаментозная терапия, иммуносупрессивная

терапия, прием кортикостероидов, таких как преднизон или эквивалентных в количестве 10 мг/сутки, лечение фактором роста или ингибитором JAK в течении 14 дней и менее до начала исследования; (4) пациенты с другим активным злокачественным новообразованием; (5) известный положительный тест на ВИЧ; (6) любая не устранённая токсическая реакция 2-го уровня от предыдущей противоопухолевой терапии; (6) неполное восстановление от каких-либо предыдущих хирургических процедур; (7) наличие острых активных инфекций, требующих применения антибиотиков; (8) неконтролируемые интеркуррентные заболевания или любые конкурентные состояния, которые могут представлять угрозу для безопасности пациента или соблюдения протокола.

**[0166]** Первостепенным результатом измерений была наилучшая общая частота реакции (РЧ) (клиническое улучшение (КУ) или полная реакция (ПР) или частичная реакция (ЧР). Временной интервал рассчитывался от момента введения первой дозы (цикл 1, день 1) и в течение первых 9 циклов лечения.

**[0167]** Вторичной целью было определить (а) побочные явления, (б) реакцию селезенки: определяется либо как уменьшение минимум на 50% прощупываемой спленомегалии селезенки с исходным размером по меньшей мере 10 см, или селезенки которая прощупывается более чем на 5 см в исходном варианте, (в) независимость переливания: где зависимость переливания определяется как история, по меньшей мере 2 переливаний эритроцитов в течение последнего месяца для поддержания уровня гемоглобина менее 85 г/л, что не было связано с клинически выраженными кровотечениями. Временной интервал рассчитывался с момента введения первой дозы (цикл 1, день 1) и до конца исследования. Поисковой целью была (а) оценка гистологии костного мозга при снижении уровня фиброза костного мозга и (б) определение процента пациентов с исходным лейкоцитозом и тромбоцитозом, у которых количество лейкоцитов и тромбоцитов уменьшилось по меньшей мере на 50% по окончании циклов 3, 6 и 9.

**[0168]** В Таблице 9 указаны определения реакции, использованные в данном исследовании. Для описания реакций на лечение миелофиброза с миелоидной метаплазией были использованы единые критерии, разработанные Международной рабочей группой (МРГ).

<b>Таблица 9. Определения реакций</b>	
	<b>Определение</b>
Полная ремиссия (РП)	<p>Полное исчезновение симптомов и признаков заболевания, включая прощупываемые гепатоспленомегалии.</p> <p>Ремиссия частиц периферической крови определяется как уровень гемоглобина по меньшей мере 110 г/л, количество тромбоцитов по меньшей мере <math>100 \times 10^9/\text{л}</math>, и абсолютное количество нейтрофилов, по меньшей мере, <math>1,0 \times 10^9/\text{л}</math>. Кроме того, все и 3 показателя крови не должны превышать нормальный верхний предел.</p> <p>Нормальная дифференцировка лейкоцитов, в том числе исчезновение ядерных эритроцитов, бластов и незрелых миелоидных клеток в мазке периферической крови, при отсутствии спленэктомии.</p> <p>Гистологическая ремиссия костного мозга определяется как нормальная насыщенность клетками с поправкой на возраст, не более чем 5% миелобластов и уровень остеомиелофиброза не выше, чем 1.</p>
Частичная ремиссия (РЧ)	<p>Требует выполнения всех вышеперечисленных критериев для РП, за исключением требования о гистологической ремиссии костного мозга. Тем не менее, для определения РЧ необходима повторная биопсия костного мозга, которая может показать наличие или отсутствие благоприятных изменений, что, однако, не удовлетворяет критерии для РП.</p>
Клиническое улучшение (КУ)	<p>Требует выполнения одного из следующих условий при отсутствии как прогрессирования заболевания, так и установления РП/РЧ</p> <p>1. Повышение уровня гемоглобина минимум на 20 г/л или исчезновение потребности в переливаниях крови</p>

