



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.05

(21) Номер заявки
202092797

(22) Дата подачи заявки
2019.07.29

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАЦИЕНТОВ, ДЛЯ КОТОРЫХ МОЖЕТ БЫТЬ ПОЛЕЗНЫМ ЛЕЧЕНИЕ ИНГИБИТОРОМ ТЕЛОМЕРАЗЫ

(31) 62/712,841; 62/772,849

(32) 2018.07.31; 2018.11.29

(33) US

(43) 2021.07.08

(86) PCT/US2019/043941

(87) WO 2020/028261 2020.02.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕРОН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Буссолари Жаклин Чирилло, Хуан Фей (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)**

(56) SOCHACKI et al., Therapeutic approaches in myelofibrosis and myelodysplastic/myeloproliferative overlap syndromes. *Onco Targets Ther.*, 2016, Vol. 9, p. 2273-86. Abstract; pg 2273, para 1; pg 2276, col. 2, top para, and Table 1; and pg 2280, col. 2, para 1

MARTY et al., Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016, Vol. 127(10), p. 1317-24. Entire documentation, especially Abstract; and pg 1317, col. 1, para 1

MUDIREDDY et al., Prefibrotic versus overtly fibrotic primary myelofibrosis: clinical, cytogenetic, molecular and prognostic comparisons. *Bri J. Haematol.* 2018, Vol. 182, p. 594-597. Epub 2017 July 5. Entire documentation, especially pg 594, col. 1, para 1; and pg 595, Table 1

SHAMMO et al., Mutations in MPNs: prognostic implications, window to biology, and impact on treatment decisions. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016, Vol. 2016(1), p. 552-560. Entire documentation, especially Abstract; pg 555, col. 2, top para, and Table 1; pg 556, Fig. 1; and 558, col. 2, middle para

US-A1-20140155465

VASKO et al., Telomeres and Telomerase in Hematopoietic Dysfunction: Prognostic Implications and Pharmacological Interventions. *Int J Mol Sci*. 2017, Vol. 18(11). PDF File: pg 1-14. Abstract; and pg 7, para 2

RUMI et al., Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014, Col. 124(7), p. 1062-9. Entire documentation, especially Abstract; pg 1063, col. 2, last para and Table 1; pg 1064, col. 2, para 1; and pg 1067, Fig 7

TEFFERI et al., A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2015, Vol. 373(10), p. 908-19. Entire documentation, especially Abstract; and pg 909, col. 1, last para and col. e, top para

MESA et al., Individualizing Care for Patients With Myeloproliferative Neoplasms: Integrating Genetics, Evolving Therapies, and Patient-Specific Disease Burden. *Am Soc Clin Oncol. Educ Book*. 2016, Vol. 35, p. e324-35. Entire documentation, especially Abstract; pg e327, Table 2; and pg e328, Fig 1

WANG et al., Imetelstat, a telomerase inhibitor, is capable of depleting myelofibrosis stem and progenitor cells. *Blood Adv*. 2018 Sep, Vol. 2(18), p. 2378-2388. Entire documentation, especially Abstract; pg 2379, col. 1, para 2; and pg 2380, col. 2, last para

(57) Согласно изобретению предложены способы идентификации или выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, таким как, например, иметелстат, путем тестирования пациента на отсутствие мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL; и/или высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Указанный пациент может страдать миелофиброзом. Согласно изобретению также предложены способы лечения миелофиброза, которые включают идентификацию таких пациентов.

Перекрестные ссылки на родственные заявки

В соответствии с разделом 35 Свода законов США §119(е) настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/712841, поданной 31 июля 2018 г., и предварительной заявки на патент США № 62/772849, поданной 29 ноября 2018 г.; содержание указанных заявок включено в настоящий документ посредством ссылок.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящий документ полностью посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII имеет название "Sequence_Listing.txt" и размер 356 Кб.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, путем идентификации пациента: у которого отсутствует мутация в каждом из JAK2, CALR и MPL; и/или который имеет высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Настоящее изобретение также относится к способам лечения миелофиброза у нуждающегося в этом субъекта (т.е. пациента) ингибитором теломеразы.

Уровень техники

Миелофиброз (МФ) представляет собой одно из классических BCR-ABL1-отрицательных хронических миелопролиферативных новообразований (МПН), характеризующееся клональной миелопролиферацией, разрегулированной киназной сигнализацией. Cervantes, Blood, 124(17):2635-2642 (2014). Он также характеризуется цитопениями, конституциональными симптомами, спленомегалией и может трансформироваться в острый миелоидный лейкоз. Kuykendall et al., Annals of Hematology, 97: 435-431 (2018). МФ представляет собой отрицательное по филадельфийской хромосоме миелопролиферативное новообразование с неудовлетворительным прогнозом, одобренной терапией при котором в настоящее время является ингибитор JAK1/JAK2 руксолитиниб. Руксолитиниб, ингибитор Янус-киназы (JAK) JAK-1 и JAK-2, представляет собой первое в своей группе лекарственное средство, лицензированное в Соединенных Штатах для лечения миелофиброза (МФ) с высоким и промежуточным риском. Pardanani, et al. Blood Cancer J.; 4(12): e268 (2014). Несколько других ингибиторов JAK находятся на стадии разработки, и некоторые из них в настоящее время проходят клинические испытания III фазы; там же. Другие варианты лечения МФ включают алло-ТСК, гидроксимочевину, интерферон, леналидомид (ревлимид (Revlimid®)) и талидомид. В настоящее время продолжаются клинические испытания при МФ для оценки селективных ингибиторов JAK, ингибиторов гистондеацетилазы/ДНК-метилтрансферазы, ингибиторы PI3K, ингибиторы Hedgehog/мишени рапамицина млекопитающих (MTOR), антифибротических агентов, иммуномодуляторов, моноклональных антител и ингибиторов иммунных контрольных точек; Shreenivas, et al., Expert Opin Emerg Drugs, 23(1):37-49 (2018).

Другие МПН включают эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и истинную полицитемию (ИП); Cervantes (ниже). МФ может возникать de novo (первичный МФ [ПМФ]) или после предшествующей ЭТ или ИП (пост-ЭТ или пост-ИП МФ); там же. Согласно Cervantes, МФ представляет собой клональную пролиферацию плюрипотентных гематопозитических стволовых клеток, при которой популяция аномальных клеток высвобождает в костный мозг несколько цитокинов и факторов роста, которые приводят к фиброзу костного мозга и изменениям в строме, и колонизирует экстрамедуллярные органы, такие как селезенка и печень; там же. Миелофиброз был связан с мутациями в гене Янус-киназы (JAK) 2 (такими как мутация V617F), мутациями в гене рецептора тромбопоэтина (MPL) и мутациями в гене кальретикулина (CALR); там же. В основном он поражает пожилых людей и, в соответствии с Cervantes, "в настоящее время направленная на излечение терапия отсутствует, кроме трансплантации аллогенных гематопозитических стволовых клеток (алло-ТСК), которую можно использовать у незначительной части пациентов." Там же.

Фактически, согласно Langabeer, "большинство пациентов с классическими миелопролиферативными новообразованиями (МПН): истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией и первичным миелофиброзом, являются носителями определенных вызывающих заболевание мутаций в генах JAK2, CALR или MPL", Langabeer, JAK-STAT, 5: e1248011 (2016). Указанные мутации представляют собой так называемые драйверные мутации. Примеры драйверных мутаций включают JAK2 V617F, мутации в экзоне 12JAK2, экзоне 10MPL и экзоне 9CALR; там же.

Согласно Spiegel, при миелофиброзе (МФ) драйверные мутации в JAK2, MPL или CALR влияют на выживание и прогрессирование до фазы бластных клеток, при этом наибольший риск обусловлен тройным отрицательным статусом (т.е. немутированными JAK2, MPL и CALR). Spiegel et al., Blood Adv., 1(20): 1729-1738 (2017). Фактически отсутствие мутаций JAK2/MPL/CALR (то есть тройной отрицательный статус) ассоциировано с наиболее неблагоприятным исходом. Pardanani, et al. Blood Cancer J.; 4(12): e268 (2014); см. также Tefferi et al., Blood, 124(16):2507-13 (2014). Кроме того, мутации в генах высокого молекулярного риска (HMR), таких как ASXL1, EZH2, IDH1/2 и SRSF2, были также ассоциированы с худшим прогнозом. Spiegel et al. Наличие возрастающего числа прогностически неблагоприятных мутаций/мутаций "с высоким молекулярным риском" (то есть генов ASXL1, EZH2, SRSF2 и/или IDH-1/2)

обуславливало прогрессирующее ухудшение исхода выживаемости, независимо от традиционных факторов риска. Guglielmelli et al., *Leukemia*, 28(9): 1804-10 (2014).

Драйверные мутации в JAK2, MPL или CALR, по отдельности или в комбинации с субклональными мутациями в таких генах, как ASXL1, были ассоциированы с различиями в общей выживаемости (ОВ). Spiegel et al. Пациенты с тройным негативным статусом, у которых отсутствуют канонические мутации в JAK2, MPL или CALR, имеют повышенный риск лейкемической трансформации, а также укороченную продолжительность ОВ. По наблюдениям Spiegel, у пациентов, страдающих миелофиброзом, которые получали лечение руксолитинибом или момелотинибом (ингибиторы JAK 1/2), указанные мутации были ассоциированы с более коротким периодом времени до установления неэффективности терапии; там же. Аналогичным образом, при "сравнении клинических характеристик JAK2-положительных, CALR-положительных, MPL-положительных и ТО-МФ-пациентов, у пациентов с мутациями CALR наблюдался значимо более низкий уровень гемоглобина (среднее значение 8,6 против 10,7 г/дл; P 5,001) и число лейкоцитов (среднее значение 11,0 против 25 г/дл; P 5,033), тренды, описанные в других когортах МПН." Patel et al., *Blood*, 126(6):790-797 (2015). Patel с соавторами наблюдал у получавших лечение руксолитинибом пациентов -носителей ≥ 3 мутаций отрицательную корреляцию с ответом селезенки и временем до прекращения лечения. Драйверные мутации или тройной отрицательный (JAK2, MPL, CALR) статус обнаруживаются у пациентов с миелофиброзом, прекращающих лечение ингибиторами JAK; см., например, Kuykendall et al.

Краткое описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены способы идентификации или выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, таким как, например, иметелстат, путем тестирования пациента на: отсутствие мутации в каждом из генов Янус-киназы 2 (JAK2), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL); и/или высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ген гомолога дополнительных половых щетинок 1 (ASXL1), ген энхансера гомолога белка Zeste 2 (EZH2), ген богатого серином и аргинином фактора сплайсинга 2 (SRSF2) и ген изоцитратдегидрогеназа 1/2 (IDH1/2). Нуждающийся в лечении пациент может страдать миелофиброзом. Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения миелофиброза у пациента, нуждающегося в таком лечении, которые включают этап идентификации такого пациента.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента с миелофиброзом, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: (а) тестирование пациента на: (i) тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, и/или (ii) мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2] и (b) выбор указанного пациента при условии наличия у него: (i) тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, и/или (ii) высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2, при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: (а) тестирование пациента на: тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и (b) выбор указанного пациента при условии наличия у него тройного отрицательного статуса, при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: (а) тестирование указанного пациента на высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2 и (b) выбор пациента с высоким молекулярным риском (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения миелофиброза у пациента, который имеет тройной отрицательный статус и/или HMR, ингибитором теломеразы, таким как, например, иметелстат.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента, имеющего миелофиброз, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: (а) получение образца ДНК от пациента; (b) тестирование указанного образца ДНК от такого пациента на: (i) тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и/или (ii) высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; и (c) выбор указанного пациента при условии наличия у него: (i) тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL и/или (ii) высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2, при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит поль-

зу от лечения ингибитором теломеразы. Согласно определенным вариантам реализации указанного способа образец ДНК получают из костного мозга, периферической крови, или и из первого, и из второго.

Указанный образец ДНК может быть получен путем первоначального получения образца костного мозга, образца периферической крови или обоих образцов, а затем - выделения ДНК из указанного образца костного мозга, образца периферической крови или обоих образцов. Согласно одному варианту реализации этап получения образца ДНК от пациента включает: получение образца костного мозга от пациента, выделение клеток из указанного образца костного мозга и экстракцию ДНК из выделенных клеток. Согласно другому варианту реализации этап получения образца ДНК от пациента включает: получение образца периферической крови от пациента; выделение клеток из указанного образца периферической крови (например, гранулоцитов); и экстракцию ДНК из выделенных клеток.

Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента, имеющего миелофиброз, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий тестирование пациента на: (a) тройной отрицательный статус на основании отсутствия какой-либо мутации в генах JAK2, CALR и MPL; (b) высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; или (c) и первое, и второе; при этом наличие (a), (b) или (c) указывает на пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Согласно любым из указанных способов указанный пациент может страдать миелофиброзом. Указанный миелофиброз может представлять собой: первичный миелофиброз; миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ); или миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ). Согласно некоторым вариантам реализации указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK. Согласно другим вариантам реализации указанный пациент ранее получал терапию ингибиторами JAK и указанная терапия ингибиторами JAK оказалась "неэффективной" (т.е. заболевание было резистентным или пациент был рефракторным (невосприимчивым) к указанной терапии, или заболевание рецидивировало, несмотря на то, что сначала наблюдался ответ на лечение). Согласно другим вариантам реализации указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

Указанные способы могут также включать этап введения ингибитора теломеразы после того, как такой пациент был идентифицирован. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

При применении иметелстата для лечения пациентов, идентифицированных указанными способами, иметелстат вводят в ходе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый из которых включает: внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели; внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата один раз в неделю в течение трех недель; или внутривенное введение приблизительно 0,5-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели. Согласно одному варианту реализации каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели. Согласно другому варианту реализации каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

При применении иметелстата натрия для лечения пациентов, идентифицированных указанными способами, иметелстат натрия вводят в ходе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый из которых включает: внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата натрия однократно каждые три недели; внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата натрия один раз в неделю в течение трех недель; внутривенное введение приблизительно 2,5-10 мг/кг иметелстата натрия однократно каждые три недели; или внутривенное введение приблизительно 0,5-9,4 мг/кг иметелстата натрия однократно каждые три недели. Согласно одному варианту реализации каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата натрия однократно каждые три недели. Согласно другому варианту реализации каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 9,4 мг/кг иметелстата натрия однократно каждые три недели. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, имеющего миелофиброз, ингибитором теломеразы, таким как иметелстат или иметелстат натрия, включающий: (i) скрининг указанного пациента для определения наличия у такого пациента: тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL, и/или высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; и (ii) введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии наличия у него тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в любом из JAK2, CALR и MPL, и/или высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Указанный миелофиброз может представлять собой: первичный миелофиброз, миелофиброз, который развивается после истинной

полицитемии (пост-ИП МФ), или миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитозии (пост-ЭТ МФ). Согласно некоторым вариантам реализации указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK. Согласно другому варианту реализации пациент ранее получал терапию ингибиторами JAK и терапия ингибиторами JAK оказалась неэффективной, или ранее получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

Согласно определенным вариантам реализации способа лечения указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат и вводят в ходе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый из которых включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели; внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата один раз в неделю в течение трех недель; внутривенное введение приблизительно 2,5-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели; или внутривенное введение приблизительно 0,5-9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели. Согласно некоторым вариантам реализации каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели. Согласно другим вариантам реализации каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

Согласно некоторым вариантам реализации способов идентификации или выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, указанный способ дополнительно включает определение средней относительной длины теломер путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента. Согласно некоторым вариантам реализации способов идентификации или выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, указанный способ дополнительно включает выбор пациента, идентифицированного как пациент, в биологическом образце от которого средняя относительная длина теломер в целевых клетках определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения пациента с миелофиброзом ингибитором теломеразы, включающий: введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии наличия у него тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия. Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения пациента, имеющего миелофиброз, ингибитором теломеразы, включающий: введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии наличия у такого пациента тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL, и/или имеет высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2.

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения пациента, имеющего миелофиброз, ингибитором теломеразы, включающий: введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту, если такой пациент отвечает одной или более из следующих характеристик:

(a) средняя относительная длина теломер в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от индивидуума, определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов;

(b) тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL; и

(c) высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия. Согласно настоящему изобретению предложен способ идентификации субъекта, имеющего миелофиброз (МФ), для лечения ингибитором теломеразы, при этом указанный способ включает: измерение уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения ингибитора теломеразы; и сравнение уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце с базовым уровнем экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы; при этом по снижению уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце идентифицируют пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения указанным ингибитором теломеразы.

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения миелофиброза (МФ), включающий: введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора теломеразы; и оценку уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения

указанного ингибитора теломеразы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

Согласно настоящему изобретению предложен способ мониторинга терапевтической эффективности у субъекта с миелофиброзом (МФ), включающий: измерение уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения ингибитора теломеразы; и сравнение уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце с базовым уровнем экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы; при этом по снижению уровня экспрессии hTERT в биологическом образце на 50% или более идентифицируют субъекта, который с большой вероятностью получит пользу от лечения указанным ингибитором теломеразы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

Согласно настоящему изобретению предложен способ выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: тестирование пациента на среднюю относительную длину теломер путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента; и выбор указанного пациента при условии, что средняя относительная длина теломер в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента, определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов, при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Согласно настоящему изобретению предложен способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: получение биологического образца от пациента; определение средней относительной длины теломер путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента; и идентификацию указанного пациента при условии, что средняя относительная длина теломер в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента, определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов, как пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Согласно настоящему изобретению предложен способ лечения пациента, имеющего миелофиброз, ингибитором теломеразы, включающий: введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии, что средняя относительная длина теломер в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от такого пациента, определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

Согласно настоящему изобретению предложен способ мониторинга терапевтической эффективности у субъекта с миелофиброзом (МФ), включающий измерение уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения ингибитора теломеразы; и сравнение уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце с базовым уровнем экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы; при этом по снижению уровня экспрессии hTERT на 50% или более в указанном биологическом образце идентифицируют субъекта, который с большой вероятностью получит пользу от лечения указанным ингибитором теломеразы. Согласно некоторым вариантам реализации измеряемый или оцениваемый уровень экспрессии hTERT представлен уровнем экспрессии РНК hTERT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

Согласно настоящему изобретению предложен способ идентификации пациента с миелофиброзом (МФ) для лечения ингибитором теломеразы, при этом указанный способ включает: измерение уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения ингибитора теломеразы; и сравнение уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце с базовым уровнем экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы; при этом по снижению уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце идентифицируют пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения указанным ингибитором теломеразы.

