

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3456333
DAL TITOLO:

“USO DELL’INIBITORE DI TELOMERASI IMETELSTAT PER IL
TRATTAMENTO DI SINDROME MIELODISPLASTICA”

*** **

Descrizione

RIFERIMENTO INCROCIATO A DOMANDE CORRELATE

[0001] La presente domanda di brevetto rivendica priorità sulla domanda di brevetto provvisorio U.S. n. 61/734.941, depositata il 7 dicembre 2012, domanda di brevetto provvisorio U.S. n. 61/799,069, depositata il 15 marzo 2013, domanda di brevetto provvisorio U.S. n. 13/841.711, depositata il 15 marzo 2013, e domanda di brevetto provvisorio U.S. n. 61/900,347 depositata il 5 novembre 2013.

CAMPO DELL'INVENZIONE

[0002] La presente invenzione riguarda composti inibitori di telomerasi per trattare o prevenire sintomi associati a disturbi mieloproliferativi o neoplasie come la trombocitemia essenziale (ET), in particolare la sindrome mielodisplastica.

FONDAMENTO

[0003] Le neoplasie maligne ematologiche sono forme di cancro che iniziano nelle cellule del tessuto che forma il sangue, come il midollo osseo, o nelle cellule del sistema immunitario. Esempi di cancro ematologico sono leucemie acute e croniche, linfomi, mieloma multiplo e sindromi mielodisplastiche.

[0004] Le neoplasie mieloproliferative, o MPN, sono neoplasie ematologiche che derivano da cellule progenitrici mieloidi ematopoietiche neoplastiche nel midollo osseo, come le cellule precursori dei globuli rossi, piastrine e granulociti. La proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche porta a una sovrapproduzione di qualsiasi combinazione di globuli bianchi, globuli rossi e/o piastrine, a seconda della malattia. Queste cellule prodotte in eccesso possono anche essere anormali, portando a ulteriori complicanze cliniche. Vi sono vari tipi di disturbi mieloproliferativi cronici. Inclusive nello spettro della malattia MPN vi sono trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), leucemia mieloide cronica (LMC), mielofibrosi (MF), leucemia neutrofila cronica, leucemia eosinofila cronica e leucemia mieloide acuta (LMA). Una sindrome mielodisplastica (MDS) è un gruppo di sintomi che include il cancro del sangue e del midollo osseo. Le sindromi mielodisplastiche (MDS) includono malattie come anemia refrattaria, anemia refrattaria con blasti in eccesso, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare, e leucemia mielomonocitica cronica (CMML).

Trombocitemia essenziale

[0005] Le piastrine circolanti sono anucleate, sebbene mantengano piccole quantità di mRNA derivato da megacariociti e una capacità biosintetica proteica completamente funzionale (Gnatenko et al., Blood 101, 2285-2293 (2003)). La trombocitemia essenziale (ET) è un sottotipo di disturbo mieloproliferativo, caratterizzato da una aumentata

proliferazione neoplastica di megacariociti, elevati numeri di piastrine circolanti e notevoli eventi tromboemorragici, non raramente neurologici (Nimer, Blood 93, 415-416 (1999)). L'ET è osservata con uguale frequenza nei maschi e nelle femmine, sebbene un ulteriore picco di incidenza tra le femmine all'età di 30 anni possa spiegare l'apparente maggiore prevalenza della malattia nelle donne dopo questa età. La base molecolare dell'ET rimane da stabilire, sebbene storicamente sia stata considerata un disturbo "clonale" (El-Kassar et al., Blood 89, 128 (1997); "Evidence that ET is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell" PJ Fialkow, Blood 1981 58: 916-919). Oltre al volume esagerato di piastrine evidente nei sottogruppi di piastrine di ET, le cellule rimangono morfologicamente indistinguibili dalle loro controparti normali. Nessuna prova funzionale o diagnostica è attualmente disponibile per ET, e resta da diagnosticare escludendo altri potenziali disturbi ematologici. Le stime di incidenza di 2-3 casi per 100.000 all'anno sono coerenti con altri tipi di leucemia, ma i tassi di prevalenza sono almeno dieci volte superiori a causa dei bassi tassi di mortalità associati all'ET.

[0006] Le attuali terapie per ET si concentrano principalmente sulla prevenzione dell'evento trombotico/emorragico e comportano una riduzione non specifica dei livelli piastrinici. Tuttavia, nessuna di queste terapie esistenti si concentra specificamente sulle cellule progenitrici neoplastiche che guidano la neoplasia maligna responsabile dello stato di malattia. Ad esempio, il trattamento dell'ET con chemioterapia citotossica ridimensiona le cellule neoplastiche lasciando al loro posto

cellule progenitrici residue. Ciò dà come risultato nuove cellule neoplastiche derivanti dalle cellule progenitrici e la continuazione dello stato di malattia. In aggiunta, molti individui con ET sviluppano resistenza ai trattamenti di prima linea come idrossiurea, o interrompono del tutto l'uso di questi farmaci a causa di effetti collaterali negativi.

Policitemia vera

[0007] I pazienti con policitemia vera (PV) hanno aumenti marcati della produzione di globuli rossi. Il trattamento è diretto a ridurre il numero eccessivo di globuli rossi. La PV può sviluppare una fase tardiva durante il suo corso, che ricorda la mielofibrosi primaria con citopenie e ipoplasia e fibrosi del midollo. La mutazione del gene Janus chinasi 2 (JAK2) sul cromosoma 9 che causa una proliferazione e sopravvivenza aumentate dei precursori ematopoietici in vitro è stata identificata nella maggior parte dei pazienti con PV. I pazienti con PV hanno un aumentato rischio di eventi cardiovascolari e trombotici e di trasformazione in leucemia mieloide acuta o mielofibrosi primaria. Il trattamento della PV include flebotomia cronica intermittente per mantenere l'ematocrito al di sotto del 45% negli uomini e del 40% nelle donne. Altri possibili trattamenti includono idrossiurea, interferone alfa e aspirina a basso dosaggio.

Mielofibrosi

[0008] La mielofibrosi o MF, o mielofibrosi primaria è una neoplasia mieloproliferativa nello stesso spettro di malattie dell'ET. I pazienti con MF spesso recano la mutazione JAK2 V617F nel midollo

osseo. Occasionalmente ET evolve in MF. L'inibizione di JAK2 è attualmente considerata uno standard di cura per la MF nei paesi in cui ruxolitinib (Jakafi®), un inibitore della janus chinasi, è approvato. Non c'è evidenza che gli inibitori di JAK2, come Jakafi®, inibiscano selettivamente la proliferazione del clone leucemico responsabile della malattia e, quindi, potrebbero non essere "modificanti la malattia".

Leucemia mieloide acuta

[0009] La leucemia mieloide acuta (LMA) è un cancro della linea mieloide delle cellule del sangue. La LMA è la leucemia acuta più comune che colpisce gli adulti. I pazienti con LMA hanno una rapida crescita di globuli bianchi anomali che si accumulano nel midollo osseo e interferiscono con la produzione delle normali cellule del sangue. La sostituzione del midollo osseo normale con cellule leucemiche provoca un calo dei globuli rossi, delle piastrine e dei normali globuli bianchi. I sintomi di LMA includono affaticamento, respiro corto, ecchimosi e sanguinamento facili, e aumentato rischio di infezione. Come leucemia acuta, l'LMA progredisce rapidamente ed è tipicamente fatale entro poche settimane o mesi se non trattata. Lo standard di cura per l'LMA è il trattamento con chemioterapia volto a indurre una remissione; i pazienti possono continuare a ricevere un trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Sindrome mielodisplastica

[0010] Una sindrome mielodisplastica (MDS) è un gruppo di sintomi che include il cancro del sangue e del midollo osseo. Le sindromi

mielodisplastiche (MDS) includono malattie come anemia refrattaria, anemia refrattaria con blasti in eccesso, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare, e leucemia mielomonocitica cronica. Le cellule staminali del sangue immature (blasti) non diventano globuli rossi, globuli bianchi o piastrine sani. Il blasto muore nel midollo osseo o subito dopo avere viaggiato nel sangue. Ciò lascia meno spazio alla formazione di globuli bianchi, globuli rossi e/o piastrine sani nel midollo osseo.

[0011] Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono una raccolta di condizioni mediche ematologiche che implicano una produzione inefficace della classe mieloide delle cellule del sangue. I pazienti con MDS spesso sviluppano anemia grave e richiedono frequenti trasfusioni di sangue. Si verificano anche sanguinamento e rischio di infezioni a causa di piastrine e neutrofili bassi o disfunzionali, rispettivamente. In alcuni casi la malattia peggiora e il paziente sviluppa citopenie (basso emocromo) causate da insufficienza progressiva del midollo osseo. In alcuni casi la malattia si trasforma in leucemia mieloide acuta (LMA). Se la percentuale complessiva di mieloblasti del midollo osseo aumenta oltre un determinato cutoff (20% per l'OMS e 30% per FAB), allora si dice che si è verificata la trasformazione in leucemia mieloide acuta (LMA).