	<p>(применимо только для пациентов с исходным уровнем гемоглобина до переливания крови 100 г/л</p> <p>2. либо уменьшение минимум на 50% прощупываемой спленомегалии селезенки с исходным размером, по меньшей мере, 10 см, либо селезенка которая прощупывалась более, чем на 5 см в исходном варианте, перестает прощупываться</p> <p>3. увеличение количества тромбоцитов минимум на 100% и абсолютное количество тромбоцитов, по меньшей мере, <math>50000 \times 10^9 / \text{л}</math> (применимо только для пациентов с исходным количеством тромбоцитов ниже, чем <math>50 \times 10^9 / \text{л}</math>)</p> <p>4. увеличение АЧН минимум на 100% и АЧН, по меньшей мере <math>0,5 \times 10^9 / \text{л}</math> (применимо только для пациентов с исходным количеством нейтрофилов ниже, чем <math>1 \times 10^9 / \text{л}</math>).</p>
<p>Прогрессирующее заболевание (ПЗ)</p>	<p>Требуется одно из следующих условий:</p> <p>1. Прогрессирующая спленомегалия, которая определяется как появление ранее отсутствующей спленомегалии, которая прощупывается более, чем на 5 см ниже левой реберной дуги или увеличение минимум на 100% прощупываемого размера спленомегалии с исходным размером 5-10 см или увеличение минимум на 50% прощупываемого размера спленомегалии с исходным размером более 10 см</p> <p>2. Уровень лейкозных преобразований, подтвержденный количеством бластов костного мозга, по меньшей мере, 20%</p> <p>3. Увеличение процентного содержания бластов в периферической крови по меньшей мере на 20%, которое сохраняется в течение по меньшей мере 8 недель.</p>

Стабильное заболевание	ни одно из вышеперечисленных условий
Рецидив	Потеря РП, РЧ или КУ

### ***Результаты***

**[0169]** У пациентов, включенных в исследование, наблюдался клинический эффект. Исследование насчитывало тридцать три пациента; первые 18 пациентов, которых изучали минимум 3 месяца или исключили из исследования, включали: 11 пациентов из группы А и 7 пациентов из группы В; 44% ПМФ, 33% пост ИП МФ и 22% пост ЭТ МФ. Средний возраст составлял 68 лет, 56% пациентов входили в группу высокого риска, а 44% – во 2 группу среднего риска. Семь пациентов нуждались в переливаниях крови. Средний размер селезенки составлял 13 см, и 11 пациентов имели общие симптомы. У 7 пациентов был ненормальный кариотип и 89% пациентов имели JAK2-мутацию. Пятнадцать пациентов (83%) ранее проходили лечение в том числе 7 с ингибитором JAK и 3 с помалидомидом.

### **Токсическая реакция**

**[0170]** В среднем, в последующие 3,2 месяца, 16 (89%) пациентов оставались на лечении и два были исключены в следствии смерти, не связанной с лечением, и прогрессирования заболевания. В группе А не наблюдалось побочных эффектов 4-го уровня, связанных с лечением; побочные эффекты 3-го уровня ограничивались тромбоцитопенией у 27% и анемией у 9% пациентов. В группе В два (29%) пациента страдали тромбоцитопенией 4-го уровня; побочные эффекты 3-го уровня ограничивались тромбоцитопенией, нейтропенией и анемией, каждый из эффектов наблюдался у одного пациента. Снижение дозы было необходимо только для двух (11%) пациентов в связи с миелосупрессией 3-го или 4-го уровней.

### **Эффективность**

**[0171]** Общая реакция составила 44%. Сюда вошли пять (28%) пациентов, у которых выполнялись критерии морфологии костного мозга (КМ) и периферической крови для полной реакции (ПР) (n=4) или частичной реакции (ЧР) (n=1) и 3 пациента с клиническим улучшением, находящиеся на стадии проверки длительности реакции и исчезновения тромбоцитопении 1-го уровня, вызванной медикаментозным лечением. У четырех (22%)

пациентов с ПР наблюдалось снижение уровня фиброза костного мозга (КМ) и восстановление нормальной морфологии мегакариоцитов. Два пациента с ПР, которые нуждались в переливаниях крови, перестали в них нуждаться. Полные молекулярные ответные реакции были зарегистрированы у 2 пациентов с ПР: у одного наблюдалось 10% JAK2V617F и у второго - 50% JAK2V617F. Из 13 пациентов с лейкоцитозом у 10 (77%) количество лейкоцитов нормализовалось или уменьшилось более чем на 50%. У одиннадцати (61%) пациентов наблюдалась полное или частичное исчезновение лейкоэритробластической анемии.

[0172] Позднее был проведен более подробный анализ 22 пациентов, включенных в группы А и В. Результаты представлены в Таблице 10.