Согласно настоящему изобретению предложен способ мониторинга терапевтической эффективности у субъекта с миелофиброзом (МФ), включающий: измерение уровня активности теломеразы в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения ингибитора теломеразы; и сравнение уровня активности теломеразы в указанном биологическом образце с базовым уровнем активности теломеразы до введения указанного ингибитора теломеразы; при этом по снижению уровня активности

теломеразы на 50% или более в указанном биологическом образце идентифицируют пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения указанным ингибитором теломеразы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно другим вариантам реализации указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

Краткое описание чертежей

Приведенное выше краткое описание, а также подробное описание изобретения ниже могут быть лучше поняты при изучении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Для иллюстрации изобретения на чертежах представлены варианты реализации настоящего изобретения. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными представленными схемами, примерами и средствами.

На фиг. 1 приведен каскадный график уменьшения объема селезенки (SVR) на 24 неделе для подгрупп вариантов лечения с 4,7 мг/кг и 9,4 мг/кг из примера 1. SVR показан как процент изменения от базового значения.

На фиг. 2 приведен каскадный график снижения общего показателя симптомов (TSS) на 24 неделе для подгрупп вариантов лечения с 4,7 мг/кг и 9,4 мг/кг из примера 1. TSS показан как процент изменения от базового значения.

На фиг. 3 приведен график Каплана-Мейера общей выживаемости с группировкой по мутационному статусу генов JAK2/MPL/CALR: ТО против не-ТО (MUT) для подгруппы 4,7 мг/кг. В частности, на фиг. 3 представлена зависимость вероятности выживаемости от времени для пациентов с тройным отрицательным статусом (ТО) и пациентов, имеющих по меньшей мере одну мутацию (MUT).

На фиг. 4 приведен график общей выживаемости Каплана-Мейера с группировкой по мутационному статусу генов JAK2/MPL/CALR: ТО против не-ТО (MUT) для подгруппы 9,4 мг/кг. В частности, на фиг. 4 представлена зависимость значений вероятности выживаемости от времени для пациентов с тройным отрицательным статусом (ТО) и пациентов, имеющих по меньшей мере одну мутацию (MUT), для подгруппы 9,4 мг/кг.

На фиг. 5 приведен график Каплана-Мейера зависимости общей выживаемости от времени с группировкой по пациентам подгруппы 9,4 мг/кг или подгруппы 4,7 мг/кг. На фиг. 6 приведен график общей выживаемости Каплана-Мейера (ОВ) с группировкой по мутационному статусу генов JAK2/MPL/CALR: ТО против не-ТО для подгруппы 9,4 мг/кг. В частности, на фиг. 6 представлена зависимость вероятности выживаемости от времени для пациентов с тройным отрицательным статусом (ТО) и пациентов, имеющих по меньшей мере одну мутацию (не-ТО), для подгруппы 9,4 мг/кг. На фиг. 7 приведен график общей выживаемости (ОВ) Каплана-Мейера с группировкой по мутационному статусу генов JAK2/MPL/CALR: ТО против не-ТО для подгруппы 4,7 мг/кг. В частности, на фиг. 7 представлена зависимость вероятности выживаемости от времени для пациентов с тройным отрицательным статусом (ТО) и пациентов, имеющих по меньшей мере одну мутацию (не-ТО), для подгруппы 4,7 мг/кг.

Подробное описание изобретения

Настоящая заявка основана на открытии того, что для пациентов с миелофиброзом, имеющих тройной отрицательный статус (т.е. отсутствие мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL), и/или пациентов в категории высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2, может принести пользу лечение ингибитором теломеразы, таким как иметелстат или иметелстат натрия. Пациенты с мутациями в генах ASXL1, EZH1, IDH1/2 и SRSF2 имеют повышенный риск ранней смерти или лейкомической трансформации. Для указанных пациентов, как правило, лечение с применением стандартных вариантов терапии, например, ингибиторами JAK не приносит пользу. Gisslinger et al., Blood, 128: 1931 (2016). Соответственно, тот факт, что указанным пациентам приносит пользу лечение ингибитором теломеразы, является неожиданным и удивительным.

Соответственно, в настоящей заявке предложены способы идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, таким как иметелстат. Указанные способы включают тестирование или идентификацию пациента для определения наличия у указанного пациента тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL; и/или имеет высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения миелофиброза ингибитором теломеразы, таким как иметелстат, которые включают идентификацию пациента, имеющего: тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL; и/или высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Для таких пациентов с большой вероятностью принесёт пользу лечение ингибитором теломеразы. Затем указанный ингибитор теломеразы (например, иметелстат) вводят указанному пациенту. Для ясности понимания изобретения, но не для ограничения подробное описание изобретения разделено на подразделы, описывающие или иллюстрирующие определенные признаки, варианты реализации или варианты применения согласно настоящему изобретению.

А. Определения.

В настоящем документе мутация в гене гомолога дополнительных половых щетинок 1 (ASXL1), энхансер гомолога белка Zeste 2 (EZH2), гена богатого серином и аргинином фактора сплайсинга 2 (SRSF2) и гена изоцитратдегидрогеназы 1/2 (IDH1/2) включает любую мутацию в указанных генах, которая влияет на выживаемость и прогрессирование заболевания у пациента с миелофиброзом. Кроме того, в настоящем документе IDH1/2 включает IDH1 и IDH2. Примеры мутаций можно найти в следующих публикациях, содержание каждой из которых включено в настоящий документ в части описания генетических мутаций, ассоциированных с миелофиброзом: Langabeer, JAK-STAT, 5: e1248011 (2016); Cervantes, Blood; 124(17):2635-2642 (2014); Patel et al., Blood; 126(6):790-797 (2015); Spiegel et al., Blood Adv., 1(20): 1729-1738 (2017); Newburry et al., Blood, 130(9):1125-1131 (2017); Kuykendall et al., Annals of Hematology, 97: 435-431 (2018). Примерами последовательностей являются следующие: высокий молекулярный риск (HMR) может быть определен на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ген ASXL1, имеющий, например, последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 5, ген EZH2, имеющий, например, последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 6, ген SRSF2, имеющий, например, последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 7, ген IDH1, имеющий, например, последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 8, ген IDH2, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 9; и в их комбинациях.

Согласно некоторым вариантам реализации, представляющие интерес мутации в гене ASXL1 включают мутации в Q575, Q588, Y591, Q592, S604, L614, Q623, A627, E635, T638, A640, G646, G658, R678, C687, D690, R693, Y700, G704, E705, Q708, G710, L721, E727, V751, P763, Q780, W796, V807, T822, K825, S846, D855, C856, L857, L885, L890, S903, S970, Y974, R965, G967, V962, L992, S1028, Q1039, R1073, E1102, H1153, S1209, S1231, A1312, F1305, P1377, R1415 и I1436. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мутация представляет собой мутацию Q575X, мутацию Q588X, мутацию Y591X, мутацию Y591N, мутацию Q592X, мутацию S604F, мутацию L614F, мутацию Q623X, мутацию A627G, мутацию E635R, мутацию T638V, мутацию A640G, мутацию G646W, мутацию G658X, мутацию R678K, мутацию C687R, мутацию C687V, мутацию D690G, мутацию R693X, мутацию Y700X, мутацию G704R, мутацию G704W, мутацию E705X, мутацию Q708X, мутацию G710E, мутацию L721C, мутацию E727X, мутацию V751L, мутацию P763R, мутацию Q780X, мутацию W796X, мутацию W796G, мутацию V807F, мутацию T822H, мутацию K825X, мутацию S846Q, мутацию D855A, мутацию C856X, мутацию L857R, мутацию L885X, мутацию L890F, мутацию S903I, мутацию S970N, мутацию Y974X, мутацию R965X, мутацию G967del, мутацию V962A, мутацию L992Q, мутацию S1028R, мутацию Q1039L, мутацию R1073C, мутацию E1102D, мутацию H1153R, мутацию S1209I, мутацию S1231F, мутацию A1312V, мутацию F1305W, мутацию P1377S, мутацию R1415Q и/или мутацию I1436M.

Согласно некоторым вариантам реализации, представляющие интерес мутации в гене EZH2 включают мутации в W60, R63, P312, F145, N182, R288, Q328, Q553, R566, T573, R591, R659, D677, V679, R690, A702, V704, E726, D730 и/или Y733. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мутация представляет собой мутацию W60X, мутацию R63X, мутацию P312S, мутацию F145S, мутацию N182D, мутацию R288Q, мутацию Q328X, мутацию Q553X, мутацию R566H, мутацию T573I, мутацию R591H, мутацию R659K, мутацию D677H, мутацию V679M, мутацию R690H, мутацию A702V, мутацию V704L, мутацию E726V, мутацию D730X и/или мутацию Y733X.

Согласно некоторым вариантам реализации, представляющие интерес мутации в гене SRSF2 включают мутации в P95. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мутация представляет собой мутацию P95H, мутацию P95L или мутацию P95R. Согласно некоторым вариантам реализации, представляющие интерес мутации в гене IDH1/2 включают мутации в R132 и/или R140. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мутация представляет собой мутацию R132G, мутацию R132H или мутацию R140Q.

Согласно определенному варианту реализации, представляющие интерес мутации включают представленные ниже.

| Ген | Белок | Изменение |
|-------|------------------|-----------------|
| ASXL1 | p.Tyr591* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Gln592* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Phe617* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Glu635Argfs*15 | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Gly646Trpfs*12 | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Asp667Trpfs*2 | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Gln692* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Arg693* | Нонсенс-мутация |

| | | |
|-------|--------------------|----------------------|
| ASXL1 | p.Arg693* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Arg693Ter | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Tyr700Ilefs*3 | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Lys726* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Gln760Hisfs*13 | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Leu775* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Trp796* | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Pro808fs | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Pro808His | Миссенс-мутация |
| ASXL1 | p.Pro808Leufs*10 | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Leu823* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Gly826Glufs*12 | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Ala861Aspfs*6 | Сдвиг рамки |
| ASXL1 | p.Pro938* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Asn986Ser | Миссенс-мутация |
| ASXL1 | p.Gln1234* | Нонсенс-мутация |
| ASXL1 | p.Thr1388Serfs*5 | Сдвиг рамки |
| EZH2 | p.Lys400_Glu401del | Делеция внутри рамки |
| EZH2 | p.Cys457Tyr | Миссенс-мутация |
| EZH2 | p.Ser480Argfs*3 | Сдвиг рамки |
| EZH2 | p.Cys552Tyr | Миссенс-мутация |
| EZH2 | p.Leu56Phefs*2 | Сдвиг рамки |
| EZH2 | p.Ser669Arg | Миссенс-мутация |
| EZH2 | p.Asp681_Lys685del | Делеция внутри рамки |
| EZH2 | p.Arg684Cys | Миссенс-мутация |
| EZH2 | p.Tyr733* | Нонсенс-мутация |
| EZH2 | p.Glu745Lys | Миссенс-мутация |
| EZH2 | p.Ile223Phefs*18 | Сдвиг рамки |
| SRSF2 | p.Pro95Ala | Миссенс-мутация |
| SRSF2 | p.Pro95His | Миссенс-мутация |
| SRSF2 | p.Pro95Arg | Миссенс-мутация |
| SRSF2 | p.Pro95Leu | Миссенс-мутация |
| SRSF2 | p.Pro107His | Миссенс-мутация |
| IDH1 | p.Arg132His | Миссенс-мутация |
| IDH2 | p.Arg140Gln | Миссенс-мутация |
| IDH2 | p.Arg140Gln | Миссенс-мутация |

В настоящем документе "тройной отрицательный статус", "тройной отрицательный" или "ТО" относится к пациентам, у которых отсутствует мутации в каждом из генов Янус-киназы 2 (JAK2), кальрептикулина (CALR) и рецептора тромбоцита (MPL). Тройной отрицательный статус может быть определен на основании отсутствия мутации в каждом из генов: ген JAK2, имеющий, например, последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 2, ген CALR, имеющий, например, последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 3, и ген MPL, имеющий, например, последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации тройной отрицательный статус включает отсутствие мутации в гене JAK2, такой как мутация в G335, F556, G571, V617 и/или V625.

Например, тройной отрицательный статус может включать отсутствие в гене JAK2 мутации G335D, мутации F556V, мутации G571S, мутации V617F и/или мутации V625S.

Согласно некоторым вариантам реализации тройной отрицательный статус включает отсутствие мутации в гене MPL, такой как мутация в T119, S204, P222, E230, V285, R321, S505, W515, Y591 и/или R592. Например, тройной отрицательный статус может включать отсутствие в гене MPL мутации T119I, мутации S204F, мутации S204P, мутации P222S, мутации E230G, мутации V285E, мутации R321W, мутации S505N, мутации W515R, мутации W515L, мутации Y591N и/или мутации R592Q. Согласно некоторым вариантам реализации тройной отрицательный статус включает отсутствие мутации в гене CALR, такой как мутация в L367, K368, E381, K385 и/или E396. Например, тройной отрицательный статус может включать отсутствие в гене CALR мутации L367T, мутации K368R, мутации K385N, мутации E381A и/или мутации E396del.

Согласно некоторым вариантам реализации представляющие интерес мутации включают представленные ниже.

| Ген | Белок | Изменение |
|------|------------------|----------------------|
| JAK2 | p.Val617Phe | Миссенс-мутация |
| JAK2 | p.Val617Phe | Миссенс-мутация |
| JAK2 | p.Val617Phe | Миссенс-мутация |
| MPL | p.Ser505Asn | Миссенс-мутация |
| MPL | p.Trp515Lys | Миссенс-мутация |
| MPL | p.Trp515Leu | Миссенс-мутация |
| CALR | p.Leu367Thrfs*46 | Сдвиг рамки |
| CALR | p.Leu367fs | Сдвиг рамки |
| CALR | p.Glu381Ala | Миссенс-мутация |
| CALR | p.Lys385Asnfs*47 | Сдвиг рамки |
| CALR | p.Glu396del | Делеция внутри рамки |
| CALR | p.Lys368Argfs*51 | Сдвиг рамки |

В настоящем документе терапия ингибитором JAK у пациента оказалась "неэффективной", если заболевание было резистентным или пациент был рефракторным к указанной терапии или заболевание рецидивировало, несмотря на то, что сначала наблюдался ответ на лечение.

В настоящем документе термин "приблизительно" в отношении измеряемой величины, такой как количество, продолжительность времени и т.п., охватывает варианты с отклонениями в пределах $\pm 20\%$ и $\pm 0,1\%$, предпочтительно в пределах $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$, более предпочтительно в пределах $\pm 5\%$, еще более предпочтительно в пределах $\pm 1\%$ и еще более предпочтительно в пределах $\pm 0,1\%$ от указанной величины, если такие варианты подходят для реализации раскрытых способов.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает соль, приемлемую для введения пациенту, такому как млекопитающее (соли с противоионами, обладающими приемлемой безопасностью для млекопитающих при заданном режиме дозирования). Такие соли могут происходить из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым солям соединения, которые происходят из различных органических и неорганических противоионов, хорошо известных в данной области техники, и включают, например, натрий и т.п.; если молекула содержит основную функциональную группу -соли органических или неорганических кислот, такие как гидрохлорид и т.п. Фармацевтически приемлемые соли, представляющие интерес, включают, не ограничиваясь перечисленными, соли алюминия, аммония, аргинина, бария, бензатина, кальция, холинатные соли, соли этилендиамина, лизина, лития, магния, меглюмина, прокаина, калия, натрия, треметамина, N-метилглюкамина, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, диэтанолamina, этанолamina, пиперазина, цинка, диизопропиламина, диизопропилэтиламина, триэтиламина и триэтанолamina.

Термин "соль (соли) перечисленного" означает соединение, образующееся при замене протона кислоты на катион, такой как катион металла или органический катион, и т.п. Предпочтительно соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль. Например, соли предложенных соединений включают соли, отличающиеся тем, что соединение протонировано неорганической или органической кислотой с получением катиона, с сопряженным основанием указанной неорганической или органической кислоты в качестве анионного компонента соли. Представляющие интерес соли включают, не ограничиваясь перечисленными, соли алюминия, аммония, аргинина, бария, бензатина, кальция, цезия, холинатные соли, соли этилендиамина, лития, магния, меглюмина, прокаина, N-метилглюкамина, пиперазина, калия, на-

трия, трометамина, цинка, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаина, диэтаноламина, этаноламина, пиперазина, диизопропиламина, диизопропилэтиламина, триэтиламина и триэтаноламина. Следует понимать, что любые олигонуклеотидные структуры, представленные в настоящем документе, которые включают остов из межнуклеозидных связей, могут также предусматривать любые подходящие солевые формы. Согласно некоторым вариантам реализации для простоты представлены кислотные формы межнуклеозидных связей. В некоторых случаях соль рассматриваемого соединения представляет собой соль моновалентного катиона. В некоторых случаях соль рассматриваемого соединения представляет собой соль дивалентного катиона. В некоторых случаях соль рассматриваемого соединения представляет собой соль тривалентного катиона. "Сольват" относится к комплексу, образованному комбинацией молекул растворителя с молекулами или ионами растворенного вещества. Указанный растворитель может представлять собой органическое соединение, неорганическое соединение, или их смесь. Некоторые примеры растворителей включают, не ограничиваясь перечисленными, метанол, N,N-диметилформамид, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид и воду. Если в качестве растворителя используют воду, образующийся сольват представляет собой гидрат. "Стереизомер" и "стереоизомеры" относятся к соединениям, которые имеют одинаковую связность атомов, но отличаются разным расположением атомов в пространстве. Стереизомеры включают, например, цис-транс изомеры, E- и Z-изомеры, энантиомеры и диастереомеры. Что касается любой из описанных здесь групп, которые содержат один или несколько заместителей, разумеется, ясно, что такие группы не содержат каких-либо замещений или паттернов замещения, которые были бы стерически нецелесообразными и/или синтетически нереализуемыми. Предполагается, что все стереоизомеры включены в объем настоящего изобретения.

Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что возможны другие таутомерные схемы групп, описанных в настоящем документе. Следует понимать, что все таутомерные формы рассматриваемого соединения охвачены структурой, описывающей одну возможную таутомерную схему групп указанного соединения, даже если это конкретным образом не указано.

Предполагается включение сольвата фармацевтически приемлемой соли таутомера стереоизомера рассматриваемого соединения. Предполагается, что такие сольваты включены в объем настоящего изобретения.

Перед переходом к более подробному описанию определенных вариантов реализации, следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено определенными описанными вариантами реализации, и поэтому может, разумеется, содержать изменения. Также следует понимать, что терминология в настоящем документе предназначена исключительно для описания определенных вариантов реализации, а не для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Следует понимать, что при указании диапазона значений, что любое промежуточное значение, вплоть до одной десятой части от нижнего предела, если контекст явным образом не говорит об ином, между верхним и нижним пределом указанного диапазона, а также любое другое приведенное или промежуточное значение в указанном диапазоне предусмотрено настоящим изобретением. Верхний и нижний пределы указанных меньших диапазонов могут независимо быть включены в указанные меньшие диапазоны и также предусмотрены настоящим изобретением, с учетом того, что из указанного диапазона могут быть конкретным образом исключены какие-либо пределы. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба включенных предела, также включены в настоящее изобретение.

Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют значения, соответствующие значениям, общеизвестным специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом применении или тестировании настоящего изобретения могут также применяться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, ниже описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы. Все публикации и патенты, цитируемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылок, как если бы все индивидуальные публикации или патенты были конкретным образом в индивидуальном порядке указаны как включенные посредством ссылки, и включены в настоящий документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми упоминаются публикации. Упоминание любой публикации связано с ее раскрытием до даты подачи и не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права на отнесение к более ранней дате, чем такая публикация, в силу предшествующего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут требовать независимого подтверждения. Отметим, что в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают соответствующие термины во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста. Также отметим, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключать любой необязательный элемент. Таким образом, настоящее заявление выступает в качестве предшествующего упоминания таких исключающих терминов, как "исключительно", "только" и т.п. применительно к перечислению элементов формулы изобретения, или "отрицательных" признаков.

Каждый из отдельных вариантов реализации, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, включает отдельные компоненты и признаки, которые могут быть легко отделены или объединены с признаками любого из других нескольких вариантов реализации без отступления от объема или существа настоящего изобретения. Любой упоминаемый способ может быть реализован согласно указанному порядку событий или в любом другом логически возможном порядке.

В. Идентификация пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены способы идентификации или выбора пациента с миелофиброзом, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы. Указанные способы основаны на идентификации пациентов с тройным отрицательным статусом (пациентов, у которых отсутствует мутация в каждом из генов JAK2, CALR и MPL) или пациентов с высоким молекулярным риском (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Для указанных пациентов с тройным отрицательным статусом или пациентов с HMR с большой вероятностью будет полезным лечение ингибитором теломеразы, таким как иметелстат или иметелстат натрия. Миелофиброз может представлять собой первичный миелофиброз, миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ), или миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ). Согласно некоторым вариантам реализации указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK. Согласно другим вариантам реализации указанный пациент ранее получал терапию ингибиторами JAK, и терапия ингибиторами JAK оказалась неэффективной (т.е. заболевание было резистентным или пациент был рефракторным к указанной терапии; или заболевание рецидивировало, несмотря на то, что сначала наблюдался ответ на лечение). Согласно другим вариантам реализации указанный пациент ранее получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости. Согласно другим дополнительным вариантам реализации указанный пациент ранее получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK.

Согласно одному варианту реализации указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK, и миелофиброз был резистентным к терапии ингибиторами JAK. Согласно другому варианту реализации указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и был рефракторным (невосприимчивым) к терапии ингибиторами JAK. Согласно другим вариантам реализации указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и испытывает рецидив. Согласно альтернативному варианту реализации указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены способы выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, путем тестирования на что-либо одно или более из: тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL (т.е. отсутствия какой-либо мутации). Согласно указанному варианту реализации указанный пациент может также быть протестирован на высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложены способы выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, путем тестирования на: тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL (т.е. отсутствия какой-либо мутации); и/или высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий тестирование пациента на: (a) тройной отрицательный статус на основании отсутствия какой-либо мутации в генах JAK2, CALR и MPL; (b) высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; или (c) и первое, и второе. Согласно указанному варианту реализации присутствие (a), (b) или (c) указывает на пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий:

- а) тестирование пациента на:
 - i) тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, и/или
 - ii) высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2,
- б) выбор указанного пациента при условии наличия у него:
 - i) тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, и/или
 - ii) высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в

одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2, при этом для выбранного пациента с большой вероятностью будет приносить пользу лечение ингибитором теломеразы.

Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: тестирование пациента на тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и выбор указанного пациента при условии наличия у него: тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, при этом для указанного выбранного пациента с большой вероятностью будет приносить пользу лечение ингибитором теломеразы. Согласно одному варианту реализации указанный способ также включает тестирование пациента на высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; и выбор указанного пациента при условии наличия у него HMR. Согласно определенным вариантам реализации любых из указанных способов у пациентов с тройным отрицательным статусом отсутствует мутация в кодирующей области (экзоне) генов JAK2, CALR и MPL.

Кроме того, согласно другим вариантам реализации любых из указанных способов высокий молекулярный риск (HMR) определяют по присутствию мутации в кодирующей области (экзоне) по меньшей мере одного из генов ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2.

Согласно определенному варианту реализации высокий молекулярный риск (HMR) определяют, детектируя присутствие мутации в ASXL1, EZH2, SRSF2 или IDH1/2 или их комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в ASXL1. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в EZH2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в SRSF2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в IDH1/2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в ASXL1 и EZH2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в ASXL1 и SRSF2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в ASXL1 и IDH1/2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в EZH2, SRSF2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в EZH2 и IDH1/2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в SRSF2 и IDH1/2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в ASXL1, EZH2 и SRSF2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в ASXL1, EZH2 и IDH1/2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно некоторым вариантам реализации способы включают детекцию присутствия мутации в ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ идентификации или выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, в популяции пациентов. Согласно указанному способу проводят скрининг популяции пациентов на пациентов с мутациями в каждом из генов JAK2, CALR и MPL для идентификации пациентов с тройным отрицательным статусом в указанной популяции. Согласно другим вариантам реализации указанные способы основаны на идентификации пациентов с тройным отрицательным статусом, у которых отсутствует каноническая мутация в каждом из JAK2, MPL и CALR. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы также включают этап взятия образца ДНК пациента. Образец пациента может быть получен из образца ДНК, собранного из костного мозга, периферической крови или и из первого, и из второго. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложенные способы включают получение образца крови пациента и выделение (экстракцию) ДНК из указанного образца крови пациента. Указанные способы могут также включать этап выделения клеток (например, гранулоцитов), из образца крови пациента. Аналогичным образом, способы согласно настоящему изобретению включают получение образца костного мозга и выделение (экстракцию) ДНК из образца костного мозга. Указанный способ может также включать этап выделения клеток из образца костей пациента.

Образец ДНК пациента тестируют на присутствие или отсутствие мутаций в каждом из генов JAK2, CALR и MPL с применением стандартных методик. Как вариант, образец ДНК пациента тестируют на присутствие мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2 с применением стандартных методик. Согласно некоторым вариантам реализации образец ДНК пациента тестируют на: (i) присутствие или отсутствие мутаций в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и (ii) присутствие мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2.

Согласно некоторым вариантам реализации тестирование указанного образца ДНК может быть проведено с применением анализа секвенирования нового поколения на платформе Illumina MiSeq согласно описанию в источнике: Patel et al., Blood; 126(6):790-797 (2015), содержание которого в части, относящейся к тестированию образцов ДНК, включено в настоящий документ.

С. Фармакодинамика (ФД).

Настоящее изобретение частично основано на фармакодинамическом эффекте, демонстрирующем

связь между ответом на терапию с ингибированием теломеразы у субъектов с миелофиброзом и снижением уровней экспрессии теломеразы hTERT у субъектов относительно базовых уровней. В некоторых случаях среди субъектов, достигавших клинического ответа (со стороны селезенки или симптома) на терапию с ингибированием теломеразы на 24 неделе, 50% или большее снижение уровней экспрессии hTERT РНК достигалось у большего %, чем среди не достигнувших ответа субъектов.

Согласно настоящему изобретению предложены стратификация и выбор пациентов, для которых может быть полезной терапия миелофиброза с ингибированием теломеразы, и способы мониторинга ответа, рецидива и прогноза у субъектов, проходящих лечение.

Аспекты настоящего изобретения включают способы выбора субъектов миелофиброзом (МФ) для лечения ингибитором теломеразы, и способы лечения МФ. Также предложены способы мониторинга терапевтической эффективности у субъекта с МФ. В некоторых случаях фармакодинамический эффект, на котором основан вариант реализации предложенных способов, представляет собой снижение экспрессии РНК hTERT на 50% или более, например, на 60% или более, 70% или более, 80% или более, или 90% или более.

Рибонуклеопротеин теломеразы состоит из компонентов или субъединиц, две из которых представляют собой матрицу теломеразной РНК (hTR) и белок обратной транскриптазы теломеразы (hTERT). Оценка, определение и/или измерение уровней экспрессии hTERT могут быть проведены с применением любых удобных способов. Различные способы могут применяться для амплификации, детекции и измерения мРНК компонентов теломеразы или родственных белков в биологических жидкостях. Представляющие интерес способы и анализы, которые могут быть адаптированы для применения согласно предложенным способам, включают, не ограничиваясь перечисленными, анализы методом количественной ПНР в реальном времени (РВ-ПЦР), например, основанной на флуоресцентном методе TaqMan, иммуногистохимические способы исследования экспрессии белков и способы, описанные в источниках: патент США № 6607898, Bieche et al., Clin. Cancer Res February 1 2000 (6) (2) 452-459, Terrin et al. ("Telomerase expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia predicts survival and delineates subgroups of patients with the same IgVH mutation status and different outcome." Leukemia 2007; 21: 965-972) и Palma et al. ("Telomere length and expression of human telomerase reverse transcriptase splice variants in chronic lymphocytic leukemia." Experimental Hematology 2013; 41: 615-626).

Оценка или измерение уровней экспрессии hTERT может быть проведена в любых подходящих целевых клетках или биологических образцах. Целевые клетки могут представлять собой любые подходящие клетки пациента, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, клетки костного мозга или периферической крови пациента. В некоторых случаях указанные целевые клетки выделяют из образца костного мозга пациента. В некоторых случаях указанные целевые клетки выделяют из образца периферической крови пациента. Указанные целевые клетки могут представлять собой гранулоциты.

Оценка или измерение уровней экспрессии hTERT РНК может быть проведена в образце РНК с применением любых удобных способов. Образец РНК может быть получен сначала путем получения образца костного мозга, образца периферической крови, или обоих образцов, и последующего выделения РНК из указанного образца костного мозга, образца периферической крови, или обоих указанных образцов. Согласно одному варианту реализации этап получения образца от пациента включает: получение образца костного мозга от указанного пациента, выделение клеток из образца костного мозга и экстракцию РНК и/или ДНК из выделенных клеток. Согласно другому варианту реализации этап получения образца РНК от пациента включает: получение образца периферической крови от указанного пациента; выделение клеток из указанного образца периферической крови (например, гранулоцитов); и экстракцию РНК и/или ДНК из выделенных клеток.

D. Лечение.

Аспекты настоящего изобретения включают способы лечения миелофиброза у нуждающегося в этом субъекта (т.е. пациента), имеющего: тройной отрицательный статус на основании отсутствия какой-либо мутации в генах JAK2, CALR и MPL (т.е. мутация в указанных генах отсутствует, или в указанных генах нет мутаций); и/или высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения миелофиброза у нуждающегося в этом субъекта (т.е. пациента), имеющего: тройной отрицательный статус на основании отсутствия какой-либо мутации в генах JAK2, CALR и MPL (т.е. мутация в указанных генах отсутствует, или в указанных генах нет мутаций). Согласно одному варианту реализации указанный миелофиброз представляет собой первичный миелофиброз. Согласно другому варианту реализации указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ). Согласно альтернативному варианту реализации указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

Согласно определенным вариантам реализации указанных способов лечения пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK. Согласно другим вариантам реализации указанный пациент ранее получал терапию ингибиторами JAK и указанная терапия ингибиторами JAK оказалась "неэффективной" (т.е. заболевание было резистентным или пациент был рефракторным к терапии, или заболевание реци-

дивировало, несмотря на то, что сначала наблюдался ответ на лечение). Согласно другим вариантам реализации способов лечения указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы лечения дополнительно включают премедикацию дифенгидраминам (25-50 мг) и гидрокортизоном (100-200 мг), или эквивалентом перечисленного.

Субъект представляет собой млекопитающее, нуждающееся в лечении рака. Как правило, субъект представляет собой пациента-человека. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный субъект может представлять собой не являющееся человеком млекопитающее, такое как не являющийся человеком примат, модельные животные (например, таких животных, как мыши и крысы, используемые для скрининга, характеристики и оценки медикаментов) и другие млекопитающие. В настоящем документе термины "пациент", "субъект" и "индивидуум" используются взаимозаменяемо.

В настоящем документе и согласно общеизвестному в данной области техники определению "лечение" представляет собой способ получения полезных или требуемых результатов, в том числе клинических результатов. Для целей настоящего изобретения полезные или требуемые клинические результаты включают, не ограничиваясь перечисленным, облегчение или смягчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие усугубления) статуса заболевания, предотвращение распространения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, смягчение или временное облегчение болезненного состояния, и ремиссию (частичную или полную), детектируемые или недетектируемые.

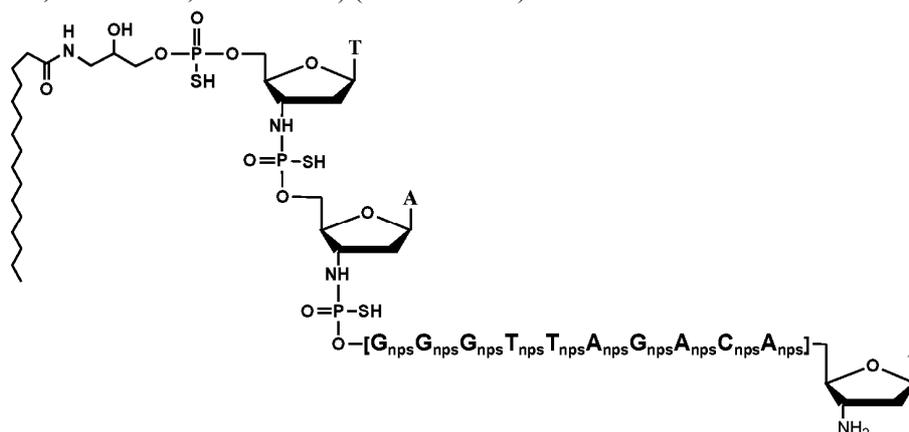
"Лечение" может также означать увеличение продолжительности выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Е. Ингибиторы теломеразы.

Способы согласно настоящему изобретению могут применяться для идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения любыми подходящими ингибиторами теломеразы. Кроме того, любые подходящие ингибиторы теломеразы могут находить применение в предложенных способах лечения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой олигонуклеотид с ингибиторной активностью в отношении теломеразы, в частности, олигонуклеотид согласно определению в WO 2005/023994 и/или WO 2014/088785, содержание которых включено в настоящий документ полностью посредством ссылки. В некоторых случаях один или более ингибиторов теломеразы (например, два или три ингибитора теломеразы) могут быть введены млекопитающему для лечения злокачественного гематологического заболевания.

Иметелстат.

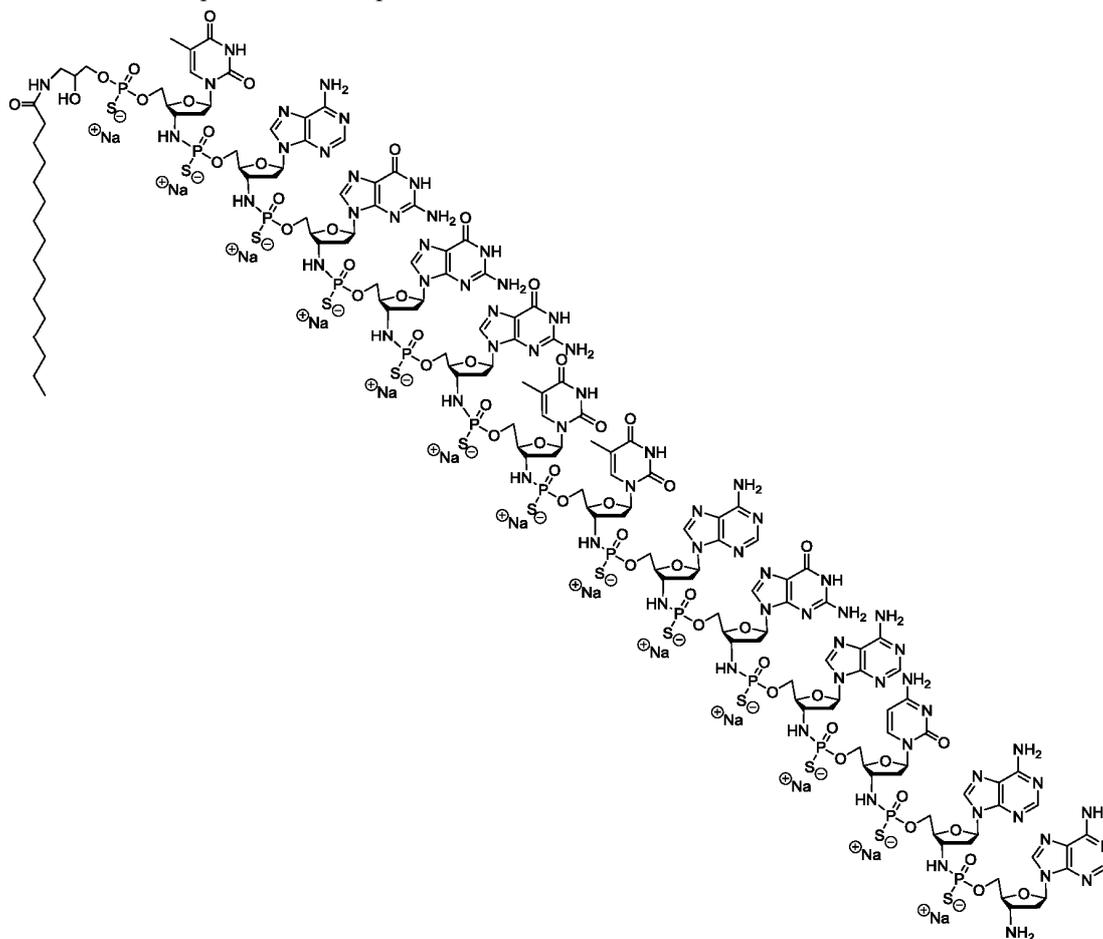
Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат, в том числе его таутомеры и его соли, например, фармацевтически приемлемые соли. Иметелстат представляет собой новый, первый в своей группе ингибитор теломеразы с клинической активностью при гематологических злокачественных новообразованиях (Baerlocher et al., NEJM 2015; 373:920-928; Tefferi et al., NEJM 2015; 373:908-919) (показан ниже):



где "nps" означает тиофосфорамидатную связь $-NH-P(=O)(SH)-O-$, соединяющую 3'-атом углерода одного нуклеозида с 5'-атомом углерода смежного нуклеозида.