[0012] Ciò che è necessario, quindi, sono nuovi trattamenti per i disturbi proliferativi mielodisplastici o neoplasia come ET, PV, MF, CML e LMA e per la sindrome mielodisplastica che bersagliano le cellule progenitrici neoplastiche responsabili del fenotipo maligno della malattia,

in particolare in individui che sono resistenti a o esperiscono eventi avversi a seguito dell'assunzione di terapie di prima linea comunemente prescritte per questo disturbo.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

[0013] La presente invenzione è definita dalle rivendicazioni. Qualsiasi riferimento nella descrizione a metodi di trattamento si riferisce ai composti, composizioni farmaceutiche e farmaci della presente invenzione per uso in un metodo per il trattamento del corpo umano (o animale) mediante terapia secondo le rivendicazioni. L'invenzione fornita nella presente divulga, *tra gli altri*, metodi per usare composti inibitori di telomerasi per trattare e alleviare sintomi associati a neoplasie mieloproliferative come trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), mielofibrosi (MF) e leucemia mieloide acuta (LMA) bersagliando le cellule progenitrici neoplastiche caratteristiche di queste malattie. L'invenzione ornita nella presente divulga anche, *tra gli altri*, metodi per usare composti inibitori di telomerasi per trattare e alleviare sintomi associati a sindromi mielodisplastiche (MDS) come, ad esempio, anemia refrattaria, anemia refrattaria con eccesso di blasti, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare e leucemia mielomonocitica cronica bersagliando le cellule progenitrici neoplastiche responsabili della produzione dei numeri anormalmente elevati di cellule caratteristici di queste malattie.

[0014] Di conseguenza, in un aspetto, forniti nella presente sono metodi per alleviare almeno un sintomo associato a neoplasie

mieloproliferative in un individuo che ne necessita, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi allevia almeno un sintomo associato a neoplasie mieloproliferative. In alcune forme di realizzazione, il sintomo comprende mal di testa, vertigini o stordimento, dolore al torace, debolezza, svenimento, alterazioni della vista, intorpidimento o formicolio delle estremità, arrossamento, dolore pulsante o bruciante alle estremità (eritromelalgia), milza ingrossata, sangue dal naso, lividi, sanguinamento dalla bocca o dalle gengive, feci sanguinolente o ictus. In alcune forme di realizzazione le neoplasie mieloproliferative sono, ad esempio, trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), mielofibrosi (MF) e leucemia mieloide acuta (LMA). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato

N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme

di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In alcune forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico di allele JAK2. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è

un essere umano.

[0015] Di conseguenza, in un aspetto, forniti nella presente sono metodi per alleviare almeno un sintomo associato a trombocitemia essenziale in un individuo che ne necessita, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi allevia almeno un sintomo associato a trombocitemia essenziale. In alcune forme di realizzazione, il sintomo comprende mal di testa, vertigini o stordimento, dolore al torace, debolezza, svenimento, alterazioni della vista, intorpidimento o formicolio delle estremità, arrossamento, dolore pulsante o bruciante alle estremità (eritromelalgia), milza ingrossata, sangue dal naso, lividi, sanguinamento dalla bocca o dalle gengive, feci sanguinolente o ictus. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato

N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme

di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In alcune forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico di allele JAK2. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, la precedente

terapia basata non su inibitore di telomerasi è idrossiurea, anagrelide, o interferone α -2B. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0016] In un altro aspetto, forniti nella presente sono metodi per ridurre la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche in un individuo cui sono diagnosticate o che si sospetta abbia neoplasie mieloproliferative o sindrome mielodisplastica, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi riduce la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche nell'individuo. In alcune forme di realizzazione le neoplasie mieloproliferative sono, ad esempio, trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), mielofibrosi (MF) e leucemia mieloide acuta (LMA). In alcune forme di realizzazione, per ET una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $600 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo. In alcune forme di realizzazione, una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo non esperisce un evento tromboembolico. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, una ridotta proliferazione di cellule neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo che si verificano

entro 2 mesi o meno dopo l'inizio della somministrazione di inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, una ridotta proliferazione di cellule neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo che si verificano entro 1 mese o meno dopo l'inizio della somministrazione di inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, come per MF, una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche superiori a circa $100 \times 10^9 / \text{l}$ nel sangue dell'individuo. In alcune forme di realizzazione, come per MF, una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato un livello di emoglobina modificato di almeno 90g/l, o 100g/l o 110g/l o 120g/l. In alcune forme di realizzazione, come per MF, una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato una conta dei neutrofilici assoluta di almeno $1,0 \times 10^9/\text{l}$ o almeno $2,0 \times 10^9/\text{l}$. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella

presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o

più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In

alcune forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico di allele JAK2. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0017] In un altro aspetto, forniti nella presente sono metodi per ridurre la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche in un individuo cui sono diagnosticate o che si sospetta abbia trombocitemia essenziale, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi riduce la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche nell'individuo. In alcune forme di realizzazione, una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $600 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo. In alcune forme di realizzazione, una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo non esperisce un evento tromboembolico. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, una ridotta proliferazione di cellule neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo che si verificano entro 2 mesi o meno dopo l'inizio della somministrazione di inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, una ridotta proliferazione di cellule neoplastiche dà come

risultato conte piastriniche inferiori a circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo che si verificano entro 1 mese o meno dopo l'inizio della somministrazione di inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, la precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi è idrossiurea, anagrelide, o interferone α -2B. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato $\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato $\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il

linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un

inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In alcune forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico di allele JAK2. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0018] In un altro aspetto, forniti nel presente documento sono metodi per mantenere conte piastriniche del sangue a meno di circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue di un individuo a cui è stata diagnosticata o che si sospetta abbia trombocitemia essenziale, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi mantiene la conta piastrinica a meno di circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$

nell'individuo. In alcuni aspetti, l'inibitore di telomerasi è somministrato non più di una volta ogni due settimane. In altri aspetti, l'inibitore di telomerasi è somministrato per mantenere le conte piastriniche del sangue da circa $150 \times 10^3 / \mu\text{l}$ a circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue di un individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di

palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente,

la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In alcune forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico di allele JAK2. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, la precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi è idrossiurea, anagrelide, o interferone α -2B. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0019] Di conseguenza, in un aspetto, forniti nella presente sono metodi per alleviare almeno un sintomo associato a policitemia vera (PV) in un individuo che ne necessita, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di

telomerasi allevia almeno un sintomo associato a policitemia vera. In alcune forme di realizzazione, il sintomo comprende mal di testa, vertigini o stordimento, dolore al torace, debolezza, svenimento, alterazioni della vista, intorpidimento o formicolio delle estremità, respiro corto, debolezza o stanchezza, milza ingrossata, sangue dal naso, lividi, sanguinamento dalla bocca o dalle gengive, o feci sanguinolente. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di

realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di

realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita eritroide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-eritroide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0020] Di conseguenza, in un aspetto, forniti nella presente sono metodi per alleviare almeno un sintomo associato a mielofibrosi in un individuo che ne necessita, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi allevia almeno un sintomo associato a mielofibrosi. In alcune forme di realizzazione, il sintomo comprende milza ingrandita e dolore alla milza, facile sazietà, anemia, dolore alle ossa, affaticamento, febbre, sudori notturni, perdita di peso, debolezza, svenimento, epistassi, lividi, sanguinamento da bocca o gengive, feci sanguinolente, o ictus. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente,

l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme

di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di

carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In alcune forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico di allele JAK2. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0021] In un altro aspetto, forniti nella presente sono metodi per ridurre la fibrosi del midollo osseo in un individuo cui è diagnosticata o che si sospetta abbia una neoplasia mieloproliferativa o sindrome mielodisplastica, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi riduce la fibrosi del midollo osseo nell'individuo. In un altro aspetto, forniti nella presente sono metodi in pazienti con MF per mantenere conte piastriniche superiori a circa $100 \times 10^9 / l$ nel sangue dell'individuo, il metodo comprendendo somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi aumenta le conte piastriniche. In un altro aspetto, forniti nella presente sono metodi in pazienti con MF per mantenere un livello di emoglobina

di almeno 90g/l, o 100g/l o 110g/l o 120g/l, il metodo comprendendo somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi aumenta i livelli di emoglobina. In un altro aspetto, forniti nella presente sono metodi in pazienti con MF per mantenere una conta di neutrofili assoluta di almeno $1,0 \times 10^9/l$ o almeno $2,0 \times 10^9/l$, il metodo comprendendo somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi aumenta le conte di neutrofili. In alcuni aspetti, l'inibitore di telomerasi è somministrato non più di una volta ogni due settimane. In altri aspetti, l'inibitore di telomerasi è somministrato per mantenere le conte piastriniche del sangue da circa $150 \times 10^3 / \mu l$ a circa $400 \times 10^3 / \mu l$ nel sangue di un individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato

N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme

di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg.