<b>Таблица 10. Первичная задача исследования: резюме по общей реакции согласно критериям IWG-MRT 2013, все приемлемые пациенты групп А и В</b>			
	<b>Группа А (N = 11)</b>	<b>Группа В (N = 11)</b>	<b>Всего (N = 22)</b>
<b>Лучшая реакция по IWG-MRT</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
Общая реакция (ПР+ЧР+КУ)	4 (36,4%)	6 (54,5%)	10 (45,5%) (доверительный интервал 95%: 24,4%–67,8%)
Ремиссия (РП+РЧ)	2 (18,2%)	3 (27,3%)	5 (22,7%)
Полная ремиссия	2 (18,2%) <sup>§</sup>	1 (9,1%)	3 (13,6%)
Частичная ремиссия		2 (18,2%)	2 (9,1%)
РЧ и ремиссии КМ		1 (9,1%)	1 (4,5%)
РЧ без ремиссий КМ		1 (9,1%)	1 (4,5%)
Клиническое улучшение	2 (18,2%)	3 (27,3%)	5 (22,7%)
КУ по реакции, связанной с анемией	1 (9,1%)	1 (9,1%)	2 (9,1%)
КУ по реакции в печени		1 (9,1%) <sup>§</sup>	1 (4,5%)
КУ-по реакции в селезенке	1 (9,1%)	1 (9,1%)	2 (9,1%)
Только реакция в селезенке	1 (9,1%)		1 (4,5%)
Стабильное заболевание	6 (54,5%) <sup>¥</sup>	5 (45,5%) <sup>¥</sup>	11 (50%)

<sup>§</sup> Два пациента находятся на стадии проверки в течение 12-недельного срока.

<sup>¥</sup> У двоих пациентов со стабильным заболеванием (СЗ) в качестве лучшей реакции развилось прогрессирующее заболевание, и они были исключены из исследования, один - из-за развития ХММЛ (группа А) второй - в связи с развитием спленомегалии (группа В).

Время первоначальной реакции (среднее) для ПР/ЧР/КУ составляет 2,4 месяца.

Время первоначальной реакции (среднее) для ПР/ЧР составляет 2,8 месяца.

Пример 5: Иметелстат ингибирует спонтанный рост клеток CD34+ *in vitro*, полученных от пациентов с острым миелоидным лейкозом, но не от здоровых индивидуумов

[0173] Данный пример демонстрирует дозозависимое угнетение клеток CD34+ иметелстатом у пациентов с острым миелоидным лейкозом, что говорит о специфичном действии иметелстата на злокачественные клетки CD34+.

### ***Материалы и способы***

[0174] Для определения эффекта иметелстата были использованы следующие способы: (1) клетки костного мозга инкубировали с иметелстатом (0,1-10 мкМ) в анализе колониеобразования и в жидкой культуре в общей сложности в течение 14 дней, и в различные моменты времени производились подсчет и оценка клеток.

[0175] Для определения кривых доза-эффект для КОЕ из периферической крови 4 здоровых индивидуумов или 5 пациентов с ОМЛ были выделены клетки костного мозга, посеяны и обработаны иметелстатом в концентрациях 0, 0,1, 1 и 10 мкМ, а также некомплементарным контролем. Клетки КОЕ-ГМ (CFU-GM) (колониеобразующая единица – гранулоцит, макрофаг) и BFU-E (эритроцитарная бурсообразующая единица) окрашивали и подсчитывали количество CFU-GM и BFU-E.

### ***Результаты***

[0176] Иметелстат не угнетал клетки КОЕ (CFU), полученные из костного мозга здорового донора в течение 14-дневного анализа КОЕ.

[0177] Обработка иметелстатом приводила к угнетению клеток КОЕ костного мозга, полученных от пациента с ОМЛ в течение 14-дневного анализа КОЕ.

[0178] Иметелстат замедлял рост клеток, полученных из костного мозга пациентов с недавно выявленным ОМЛ, в течение 14-дневного анализа на жидкой культуральной среде.

[0179] Иметелстат замедлял рост клеток CD34+, полученных из клеток костного мозга пациентов с ОМЛ, но не из костного мозга нормальных пациентов. На **Фигуре 6** показан процент роста клеток в культуре после обработки *in vitro* иметелстатом клеток CD34+, полученных от здорового донора, и клеток CD34+ от пациента с ОМЛ, на 5-й день, 7 день и 9-й день.