В некоторых случаях указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат натрия, в том числе его таутомеры. Иметелстат натрия представляет собой натриевую соль иметелстата, представляющую собой конъюгированный с синтетическим липидом 13-мерный олигонуклеотид N3'→P5'-тиофосфорамидат. Иметелстат натрия представляет собой ингибитор теломеразы, представляющий собой ковалентно липидированный 13-мерный олигонуклеотид (показан ниже), комплементарный матричной области РНК теломеразы человека (hTR). Химическое название иметелстата натрия: ДНК, d(3'-амино-3'-дезоксип-тио) (Т-А-Г-Г-Г-Т-Т-А-Г-А-С-А-А), 5'-[O-[2-гидрокси-3-(гексадеканол-амино)пропил]фосфотиоат], натриевая соль (1:13) (SEQ ID NO: 1). Иметелстат натрия не задействует для

функционирования антисмысловой механизм и, соответственно, у него отсутствуют побочные эффекты, часто наблюдаемые при подобной терапии.



Иметелстат натрия

Если иное не указано или не очевидно из контекста, в настоящем документе при упоминании иметелстата также подразумеваются его таутомеры и его соли, например, фармацевтически приемлемые соли. Как было упомянуто, иметелстат натрия, в частности, представлен натриевой солью иметелстата. Если иное не указано или не очевидно из контекста, в настоящем документе при упоминании иметелстата также подразумеваются все его таутомеры.

Иметелстат и иметелстат натрия могут быть произведены, изготовлены или получены согласно существующим описаниям (см., например, Asai et al., *Cancer Res.*, 63:3931- 3939 (2003), Herbert et al., *Oncogene*, 24:5262-5268 (2005), и Gryaznov, *Chem. Biodivers.*, 7:477-493 (2010)). Если иное не указано или не очевидно из контекста в настоящем документе при упоминании иметелстата также подразумеваются также включают его соли. Как было упомянуто, иметелстат натрия, в частности, является натриевой солью иметелстата.

Иметелстат нацелен на РНК-матрицу теломеразы и ингибирует активность теломеразы и пролиферацию клеток в различных линиях раковых клеток и ксенотрансплантатах опухолей у мышей. Исследования I фазы, включающие пациентов с раком молочной железы, немелкоклеточным раком легкого и другими солидными опухолями, множественной миеломой или хроническим лимфоцитарным лейкозом обеспечили информацию о фармакокинетике и фармакодинамике лекарственного средства. Последующее исследование II фазы, включающее пациентов с эссенциальной тромбоцитемией, показало активность, обеспечивающую снижение уровня тромбоцитов, сопровождаемое значимым снижением нагрузки мутантными аллелями JAK2 V617F и CALR. Иметелстат натрия обычно вводят внутривенно; при реализации предложенных способов предусмотрено также возможное введение другими способами, например, интратекальное введение, внутритухоловая инъекция, пероральное введение и др. Иметелстат натрия может вводиться в дозах, сопоставимых с обычными дозами для клинического применения. Согласно некоторым вариантам реализации иметелстат натрия вводят согласно описанию в тексте настоящего документа.

Согласно конкретному варианту реализации, соответствующему любому другому варианту реализации, иметелстат ограничен иметелстатом натрия.

Ф. Фармацевтические композиции.

Для облегчения введения ингибитор теломеразы (например, согласно описанию в настоящем документе) может быть введен в состав различных фармацевтических форм, предназначенных для введения. В некоторых случаях указанный ингибитор теломеразы вводят в виде фармацевтической композиции. Носитель или разбавитель фармацевтической композиции должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции, и не причинять вреда ее реципиентам.

Фармацевтическая композиция может быть заключена в единичную лекарственную форму, подходящую, в частности, для введения перорально, ректально, чрескожно, путем парентеральной инъекции или путем ингаляции. В некоторых случаях введение может быть осуществлено посредством внутривенной инъекции. Например, при приготовлении композиции в виде лекарственной формы для перорального применения могут применяться любые обычные фармацевтические среды, такие как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п. в случае жидких составов для перорального применения, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, разбавители, смазывающие вещества, связующие вещества, агенты для улучшения распадаемости и т.п., в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Ввиду простоты введения таблетки и капсулы представляют собой наиболее полезные единичные дозированные формы для перорального применения, для получения которых, очевидным образом, используют твердые фармацевтические носители. Носитель для парентеральных композиций обычно содержит стерильную воду, составляющую по меньшей мере его значительную часть, хотя могут быть включены и другие ингредиенты, например, способствующие растворимости. Могут быть получены, например, инъецируемые растворы, где носитель содержит солевой раствор, раствор глюкозы или смесь солевого раствора и раствора глюкозы. Могут быть получены, например, инъецируемые растворы, где носитель содержит солевой раствор, раствор глюкозы или смесь солевого раствора и раствора глюкозы. Инъецируемые растворы, содержащие ингибитор теломеразы, описанный в настоящем документе, могут быть введены в состав с маслом для пролонгированного действия. Подходящие масла для указанной цели представлены, например, арахисовым маслом, кунжутным маслом, хлопковым маслом, кукурузным маслом, соевым маслом, синтетическими сложными эфирами глицерина и длинноцепочечных жирных кислот, и смесями указанных и других масел. Могут также быть приготовлены инъецируемые суспензии, в этом случае подходящие жидкие носители, суспендирующие агенты и т.п., могут быть использованы. Также предусмотрены составы в твердой форме, которые предназначены для преобразования, незадолго перед применением, в составы в жидкой форме. В композициях, подходящих для чрескожного введения, носитель необязательно содержит улучшающий проникновение агент и/или подходящий смачивающий агент, необязательно в комбинации с подходящими добавками любой природы в незначительных количествах, которые не оказывают значимого пагубного эффекта на кожу. Указанные добавки могут облегчать применение на коже и/или могут быть полезны для получения требуемой композиции. Указанная композиция может вводиться различными путями, например, в виде трансдермального пластыря, точечным нанесением, в виде мази. В частности, является полезным получение вышеупомянутых фармацевтических композиций в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и единообразия дозировки. Единичная лекарственная форма в настоящем документе относится к физически дискретным единицам, подходящим для применения в качестве единиц дозы, где каждая единица содержит заданное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта, связанного с требуемым фармацевтическим носителем. Примеры таких единичных лекарственных форм представлены таблетками (в том числе таблетками с насечкой или таблетками в оболочке), капсулами, пилюлями, пакетированными порошками, облатками, суппозиториями, инъецируемыми растворами или суспензиями и т.п., и их обособленными множествами.

Для повышения растворимости и/или стабильности в фармацевтических композициях лекарственного средства, описанного в настоящем документе, может быть полезным использовать α -, β - или γ -циклодекстрины или их производные, в частности, гидроксилалкил-замещенные циклодекстрины, например, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин или сульфобутил- β -циклодекстрин. Также улучшать растворимость и/или стабильность указанного ингибитора теломеразы в фармацевтических композициях могут соразтворители, такие как спирты.

В зависимости от способа введения указанная фармацевтическая композиция предпочтительно содержит 0,05-99 мас.%, более предпочтительно от 0,1 до 70 мас.%, еще более предпочтительно от 0,1 до 50 мас.% ингибитора теломеразы, описанного в настоящем документе, и от 1 до 99,95 мас.%, более предпочтительно от 30 до 99,9 мас.%, еще более предпочтительно от 50 до 99,9 мас.% фармацевтически приемлемого носителя; все процентные показатели основаны на общей массе композиции.

Г. Введение и режимы введения.

Частота введения может быть представлена любой частотой, которая уменьшает тяжесть симптома миелофиброза, не обуславливающей значимой токсичности для субъекта. Например, может быть использована частота введения от введения приблизительно однократно каждые два месяца до введения приблизительно однократно в неделю, как вариант - от введения приблизительно один раз в месяц до введе-

ния приблизительно дважды в месяц, как вариант - введение приблизительно однократно каждые шесть недель, приблизительно однократно каждые 5 недель, как вариант - приблизительно однократно каждые 4 недели, как вариант - приблизительно однократно каждые 3 недели, как вариант - приблизительно однократно каждые 2 недели или как вариант - приблизительно один раз в неделю. Частота введения может оставаться постоянной или может варьировать на протяжении лечения. Курс лечения композицией, содержащей один или более ингибиторов теломеразы, может включать периоды отдыха. Например, композиция, содержащая ингибитор теломеразы, может вводиться еженедельно на протяжении трехнедельного периода с последующим двухнедельным периодом отдыха, и такой режим может быть повторен неоднократно. Как и на эффективное количество, на фактическую частоту введения, используемую для конкретного применения, могут влиять различные факторы. Например, эффективное количество, продолжительность лечения, применение нескольких агентов для лечения, путь введения и тяжесть миелофиброза и связанных симптомов могут потребовать увеличения или уменьшения частоты введения.

Эффективной продолжительностью введения композиции, содержащей ингибитор теломеразы (например, иметелстат или иметелстат натрия), может быть любая продолжительность, которая уменьшает тяжесть симптома миелофиброза (например, согласно описанию в настоящем документе), не обуславливая значимую токсичность для субъекта. Соответственно, эффективная продолжительность может варьировать от одного месяца до нескольких месяцев или лет (например, от одного месяца до двух лет, от одного месяца до одного года, от трех месяцев до двух лет, от трех месяцев до десяти месяцев, или от трех месяцев до 18 месяцев). В целом, эффективная продолжительность лечения миелофиброза может варьировать от двух месяцев до двадцати месяцев. В некоторых случаях эффективная продолжительность может составлять весь период, на протяжении которого индивидуальный субъект остается в живых. Несколько факторов могут влиять на фактическую эффективную продолжительность для конкретного лечения. Например, эффективная продолжительность может варьировать в зависимости от частоты введения, эффективного количества, применения нескольких агентов для лечения, маршрута введения и тяжести миелофиброза и связанных симптомов.

В некоторых случаях может проводиться мониторинг курса лечения и тяжести одного или более симптомов, связанных с миелофиброзом. Любой способ подходит для определения уменьшения или отсутствия уменьшения тяжести симптома миелофиброза. Например, оценка тяжести симптома миелофиброза (например, согласно описанию в настоящем документе) может быть проведена с применением методов биопсии.

Ингибиторы теломеразы согласно предложенным способам могут вводиться в любой дозе, которая является терапевтически эффективной, например, в дозах, сопоставимых с обычно используемыми в клинике. Конкретные режимы дозирования для известных и одобренных противораковых агентов (например, рекомендованная эффективная доза) известны лечащим врачам и приводятся, например, в описаниях продукта в источниках: Physicians' desk reference, 2003, 57th Ed., Medical Economics Company, Inc., Oradell, N.J.; Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 2001, 10th Edition, McGraw-Hill, New York; и/или предоставляются Федеральным управлением по лекарственным средствам, и/или описаны в медицинской литературе.

Согласно некоторым вариантам доза ингибитора теломеразы, иметелстата натрия, которую вводят субъекту, составляет от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 13,0 мг/кг. Согласно другим аспектам доза ингибитора теломеразы составляет от приблизительно 4,5 мг/кг до приблизительно 11,7 мг/кг, или от приблизительно 6,0 мг/кг до приблизительно 11,7 мг/кг, или от приблизительно 6,5 мг/кг до приблизительно 11,7 мг/кг. Согласно некоторым вариантам реализации доза ингибитора теломеразы включает по меньшей мере приблизительно 4,5 мг/кг, или 4,6 мг/кг, 4,7 мг/кг, 4,8 мг/кг, 4,9 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,1 мг/кг, 6,2 мг/кг, 6,3 мг/кг, 6,4 мг/кг, 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. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество ингибитора теломеразы, которое вводят индивидууму, включает по меньшей мере приблизительно 1 мг/кг, или 2,5 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,7 мг/кг, 5 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,4 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг или 20 мг/кг. Согласно некоторым вариантам реализации эффективное количество ингибитора теломеразы, которое вводят индивидууму, составляет приблизительно 1 мг/кг, или 2,5 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,7 мг/кг, 5 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,5 мг/кг, 9,4 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг или 20 мг/кг. Согласно различным вариантам реализации эффективное количество ингибитора теломеразы, которое вводят индивидууму, включает менее чем приблизительно 350 мг/кг, 300 мг/кг, 250 мг/кг, 200 мг/кг, 150 мг/кг, 100 мг/кг, 50 мг/кг, 30 мг/кг, 25 мг/кг, 20 мг/кг, 10 мг/кг, 7,5 мг/кг, 6,5 мг/кг, 5 мг/кг, 3,5 мг/кг, 2,5 мг/кг, 1 мг/кг или 0,5 мг/кг ингибитора теломеразы.

Примеры частоты дозирования фармацевтической композиции, включающей ингибитор теломера-

зы, включают, не ограничиваясь перечисленным, ежедневное дозирование; дозирование через день; дважды в неделю; три раза в неделю; еженедельно без перерыва; еженедельно три недели из четырех недель; однократно каждые три недели; однократно каждые две недели; еженедельно две недели из трех недель. Согласно некоторым вариантам реализации указанную фармацевтическую композицию вводят приблизительно однократно каждую неделю, однократно каждые 2 недели, однократно каждые 3 недели, однократно каждые 4 недели, однократно каждые 5 недель, однократно каждые 6 недель, однократно каждые 7 недель или однократно каждые 8 недель. Согласно некоторым вариантам реализации указанную композицию вводят по меньшей мере приблизительно: 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз или 7 раз (т.е. ежедневно) в неделю, или три раза ежедневно, два раза ежедневно. Согласно некоторым вариантам реализации интервалы между всеми введениями составляют менее чем приблизительно: 6 месяцев, 3 месяца, 1 месяц, 20 дней, 15 дней, 12 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день. Согласно некоторым вариантам реализации интервалы между всеми введениями составляют более чем приблизительно: 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 8 месяцев или 12 месяцев. Согласно некоторым вариантам реализации в схеме дозирования нет перерывов. Согласно некоторым вариантам реализации интервал между всеми введениями составляет не более чем приблизительно неделю.

Ингибиторы теломеразы, такие как иметелстат (например, иметелстат натрия), могут вводиться с применением любого подходящего способа. Например, ингибиторы теломеразы, такие как иметелстат (например, иметелстат натрия), могут вводиться внутривенно однократно каждые 4 недели на протяжении периода времени (например, одного, двух, трех, четырех или пяти часов). Согласно некоторым вариантам реализации иметелстат вводят внутривенно один раз в неделю на протяжении периода, составляющего приблизительно 2 ч, в дозе 7-10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам реализации иметелстат вводят внутривенно однократно каждые 3 недели на протяжении периода, составляющего приблизительно 2 ч, в дозе приблизительно 0,5-9,4 мг/кг. Согласно варианту реализации иметелстат вводят внутривенно на протяжении периода, составляющего приблизительно 2 ч однократно каждые 4 недели в дозе 0,5-5 мг/кг. Согласно варианту реализации иметелстат вводят внутривенно однократно каждые 3 недели на протяжении периода, составляющего приблизительно 2 ч, в дозе приблизительно 2,5-10 мг/кг. Как вариант, иметелстат вводят внутривенно на протяжении периода, составляющего приблизительно 2 ч, однократно каждые 4 недели в дозе приблизительно 0,5-9,4 мг/кг.

Согласно определенным вариантам реализации указанного способа иметелстат вводят в ходе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый из которых включает: внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели, внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата один раз в неделю в течение трех недель, внутривенное введение приблизительно 2,5-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели, или внутривенное введение приблизительно 0,5-9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели. В определенных случаях каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели. В некоторых случаях каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 9,4 мг/кг иметелстата приблизительно однократно каждые три недели.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения иметелстат вводят внутривенно в дозировке приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели после премедикации антигистаминным средством, кортикостероидом, или и тем, и другим. Согласно другим вариантам реализации иметелстат вводят внутривенно в дозировке приблизительно 9,4 мг/кг, как вариант - от приблизительно 7,0 мг/кг до приблизительно 9,8 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели после премедикации антигистаминным средством, кортикостероидом, или и тем, и другим. Согласно некоторым вариантам реализации иметелстат вводят в дозировке приблизительно 7,5 мг/кг, как вариант - от приблизительно 7,0 мг/кг до приблизительно 7,7 мг/кг, однократно каждые три недели в ходе по меньшей мере трех циклов, после чего дозировку увеличивают. Согласно некоторым вариантам реализации указанная дозировка иметелстата может быть увеличена до приблизительно 9,4 мг/кг, как вариант, до приблизительно 8,8 мг/кг - приблизительно 9,6 мг/кг, при условии, что максимальное снижение АЧН и числа тромбоцитов не достигло уровня от приблизительно $1,5 \times 10^9/\text{л}$ до приблизительно $75 \times 10^9/\text{л}$, соответственно, и отсутствия негематологической токсичности ≥ 3 степени.