[0022] Di conseguenza, in un aspetto, forniti nella presente sono metodi per alleviare almeno un sintomo associato a leucemia mieloide acuta in un individuo che ne necessita, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi allevia almeno un sintomo associato a leucemia mieloide acuta. In alcune forme di realizzazione, i sintomi comprendono milza ingrandita e dolore alla milza, anemia, dolore alle ossa, affaticamento, febbre, sudori notturni, perdita di peso, debolezza, svenimento, epistassi, lividi, sanguinamento da bocca o gengive, feci sanguinolente, o ictus. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi

delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace

dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione nella presente, l'individuo reca una mutazione di guadagno di funzione V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In alcune forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente

dalla riduzione del carico di allele JAK2. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0023] Di conseguenza, in un aspetto, forniti nella presente sono metodi per alleviare almeno un sintomo associato a sindrome mielodisplastica, come, ad esempio, anemia refrattaria, anemia refrattaria con eccesso di blasti, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare, e leucemia mielomonocitica cronica in un individuo che ne necessiti, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi allevia almeno un sintomo associato alla sindrome mielodisplastica. In alcune forme di realizzazione, i sintomi comprendono respiro corto, affaticamento, debolezza, svenimento, epistassi, lividi, sanguinamento da bocca o gengive, feci sanguinolente, petecchie, o ictus. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi comprende un oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende

almeno un legame internucleosidico di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker. In alcune forme di realizzazione, il linker è un linker di glicerolo o amminoglicerolo. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, l'inibitore di telomerasi è formulato per una somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende mettere a contatto una o più cellule

progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione di una qualsiasi delle forme di realizzazione nella presente, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata non su inibitore di telomerasi. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

DESCRIZIONE DEI DISEGNI

[0024]

Le Figure 1A e 1B illustrano l'effetto di Imetelstat sulla crescita e

differenziazione di megacariociti.

La Figura 2 illustra le curve di risposta alla dose di megacariociti

di unità formante colonia (CFU-Mega).

La Figura 3 illustra i risultati per l'endpoint primario dello studio (risposta ematologica) dalla sperimentazione di Fase II per valutare l'attività di Imetelstat (GRN163L) in pazienti con trombocitemia essenziale che richiedono citoriduzione e hanno fallito o sono intolleranti alla terapia precedente o che rifiutano la terapia standard (Studio di fase II Imetelstat ET). CR, risposta completa; PR, risposta parziale. Il tempo alla prima occorrenza della conta piastrinica $\leq 400 \times 10^3/\mu\text{l}$ è rappresentato da forme a diamante, mentre il tempo alla risposta completa è indicato da cerchi.

Le Figure 4A e 4B illustrano i risultati dello studio su Imetelstat ET di fase II per l'endpoint secondario dello studio (carico allelico di JAK2 V617F). PR, risposta parziale. La Figura 4A illustra il carico allelico % di JAK2 V617F in funzione del tempo in mesi dal punto di riferimento al basale. La Figura 4B descrive il carico allelico mediano (%) in funzione del tempo dal punto temporale al basale.

La Figura 5 illustra i risultati dello studio su Imetelstat ET di fase II per l'endpoint esplorativo (CFU-Mega).

La Figura 6 illustra la percentuale di crescita cellulare in coltura dopo trattamento *in vitro* con Imetelstat di cellule CD34+ ottenute da un donatore sano e cellule CD34+ da un paziente con LMA al giorno 5, giorno 7 e giorno 9.

La Figura 7 illustra gli effetti di imetelstat sulla crescita e la differenziazione dei megacariociti da un paziente con mielofibrosi

primaria.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

[0025] La presente invenzione fornisce, *tra gli altri*, metodi per ridurre la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche e alleviare sintomi in individui. L'invenzione fornita nella presente divulga, *tra gli altri*, metodi per usare composti inibitori di telomerasi per trattare e alleviare sintomi associati a neoplasie mieloproliferative (MPN) come trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), mielofibrosi, e leucemia mieloide acuta bersagliando le cellule progenitrici neoplastiche caratteristiche di queste malattie. L'invenzione fornita nella presente divulga anche, tra gli altri, metodi per usare composti inibitori di telomerasi per trattare e alleviare sintomi associati a sindromi mielodisplastiche (MDS) come, ad esempio, anemia refrattaria, anemia refrattaria con eccesso di blasti, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare e leucemia mielomonocitica cronica bersagliando le cellule progenitrici neoplastiche responsabili della produzione dei numeri anormalmente elevati di cellule caratteristici di queste malattie. Gli inventori hanno fatto la sorprendente scoperta che gli inibitori di telomerasi (come imetelstat) possono efficacemente ridurre i livelli di piastrine circolanti nel sangue in soggetti con MPN e MDS. In aggiunta, questa riduzione dei livelli piastrinici è osservata indipendentemente dalla comune mutazione associata a ET nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2; osservato in circa il 50% dei casi di ET) ed è efficace in soggetti che erano precedentemente resistenti al

trattamento con idrossiurea, che è una terapia di prima linea comune per ET. Nel presente documento sono anche forniti metodi per usare inibitori della telomerasi (ad esempio, imetelstat) per mantenere le conte piastriniche nel sangue a intervalli relativamente normali nel sangue di individui cui è diagnosticata o sospetti di avere ET. Senza essere legati alla teoria e diversamente da altri trattamenti comuni per MPN e MDS, i composti inibitori della telomerasi usati nei metodi della presente invenzione sembrano inibire specificamente le cellule progenitrici neoplastiche che guidano la malignità responsabile di questa condizione.

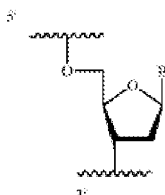
I. Tecniche generali

[0026] La pratica dell'invenzione utilizzerà, se non diversamente indicato, tecniche convenzionali nella chimica degli acidi nucleici, biologia molecolare, microbiologia, biologia cellulare, biochimica e immunologia, che sono ben note agli esperti dell'arte. Tali tecniche sono spiegate appieno nella letteratura come in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, seconda edizione (Sambrook et al., 1989) e *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, terza edizione (Sambrook e Russel, 2001), (congiuntamente definiti nella presente come "Sambrook"); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., a cura di, 1987, inclusi supplementi al 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., a cura di, 1994). Gli acidi nucleici possono essere sintetizzati *in vitro* mediante ben note tecniche di sintesi chimica, come descritto, *ad es., in* Carruthers (1982) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47:411-418; Adams (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:661;

Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 5 25:3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33:7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859; Komberg e Baker, *DNA Replication*, 2a ed. (Freeman, San Francisco, 1992); Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, New York, 1980); Uhlmann e Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584, 1990.

II. Definizioni

[0027] Il termine "nucleoside" si riferisce a una frazione avente la struttura generale rappresentata di seguito, dove B rappresenta una nucleobase e il carbonio in 2' può essere sostituito come descritto di seguito. Quando incorporato in un oligomero o polimero, il carbonio in 3' è ulteriormente legato a un atomo di ossigeno o azoto.



[0028] Questa struttura include forme di 2'-deossi e 2'-idrossile (*vale a dire* deossiribosio e ribosio), e analoghi. Meno comunemente, un gruppo 5'-NH può essere sostituito all'ossigeno in 5'. Gli "analoghi", in riferimento ai nucleosidi, includono nucleosidi sintetici aventi frazioni di nucleobasi modificate (si veda la definizione di "nucleobasi" di seguito) e/o frazioni di zucchero modificate, come gli zuccheri 2'-fluoro e altri analoghi. Tali analoghi sono tipicamente progettati per influenzare le proprietà di legame, *ad es.*, stabilità, specificità o simili. Il termine

nucleoside comprende i nucleosidi naturali, comprese le forme 2'-desossi e 2'-idrossile, *ad es.*, come descritto in Komberg e Baker, DNA Replication, 2a ed. (Freeman, San Francisco, 1992), e analoghi. Gli "analoghi", in riferimento ai nucleosidi, includono nucleosidi sintetici aventi frazioni di nucleobasi modificate (si veda la definizione di "nucleobasi", *infra*) e/o frazioni di zucchero modificate, *ad es.*, descritte in generale da Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980). Tali analoghi includono nucleosidi sintetici progettati per migliorare le proprietà di legame, *ad es.*, stabilità, specificità o simili, come divulgato da Uhlmann e Peyman, Chemical Reviews 90:543-584, 1990). Un oligonucleotide contenente tali nucleosidi e che tipicamente contiene legami internucleosidici resistenti a nucleasi sintetici, può essere esso stesso definito "analogo".

[0029] Un "polinucleotide" o "oligonucleotide" si riferisce a un polimero o oligomero di subunità nucleosidica di ribosio e/o desossiribosio avente tra circa 2 e circa 200 subunità contigue. Le subunità nucleosidiche possono essere unite da una varietà di legami intersubunità, tra cui, tuttavia senza limitazione, legami di fosfodiesteri, fosfotriesteri, metilfosfonato, P3'→N5' fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato, N3→P5' tiosfosforamidato, e fosforotioato. Il termine include anche tali polimeri o oligomeri aventi modifiche, note a un esperto nella tecnica, allo zucchero (*ad es.*, sostituzioni in 2'), alla base (si veda la definizione di "nucleoside", *sopra*), e i terminali in 3' e 5'. In forme di realizzazione in cui la frazione di oligonucleotide include una pluralità di

legami intersubunità, ciascun legame può essere formato usando la stessa chimica, oppure può essere usata una miscela di chimiche di legame. Quando un oligonucleotide è rappresentato da una sequenza di lettere, come "ATGUCCTG", si comprenderà che i nucleotidi sono nell'ordine 5'→3' da sinistra a destra. La rappresentazione della sequenza di base dell'oligonucleotide in questo modo non implica l'uso di alcun tipo particolare di subunità internucleosidica nell'oligonucleotide.

[0030] Una "nucleobase" include (i) nucleobasi di DNA e RNA native (uracile, timina, adenina, guanina e citosina), (ii) nucleobasi modificate o analoghi di nucleobase (*ad es.*, 5-metilcitosina, 5-bromouracile, o inosina) e (iii) analoghi di nucleobase. Un analogo di nucleobase è un composto la cui struttura molecolare imita quella di una tipica base di DNA o RNA.