[0180] Примеры, которые предназначены исключительно для иллюстрации данного изобретения и поэтому не должны рассматриваться как таковые, которые ограничивают данное изобретение каким-либо образом, также описывают и детализируют аспекты и варианты реализации данного изобретения, описанные выше. Приведенные примеры и подробное описание приведены только в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения. Все публикации, заявки на патенты и патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, заявка на патент или патент были бы указаны конкретно и отдельно для включения посредством ссылки. В частности, все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него посредством ссылки для раскрытия и описания композиций и методологий, которые могут быть использованы в связи с данным изобретением. Хотя данное изобретение было описано в некоторых деталях с помощью иллюстраций и примеров в целях ясности понимания, для обычных специалистов в данной области техники в свете идей настоящего изобретения будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть дополнительно внесены без отступления от сущности или содержания прилагаемой формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения миелодиспластического синдрома у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение этому индивидууму терапевтически эффективного количества иметелстата или его фармацевтически приемлемой соли, позволяющее эффективно лечить у индивидуума миелодиспластический синдром, причем это терапевтически эффективное количество составляет от 6,5 мг/кг до 11,7 мг/кг, а индивидуумом является человек.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что индивидуум является устойчивым к предшествующей терапии, которая не основана на ингибиторе теломеразы, или является не переносящим такую терапию.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что индивидуум является зависимым от переливаний крови.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль вводят в составе фармацевтического препарата для внутривенного введения.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет от 7,1 мг/кг до 8,9 мг/кг.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество составляет 7,1 мг/кг.

7. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что индивидууму вводят иметелстат натрия.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество иметелстата натрия составляет от 7,5 мг/кг до 9,4 мг/кг.

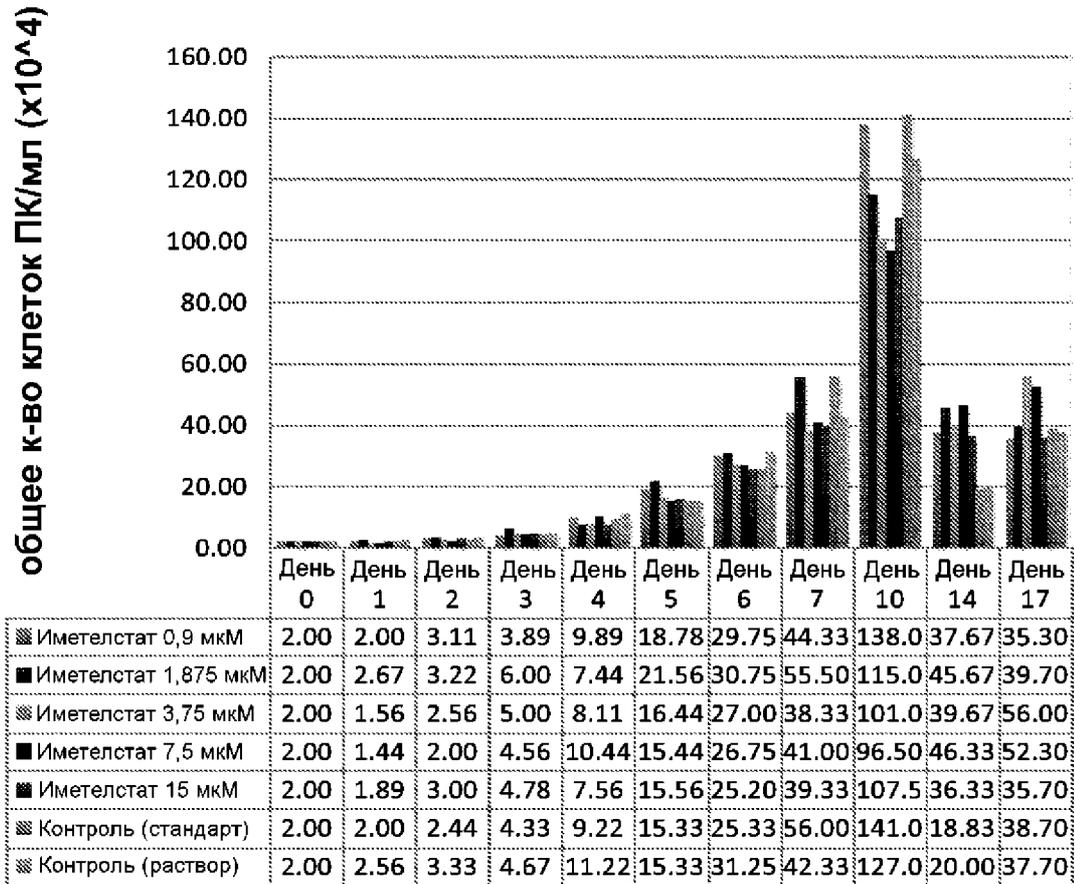
9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество иметелстата натрия составляет 7,5 мг/кг.

10. Способ по п. 4, отличающийся тем, что введение иметелстата или его фармацевтически приемлемой соли включает внутривенное введение на протяжении 2 часов.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что введение иметелстата или его фармацевтически приемлемой соли включает введение один раз в каждые четыре недели.