Следует понимать, что лечение рака иногда включает несколько "раундов" или "циклов" введения лекарственного средства, где каждый цикл включает введение указанного лекарственного средства один или более раз в соответствии с установленным графиком (например, каждые три недели в течение трех последовательных дней; один раз в неделю; и т.п.). Например, противораковые лекарственные средства могут вводиться в ходе 1-8 циклов, или на протяжении более длительного периода. При введении субъекту более одного лекарственного средства (например, двух лекарственных средств), каждое из них может вводиться в соответствии с собственным графиком (например, еженедельно; однократно каждые три недели; и т.п.). Понятно, что введение лекарственных средств, даже таких, которые вводят с разной периодичностью, может быть согласовано таким образом, чтобы по меньшей мере иногда вводить оба лекарственных средства в один день, или, как вариант, таким образом, чтобы по меньшей мере иногда вводить лекарственные средства в последовательные дни.

Согласно некоторым вариантам реализации иметелстат может вводиться согласно режиму, который включает снижение доз. Согласно одному варианту реализации указанному пациенту сначала вводят приблизительно 9,4 мг/кг каждые три недели, затем дозу изменяют до приблизительно 7,5 мг/кг каждые три недели, после чего дозу изменяют до приблизительно 6,0 мг/кг каждые три недели.

Как известно в данной области техники, лечение противораковыми терапевтическими лекарственными средствами может быть временно приостановлено в случае, если наблюдается токсичность, или для удобства пациента, без отступления от объема настоящего изобретения, после чего лечение возобновляют.

Аспекты предложенных способов включают идентификацию или выбор пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения, на основании относительной длины теломер в целевых клетках (например, согласно описанию в настоящем документе) указанного пациента. Целевые клетки могут представлять собой любые подходящие клетки пациента, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, клетки костного мозга или периферической крови пациента. В некоторых случаях указанные целевые клетки выделяют из образца костного мозга пациента. В некоторых случаях указанные целевые клетки выделяют из образца периферической крови пациента. Указанные целевые клетки могут представлять собой гранулоциты. В некоторых случаях у пациента отсутствует мутация в каждом из генов Янус-киназы 2 (JAK2), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL); и и указанный пациент, в частности, имеет небольшую длину теломер в клетках-мишенях. В настоящем документе небольшая длина теломер представляет собой длину меньше медианной или средней длины теломер, или равную такой длине, при сравнении с подходящим контролем, например, одним или более известными стандартами согласно описанию в настоящем документе. Соответственно, предложенные способы могут также включать определение относительной длины теломер путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от индивидуума; выбор индивидуума, для которого будет полезным лечение ингибитором теломеразы, при условии, что средняя относительная длина теломер в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от указанного индивидуума, определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов, например, определена как попадающая в 45-й или более низкий процентиль, 40-й или более низкий процентиль, 35-й или более низкий процентиль, 30-й или более низкий процентиль, 25-й или более низкий процентиль, 20-й или более низкий процентиль, или даже более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов.

В некоторых случаях согласно указанному способу один или более известных стандартных образцов представлены диапазоном длины теломер, установленным в совокупности встречающихся в природе целевых клеток (например, согласно описанию в настоящем документе) от совокупности индивидуумов, у которых диагностировано заболевание. В определенных случаях согласно указанному способу один или более известных стандартных образцов представлены охарактеризованными линиями клеток. Под "охарактеризованными линиями клеток" подразумевается, что соответствующие теломерные нуклеиновые кислоты клеток указанных известны и относительно постоянны. Согласно некоторым вариантам реализации длина теломер в раковых клетках, присутствующих в указанном биологическом образце, определена как равная медианной или средней длине теломер или меньшая. Согласно некоторым вариантам реализации длина теломер в раковых клетках, присутствующих в указанном биологическом образце, определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль, 40-й или более низкий процентиль, 35-й или более низкий процентиль, 30-й или более низкий процентиль, 25-й или более низкий процентиль, 20-й или более низкий процентиль, 15-й или более низкий процентиль, 10-й или более низкий процентиль, или 5-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов.

Длина теломер в целевой клетке может быть определена с применением любых удобных способов анализа, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, анализом кПЦР, тело-FISH (флуоресцентная гибридизация теломер *in situ*) или саузерн-блоттинга, согласно описанию Bassett с соавторами в патенте США №9200327. Согласно одному аспекту длина теломер может быть определена путем измерения средней длины концевой рестрикционного фрагмента (TRF). TRF определен как длина - как правило, средняя длина - фрагментов, образующихся при полном расщеплении геномной ДНК рестрикционным ферментом, который не расщепляет нуклеиновую кислоту в теломерной последовательности. В некоторых случаях ДНК расщепляют рестрикционными ферментами, которые часто расщепляют геномную ДНК, но не расщепляют теломерные последовательности. В некоторых случаях указанные рестрикционные ферменты содержат последовательность распознавания 4 оснований (например, AluI, HinfI, RsaI и Sau3A1), и используются по отдельности или в комбинации. Полученный концевой рестрикционный фрагмент содержит как теломерные повторы, так и субтеломерную ДНК. Субтеломерная ДНК представляет собой последовательности ДНК, смежные с тандемными повторами теломерных последовательностей и содержит последовательности теломерных повторов, перемежаемые вариabельными теломерно-подобными последовательностями. Расщепленную ДНК разделяют путем электрофореза и готовят блоты на подложке, например, на мембране. Фрагменты, содержащие теломерные последовательности, детек-

тируют путем гибридизации зонда, т.е. меченых последовательностей повторов, с мембраной. После визуализации содержащих теломеры фрагментов могут быть вычислены средние длины концевых рестрикционных фрагментов (Harley, C.B. et al., *Nature*. 345(6274):458-60 (1990), включен в настоящий документ посредством ссылки). Расчетная оценка TRF с применением саузерн-блоттинга дает распределение длин теломер в клетках или ткани, и, соответственно, медианную и среднюю длину теломер во всех клетках.

Согласно другому аспекту длина теломер может быть измерена с помощью проточной цитометрии (Hultdin, M. et al., *Nucleic Acids Res.* 26: 3651-3656 (1998); Rufer, N. et al., *Nat. Biotechnol.* 16:743-747 (1998); включены в настоящий документ посредством ссылки). Способы проточной цитометрии представляют собой варианты методик FISH. В случае, если стартовый материал представляет собой ткань, готовят суспензию клеток, как правило, путем механического разделения и/или обработки протеазами. Клетки фиксируют закрепителем и гибридизируют с зондом, специфическим в отношении теломерных последовательностей, предпочтительно, ПНК-зондом, меченым флуоресцентной меткой. После гибридизации клетки промывают, после чего анализируют с применением FACS. Флуоресцентный сигнал измеряют для клеток в фазах G₀/G₁ после надлежащего вычитания фоновой флуоресценции. Указанная методика подходит для быстрого расчета длины теломер в большом числе образцов. Как и в случае TRF, длина теломер представлена средней длиной теломер в клетке.

Согласно другим аспектам медианную или среднюю длину теломер из клеток в биологическом образце определяют посредством количественной ПЦР (кПЦР) или флуоресцентной гибридизации теломер *in situ* (тело-FISH). При кПЦР связывающий ДНК краситель связывается со всей двуцепочечной ДНК, что вызывает флуоресценцию красителя. Увеличение количества продукта ДНК во время реакции ПЦР приводит к повышению интенсивности флуоресценции и измеряется в каждом цикле реакции ПЦР. Это позволяет количественно определять концентрацию ДНК. Относительную концентрацию ДНК, присутствующей в экспоненциальной фазе реакции, определяют путем построения графика зависимости уровня флуоресценции от номера цикла ПЦР в полулогарифмическом масштабе. Определяют порог детекции флуоресценции выше фоновой. Цикл, в ходе которого флуоресценция в указанном образце превысила указанный порог, называют пороговым циклом (C_t). Поскольку количество ДНК теоретически удваивается в каждом цикле в течение экспоненциальной фазы, могут быть рассчитаны относительные количества ДНК. Базовый уровень соответствует начальным циклам ПЦР, в которых флуоресцентный сигнал изменяется незначительно. Согласно некоторым аспектам длину теломер определяют с применением тело-FISH. В указанном способе клетки фиксируют и гибридизируют с зондом, конъюгированным с флуоресцентной меткой, например, Cy-3, флуоресцеином, родамином и т.п. Зонды для указанного способа представляют собой олигонуклеотиды, разработанные для специфической гибридизации с последовательностями теломер. Как правило, длина указанных зондов -8 или более нуклеотидов, например, 12-20 или более нуклеотидов. Согласно одному аспекту указанные зонды представляют собой олигонуклеотиды, содержащие встречающиеся в природе нуклеотиды. Согласно одному аспекту указанный зонд представляет собой пептидную нуклеиновую кислоту, T_m которой выше, чем у аналогичных встречающихся в природе последовательностей, и, соответственно, позволяет использовать более жесткие условия гибридизации. Клетки могут быть обработаны таким агентом, как колцеид, для индукции останковки клеточного цикла в метафазе и получения метафазных хромосом для гибридизации и анализа.

Согласно некоторым вариантам реализации клеточная ДНК может также быть окрашена флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI).

Получают цифровые изображения интактных метафазных хромосом и количественно определяют интенсивность флуоресценции зондов, гибридизированных с теломерами. Это позволяет измерить длину теломер индивидуальных хромосом, а также среднюю или медианную длину теломер в клетке, и избежать проблем, ассоциированных с присутствием субтеломерной ДНК (Zijlmans, J.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7423-7428 (1997); Blasco, M.A. et al., *Cell* 91:25-34 (1997); включены посредством ссылки). Интенсивность флуоресцентного сигнала коррелирует с длиной теломеры, при этом более яркий флуоресцентный сигнал указывает на более длинную теломеру.

Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к ингибитору теломеразы для применения в способе лечения миелофиброза, при этом указанный способ включает:

идентификацию пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий тестирование пациента на:

(a) тройной отрицательный статус на основании отсутствия какой-либо мутации в генах JAK2, CALR и MPL;

(b) высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2 или

(c) и на первое, и на второе;

при этом наличие (a), (b) или (c) указывает на пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы и введение указанному пациенту эффективного количества ингибитора теломеразы. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к ингибитору теломеразы для применения в способе согласно определению в любых других вариантах реализации.

Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения предложен ингибитор теломеразы для применения в лечении миелофиброза, включающем: (а) скрининг пациента для определения наличия у такого пациента: тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL и/или высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; и; (b) введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии наличия у такого пациента тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL, и/или имеет высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно одному варианту реализации указанное применение включает скрининг указанного пациента на тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения предложен ингибитор теломеразы для применения в лечении миелофиброза, включающем: (а) скрининг пациента для определения наличия у такого пациента тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL; и (b) введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии наличия у такого пациента тройного отрицательного статуса. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения предложено применение ингибитора теломеразы для лечения миелофиброза, включающее: (а) скрининг пациента для определения наличия у такого пациента: тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL, и/или высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; и; (b) введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии наличия у такого пациента тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL, и/или имеет высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2. Согласно одному варианту реализации указанное применение включает скрининг указанного пациента на тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL. Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения предложено применение ингибитора теломеразы для лечения миелофиброза, включающее: (а) скрининг пациента для определения наличия у такого пациента: тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из JAK2, CALR и MPL; и (b) введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту при условии наличия у такого пациента тройного отрицательного статуса.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения тройной отрицательный статус может быть определен на основании отсутствия мутации в каждом из следующих генов: гена JAK2, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 2, гена CALR, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 3, и гена MPL, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 4. Согласно другим вариантам реализации тройной отрицательный статус может быть определен на основании отсутствия мутации в каждой из последовательностей SEQ ID NO: 2; CALR и MPL. Согласно альтернативному варианту реализации тройной отрицательный статус может быть определен на основании отсутствия мутации в каждой из последовательностей: JAK2, SEQ ID NO: 3 и MPL. Согласно альтернативному варианту реализации тройной отрицательный статус может быть определен на основании отсутствия мутации в каждой из последовательностей: JAK2, CALR и SEQ ID NO: 4. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения высокий молекулярный риск (HMR) может быть определен на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: гене ASXL1, имеющем последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 5, гене EZH2, имеющем последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 6, гене SRSF2, имеющем последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 7, гене IDH1, имеющем последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 8, гене IDH2, имеющем последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 9, и в их комбинациях.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения могут быть определены активность теломеразы и уровень экспрессии hTERT в биологических образцах, полученных от пациентов, для оценки фармакодинамических эффектов и/или мониторинга пациентов, лечение которых проводят путем ингибирования теломеразы. Активность теломеразы может быть измерена с использованием протокола анализа на активность теломеразы TRAP ("Telomeric Repeat Amplification Protocol"). Уровень экспрессии hTERT может быть определен путем измерения уровня экспрессии РНК hTERT в клетках в биологическом образце с использованием нозерн-блотов или последовательного анализа геной экспрессии (SAGE), или других способов. Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к ингибитору теломеразы для применения в лечении миелофиброза согласно определению в любых других вариантах реализации.

Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к применению ингибитора теломеразы для лечения миелофиброза согласно определению в любых других вариантах реализации.

Дополнительные варианты реализации

Дополнительные представляющие интерес варианты реализации представлены в пунктах ниже.

Пункт 1. Способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий:

(a) тестирование пациента на тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов Янус-киназы 2 (JAK2), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL); и

(b) выбор указанного пациента при условии наличия у него тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL,

при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Пункт 2. Способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий:

(c) тестирование пациента на:

i) тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, и/или

ii) высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2,

(d) выбор пациента при наличии у него:

i) тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, и/или

ii) высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2,

при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Пункт 3. Способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий:

(e) получение образца ДНК от пациента;

(f) тестирование указанного образца ДНК от пациента на тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и

(g) выбор указанного пациента при условии наличия у него тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL;

при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Пункт 4. Способ идентификации пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий: (h) получение образца ДНК от пациента; (i) тестирование указанного образца ДНК от пациента на:

i) тройной отрицательный статус на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и/или

ii. высокий молекулярный риск (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; и (j) выбор указанного пациента при условии наличия у него:

i. тройного отрицательного статуса на основании отсутствия мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и/или

ii) высокого молекулярного риска (HMR) на основании присутствия мутации по меньшей мере в одном из следующих генов: ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2,

при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

Пункт 5. Применение ингибитора теломеразы в лечении пациента с миелофиброзом отличающееся тем, что указанный пациент определен как имеющий тройной отрицательный статус, где указанный тройной отрицательный статус характеризуется отсутствием мутации в каждом из генов: Янус-киназы 2 (JAK2), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL).

Пункт 6. Применение ингибитора теломеразы в лечении пациента с миелофиброзом отличающееся тем, что указанный пациент определен как имеющий высокий молекулярный риск (HMR), где наличие HMR включает присутствие мутации по меньшей мере в одном гене, выбранном из группы, состоящей из гена гомолога дополнительных половых щетинок 1 (ASXL1), гена энхансера гомолога белка Zeste 2 (EZH2), гена богатого серином и аргинином фактора сплайсинга 2 (SRSF2) и гена изоцитратдегидрогеназы 1/2 (IDH1/2).

Пункт 7. Применение ингибитора теломеразы в лечении пациента, который имеет миелофиброз, при этом, было определено, что клетки, присутствующие в биологическом образце от указанного пациента, имеют среднюю относительную длину теломер, которая определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов.

Пункт 8. Применение ингибитора теломеразы при получении медикамента для лечения пациента с миелофиброзом, отличающееся тем, что указанный пациент определен как имеющий тройной отрицательный статус, характеризующийся отсутствием мутации в каждом из генов: Янус-киназы 2 (JAK2), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL).

Пункт 9. Применение ингибитора теломеразы при получении медикамента для лечения пациента с миелофиброзом, отличающееся тем, что указанный пациент определен как имеющий высокий молекулярный риск (HMR), где наличие HMR включает присутствие мутации по меньшей мере в одном гене, выбранном из группы, состоящей из гена гомолога дополнительных половых щетинок 1 (ASXL1), гена энхансера гомолога белка Zeste 2 (EZH2), гена богатого серином и аргинином фактора сплайсинга 2 (SRSF2) и гена изоцитратдегидрогеназы 1/2 (IDH1/2).

Пункт 10. Применение ингибитора теломеразы при получении медикамента для лечения пациента с миелофиброзом, отличающееся тем, что было определено, что клетки, присутствующие в биологическом образце от пациента, имеют среднюю относительную длину теломер, которая определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов.

Представленные ниже примеры служат для иллюстрации, а не для ограничения.

Примеры

Пример 1. Иметелстат натрия является эффективным лечением для пациентов с миелофиброзом (МФ) с промежуточным уровнем риска 2 (Int-2) или высоким уровнем риска, рецидивирующим или рефракторным к терапии ингибиторами Янус-киназ (JAK).

Введение.

Иметелстат, 13-мерный олигонуклеотид, специфически нацеленный на РНК-матрицу теломеразы человека, представляет собой мощный конкурентный ингибитор ферментативной активности теломеразы (Asai et al., Cancer Res 2003; Herbert, Oncogene 2005). Сообщалось о клинической активности и приемлемом профиле безопасности при миелофиброзе (МФ) с промежуточным уровнем риска 2 (int-2) или высоким риском в пилотном исследовании на 33-пациентах, где 48% пациентов ранее получали лечение ингибитором Янус-киназы (JAKi) (Tefferi, N Engl J Med 2015). В указанном примере представлены результаты клинического исследования II фазы иметелстата натрия при двух уровнях дозы у пациентов с миелофиброзом (МФ).

Способы.