[0031] Il termine "lipide" è ampiamente usato nella presente per comprendere sostanze che sono solubili in solventi organici, ma scarsamente solubili, se non insolubili, in acqua. Il termine lipidi include, tuttavia senza limitazione, idrocarburi, oli, grassi (come acidi grassi e gliceridi), steroli, steroidi e forme derivate di questi composti. In alcune forme di realizzazione, i lipidi sono acidi grassi e loro derivati, idrocarburi e loro derivati e steroli, come il colesterolo. Gli acidi grassi di solito contengono un numero pari di atomi di carbonio in una catena lineare (comunemente 12-24 atomi di carbonio) e possono essere saturi o insaturi e possono contenere, o essere modificati per contenere, una varietà di gruppi sostituenti. Per semplicità, il termine "acido grasso"

comprende anche derivati di acidi grassi, come grassi o esteri. In alcune forme di realizzazione, il termine "lipide" include anche composti anfipatici contenenti porzioni sia lipidiche sia idrofile.

[0032] Un "inibitore di telomerasi" è un composto che è in grado di ridurre o inibire l'attività dell'enzima telomerasi trascrittasi inversa in una cellula di mammifero. Un tale inibitore può essere un composto a piccola molecola, come descritto nella presente, o un inibitore di modello di hTR includente un oligonucleotide, come descritto nella presente. In un aspetto, l'inibitore della telomerasi è Imetelstat o Imetelstat sodico. In un altro aspetto, l'inibitore della telomerasi è GRN163L.

[0033] Un "inibitore di modello di hTR" è un composto che blocca la regione modello del componente di RNA della telomerasi umana, inibendo in tal modo l'attività dell'enzima. L'inibitore è in genere un oligonucleotide che è in grado di ibridare a questa regione. In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide include una sequenza efficace per ibridare a una porzione più specifica di questa regione, avente sequenza 5'-CUAACCCUAAC-3'.

[0034] Un composto è detto "inibire la proliferazione di cellule" se la proliferazione delle cellule in presenza del composto è inferiore a quella osservata in assenza del composto. Cioè, la proliferazione delle cellule viene rallentata o arrestata in presenza del composto. L'inibizione della proliferazione delle cellule tumorali può essere evidenziata, ad esempio, dalla riduzione del numero di cellule o della velocità di espansione delle cellule, riduzione della massa tumorale o velocità di

crescita del tumore, o aumento del tasso di sopravvivenza di un soggetto che viene trattato.

[0035] Un oligonucleotide avente "legami resistenti a nucleasi" si riferisce a uno la cui catena principale ha legami di subunità sostanzialmente resistenti al clivaggio della nucleasi, in forma non ibridata o ibridata, da comuni nucleasi extracellulari e intracellulari nel corpo; cioè, l'oligonucleotide mostra poco o nullo clivaggio di nucleasi in normali condizioni di nucleasi nel corpo a cui è esposto l'oligonucleotide. I legami N3'→P5' fosforamidato (NP) o N3'→P5' tiofosforamidato (NPS) descritti di seguito sono resistenti alla nucleasi.

[0036] Un "individuo" può essere un mammifero, come un qualsiasi comune organismo modello di laboratorio. I mammiferi includono, tuttavia senza limitazione, esseri umani e primati non umani, animali da reddito, animali da sport, animali domestici, topi, ratti e altri roditori. In alcune forme di realizzazione, un individuo è un essere umano.

[0037] Una "quantità efficace" o "quantità terapeuticamente efficace" o "quantità clinicamente efficace" si riferisce a una quantità di composto terapeutico, come inibitore della telomerasi, somministrato a un soggetto mammifero, come dose singola o come parte di una serie di dosi, che è efficace per produrre un effetto terapeutico desiderato.

[0038] Come usato nella presente, "cellule neoplastiche" si riferisce a cellule che esibiscono una crescita relativamente autonoma, in modo che esibiscono un fenotipo di crescita aberrante caratterizzato da una significativa perdita di controllo della proliferazione cellulare. Le

cellule neoplastiche comprendono cellule che possono replicarsi attivamente o in uno stato di riposo temporaneo non replicativo (G_1 o G_0); analogamente, le cellule neoplastiche possono comprendere cellule che hanno un fenotipo ben differenziato, un fenotipo scarsamente differenziato o una miscela di entrambi i tipi di cellule. Pertanto, non tutte le cellule neoplastiche sono necessariamente cellule replicanti in un determinato punto temporale. Le "cellule neoplastiche" comprendono cellule nelle neoplasie benigne e cellule nelle neoplasie maligne.

[0039] Come usato nella presente, "cellule progenitrici neoplastiche" si riferisce a cellule di una composizione cellulare che possiedono la capacità di diventare neoplastiche.

[0040] Come usato nella presente, il termine "neoplasia" o o "neoplastico" si riferisce a una crescita anomala di nuove cellule. A differenza dell'iperplasia, la proliferazione neoplastica persiste anche in assenza di uno stimolo originario.

[0041] Come usato nella presente, la forma singolare "un/uno/una", "un'", e "il/lo/la" include riferimenti plurali se non diversamente indicato.

[0042] Resta inteso che aspetti e forme di realizzazione dell'invenzione descritti nella presente documento "comprendente", "costituito da" e "costituito essenzialmente da" aspetti e forme di realizzazione.

[0043] Resta inteso che ogni limite numerico massimo riportato in tutta questa descrizione brevettuale include ogni limite numerico

inferiore, come se tali limiti numerici inferiori fossero espressamente scritti nella presente. Ogni limite numerico minimo riportato in tutta questa descrizione includerà ogni limite numerico superiore, come se tali limiti numerici superiori siano stati espressamente scritti nella presente. Ogni intervallo numerico riportato in tutta questa descrizione includerà ogni intervallo numerico più stretto che rientra in tale intervallo numerico più ampio, come se tali intervalli numerici più stretti siano stati tutti espressamente scritti nella presente.

III Composti inibitori di telomerasi

[0044] La telomerasi è una ribonucleoproteina che catalizza l'aggiunta di sequenze ripetitive telomeriche (avente la sequenza 5'-TTAGGG-3' negli esseri umani) a estremità del cromosoma. Si veda *ad es.* Blackburn, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:113-129. L'enzima è espresso nella maggior parte delle cellule cancerose, ma non in cellule somatiche mature. La perdita di DNA telomerico può avere un ruolo nell'innescare la senescenza cellulare; si veda Harley, 1991, *Mutation Research* 256:271-282. È stato mostrato che una varietà di cellule cancerose è positiva alla telomerasi, tra cui cellule da cancro della pelle, tessuto connettivo, adiposo, mammella, polmone, stomaco, pancreas, ovaia, cervice, utero, rene, vescica, colon, prostata, sistema nervoso centrale(SNC), retina e tumori ematologici (come mieloma, leucemia e linfoma). Il bersagliamento della telomerasi può essere efficace nel fornire trattamenti che discriminano tra le cellule maligne e normali in misura elevata, evitando molti degli effetti collaterali deleteri che possono

accompagnare i regimi chemioterapici che colpiscono indiscriminatamente le cellule in divisione.

[0045] Gli inibitori della telomerasi identificati ad oggi includono oligonucleotidi (ad esempio, oligonucleotidi aventi legami resistenti alla nucleasi) nonché composti a piccola molecola. Ulteriori informazioni riguardanti i composti inibitori della telomerasi si possono trovare nel brevetto U.S. n. 7.998.938.

A. Composti a piccola molecola

[0046] Gli inibitori di telomerasi a piccola molecola includono, ad esempio, BRACO19 ((9-(4-(N,N-dimetilammino)fenilammino)-3,6-bis(3-pirrolo-dino propionammido)acridina (*si veda* Mol. Pharmacol. 61(5):1154-62, 2002); DODC (dietilossadicarbocianina, e telomestatina. Questi composti possono agire come stabilizzatori del G-quad, che promuovono la formazione di una configurazione di G-quad inattiva nel componente di RNA della telomerasi. Altri inibitori di telomerasi a piccola molecola includono BIBR1532 (acido 2-[(E)-3-naften-2-il-but-2-enoilammino]benzoico) (*si veda* Ward e Autexier, Mol. Pharmacol. 68:779-786, 2005; *ancora* J. Biol. Chem. 277(18):15566-72, 2002); AZT e altri analoghi nucleosidici, come ddG e ara-G (*si veda*, ad esempio, i brevetti U.S. nn. 5.695.932 e 6.368.789), e certi derivati di tiopiridina, benzo[b]tiofene, e pirido[b]tiofene, descritti da Gaeta et al. nei brevetti U.S. nn. 5.767.278, 5.770.613, 5.863.936, 5.656.638 e 5.760.062, e un altro esempio è 3-clorobenzo[b]tiofen-2-carbossi-2'-[(2,5-diclorofenilammino)tia]idrazina, descritti nel brevetto U.S. n. 5,760,062.

B. Inibitori di telomerasi a base di oligonucleotidi: Sequenza e composizione

[0047] I geni che codificano sia i componenti proteici che quelli dell'RNA della telomerasi umana sono stati clonati e sequenziati (si vedano i brevetti U.S. nn. 6.261.836 e 5.583.016, rispettivamente). Gli oligonucleotidi possono essere mirati contro l'mRNA che codifica il componente proteico della telomerasi (la cui forma umana è nota come telomerasi umana trascrittasi inversa, o hTERT) o il componente di RNA dell'olenzima telomerasi (la cui forma umana è nota come RNA telomerasi umano, o hTR).