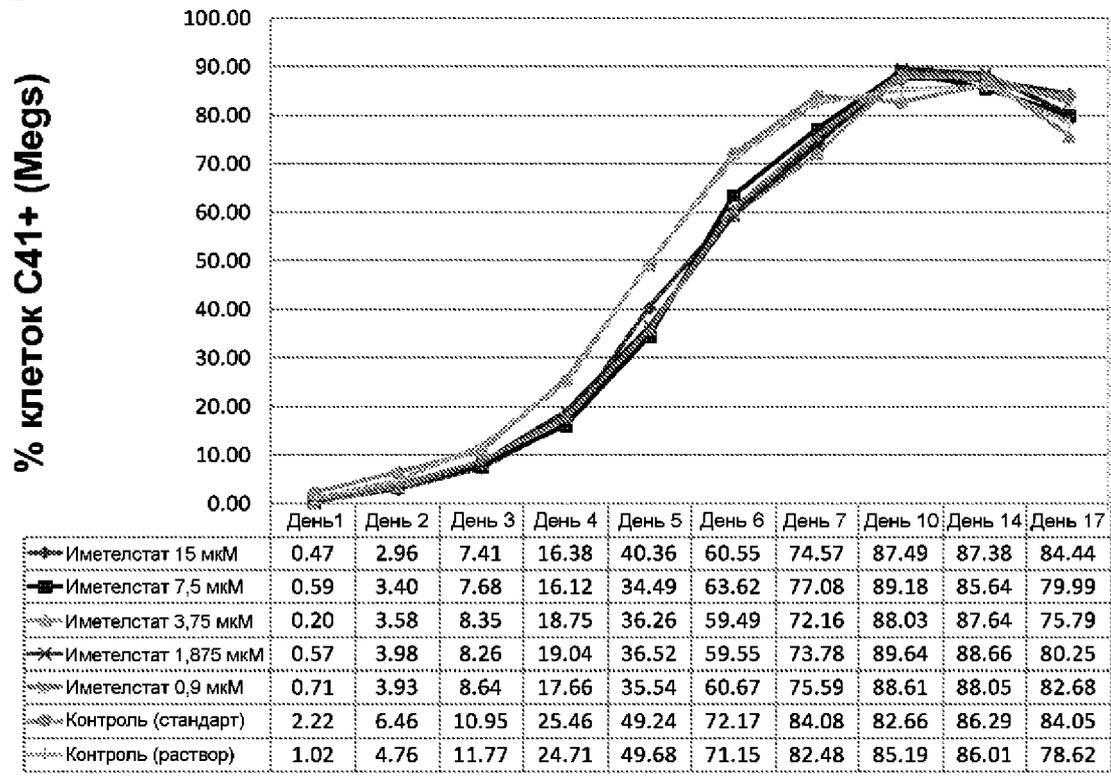
Фигура 1

А

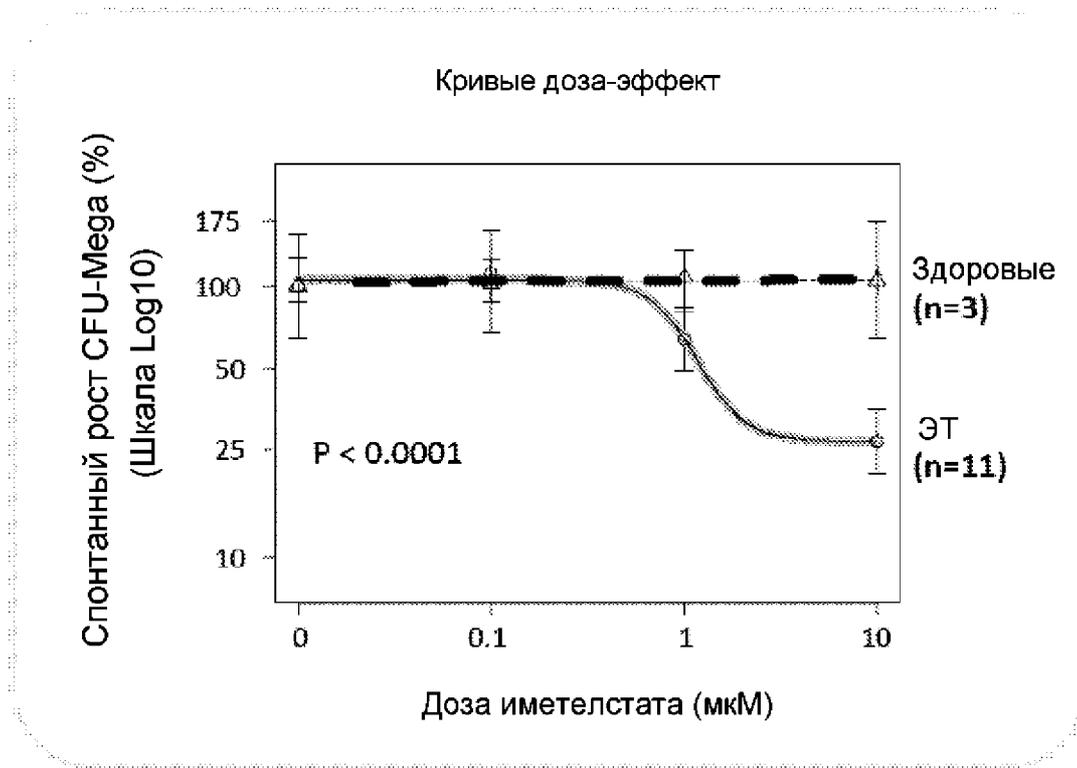


Фигура 1

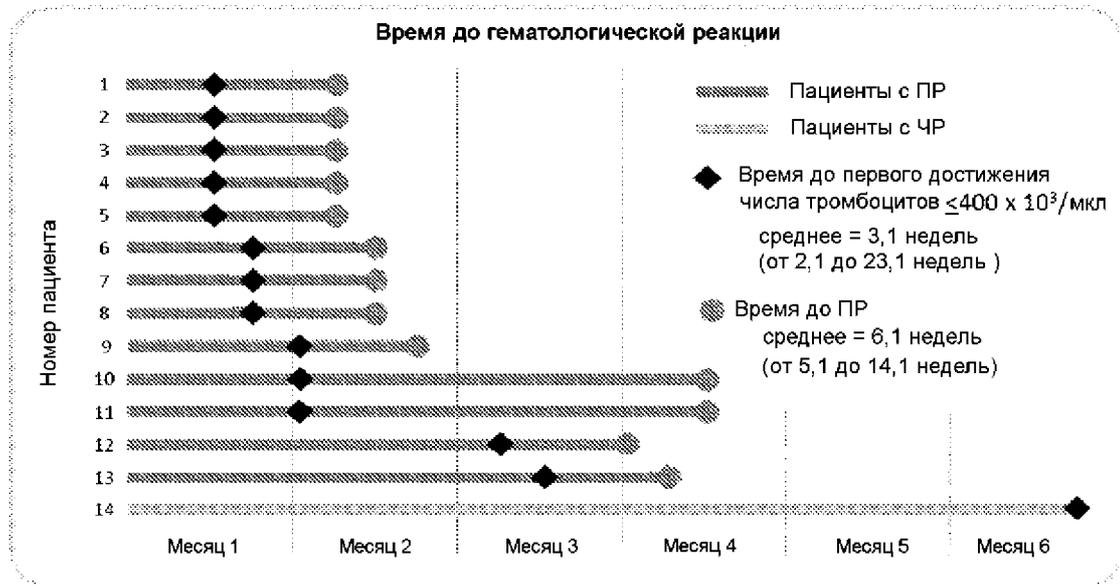