Рандомизированное многоцентровое исследование II фазы двух дозировок иметелстата натрия (9,4 мг/кг или 4,7 мг/кг в/в, каждые 3 недели) проводили на взрослых людях, страдающих МФ, с показателем риска по динамической международной шкале оценки прогноза (DIPSS) "int-2"; или МФ с высоким риском, рецидивировавшим/рефракторным к предшествующей терапии JAKi (т.е. при отсутствии уменьшения спленомегалии через 12 недель или усугублении спленомегалии в любой момент времени после начала терапии ингибитором JAK ("JAKi")). Необходимым условием был диагностированный первичный МФ, МФ после эссенциальной тромбоцитемии или МФ после истинной полицитемии; другие критерии включения в исследование включали измеряемую спленомегалию (путем магнитно-резонансной визуализации [МРТ]), связанные с активным МФ системные симптомы и число тромбоцитов $\geq 75 \times 10^9/\text{л}$. Первичные конечные точки включали: показатель ответа селезенки (достижение % уменьшения объема селезенки $\geq 35\%$ [SVR] по данным МРТ на 24 неделе); и показатель ответа симптомов (достижение % снижения общего показателя симптомов $\geq 50\%$ [TSS] по форме оценки симптомов миелофиброза (MFSAF) v2 на 24 неделе). Ключевые вторичные конечные точки включали безопасность, общую выживаемость (ОВ), ответ на лечение, молекулярный ответ и взаимосвязь фармакокинетики и фармакодинамики.

Результаты.

Было включено 107 пациентов из 55 учреждений (48 на 4,7 мг/кг; 59 на 9,4 мг/кг). Основные характеристики приведены в табл. 1 ниже. Кроме того, медианная продолжительность периода на JAKi составляла 23 (0,9-89,7) месяца, а медианное число тромбоцитов составляло $147 \times 10^9/\text{л}$. Тройной отрицательный статус (ТО; т.е. отсутствие мутаций JAK2, MPL или CALR) наблюдался у 24,8% пациентов, и 67,6% пациентов считались имеющими высокий молекулярный риск (HMR; т.е. ≥ 1 мутации в ASXL1, EZH2, SRSF2 или IDH1/2).

Таблица 1

| Базовые характеристики | | |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| | 4,7 мг/кг (n = 48) | 9,4 мг/кг (n = 59) |
| Медианный возраст (диапазон; г) | 68,5 (44, 84) | 67,0 (31, 86) |
| Мужской пол | 32 (66,7%) | 35 (59,3%) |
| Подтип миелофиброза | | |
| Первичный | 27 (56,3%) | 36 (61,0%) |
| Пост-ЭТ | 9 (18,8%) | 10 (16,9%) |
| Пост-ИП | 12 (25,0%) | 13 (22,0%) |
| Статус риска по DIPSS | | |
| Промежуточный уровень риска 1 | 1 ^a (2,1%) | 0 |
| Промежуточный уровень риска 2 | 28 (58,3%) | 34 (57,6%) |
| Высокий риск | 19 (39,6%) | 25 (42,4%) |
| Длина селезенки (при пальпации) – медианное значение (диапазон; см) | 18,0 (4,0, 35,0) | 18,0 (3,0, 32,0) |
| > 15см | 31 (64,6%) | 35 (59,3%) |
| Объем селезенки (MRI) - Медианное значение ^b (диапазон; см ³) | 3352,8 (726; 7243) | 2997,5 (890; 7607) |
| Общий показатель симптомов - Медианное значение (диапазон; TSS) | 22,29 (6,7, 58,4) | 23,86 (3,1, 57,2) |
| Зависимость от переливания эритроцитов ^c | 14 (29,2%) | 12 (20,3%) |
| Число тромбоцитов – Медианное значение (диапазон; ×10 ⁹ /л) | 153 (74, 1097) | 146 (65, 798) |
| Время с момента постановки первоначального диагноза – Медианное значение (диапазон; месяцы) | 48,90 (2,0; 227,3) | 42,84 (6,6; 200,7) |
| Время после проведения последней терапии JAKi – Медианное значение (диапазон; месяцы) | 1,41 (0,5, 31,2) | 1,71 (0,5, 37,8) |
| Продолжительность предшествующей терапии JAKi – Медианное значение (диапазон; месяцы) | 22 (3, 90) | 25 (1, 73) |

^a Вариант протокола.

^b По оценке независимого наблюдательного комитета.

^c Получили 6 единиц PRBC за 12 недель до включения.

К моменту первичной даты прекращения сбора клинических данных медианная продолжительность периода исследования составила 22,6 месяцев (диапазон, 0,2-27,4 месяца); медианная продолжительность периода лечения составила 6,2 месяцев (диапазон, 0,0-27,2 месяцев). У шести (10,2%) пациентов в подгруппе 9,4 мг/кг присутствовал ответ селезенки по данным МРТ, подтвержденный независимым наблюдательным комитетом (IRC).

К моменту даты прекращения сбора клинических данных пациентов наблюдали на протяжении периода с медианой 22,6 (0,2-27,4) месяцев, включающих лечение с медианной продолжительностью 6,2 (0,0-27,2) месяцев. Медианная продолжительность лечения была больше в подгруппе 9,4 мг/кг (7,7 месяцев) по сравнению с подгруппой 4,7 мг/кг. У шести (10,2%) пациентов в подгруппе 9,4 мг/кг присутствовал ответ селезенки по данным МРТ, при этом в подгруппе 4,7 мг/кг (см. фиг. 1) ответы отсутствовали. У девятнадцати (32%) пациентов в подгруппе 9,4 мг/кг и 3 (6%) пациентов в подгруппе 4,7 мг/кг наблюдался ответ симптомов (снижение TSS ≥ 50%) (см. фиг. 2). Медианная ОВ в подгруппе 9,4 мг/кг не была

достигнута к первой дате прекращения сбора клинических данных, тогда как в подгруппе 4,7 мг/кг медианная ОВ составила 19,9 месяцев. Уровни выживаемости в течение 18 месяцев составили 76,7% и 62,9% для подгруппы 9,4 мг/кг и подгруппы 4,7 мг/кг, соответственно. Анализы чувствительности при цензурировании пациентов в момент эскалации дозы для последующей терапии JAKi или трансплантации стволовых клеток давали аналогичные результаты. В подгруппе 9,4 мг/кг наблюдалась связь между пациентами с ТО и ОВ (медианная ОВ не была достигнута у пациентов с ТО и составила 23,6 месяцев для пациентов без ТО). Показатели ответа селезенки были выше у пациентов с 1 HMR-мутацией (ASXL1, EZH2, SRSF2 или IDH1/2).

Наиболее распространенные нежелательные явления при лечении (всех степеней) в подгруппе 9,4 мг/кг были представлены тромбоцитопенией (49%), анемией (44%), нейтропенией (36%) и тошнотой (34%); и в подгруппе 4,7 мг/кг - диареей (38%), тошнотой (31%), анемией (31%) и тромбоцитопенией (23%). Нейтропения $\frac{3}{4}$ степени и тромбоцитопения наблюдались чаще в подгруппе 9,4 мг/кг (34% и 42%, соответственно) по сравнению с подгруппой 4,7 мг/кг (13% и 29%, соответственно); большинство случаев цитопении разрешились в течение 4 недель. Повышение показателей ФПП $\frac{3}{4}$ степени наблюдалось у 7 пациентов в период исследования. Связанная с иметелстатом гепатотоксичность, подтвержденная независимым комитетом по оценке реакций со стороны печени, не наблюдалась.

К моменту второй даты прекращения сбора клинических данных пациентов наблюдали на протяжении периода с медианой 27,4 (0,2-33,0) месяцев, включающих лечение с медианной продолжительностью 26,9 (0,1-118,1) недель. Медианная продолжительность лечения была больше в подгруппе 9,4 мг/кг (33,3 недель) по сравнению с подгруппой 4,7 мг/кг (23,9 недель). Подгруппа 4,7 мг/кг была досрочно закрыта, что повлияло на продолжительность лечения. Медианная ОВ с 95% доверительным интервалом в подгруппе 9,4 мг/кг составила 29,9 месяцев (22,8, Н.О.) (Н.О. = не подлежала оценке) в подгруппе 9,4 мг/кг и была достигнута ко второй дате прекращения сбора клинических данных.

Тройной отрицательный статус и ОВ.

Субъектов группируют по мутационному статусу генов JAK2/MPL/CALR, тройному отрицательному статусу (ТО, отсутствие мутации в каждом из генов JAK2/MPL/CALR) и отсутствию ТО (с мутацией в любом из генов JAK2/MPL/CALR). Медианная ОВ не подлежала оценке (Н.О.) для субъектов с ТО с 95% доверительным интервалом (23,2, Н.О.) и составляла 23,6 месяцев для субъектов без ТО с 95% доверительным интервалом (20,7, Н.О.) в подгруппе 9,4 мг/кг, тогда как в подгруппе 4,7 мг/кг медианная ОВ с 95% доверительным интервалом составила 22,3 (17, Н.О.) и 20,3 (18,3, Н.О.) для субъектов с ТО и субъектов без ТО, соответственно. В подгруппе 9,4 мг/кг более низкий уровень смертности наблюдался в группе с тройным отрицательным статусом (ТО) по сравнению с группой без ТО (см. табл. 2, фиг. 3 и 4).

Таблица 2

Общая выживаемость с группировкой по мутационному статусу генов JAK2/MPL/CALR

| Доза (мг/кг) | Мутационный статус | Уровень смертности % | Медианное выживание, месяцев (95% Д.И.) | HR (95% Д.И.) | P-значение (логранговый критерий) |
|--------------|--------------------|----------------------|---|-------------------|-----------------------------------|
| 4,7 | ТО | 40 | 22,3 (17, Н.О.) | | |
| | Без ТО | 36,8 | 20,3 (18,3, Н.О.) | 0,98 (0,32, 2,98) | 0,9719 |
| 9,4 | ТО | 18,8 | Н.О. (23,2, Н.О.) | | |
| | Без ТО | 41,5 | 23,6 (20,7, Н.О.) | 2,76 (0,81, 9,46) | 0,0910 |

К моменту второй даты прекращения сбора клинических данных более низкий уровень смертности наблюдался в подгруппе 9,4 мг/кг в группе с тройным отрицательным статусом (ТО) по сравнению с группой без ТО (см. табл. 3, фиг. 6 и 7).

Таблица 3

Общая выживаемость с группировкой по мутационному статусу генов JAK2/MPL/CALR

| Доза иметелстата (мг/кг) | Мутационный статус | Процент скончавшихся субъектов | Медианное выживание (месяцы) (95% Д.И.) | HR* (95% Д.И.) | Р-значение (Логранговый критерий) |
|--------------------------|----------------------------|--------------------------------|---|-------------------|-----------------------------------|
| 4,7 | Тройной отрицательный (ТО) | 6/10 (60,0%) | 23,1 (4,2, Н.О.) | | |
| | Без ТО (MUT) | 21/38 (55,3%) | 19,5 (16,7, 31,6) | 1,16 (0,46, 2,87) | 0,7562 |
| 9,4 | Тройной отрицательный (ТО) | 4/16 (25,0%) | Н.О. (23,2, Н.О.) | | |
| | Без ТО (MUT) | 21/41 (51,2%) | 24,6 (19,7, Н.О.) | 2,60 (0,89, 7,59) | 0,0700 |

*HR = Отношение рисков.

Тройной отрицательный статус и ответ на 24 неделе.

Для подгруппы 9,4 мг/кг больший показатель ответа (SVR или TSS) наблюдался в группе ТО по сравнению с группой без ТО (см. табл. 4 ниже).

Базовый мутационный статус JAK2/CALR/MPL и клинический ответ

| SVR > 20% на 24 неделе согласно IRC | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|
| Мутационный статус JAK2/CALR/MPL | Всего, N=105 | 4,7 мг/кг, N=48 | | | 9,4 мг/кг, N=57 | | |
| | | Общее число | Присутствует, N=2 (4,2%) | Отсутствует, N=46 (95,8%) | Общее число | Присутствует, N=12 (21,1%) | Отсутствует, N=45 (78,9%) |
| ТО | 26(24,8%) | 10 | 0 (0%) | 10 (100%) | 16 | 5 (31,25%) | 11 (68,75%) |
| Без ТО | 79 (75,2%) | 38 | 2 (5,3%) | 36 (94,7%) | 41 | 7 (17,1%) | 34 (82,9%) |
| SVR > 35% на 24 неделе согласно IRC | | | | | | | |
| Мутационный статус JAK2/CALR/MPL | Всего, N=105 | 4,7 мг/кг, N=48 | | | 9,4 мг/кг, N=57 | | |
| | | Общее число | Присутствует, N=0 (0%) | Число, N=48 (100%) | Общее число | Присутствует, N=6 (10,5%) | Отсутствует, N=51 (89,5%) |
| ТО | 26(24,8%) | 10 | 0 (0%) | 10 (100%) | 16 | 3 (18,75%) | 13 (81,25%) |
| Без ТО | 79 (75,2%) | 38 | 0 (0%) | 38 (100%) | 41 | 3 (7,3%) | 38 (92,7%) |
| TSS > 50% снижение на 24 неделе | | | | | | | |
| Мутационный статус JAK2/CALR/MPL | Всего, N=105 | 4,7 мг/кг, N=48 | | | 9,4 мг/кг, N=57 | | |
| | | Общее число | Присутствует, N=3 (6,3%) | Отсутствует, N=45 (93,8%) | Общее число | Присутствует, N=18 (31,6%) | Отсутствует, N=39 (68,4%) |
| ТО | 26(24,8%) | 10 | 1 (10,0%) | 9 (90,0%) | 16 | 8 (50%) | 8 (50%) |
| Без ТО | 79 (75,2%) | 38 | 2 (5,3%) | 36 (94,7%) | 41 | 10 (24,4%) | 31 (75,6%) |
| | (75,2%) | | | | | | |

Молекулярный риск и ответы на 24 неделе.

В подгруппе 9,4 мг/кг больший показатель ответа (SVR или TSS) наблюдался в группе низкого молекулярного риска (LMR) или в группе высокого молекулярного риска (HMR) с единственной мутацией (MUT) по сравнению с группой HMR более чем с 1 мутацией (см. табл. 5).

Молекулярный риск и ответы на 24 неделе

| SVR ≥ 20% на 24 неделе | | | | | | | |
|--|--------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------|
| Молекулярный риск | Всего, N=105 | 4,7 мг/кг, N=48 | | | 9,4 мг/кг, N=57 | | |
| | | Общее число | Присутствует, N=1 (2,1%) | Отсутствует, N=47(97,8%) | Общее число | Присутствует, N=12 (21,1%) | Отсутствует, N=45 (78,9%) |
| LMR, Нет мутаций | 34 (32,4%) | 12 | 1 (8,3%) | 11 (91,7%) | 22 | 5 (22,7%) | 17 (77,3%) |
| HMR с 1 мутацией | 48 (45,7%) | 27 | 0 (0%) | 27(100%) | 21 | 6 (28,6%) | 15 (71,4%) |
| HMR более чем с 1 мутацией | 23 (21,9%) | 9 | 0 (0%) | 9 (100%) | 14 | 1 (7,1%) | 13 (92,9%) |
| SVR ≥ 35% на 24 неделе согласно IRC | | | | | | | |
| Молекулярный риск | Всего, N=105 | 4,7 мг/кг, N=48 | | | 9,4 мг/кг, N=57 | | |
| | | Общее число | Присутствует, N=0 (0%) | Отсутствует, N=48 (100%) | Общее число | Присутствует, N=6 (10,5%) | Отсутствует, N=51 (89,5%) |

| | | | | | | | |
|---|--------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| LMR, Нет мутаций | 34 (32,4%)) | 12 | 0 (0%) | 12 (100%) | 22 | 2 (9,1%) | 20 (90,9%) |
| HMR с 1 мутацией | 48 (45,7%)) | 27 | 0 (0%) | 27 (100%) | 21 | 4 (19%) | 17 (81%) |
| HMR более чем с 1 мутацией | 23 (21,9%)) | 9 | 0 (0%) | 9 (100%) | 14 | 0 (0%) | 14 (100%) |
| TSS > 50% снижение на 24 неделе | | | | | | | |
| Молекулярны й риск | Всего, N=105 | 4,7 мг/кг, N=48 | | | 9,4 мг/кг, N=57 | | |
| | | Обще е число | Присутствует , N=3 (6,3%) | Отсутствует, N=45 (93,8%) | Обще е число | Присутствует , N=18 (31,6%) | Отсутствует , N=39 (68,4%) |
| LMR, Нет мутаций | 34 (32,4%)) | 12 | 3 (25%) | 9 (75%) | 22 | 8 (36,4%) | 14 (63,6%) |
| HMR с 1 мутацией | 48 (45,7%)) | 27 | 0 (0%) | 27 (100%) | 21 | 7 (33,3%) | 14 (66,7%) |
| HMR более чем с 1 мутацией | 23 (21,9%)) | 9 | 0 (0%) | 9 (100%) | 14 | 3 (21,4%) | 11 (78,6%) |

Для субъектов, получавших 9,4 мг/кг, наблюдалась связь между следующими факторами и клиническими ответами или ОВ.

Тройной отрицательный статус (ТО): ответ (SVR или TSS) чаще встречался у субъектов с ТО. Медианная ОВ не подлежала оценке для субъектов с ТО, субъекты без ТО = 23,6 месяцев; и

Молекулярный риск: ответ (SVR или TSS) чаще встречался у субъектов с HMR только с одной мутацией, и наблюдались ответы у пациентов с HMR более чем с одной мутацией, которые получали лечение 9,4 мг/кг иметелстата.

Пример 2. Базовая длина теломер (ДТ) и общая выживаемость (ОВ).

Субъектов группируют по медианному значению базовой ДТ. В подгруппе 9,4 мг/кг медианная ОВ не подлежала оценке (Н.О.) для первой даты прекращения сбора клинических данных с 95% доверительным интервалом (23,2, Н.О.) для субъектов с меньшей базовой ДТ (\leq медианное значение) и составляла 22,8 месяцев (16,2, Н.О.) для субъектов с большей ДТ ($>$ медианное значение), соответственно (табл. 6). В подгруппе 4,7 мг/кг медианная ОВ с 95% доверительным интервалом составляла 20,3 (17,2, Н.О.) месяца и 22,3 (16,6, Н.О.) месяца для субъектов с меньшей базовой ДТ и субъектов с большей ДТ, соответственно (табл. 6).

В подгруппе 9,4 мг/кг тренд лучшей ОВ наблюдался для субъектов с меньшей базовой ДТ, т.е. с базовой ДТ, меньшей медианной ДТ или равной ей.