[0048] La sequenza nucleotidica del componente di RNA della telomerasi umana (hTR) è mostrata nell'Elenco sequenze nrl seguito (SEQ ID NO: 1), nella direzione 5'→3'. La sequenza è mostrata usando le abbreviazioni standard per i ribonucleotidi; gli esperti dell'arte riconosceranno che la sequenza rappresenta anche la sequenza del cDNA, in cui i ribonucleotidi sono sostituiti da desossiribonucleotidi, con uridina (U) sostituita da timidina (T). La sequenza di modello del componente di RNA si situa all'interno della regione definita dai nucleotidi 46-56 (5'-CUAACCCUAAC-3'), che è complementare a una sequenza telomerica composta da circa uno e due terzi di unità ripetitive telomeriche. La regione modello funziona per specificare la sequenza delle ripetizioni telomeriche che la telomerasi aggiunge alle estremità cromosomiche ed è essenziale per l'attività dell'enzima telomerasi (si veda ad es. Chen et al., Cell 100: 503-514, 2000; Kim et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 98 (14):7982-7987, 2001). La progettazione di agenti antisenso, a ribozima o piccoli RNA interferenti (siRNA) per inibire o causare la distruzione di mRNA è ben nota (si veda, ad esempio, Lebedeva, I, et al. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 41: 403-419, aprile 2001; Macejak, D, et al., Journal of Virology, Vol. 73 (9): 7745-7751, settembre 1999, e Zeng, Y. et al., PNAS Vol. 100 (17) pp. 9779-9784, 19 agosto 2003) e tali agenti possono essere progettati per bersagliare il hTERT mRNA e inibire in tal modo la produzione della proteina hTERT in una cellula bersaglio, come una cellula di cancro (*si vedano*, ad esempio, i brevetti U.S. nn. 6.444.650 e 6.331.399).

[0049] Gli oligonucleotidi che bersagliano hTR (cioè il componente di RNA dell'enzima) fungono da inibitori dell'attività dell'enzima telomerasi bloccando o interferendo in altro modo con l'interazione dell'hTR con la proteina hTERT, la quale interazione è necessaria per la funzione della telomerasi (*si veda*, ad esempio, Villeponteau et al., U.S. Pat. n. 6,548,298).

[0050] Una regione bersaglio preferita di hTR è la regione modello, che copre i nucleotidi 30-67 della SEQ ID NO:1
 (GGGUUGCGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUU
 UUUGUCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUU
 GCUC⁵CCC
 GCGCGCUGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCU
 CGGCCUG
 CCGCCU³CCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCU

GCUGGC
 CCGUUCGCCUCCCGGGGACCUGCGGCGGGUCGCCUGCCCAGCC
 CCCGAAC
 CCCGCCUGGAGCCGCGGUCGGCCCCGGGGCUUCUCCGGAGGCAC
 CCACUGC
 CACCGCGAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGG
 GCGAGGG
 CGAGGUUCACCGUUUCAGGCCGCAGGAAGAGGAACGGAGCGAG
 UCCCGCC
 GCGGCGCGAUUCCCUGAGCUGUGGGACGUGCACCCAGGACUCG
 GCUCACA
 CAUGCAGUUCGCUUUCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUG
 CGCAUCC

GUCACCCCUCGCCGGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCU
 GACUGAC UGGGCCAGUGUGCU). Gli oligonucleotidi che bersagliano
 questa regione sono definiti nella presente come "inibitori di modello di
 hTR" (*si veda ad es.* Herbert et al., *Oncogene* 21 (4):638-42 (2002).)
 Preferibilmente, tale oligonucleotide include una sequenza che è
 complementare o quasi complementare a una porzione della regione di
 11 nucleototidi avente la sequenza 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID
 NO:23).

[0051] Un'altra regione bersaglio preferita è la regione che
 comprende i nucleotidi 137-179 di hTR (si veda Pruzan et al., *Nucl. Acids
 Research*, 30:559-568, 2002). All'interno di questa regione, la sequenza

che copre 141-153 è un bersaglio preferito. La pubblicazione PCT WO 98/28442 descrive l'uso di oligonucleotidi di almeno 7 nucleotidi di lunghezza per inibire la telomerasi, dove gli oligonucleotidi sono progettati per essere complementari a porzioni accessibili della sequenza di hTR esterna alla regione modello, inclusi i nucleotidi 137-196, 290-319, e 350-380 di hTR. La sequenza di bersagliamento di hTR preferita è data nel seguito e identificata da SEQ ID NOS: 2-22.

[0052] La regione dell'oligonucleotide terapeutico che è mirata alla sequenza di hTR è preferibilmente esattamente complementare alla corrispondente sequenza di hTR. Sebbene in alcuni casi possano essere tollerati appaiamenti errati, si prevede che essi diminuiranno la specificità e l'attività del coniugato oligonucleotidico risultante. In particolari forme di realizzazione, la sequenza di base dell'oligonucleotide viene così selezionata per includere una sequenza di almeno 5 nucleotidi esattamente complementari al bersaglio hTR, e può essere ottenuta una potenziata inibizione della telomerasi se sono impiegate lunghezze crescenti di sequenza complementare, come almeno 8, almeno 10, almeno 12, almeno 13 o almeno 15 nucleotidi esattamente complementari al bersaglio di hTR. In altre forme di realizzazione, la sequenza dell'oligonucleotide include una sequenza da almeno 5 a 20, da almeno 8 a 20, da almeno 10 a 20 o da almeno 10 a 15 nucleotidi esattamente complementari alla sequenza bersaglio di hTR.

[0053] Un'attività inibitoria ottimale della telomerasi può essere ottenuta quando è selezionata l'intera lunghezza dell'oligonucleotide per

essere complementare alla sequenza bersaglio di hTR. Tuttavia, non è necessario che l'intera lunghezza dell'oligonucleotide sia esattamente complementare alla sequenza bersaglio, e la sequenza dell'oligonucleotide può includere regioni che non sono complementari alla sequenza bersaglio. Tali regioni possono essere aggiunte, ad esempio, per conferire altre proprietà al composto, come sequenze che facilitano la purificazione. In alternativa, un oligonucleotide può includere più ripetizioni di una sequenza complementare a una sequenza bersaglio di hTR.

[0054] Se l'oligonucleotide deve includere regioni che non sono complementari alla sequenza bersaglio, tali regioni sono tipicamente posizionate su uno o entrambi i terminali in 5' o 3'. Sequenze esemplificative che bersagliano RNA di telomerasi umana (hTR) includono le seguenti:

| Sequenza di bersagliamento di hTR | Regione di SEQ.ID NO: 1 | SEQ.ID NO: |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------|
| AGATTTTCTTATTTTCTTAC | 135-138 | 8 |
| GCTCTAGATGATGATGCTGTAAGCTGCTGAG | 137-140 | 8 |
| GTGAGGCTGCTGAG | 137-141 | 8 |
| GGAGGCTGCTGAG | 137-143 | 8 |
| GTGAGGCTGCTGAG | 139-151 | 8 |
| GTGAGGCTGAG | 141-151 | 7 |
| CGTCTGAGGCTGAG | 141-153 | 8 |
| AGCTCTGAGGCTGAG | 143-154 | 8 |
| AGCTCTGAGGCTGAGGCTGAG | 143-156 | 10 |
| ATGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG | 145-158 | 11 |
| TAGGCTGAGGCTGAG | 42-54 | 12 |
| CGCTGAGGCTGAG | 48-58 | 13 |
| TAGGCTGAGGCTGAG | 42-53 | 14 |
| TAGGCTGAGGCTGAG | 42-52 | 15 |
| GTAGGCTGAG | 46-56 | 16 |
| GTAGGCTGAGGCTGAG | 48-56 | 17 |
| GTAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG | 42-56 | 18 |
| GGTTAGGCTGAG | 48-52 | 19 |
| CGCTTAGGCTGAG | 50-58 | 20 |
| CGCTTAGGCTGAG | 54-65 | 21 |
| CGCTTAGGCTGAG | 56-67 | 22 |

[0055] I legami internucleosidici nell'oligonucleotide possono includere una qualsiasi delle chimiche oligonucleotidiche disponibili, *ad es.* fosfodiesteri, fosfotriesteri, metilfosfonati, P3'→N5' fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato, N3'→P5' tiofosforamidato, e fosforotioato. Tipicamente, ma non necessariamente, tutti i legami internucleosidici all'interno dell'oligonucleotide saranno dello stesso tipo, sebbene il componente oligonucleotidico possa essere sintetizzato usando una miscela di legami diversi.

[0056] In alcune forme di realizzazione, l'oligonucleotide ha almeno un legame di N3'→P5' fosforamidato (NP) o N3'→P5'

tiofosforamidato (NPS), il quale legame può essere rappresentato dalla struttura: 3'-(-NH--P(=O)(--XR)--O-)-5', in cui X è O o S e R è selezionato dal gruppo costituito da idrogeno, alchile e arile; e loro sali farmaceuticamente accettabili, quando XR è OH o SH. In altre forme di realizzazione, l'oligonucleotide include tutti legami di NP o, in alcune forme di realizzazione, tutti legami di NPS.

[0057] In una forma di realizzazione, la sequenza per un oligonucleotide inibitore di modello di hTR è la sequenza complementare ai nucleotidi 42-54 di SEQ ID NO: 1 *sopra*. L'oligonucleotide avente questa sequenza (TAGGGTTAGACAA; SEQ ID NO:12) e legami di N3'→P5' tiofosforamidato (NPS) sono qui designati come GRN163. Si vedano, ad esempio, Asai et al., *Cancer Research* 63:3931-3939 (2003) e Gryaznov et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22(5-8):577-81 (2003).