Б



Фигура 2

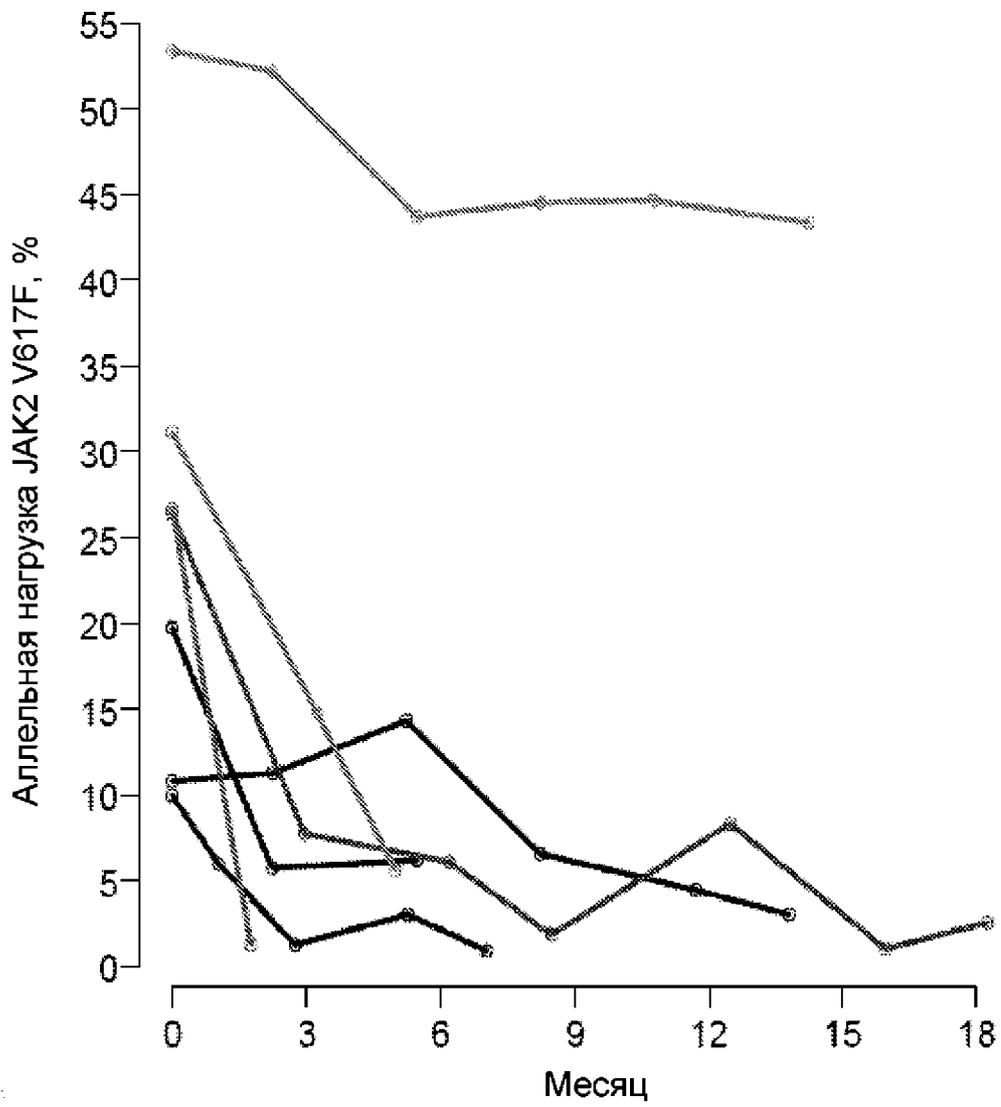


Фигура 3



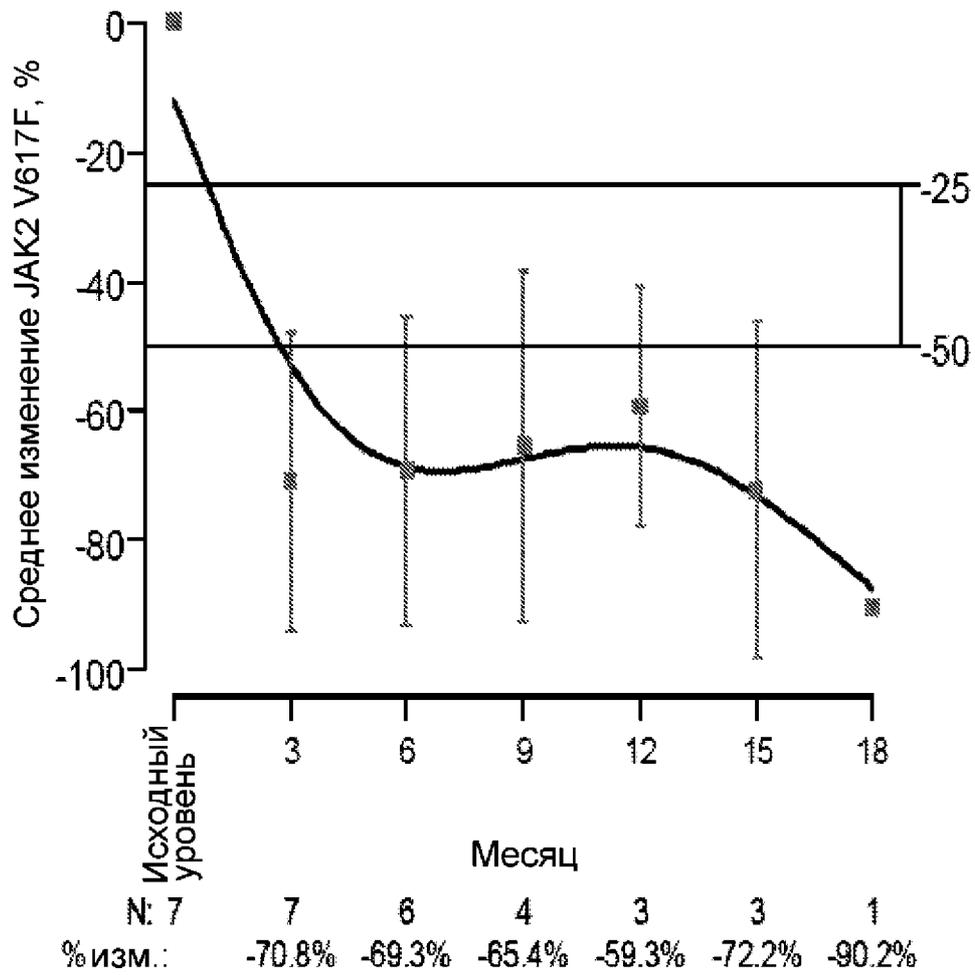
Фигура 4

А