Таблица 6

Зависимость общей выживаемости от базовой длины теломер (ДТ)
с группировкой по медианному значению
4,7 МГ/КГ 9,4 МГ/КГ

| | ≤Медианное >Медианное | | | ≤Медианное >Медианное | | |
|---|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| | N | значение | значение | N | значение | значение |
| Субъекты с базовым значением | 40 | 18 | 22 | 53 | 29 | 24 |
| Число оцениваемых субъектов | 40 | 18 (45,0%) | 22(55,0%) | 53 | 29(54,7%) | 24(45,3%) |
| Число субъектов с цензурированными данными (%) | 20 | 8 (20,0%) | 12(30,0%) | 35 | 21(39,6%) | 14(26,4%) |
| Число событий (%) | 20 | 10 (25,0%) | 10(25,0%) | 18 | 8(15,1%) | 10(18,9%) |
| Общая выживаемость (месяцы) | | | | | | |
| Медианное (95% Д.И.) | 22,3 (18,2, Н.О.) | 20,3 (17,2, Н.О.) | 22,3 (16,6, Н.О.) | Н.О. (22,8, Н.О.) | Н.О. (23,2, Н.О.) | 22,8 (16,2, Н.О.) |
| Уровень выживаемости через 18 месяцев, % (95% Д.И.) | 68,2 (50,7, 80,6) | 76,7 (49,2, 90,6) | 61,0 (36,7, 78,3) | 75,9 (61,5, 85,6) | 81,2 (60,5, 91,7) | 69,8 (46,9, 84,3) |
| Уровень выживаемости через 24 месяца, % (95% Д.И.) | 39,6 (21,1, 57,6) | 34,1 (10,9, 59,3) | 46,6 (21,8, 68,2) | 54,2 (35,1, 69,9) | 59,3 (30,9, 79,3) | 47,6 (22,1, 69,4) |

Базовая ДТ и ответы на 24 неделе.

Базовая длина теломер (ДТ): SVR- или TSS-ответ на 24 неделе чаще встречался у субъектов с меньшей базовой ДТ (\leq медианное значение). У 17,3% (5/29) субъектов с меньшей базовой ДТ и у 4,2% (1/24) субъектов с большей базовой ДТ присутствовал ответ селезенки, соответственно. У 34,5% (10/29) субъектов с меньшей базовой ДТ и у 25% (6/24) субъектов с большей базовой ДТ присутствовал TSS-ответ, соответственно. В подгруппе 9,4 мг/кг на 24 неделе больший показатель ответа (SVR или TSS) чаще наблюдался у субъектов с меньшей базовой ДТ по сравнению с субъектами с большей ДТ (табл. 7).

Таблица 7

Обзор зависимости клинического ответа от базовой длины теломер (ДТ)

| Базовая ДТ | SVR \geq 35% на 24 неделе согласно IRC | | | | | | |
|--|--|--------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| | Всего, N=93 С данным и | 4,7 мг/кг, N=40 | | | 9,4 мг/кг, N=53 | | |
| | | Обще е число | Присутствует , N=0 (0%) | Отсутствует , N=40 (100%) | Обще е число | Присутствует , N=6 (10,5%) | Отсутствует , N=47 (89,5%) |
| Меньшая ДТ (\leq Медианное значение) | 47 | 18 | 0 (0%) | 10 (100%) | 29 | 5 (17,25%) | 24 (82,75%) |
| Большая ДТ ($>$ Медианно е значение) | 46 | 22 | 0 (0%) | 38 (100%) | 24 | 1 (4,2%) | 23 (92,7%) |
| | | | | | | | |
| Базовая ДТ | TSS \geq 50% снижение на 24 неделе | | | | | | |
| | Всего, N = 93 с данным и | 4,7 мг/кг, N=40 | | | 9,4 мг/кг, N=53 | | |
| | | Обще е число | Присутствует , N = 2 (5%) | Отсутствует , N = 38 (95%) | Обще е число | Присутствует , N = 16 (30,2%) | Отсутствует , N = 37 (69,8%) |
| Меньшая ДТ (\leq Медианное значение) | 47 | 18 | 1 (5,6%) | 17 (94,4%) | 29 | 10 (34,5%) | 19 (65,6%) |
| Большая ДТ | 46 | 22 | 1 (4,5%) | 21 (95,5%) | 24 | 6 (25%) | 18 (75%) |
| ($>$ Медианно е значение) | | | | | | | |

Пример 3. Дозозависимый фармакодинамический (ФД) эффект.

Активность теломеразы и hTERT анализировали для оценки фармакодинамических эффектов иметелстата. Из субъектов с доступными данными о базовых уровнях и уровнях после лечения у 23 (51,1%) субъектов в подгруппе 9,4 мг/кг и у 10 (29,4%) субъектов в подгруппе 4,7 мг/кг достигалось снижение активности теломеразы \geq 50% от базового уровня; указанный ФД-эффект демонстрировал корреляцию с противоопухолевой активностью в доклинических моделях с ксенотрансплантатами *in vivo*. Кроме того, у 35 (61,4%) субъектов в подгруппе 9,4 мг/кг и 20 (47,7%) субъектов в подгруппе 4,7 мг/кг достигалось $>$ 50% снижение уровня hTERT РНК относительно базового, соответственно (табл. 8). Таким образом, был продемонстрирован дозозависимый ФД-эффект, указывающий на целевое связывание.

Таблица 8

У субъектов достигалось снижение активности теломеразы (ТА) (30%, 50%) или hTERT (50%) относительно базового значения в любые момент времени

| | 4,7 МГ/КГ | 9,4 МГ/КГ |
|------------------------------------|------------|------------|
| Субъекты с базовым уровнем (hTERT) | 48 | 57 |
| hTERT \geq 50% снижение | 20 (41,7%) | 35 (61,4%) |
| Субъекты с базовым уровнем (ТА) | 34 | 45 |
| ТА \geq 30% снижение | 14 (41,2%) | 28 (62,2%) |
| ТА \geq 50% снижение | 10 (29,4%) | 23 (51,1%) |

Пример 4. Связь между ФД-эффектом и ответом на 24 неделе.

Среди тех, у кого наблюдался ответ селезенки, у большего % субъектов (83,3%) достигалось по меньшей мере \geq 50% снижение уровней экспрессии hTERT РНК по сравнению с теми, у кого не наблюдался ответ селезенки (55,6%); среди тех, у кого наблюдался TSS-ответ, у большего % субъектов достигалось по меньшей мере \geq 50% снижение уровней экспрессии hTERT РНК по сравнению с теми, у кого не наблюдался TSS-ответ (табл. 9). Уровни экспрессии hTERT РНК измеряли в образцах цельной крови, взятых у пациентов до и после лечения.

Таблица 9

Связь между снижением hTERT (50%) относительно базового значения и SVR- или TSS-ответом на 24 неделе

| Ответ селезенки на 24 неделе | hTERT > 50% снижение |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| согласно IRC | |
| Присутствует | 5/6 (83,3%) |
| Отсутствует | 55/99(55,6%) |
| TSS-ответ на 24 неделе | |
| Присутствует | 15/24 (62,5%) |
| Отсутствует | 45/81 (55,6%) |

По сравнению с субъектами, у которых отсутствовал ответ селезенки или TSS-ответ, по меньшей мере \geq 30% или \geq 50% снижение активности теломеразы достигалось у большего % субъектов, у которых присутствовал ответ селезенки или TSS-ответ (табл. 10).

Таблица 10

Связь между снижением активности теломеразы (30%, 50%) относительно базовой и SVR- или TSS-ответом на 24 неделе

| Ответ селезенки на 24 неделе | Активность теломеразы | |
|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | >50% снижение | >30% снижение |
| согласно IRC | | |
| Присутствует | 2/4 (50%) | 3/4 (75%) |
| Отсутствует | 34/70 (48,6%) | 41/70 (58,6%) |
| TSS-ответ на 24 неделе | | |
| Присутствует | 12/18 (66,7%) | 15/18 (83,3%) |
| Отсутствует | 24/56 (42,9%) | 29/56 (51,8%) |

Аспекты, в том числе варианты реализации предмета изобретения, описанные в настоящем документе, могут быть полезными по отдельности или в комбинации с одним или более другими аспектами или вариантами реализации. Без ограничения настоящего описания, ниже представлены определенные неограничивающие аспекты настоящего изобретения. Как будет очевидно для специалистов в данной области техники после прочтения указанного документа, каждый из индивидуально пронумерованных аспектов может применяться или быть скомбинирован с любыми предшествующими или последующими индивидуально пронумерованными аспектами. Таким образом, предусмотрены все такие комбинации

аспектов, без ограничения комбинациями аспектов, прямо представленными ниже.

1. Применение ингибитора теломеразы в лечении пациента с миелофиброзом, который определен как имеющий тройной отрицательный статус, где тройной отрицательный статус характеризуется отсутствием мутации в каждом из генов: Янус-киназы 2 (JAK2), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL).

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой первичный миелофиброз.

3. Применение по п.2, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ).

4. Применение по п.2, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

5. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.

6. Применение по любому из 1-4, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK.

7. Применение по любому из 1-4, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и испытывает рецидив.

8. Применение по любому из 1-4, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

9. Применение по любому из 1-8, отличающееся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат.

10. Применение по п.9, отличающееся тем, что указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

11. Применение по п.10, отличающееся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат и вводится в ходе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый из которых включает

внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели;

внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата один раз в неделю в течение трех недель;

внутривенное введение приблизительно 2,5-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели или

внутривенное введение приблизительно 0,5-9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

12. Применение по п.11, отличающееся тем, что каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

13. Применение по п.12, отличающееся тем, что каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

14. Применение по любому из пп.1-13, отличающееся тем, что среднюю относительную длину теломер определяют путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента.

15. Применение по любому из пп.1-14, дополнительно включающее выбор пациента, идентифицированного как пациент, в биологическом образце от которого средняя относительная длина теломер в целевых клетках определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов.

16. Применение по любому из пп.1-15, дополнительно включающее скрининг пациента для определения наличия у указанного пациента высокого молекулярного риска (HMR), при этом наличие HMR включает присутствие мутации по меньшей мере в одном гене, выбранном из группы, состоящей из ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2.

17. Применение по любому из пп.1-16, дополнительно включающее оценку уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента, после введения указанного ингибитора теломеразы.

18. Применение по п.17, отличающееся тем, что уровень экспрессии hTERT снижен на 50% или более относительно базового уровня экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы.

19. Применение по любому из пп.17-18, дополнительно включающее изменение дозировки указанного ингибитора теломеразы, частоты дозирования или курса терапии, проводимого у субъекта.

20. Применение ингибитора теломеразы в лечении пациента с миелофиброзом, отличающееся тем, что указанный пациент определен как имеющий высокий молекулярный риск (HMR),

где наличие HMR включает присутствие мутации по меньшей мере в одном гене, выбранном из группы, состоящей из гена гомолога дополнительных половых щетинок 1 (ASXL1), гена энхансера гомолога белка Zeste 2 (EZH2), гена богатого серином и аргинином фактора сплайсинга 2 (SRSF2) и гена изоцитратдегидрогеназы 1/2 (IDH1/2).

21. Применение по п.20, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой пер-

вичный миелофиброз.

22. Применение по п.21, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ).

23. Применение по п.21, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

24. Применение по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.

25. Применение по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK.

26. Применение по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и испытывает рецидив.

27. Применение по любому из пп.20-23, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

28. Применение по любому из пп.20-27, отличающееся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат.

29. Применение по п.28, отличающееся тем, что указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

30. Применение по п.28, отличающееся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат и его вводят в ходе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый из которых включает

внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели;

внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата один раз в неделю в течение трех недель;

внутривенное введение приблизительно 2,5-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели или

внутривенное введение приблизительно 0,5-9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

31. Применение по п.30, отличающееся тем, что каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

32. Применение по п.31, отличающееся тем, что каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

33. Применение по любому из пп.20-32, дополнительно включающее определение средней относительной длины теломер путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента.

34. Применение по любому из пп.20-33, дополнительно включающее выбор пациента, идентифицированного как пациент, в биологическом образце от которого средняя относительная длина теломер в целевых клетках определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов.

35. Применение по любому из пп.20-34, дополнительно включающее скрининг пациента для определения наличия у указанного пациента тройного отрицательного статуса, характеризующегося отсутствием мутации в каждом из генов, выбранных из группы, состоящей из JAK2, CALR и MPL.

36. Применение по любому из пп.20-35, дополнительно включающее оценку уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения указанного ингибитора теломеразы.

37. Применение по п.36, отличающееся тем, что уровень экспрессии hTERT снижается на 50% или более относительно базового уровня экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы.

38. Применение по любому из пп.36, 37, дополнительно включающее изменение дозировки указанного ингибитора теломеразы, частоты дозирования или курса терапии, проводимого у указанного субъекта.

39. Применение ингибитора теломеразы в лечении пациента, который имеет миелофиброз, причём было определено, что клетки, присутствующие в биологическом образце от указанного пациента имеют среднюю относительную длину теломер, которая определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов.

40. Применение по п.39, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой первичный миелофиброз.

41. Применение по п.40, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ).

42. Применение по п.40, отличающееся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

43. Применение по любому из пп.39-42, отличающееся тем, что указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.

44. Применение по любому из пп.39-42, отличающееся тем, что указанный пациент получал тера-

пию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK.

45. Применение по любому из пп.39-42, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и испытывает рецидив.

46. Применение по любому из пп.39-42, отличающееся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

47. Применение по любому из пп.39-46, отличающееся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат.

48. Применение по п.47, отличающееся тем, что указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

49. Применение по п.47, отличающееся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат и его вводят в ходе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 циклов дозирования, каждый из которых включает

внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели;

внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата один раз в неделю в течение трех недель;

внутривенное введение приблизительно 2,5-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели или

внутривенное введение приблизительно 0,5-9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

50. Применение по п.49, отличающееся тем, что каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 7-10 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

51. Применение по п.50, отличающееся тем, что каждый цикл дозирования включает внутривенное введение приблизительно 9,4 мг/кг иметелстата однократно каждые три недели.

52. Применение по любому из пп.39-51, дополнительно включающее определение средней относительной длины теломер путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в клетках, присутствующих в указанном биологическом образце от пациента.

53. Применение по любому из пп.39-52, дополнительно включающее оценку уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения указанного ингибитора теломеразы.

54. Применение по п.53, отличающееся тем, что уровень экспрессии hTERT снижается на 50% или более относительно базового уровня экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы.

55. Применение по любому из пп.53-54, дополнительно включающее изменение дозировки указанного ингибитора теломеразы, частоты дозирования или курса терапии, проводимого у указанного субъекта.

56. Способ выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий

тестирование пациента на тройной отрицательный статус, который характеризуется отсутствием мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL; и

выбор указанного пациента при условии наличия у него тройного отрицательного статуса,

при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

57. Способ по п.56, отличающийся тем, что указанный пациент страдает миелофиброзом.

58. Способ по п.57, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой первичный миелофиброз.

59. Способ по п.57, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ).

60. Способ по п.57, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

61. Способ по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.

62. Способ по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что указанный пациент

ранее получал терапию ингибиторами JAK;

ранее получал терапию ингибиторами JAK и она оказалась неэффективной или

ранее получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

63. Способ по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK.

64. Способ по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и испытывает рецидив.

65. Способ по любому из пп.56-60, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

66. Способ по любому из пп.56-65, дополнительно включающий введение указанного ингибитора

теломеразы указанному пациенту.

67. Способ по п.66, отличающийся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат.

68. Способ по п.67, отличающийся тем, что указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

69. Способ по любому из пп.56-68, дополнительно включающий получение образца, который содержит ДНК от пациента.

70. Способ по п.69, отличающийся тем, что указанный образец содержит костный мозг, периферическую кровь или их комбинацию.

71. Способ по п.70, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца костного мозга, образца периферической крови или их комбинации и выделение ДНК из образца костного мозга, образца периферической крови или их комбинации.

72. Способ по п.70, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца костного мозга от пациента;

выделение клеток из образца костного мозга и

экстракцию ДНК из выделенных клеток.

73. Способ по п.70, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает

получение образца периферической крови от указанного пациента;

выделение клеток из указанного образца периферической крови и

экстракцию ДНК из выделенных клеток.

74. Способ выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий

тестирование пациента для определения наличия у него HMR, где наличие HMR включает присутствие мутации по меньшей мере в одном гене, выбранном из группы, состоящей из ASXL1, EZH2, SRSF2 и IDH1/2; и

выбор указанного при условии наличия у него HMR,

при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.

75. Способ по п.74, отличающийся тем, что указанный пациент страдает миелофиброзом.

76. Способ по п.75, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой первичный миелофиброз.

77. Способ по п.75, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ).

78. Способ по п.75, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

79. Способ по любому из пп.74-78, отличающийся тем, что указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.

80. Способ по любому из пп.74-78, отличающийся тем, что указанный пациент: ранее получал терапию ингибиторами JAK;

ранее получал терапию ингибиторами JAK, и она оказалась неэффективной; или ранее получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

81. Способ по любому из пп.74-78, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK.

82. Способ по любому из пп.74-78, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и испытывает рецидив.

83. Способ по любому из пп.74-78, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

84. Способ по любому из пп.74-83, дополнительно включающий введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту.

85. Способ по п.84, отличающийся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат.

86. Способ по п.85, отличающийся тем, что указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.

87. Способ по любому из пп.74-86, дополнительно включающий получение образца, который содержит ДНК от пациента.

88. Способ по п.87, отличающийся тем, что указанный образец содержит костный мозг, периферическую кровь или их комбинацию.

89. Способ по п.88, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца костного мозга, образца периферической крови или их комбинации и выделение ДНК из образца костного мозга, образца периферической крови или их комбинации.