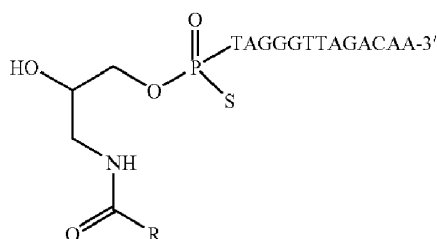
[0058] L'oligonucleotide GRN163 somministrato da solo ha mostrato attività inibitoria *in vitro* in coltura cellulare, tra cui carcinoma epidermoide, epitelio mammario, carcinoma renale, adenocarcinoma renale, cellule di cancro pancreatico, del cervello, colon, prostata, leucemia, linfoma, mieloma, epidermico, della cervice, ovarico e del fegato.

[0059] L'oligonucleotide GRN163 è stato anche testato e ha mostrato di essere terapeuticamente efficace in una varietà di modelli di tumore animale, inclusi ovarico e del polmone, sia a piccole cellule che a cellule non piccole (*si veda, ad es, il, brevetto U.S. n. 7.998.938*).

C. Coniugati lipide-oligonucleotide

[0060] In alcuni aspetti, gli inibitori della telomerasi a base di oligonucleotidi descritti nella presente includono almeno un gruppo lipidico legato covalentemente (*si veda la* pubbl. U.S. n. 2005/0113325). Questa modifica fornisce proprietà di captazione cellulare superiori, in modo tale che si possa ottenere un effetto biologico equivalente usando quantità minori di oligonucleotide coniugato rispetto alla forma non modificata. Se applicato all'ambiente terapeutico umano, ciò può tradursi in ridotti rischi di tossicità e risparmi sui costi.

[0061] Il gruppo lipidico L è tipicamente un idrocarburo alifatico o acido grasso, inclusi derivati di idrocarburi e acidi grassi, con esempi essendo composti a catena lineare saturi aventi 14-20 atomi di carbonio, come acido miristico (tetradecanoico), acido palmitico (esadecanoico) e acido stearico (ottadecanoico) e le loro corrispondenti forme di idrocarburi alifatici, tetradecano, esadecano e ottadecano. Esempi di altri gruppi lipidici adatti che possono essere impiegati sono gli steroli, come il colesterolo, e gli acidi grassi e gli idrocarburi sostituiti, in particolare le forme polifluorate di questi gruppi. La portata del gruppo lipidico L include derivati come derivati di ammina, ammidi, estere e carbammato. Il tipo di derivato è determinato dalla modalità di legame con l'oligonucleotide, come esemplificato di seguito:



quando -R è $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ (palmitoile). Questo composto è designato nella presente come GRN163L (imemetelstat).

[0062] In una struttura esemplificativa, la porzione lipidica è palmitoilammide (derivata dall'acido palmitico), coniugata attraverso un legame amminoglicerolico al gruppo tiofosfato in 5' di un oligonucleotide legato a NPS. L'oligonucleotide di NPS avente la sequenza mostrata per GRN163 e coniugato in questo modo (come mostrato sotto) è designato nella presente come GRN163L (Imemetelstat). In una seconda struttura esemplificativa, il lipide, come palmitoilammide, è coniugato attraverso il gruppo amminico terminale in 3' di un oligonucleotide di NPS.

D. Composizioni farmaceutiche

[0063] In alcuni aspetti della presente invenzione, quando impiegati come prodotti farmaceutici, i composti inibitori di telomerasi divulgati nella presente possono essere formulati con un eccipiente o veicolante farmaceuticamente accettabile da formulare in una composizione farmaceutica.

[0064] Quando impiegati come prodotti farmaceutici, i composti inibitori della telomerasi possono essere somministrati sotto forma di composizioni farmaceutiche. Questi composti possono essere somministrati mediante una varietà di vie tra cui orale, rettale, transdermica, sottocutanea, endovenosa, intramuscolare e intranasale.

Questi composti sono efficaci come composizioni sia iniettabili che orali. Tali composizioni sono preparate in una maniera ben nota nell'arte farmaceutica e comprendono almeno un composto attivo. Quando impiegati come composizioni orali, i composti inibitori della telomerasi divulgati nella presente sono protetti dalla digestione acida nello stomaco mediante un protettivo farmaceuticamente accettabile.

[0065] La presente invenzione include anche composizioni farmaceutiche che contengono, come ingrediente attivo, un composto inibitore della telomerasi associato a uno o più eccipienti o veicolanti farmaceuticamente accettabili. Nel produrre le composizioni della presente invenzione, l'ingrediente attivo è solitamente miscelato con un eccipiente o veicolante, diluito mediante un eccipiente o veicolante o racchiuso all'interno di tale eccipiente o veicolante che può essere sotto forma di capsula, bustina, carta o altro contenitore. Quando l'eccipiente o il veicolante funge da diluente, può essere un materiale solido, semisolido o liquido, che funge da veicolo, veicolante o mezzo per l'ingrediente attivo. Pertanto, le composizioni possono essere sotto forma di compresse, pillole, polveri, pastiglie da masticare, bustine, cachet, elisir, sospensioni, emulsioni soluzioni, sciroppi, aerosol (come un solido in un mezzo liquido), unguenti contenenti per esempio fino al 10% in peso del composto attivo, capsule di gelatine morbide e dure, supposte, soluzioni iniettabili sterili, e polveri confezionate sterili.

[0066] Nel preparare una formulazione, può essere necessario macinare il composto liofilizzato attivo per fornire la granulometria

appropriata prima di combinarlo con gli altri ingredienti. Se il composto attivo è sostanzialmente insolubile, viene normalmente macinato fino a una granulometria inferiore a 200 mesh. Se il composto attivo è sostanzialmente solubile in acqua, la granulometria è normalmente regolata mediante macinazione per fornire una distribuzione sostanzialmente uniforme nella formulazione, *ad es.* circa 40 mesh.

[0067] Può essere conveniente o desiderabile preparare, purificare e/o manipolare un sale corrispondente del composto attivo, ad esempio un sale farmaceuticamente accettabile. Esempi di sali farmaceuticamente accettabili sono trattati in Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19. Ad esempio, se il composto è anionico o ha un gruppo funzionale che può essere anionico (ad esempio, -COOH può essere -COO⁻), allora un sale può essere formato con un catione adatto. Esempi di cationi inorganici adatti includono, tuttavia senza limitazione, Na⁺. Esempi di cationi organici adatti includono, tuttavia senza limitazione, ione ammonio (vale a dire NH₄⁺) e ioni ammonio sostituito (ad es., NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺).

[0068] Alcuni esempi di eccipienti o veicolanti adatti includono lattosio, destrosio, saccarosio, sorbitolo, mannitolo, amidi, gomma di acacia, fosfato di calcio, alginati, gomma adragante, gelatina, silicato di calcio, cellulosa microcristallina, polivinilpirrolidone, cellulosa, acqua sterile, sciroppo, e metilcellulosa. Le formulazioni possono inoltre includere: agenti lubrificanti quali talco, stearato di magnesio e olio

minerale; agenti umettanti, agenti emulsioni e di sospensione; agenti conservanti quali metil- e propilidrossibenzoati; agenti dolcificanti e agenti aromatizzanti. Le composizioni dell'invenzione possono essere formulate per fornire rilascio rapido, prolungato o ritardato dell'ingrediente attivo dopo la somministrazione al paziente mediante impiego di procedure note nell'arte.

[0069] Le composizioni possono essere formulate in una forma di dosaggio unitario, ogni dosaggio contenendo da circa 5 mg a circa 100 mg o più, come qualsiasi da circa 1 mg a circa 5 mg, 1 mg a circa 10 mg, da circa 1 mg a circa 20 mg, da circa 1 mg a circa 30 mg, da circa 1 mg a circa 40 mg, da circa 1 mg a circa 50 mg, da circa 1 mg a circa 60 mg, da circa 1 mg a circa 70 mg, da circa 1 mg a circa 80 mg, o da circa 1 mg a circa 90 mg, inclusi, compreso qualsiasi intervallo tra questi valori, dell'ingrediente attivo. L'espressione "forme di dosaggio unitario" si riferisce a unità fisicamente distinte adatte come dosaggi unitari per individui, ciascuna unità contenendo una quantità predeterminata di materiale attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato, in associazione con un eccipiente o veicolante farmaceutico adatto.

[0070] I composti inibitori della telomerasi sono efficaci in un ampio intervallo di dosaggio e sono generalmente somministrati in una quantità terapeuticamente efficace. Resta inteso, tuttavia, che la quantità dei composti inibitori della telomerasi effettivamente somministrati sarà determinata da un medico, alla luce delle circostanze pertinenti, tra cui la condizione da trattare, la via di somministrazione scelta, il composto

effettivo somministrato, l'età, il peso e la risposta del singolo paziente, la gravità dei sintomi del paziente e simili.

[0071] Per preparare composizioni solide quali compresse, il principale ingrediente attivo composto inibitore della telomerasi viene miscelato con un eccipiente o veicolante farmaceutico per formare una composizione di preformulazione solida contenente una miscela omogenea di un composto della presente invenzione. Quando ci si riferisce a queste composizioni di pre-formulazione come omogenee, si intende che l'ingrediente attivo è disperso uniformemente in tutta la composizione in modo che la composizione possa essere prontamente suddivisa in forme di dosaggio unitario ugualmente efficaci quali compresse, pillole e capsule.