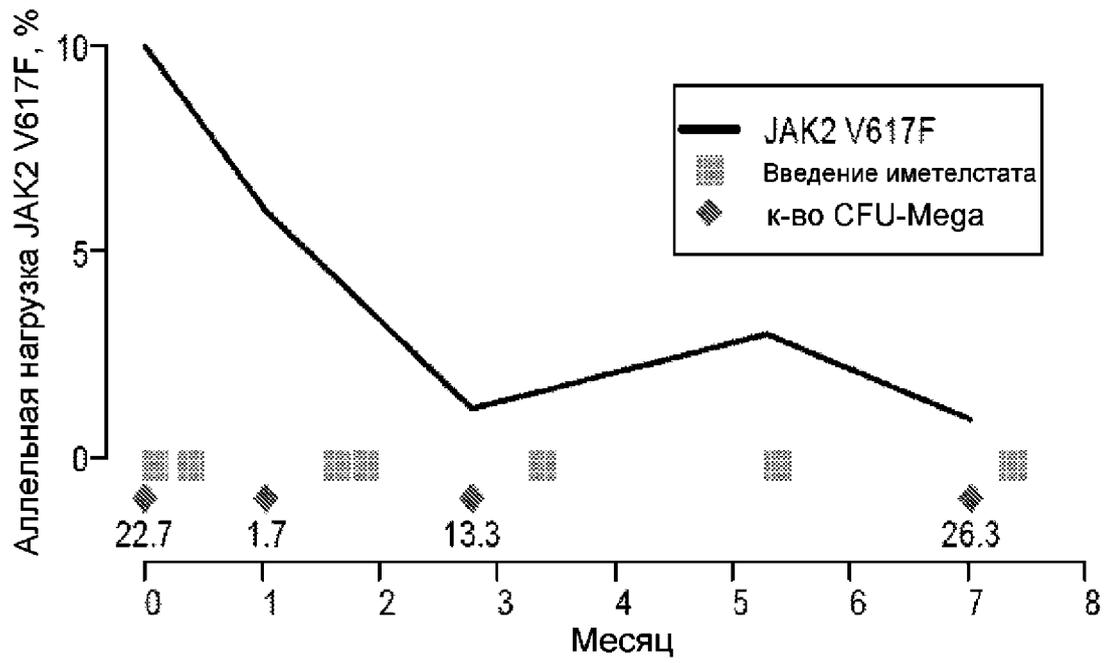


Фигура 4

Б

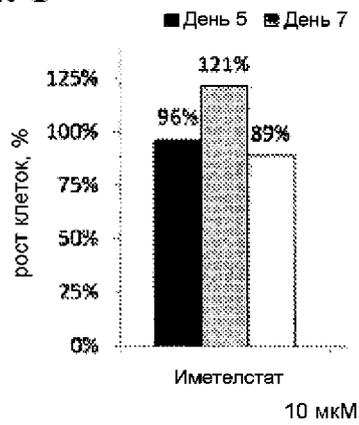


Фигура 5

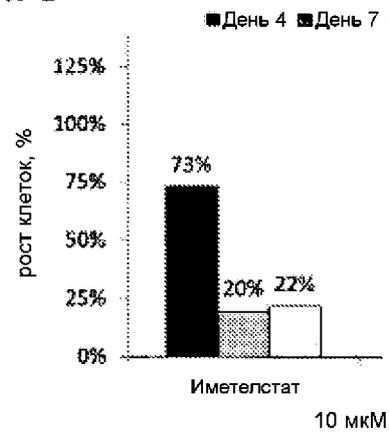


Фигура 6

Клетки CD34+ от здорового донора  
N=1



клетки CD34+ от пациента с ОМЛ (бласты)  
N=1



# ПМФ, 52 года, мужчина

Фигура 7