90. Способ по п.88, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца костного мозга от указанного пациента; выделение клеток из образца костного мозга и экстракцию ДНК из выделенных клеток.
91. Способ по п.88, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца периферической крови от указанного пациента; выделение клеток из указанного образца периферической крови и экстракцию ДНК из выделенных клеток.
92. Способ выбора пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий
тестирование пациента на среднюю относительную длину теломер путем анализа относительной длины теломерных нуклеиновых кислот в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента; и
выбор указанного пациента при условии, что средняя относительная длина теломер в целевых клетках, присутствующих в биологическом образце от пациента, определена как попадающая в 50-й или более низкий процентиль диапазона относительных длин теломер, определенных для одного или более известных стандартных образцов, при этом указанный выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы.
93. Способ по п.92, отличающийся тем, что указанный пациент страдает миелофиброзом.
94. Способ по п.93, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой первичный миелофиброз.
95. Способ по п.93, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ).
96. Способ по п.93, отличающийся тем, что указанный миелофиброз представляет собой миелофиброз, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).
97. Способ по любому из пп.92-96, отличающийся тем, что указанный пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.
98. Способ по любому из пп.92-96, отличающийся тем, что указанный пациент ранее получал терапию ингибиторами JAK;
ранее получал терапию ингибиторами JAK и она оказалась неэффективной или ранее получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.
99. Способ по любому из пп.92-96, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK.
100. Способ по любому из пп.92-96, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и испытывает рецидив.
101. Способ по любому из пп.92-96, отличающийся тем, что указанный пациент получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.
102. Способ по любому из пп.92-101, дополнительно включающий введение указанного ингибитора теломеразы указанному пациенту.
103. Способ по п.102, отличающийся тем, что указанный ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат.
104. Способ по п.103, отличающийся тем, что указанный иметелстат представляет собой иметелстат натрия.
105. Способ по любому из пп.92-104, дополнительно включающий получение образца, который содержит ДНК от пациента.
106. Способ по п.105, отличающийся тем, что указанный образец содержит костный мозг, периферическую кровь или их комбинацию.
107. Способ по п.106, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца костного мозга, образца периферической крови или их комбинации и выделение ДНК из образца костного мозга, образца периферической крови или их комбинации.
108. Способ по п.106, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца костного мозга от указанного пациента;
выделение клеток из образца костного мозга; и экстракцию ДНК из выделенных клеток.
109. Способ по п.106, отличающийся тем, что этап получения образца от пациента включает получение образца периферической крови от указанного пациента;
выделение клеток из указанного образца периферической крови и экстракцию ДНК из выделенных клеток.
110. Способ мониторинга терапевтической эффективности у субъекта с миелофиброзом (МФ), включающий
измерение уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения ингибитора теломеразы; и

сравнение уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце с базовым уровнем экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы,

при этом по снижению уровня экспрессии hTERT на 50% или более в указанном биологическом образце идентифицируют субъекта, который с большой вероятностью получит пользу от лечения указанным ингибитором теломеразы.

111. Способ по п.110, отличающийся тем, что измеряемый или оцениваемый уровень экспрессии hTERT представлен уровнем экспрессии РНК hTERT.

112. Способ идентификации пациента с миелофиброзом (МФ) для лечения ингибитором теломеразы, включающий

измерение уровня экспрессии hTERT в биологическом образце, полученном от указанного пациента после введения ингибитора теломеразы; и

сравнение уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце с базовым уровнем экспрессии hTERT до введения указанного ингибитора теломеразы,

отличающийся тем, что по снижению уровня экспрессии hTERT в указанном биологическом образце идентифицируют пациента, который с большой вероятностью получит пользу от лечения указанным ингибитором теломеразы.

113. Способ по п.112, отличающийся тем, что указанное снижение уровня экспрессии hTERT составляет 50% или более.

Хотя конкретные варианты реализации были достаточно подробно описаны в качестве иллюстраций и примеров для ясности понимания, в свете изложенных принципов настоящего изобретения очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть внесены в него без отступления от существа или объема прилагаемой формулы изобретения.

Соответственно, вышеизложенное лишь иллюстрирует принципы настоящего изобретения. Могут быть разработаны различные схемы, в которых, хотя они явным образом и не описаны или не представлены в настоящем документе, реализованы принципы настоящего изобретения и которые входят в объем и соответствуют существу настоящего изобретения. Кроме того, все примеры и условные обозначения, используемые в настоящем документе, по существу предназначены для содействия читателю в понимании принципов настоящего изобретения и привнесенных авторами настоящего изобретения идей, направленных на развитие данной области техники, и не должны быть истолкованы как ограничивающие изобретение конкретными перечисленными примерами и условиями. Кроме того, все утверждения в настоящем документе, где описаны принципы, аспекты и варианты реализации настоящего изобретения, а также их конкретные примеры, включают как структурные, так и функциональные их эквиваленты. Кроме того, подразумевается, что такие эквиваленты включают как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, которые будут разработаны в будущем, т.е. любые разработанные элементы, выполняющие такую же функцию, независимо от структуры. Соответственно, не подразумевается, что объем настоящего изобретения ограничен представленными и описанными в настоящем документе примерами вариантов реализации. В действительности объем и сущность настоящего изобретения определены прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выбора пациента с миелофиброзом, который с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, включающий:

(а) тестирование пациента на тройной отрицательный статус, который характеризуется отсутствием мутации в каждом из генов: Янус-киназы 2 (JAK2), кальретикулина (CALR) и рецептора тромбопоэтина (MPL); и

(б) выбор пациента при условии наличия у него тройного отрицательного статуса,

при этом выбранный пациент с большой вероятностью получит пользу от лечения ингибитором теломеразы, причем ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль, и

ингибитор теломеразы вводят пациенту в дозе, которая составляет от 4,5 до 11,7 мг/кг.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что миелофиброз выбран из группы, состоящей из первичного миелофиброза, миелофиброза, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ), миелофиброза, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

3. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.

4. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что пациент получал терапию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK; получал терапию ингибиторами JAK и испытывал рецидив или получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат натрия.

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий получение образца, содержащего ДНК от пациента, где указанный образец содержит костный мозг, периферическую кровь или их комбинацию.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что доза составляет 4,7 мг/кг.

8. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что доза составляет 9,4 мг/кг.

9. Применение ингибитора теломеразы при лечении пациента с миелофиброзом,

причем пациент определен как имеющий тройной отрицательный статус, характеризующийся отсутствием мутации в каждом из генов JAK2, CALR и MPL, а ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат или его фармацевтически приемлемую соль,

при этом ингибитор теломеразы вводят пациенту в дозе, которая составляет от 4,5 до 11,7 мг/кг.

10. Применение по п.9, причем миелофиброз выбран из группы, состоящей из первичного миелофиброза, миелофиброза, который развивается после истинной полицитемии (пост-ИП МФ), миелофиброза, который развивается после эссенциальной тромбоцитемии (пост-ЭТ МФ).

11. Применение по любому из пп.9, 10, причем пациент ранее не получал терапию ингибиторами JAK.

12. Применение по любому из пп.9-11, причем пациент

получал терапию ингибиторами JAK и был невосприимчив к терапии ингибиторами JAK;

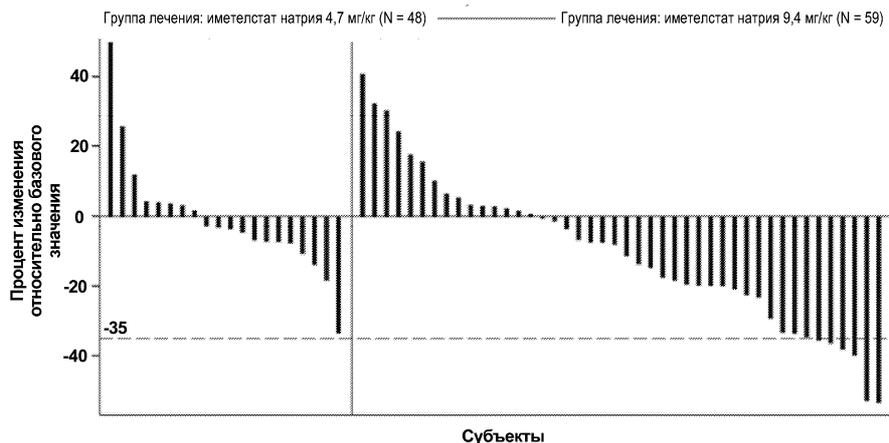
получал терапию ингибиторами JAK и испытывал рецидив или

получал терапию ингибиторами JAK и прекратил терапию ингибиторами JAK из-за связанной с лечением токсичности или непереносимости.

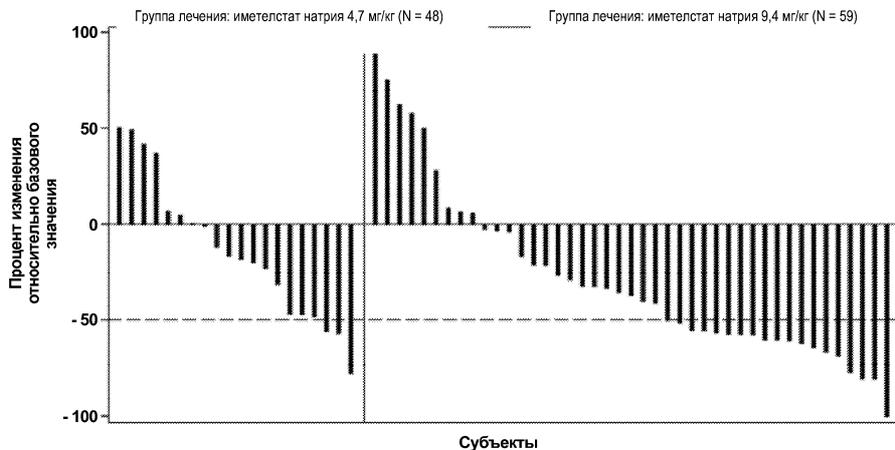
13. Применение по любому из пп.9-12, причем доза составляет 4,7 мг/кг.

14. Применение по любому из пп.9-12, причем доза составляет 9,4 мг/кг.

15. Применение по любому из пп.9-14, причем ингибитор теломеразы представляет собой иметелстат натрия.

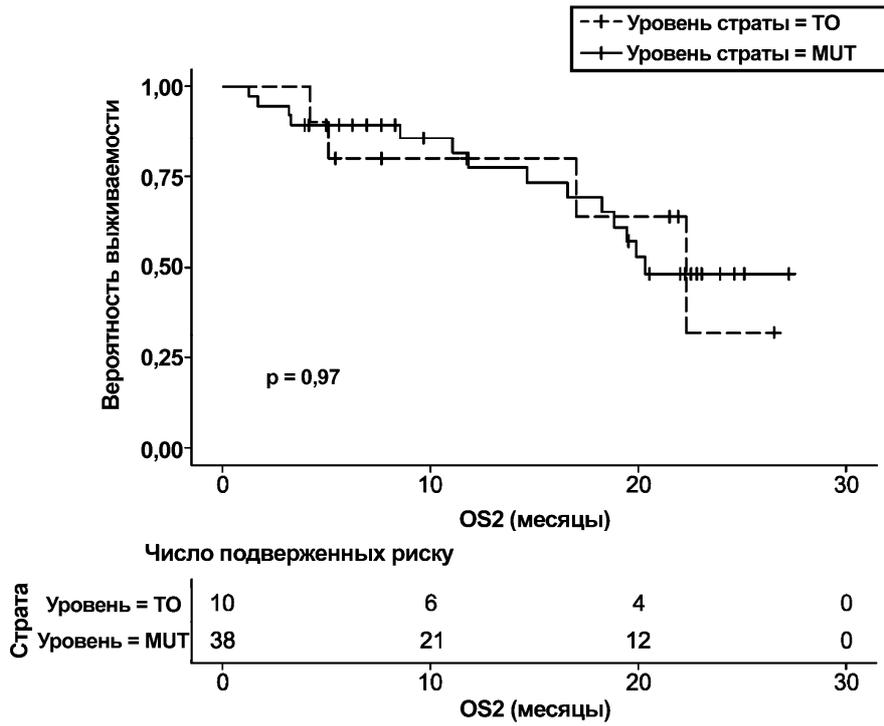


Фиг. 1



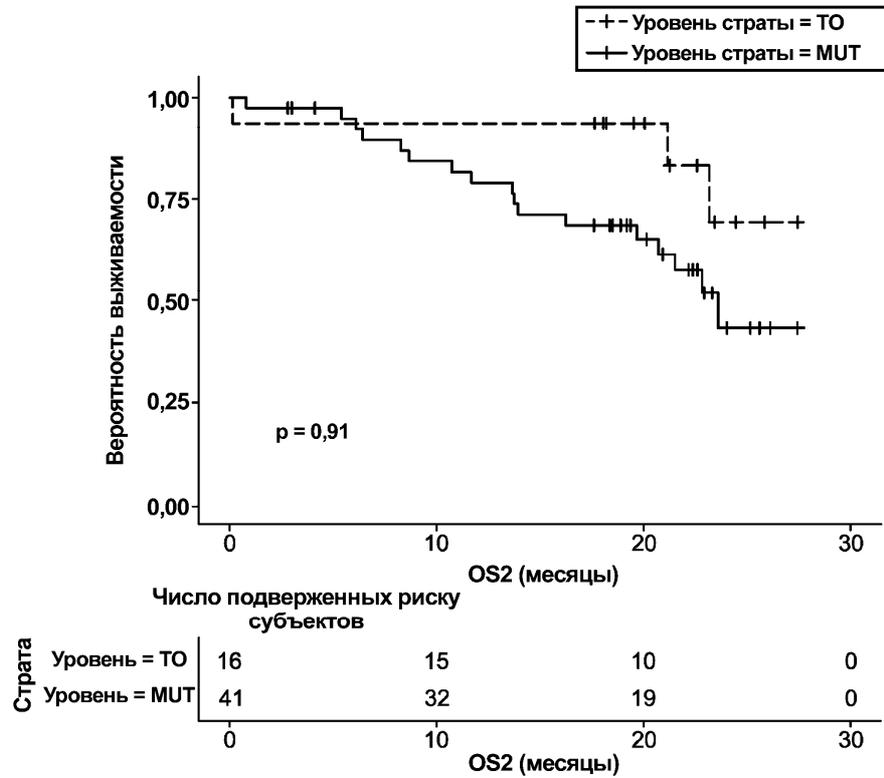
Фиг. 2

Тройной отрицательный статус + иметелстат натрия 4,7 мг/кг

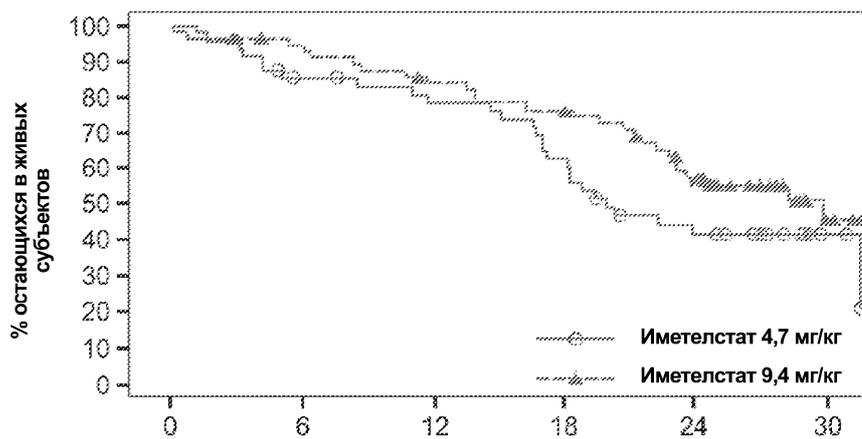


Фиг. 3

Тройной отрицательный статус + иметелстат натрия 9,4 мг/кг



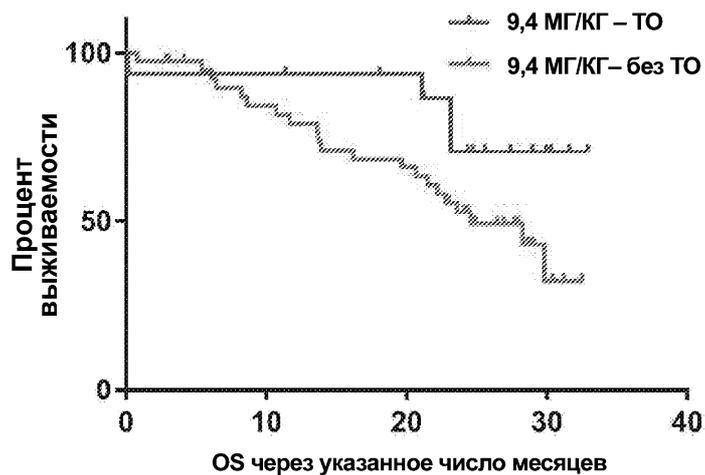
Фиг. 4



| Подверженные риску субъекты | Число месяцев после введения первой дозы | | | | | |
|-----------------------------|--|----|----|----|----|----|
| | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 30 |
| Иметелстат 4,7 мг/кг | 48 | 39 | 35 | 28 | 16 | 3 |
| Иметелстат 9,4 мг/кг | 59 | 53 | 46 | 42 | 29 | 7 |

Фиг. 5

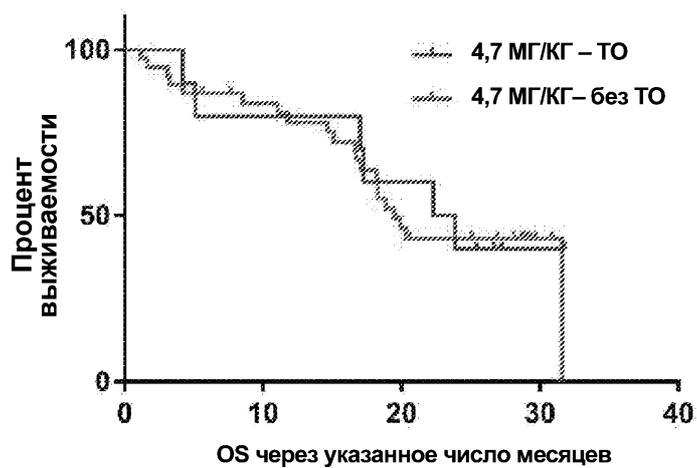
Выживаемость в группе 9,4 МГ/КГ



| | Число подверженных риску субъектов | | | |
|--------|------------------------------------|--------|----|--------|
| | ТО | без ТО | ТО | без ТО |
| ТО | 16 | 16 | 14 | 3 |
| без ТО | 41 | 33 | 20 | 4 |

Фиг. 6

Выживаемость в группе 4,7 МГ/КГ



Число подверженных риску субъектов

| | | | | |
|--------|----|----|----|---|
| ТО | 10 | 9 | 7 | 1 |
| без ТО | 38 | 30 | 16 | 2 |

Фиг. 7