[0072] Le compresse o pillole della presente invenzione possono essere rivestite o compoundizzate in altro modo per fornire una forma di dosaggio che offre il vantaggio di un'azione prolungata e per proteggere i composti inibitori di telomerasi dall'idrolisi acida nello stomaco. Per esempio, la compressa o pillola può comprendere un componente di dosaggio interno e un componente di dosaggio esterno, quest'ultimo essendo sotto forma di un involucro al di sopra del primo. I due componenti possono essere separati da uno strato enterico che serve per la resistenza alla disgregazione nello stomaco e a permettere al componente interno di passare intatto nel duodeno o di essere rilasciato in modo ritardato. Può essere usata una varietà di materiali per tali strati o rivestimenti enterici come materiali includenti un certo numero di acidi

polimerici e miscele di acidi polimerici quali materiali come gommalacca, alcol cetilico e acetato di cellulosa.

[0073] Le forme liquide in cui le nuove composizioni della presente invenzione possono essere incorporate per la somministrazione per via orale o mediante iniezione includono soluzioni acquose, sciroppi idoneamente aromatizzati, sospensioni acquose od oleose ed emulsioni aromatizzate quali oli alimentari, come olio di mais, olio di semi di cotone, olio di sesamo, olio di cocco od olio di arachidi, nonché elisir e simili veicoli farmaceutici.

[0074] Le composizioni per inalazione o insufflazione includono soluzioni e sospensioni in solventi acquosi o organici farmaceuticamente accettabili, o loro miscele, e polveri. Le composizioni liquide o solide possono contenere eccipienti farmaceuticamente accettabili adatti come descritto sopra. Le composizioni possono essere somministrate mediante la via respiratoria orale o nasale per un effetto locale o sistemico. Le composizioni in solventi farmaceuticamente accettabili possono essere nebulizzate mediante l'uso di gas inerti. Le soluzioni nebulizzate possono essere inalate direttamente dal dispositivo nebulizzatore oppure il dispositivo nebulizzatore può essere attaccato a una tenda di mascherina facciale, o macchina per la respirazione a pressione positiva intermittente. Le composizioni in soluzione, sospensione o in polvere possono anche essere somministrate oralmente o per via nasale da dispositivi che erogano la formulazione in modo appropriato.

IV. Metodi dell'invenzione

[0075] I composti inibitori della telomerasi (come nelle composizioni farmaceutiche) forniti nella presente sono utili per modulare stati di malattia. In alcune forme di realizzazione, il disturbo proliferativo cellulare è associato a una aumentata espressione o attività della telomerasi o crescita cellulare (come cellule progenitrici neoplastiche associate a una produzione anormale di piastrine nella trombocitemia essenziale (ET)) o entrambe.

[0076] In alcuni aspetti, sono forniti nella presente metodi per alleviare almeno un sintomo associato a MPN in un individuo che ne necessita. In alcuni aspetti, sono forniti nella presente metodi per alleviare almeno un sintomo associato a MDS in un individuo che ne necessita. Forniti nella presente sono anche metodi per ridurre la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche in pazienti con MPN o MDS, nonché metodi per mantenere concentrazioni di piastrine e/o concentrazioni di globuli rossi e/o concentrazioni di globuli bianchi nel sangue a livelli normali in individui con diagnosi o sospetto di avere MPN o MDS.

[0077] Le neoplasie mieloproliferative, o MPN, sono neoplasie ematologiche che derivano da cellule progenitrici mieloidi ematopoietiche maligne nel midollo osseo, come le cellule precursori dei globuli rossi, piastrine e granulociti. La proliferazione di cellule progenitrici maligne porta a una sovrapproduzione di qualsiasi combinazione di globuli bianchi, globuli rossi e/o piastrine, a seconda della malattia. Queste

cellule prodotte in eccesso possono anche essere anormali, portando a ulteriori complicanze cliniche. Vi sono vari tipi di disturbi mieloproliferativi cronici. Inclusive nello spettro della malattia MPN vi sono trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), e leucemia mieloide cronica (LMC), mielofibrosi (MF), leucemia neutrofila cronica, leucemia eosinofila cronica e leucemia mieloide acuta (LMA).

[0078] Una sindrome mielodisplastica (MDS) è un gruppo di sintomi che include il cancro del sangue e del midollo osseo. Le sindromi mielodisplastiche (MDS) includono malattie come anemia refrattaria, anemia refrattaria con blasti in eccesso, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare, e leucemia mielomonocitica cronica. Le cellule staminali del sangue immature (blasti) non diventano globuli rossi, globuli bianchi o piastrine sani. Il blasto muore nel midollo osseo o subito dopo avere viaggiato nel sangue. Ciò lascia meno spazio alla formazione di globuli bianchi, globuli rossi e/o piastrine sani nel midollo osseo.

A. Trombocitemia essenziale

[0079] Il megacariocita è una cellula del midollo osseo responsabile della produzione di trombociti del sangue (piastrine), necessari per la normale coagulazione del sangue. I megacariociti rappresentano normalmente 1 su 10.000 cellule del midollo osseo, ma possono aumentare di circa 10 volte nel corso di determinate malattie.

[0080] I megacariociti sono derivati da cellule precursori di cellule staminali ematopoietiche nel midollo osseo. Una volta che la cellula ha

completato la differenziazione e diventa un megacariocita maturo, inizia il processo di produzione di piastrine. Mentre si sospetta che molte citochine svolgano un ruolo nella stimolazione dei megacariociti per la produzione di piastrine, è la trombopoietina citochinica che induce i megacariociti a formare piccoli processi proto-piastrinici. Le piastrine sono trattenute all'interno di queste membrane interne all'interno del citoplasma dei megacariociti. Ognuno di questi processi proto-piastrinici può dare origine a 2000-5000 nuove piastrine dopo la rottura. Complessivamente, 2/3 di queste piastrine di nuova produzione rimarranno in circolazione mentre 1/3 sarà sequestrato dalla milza.

[0081] La trombocitemia essenziale (ET) è un disturbo cronico associato a una produzione aumentata o anomala di piastrine nel sangue. La formazione di piastrine nella ET avviene in modo indipendente dalle citochine, con i megacariociti che producono piastrine in modo sregolato. Poiché le piastrine sono coinvolte nella coagulazione del sangue, una produzione anomala può comportare una formazione inappropriata di coaguli di sangue o sanguinamento, dando come risultato un aumentato rischio di sanguinamento gastrointestinale, infarto e ictus.

[0082] Spesso, molti pazienti con ET sono asintomatici; la diagnosi si verifica in genere dopo che gli emocromi come parte di un controllo di routine rivelano una elevata conta di piastrine. Quando sono presenti sintomi di ET, possono includere affaticamento o possono essere correlati a disturbi o sanguinamento dei vasi piccoli o grandi. I disturbi dei piccoli vasi (spesso considerati di natura vasomotoria)

possono portare a:

mal di testa, disturbi della vista o emicrania silenziosa, vertigini o stordimento, freddo o colorazione bluastra delle dita delle mani o dei piedi, o bruciore, arrossamento e dolore alle mani e ai piedi ([www.mpnresearchfoundation.org/ Essential-Thrombocythemia](http://www.mpnresearchfoundation.org/Essential-Thrombocythemia)). Le complicanze trombotiche possono essere piuttosto gravi, portando a: ictus, attacco ischemico transitorio (TIA), infarto, trombosi venosa profonda o embolia polmonare (coagulo di sangue nei polmoni). Il sanguinamento può manifestarsi come facilità ai lividi, epistassi, periodi pesanti, sanguinamento gastrointestinale o sangue nelle urine

(www.mpnresearchfoundation.org/Essential-Thrombocythemia). Una piccola minoranza di persone con ET può successivamente sviluppare leucemia acuta o mielofibrosi, entrambe le quali possono essere pericolose per la vita. La leucemia mieloide acuta è un tipo di tumore del sangue e del midollo osseo che progredisce rapidamente. La mielofibrosi è un disturbo progressivo del midollo osseo che provoca cicatrici del midollo osseo, anemia grave e ingrossamento del fegato e della milza.

[0083] Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità, la diagnosi di ET richiede che siano soddisfatti i criteri da A1 a A4: (A1) una conta piastrinica sostenuta di $> 450 \times 10^9/l$; (A2) midollo osseo che mostra un aumentato numero di megacariociti maturi ingranditi e nessun aumento significativo dello spostamento a sinistra della granulopoiesi o

dell'eritropoiesi; (A3) non soddisfa i criteri dell'OMS per policitemia, mielofibrosi primaria, leucemia mieloide cronica, sindrome mielodisplastica o altre neoplasie mieloidi; e (A4) avente una mutazione acquisita o marcatore clonale o nessuna causa reattiva di trombocitosi (Swedlow, et al., (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, IARC Press). Nella diagnosi di ET, alcuni medici utilizzano i criteri del British Committee for Standards in Haematology (pubblicato nel 2010), che sono simili ai criteri dell'OMS del 2008, ma ne differiscono vari diversi aspetti significativi (Beer, et al., (2010) Blood 117(5): 1472-1482).

[0084] Le prove che possono essere effettuate per diagnosticare ET includono: (1) esami del sangue per escludere altre cause di una elevata conta di piastrine, inclusi test per la carenza di ferro e indicatori di infiammazione (sono escluse anche altre malattie del sangue che la imitano); (2) test per le mutazioni del gene JAK2 (che si verificano in circa il 50% dei casi) o MPL (che si verificano fino al 5% dei casi); (3) biopsie del midollo osseo per cercare segni classici di ET, incluso un aumento dei precursori piastrinici. Ulteriori informazioni relative alla diagnosi di ET sono disponibili nella pubblicazione domanda di brevetto U.S. n. 2006/0166221, che è incorporata nella presente per riferimento.

[0085] L'ET è generalmente trattata mediante l'uso di: la modifica dei fattori di rischio cardiovascolare, terapia antiplastrinica e terapia citoriduttiva (Beer, et al., Blood 117(5): 1472-1482; nel seguito (Beer et al., 2010). Per quanto riguarda i fattori di rischio cardiovascolare, i

pazienti vengono sottoposti a screening per la presenza di ipertensione, diabete, fumo, ipercolesterolemia e obesità e trattati dove indicato secondo le linee guida appropriate per tali condizioni (Beer et al., 2010). La terapia antiplastrinica include, tuttavia senza limitazione, aspirina, a meno che sia controindicato, e agenti antiplastrinici come clopidogrel. I pazienti con ET possono essere classificati in base al rischio trombotico; i pazienti ad alto rischio hanno più di 60 anni, hanno precedenti eventi trombotici o una conta piastrinica maggiore di $1500 \times 10^9/l$; questi pazienti ad alto rischio trarranno probabilmente beneficio dalla terapia citoreducitiva (Beer et al, 2010).

[0086] Nonostante un possibile aumentato rischio di trasformazione leucemica quando i pazienti con ET sono trattati con idrossicarbamide (idrossiurea), essa rimane la terapia di prima linea per la maggior parte dei pazienti che richiedono un trattamento (Beer et al, 2010). Altri trattamenti includono, ma non sono limitati a, interferone, anagrelide, pipobromano, busulfano, e irradiazione con fosforo radioattivo.

[0087] L'attuale terapia farmacologica per l'ET non è curativa, e vi è poca evidenza che suggerisca un effetto favorevole sulla sopravvivenza. Nessuna di queste strategie attuali si rivolge o bersaglia direttamente le cellule clonali maligne responsabili della malattia, l'evoluzione della malattia o i sintomi esperiti dai pazienti, che influenzano la qualità della loro vita. L'obiettivo dell'attuale terapia per l'ET è prevenire le complicanze tromboemorragiche. Importanti progressi nel chiarire la

patogenesi dell'ET sono stati fatti con la descrizione, nel 2005, della mutazione somatica JAK2 (V617F), che è presente nel 50-60% dei pazienti con ET (James, et al. (2005) Nature 434: 1144-1148; Kralovics, et al. (2005) N Engl J Med 352: 1779-90; Baxter, et al. (2005) Lancet 365: 1054-61; Levine, et al. (2005) Cancer Cell 7: 387-97). Oltre alla presenza e al carico allelico della mutazione JAK2/V617F, la leucocitosi al basale è stata recentemente riconosciuta come un nuovo fattore di rischio correlato alla malattia nella ET (Ziakas PD. (2008) Haematologica 93: 1412-1414; Carobbio et al., (2007) Blood 109: 2310-2313). L'evidenza indica anche che la leucocitosi ha una significatività prognostica e può essere considerata causa di eventi vascolari (Barbui, et al., (2009) Blood 114: 759-63).

B. Policitemia vera

[0088] I pazienti con policitemia vera (PV) hanno aumenti marcati della produzione di globuli rossi. Il trattamento è diretto a ridurre il numero eccessivo di globuli rossi. La PV può sviluppare una fase tardiva durante il suo corso, che ricorda la mielofibrosi primaria con citopenie e ipoplasia e fibrosi del midollo. La mutazione del gene Janus chinasi 2 (JAK2) sul cromosoma 9 che causa una proliferazione e sopravvivenza aumentate dei precursori ematopoietici in vitro è stata identificata nella maggior parte dei pazienti con PV. I pazienti con PV hanno un aumentato rischio di eventi cardiovascolari e trombotici e di trasformazione in leucemia mieloide acuta o mielofibrosi primaria. Il trattamento della PV include flebotomia cronica intermittente per

mantenere l'ematocrito al di sotto del 45% negli uomini e del 40% nelle donne. Altri possibili trattamenti includono idrossiurea, interferone alfa e aspirina a basso dosaggio.

C. Mielofibrosi

[0089] La mielofibrosi o MF è una neoplasia mieloproliferativa nello stesso spettro di malattie dell'ET. I pazienti con MF spesso recano la mutazione JAK2 V617F nel midollo osseo. Occasionalmente ET evolve in MF. L'inibizione di JAK2 è attualmente considerata uno standard di cura per la MF nei paesi in cui ruxolitinib (Jakafi®), un inibitore della Janus chinasi, è approvato. Non c'è evidenza che gli inibitori di JAK2, come Jakafi®, inibiscano selettivamente la proliferazione del clone leucemico responsabile della malattia e, quindi, potrebbero non essere "modificanti la malattia".

D. Leucemia mieloide acuta

[0090] La leucemia mieloide acuta (LMA) è un cancro della linea mieloide delle cellule del sangue. La LMA è la leucemia acuta più comune che colpisce gli adulti. I pazienti con LMA hanno una rapida crescita di globuli bianchi anomali che si accumulano nel midollo osseo e interferiscono con la produzione delle normali cellule del sangue. La sostituzione del midollo osseo normale con cellule leucemiche provoca un calo dei globuli rossi, delle piastrine e dei normali globuli bianchi. I sintomi di LMA includono affaticamento, respiro corto, ecchimosi e sanguinamento facili, e aumentato rischio di infezione. Come leucemia acuta, l'LMA progredisce rapidamente ed è tipicamente fatale entro

poche settimane o mesi se non trattata. Lo standard di cura per l'LMA è il trattamento con chemioterapia volto a indurre una remissione; i pazienti possono continuare a ricevere un trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

E. Sindrome mielodisplastica

[0091] Una sindrome mielodisplastica (MDS) è un gruppo di sintomi che include il cancro del sangue e del midollo osseo. Le cellule staminali del sangue immature (blasti) non diventano globuli rossi, globuli bianchi o piastrine sani. Il blasto muore nel midollo osseo o subito dopo avere viaggiato nel sangue. Ciò lascia meno spazio alla formazione di globuli bianchi, globuli rossi e/o piastrine sani nel midollo osseo.

[0092] Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono una raccolta di condizioni mediche ematologiche che implicano una produzione inefficace della classe mieloide delle cellule del sangue. I pazienti con MDS spesso sviluppano anemia grave e richiedono frequenti trasfusioni di sangue. In alcuni casi la malattia peggiora e il paziente sviluppa citopenie (basso emocromo) causate da insufficienza progressiva del midollo osseo. In alcuni casi la malattia si trasforma in leucemia mieloide acuta (LMA). Se la percentuale complessiva di mieloblasti del midollo osseo aumenta oltre un determinato cutoff (20% per l'OMS e 30% per FAB), allora si dice che si è verificata la trasformazione in leucemia mieloide acuta (LMA).

F. Metodi per trattare MPN o MDS mediante inibitori di telomerasi

[0093] Forniti nella presente sono metodi per ridurre la

proliferazione delle cellule progenitrici neoplastiche e alleviare sintomi associati in individui a cui è stata diagnosticata o che si pensa abbiano MPN o MDS attraverso la somministrazione di inibitori della telomerasi (come uno qualsiasi degli inibitori della telomerasi divulgati nella presente).

[0094] I metodi possono essere praticati in un ambiente adiuvante. "Ambiente adiuvante" si riferisce a un'ambientazione clinica in cui un individuo ha avuto una storia di malattia proliferativa e generalmente (ma non necessariamente) ha risposto alla terapia, che include, tuttavia senza limitazione, intervento chirurgico (come la resezione chirurgica), radioterapia e chemioterapia. Tuttavia, a causa della loro storia di malattia proliferativa, questi individui sono considerati a rischio di sviluppo della malattia. Il trattamento o la somministrazione in "ambiente adiuvante" si riferisce a una modalità di trattamento successiva. Il grado di rischio (*vale a dire*, quando un individuo nell'ambiente adiuvante è considerato "ad alto rischio" o "a basso rischio") dipende da diversi fattori, più solitamente l'entità della malattia al primo trattamento.

[0095] I metodi forniti nella presente possono anche essere praticati in un "ambiente neoadiuvante", *vale a dire*, il metodo può essere eseguito prima della terapia primaria/definitiva. In alcune forme di realizzazione, l'individuo è stato precedentemente trattato. In alcune forme di realizzazione, l'individuo non è stato precedentemente trattato. In alcune forme di realizzazione, il trattamento è una terapia di prima

linea.

1. Metodi per alleviare sintomi di neoplasie mieloproliferative e di sindromi mielodisplastiche

[0096] In alcuni aspetti, la presente invenzione è diretta a metodi per inibire i sintomi o le condizioni (disabilità, menomazioni) associati a neoplasie mieloproliferative come descritto in dettaglio sopra. Come tali, non è necessario che tutti gli effetti della condizione siano completamente impediti o invertiti, sebbene gli effetti dei metodi divulgati nella presente possano estendersi a un significativo beneficio terapeutico per il paziente. Come tale, un beneficio terapeutico non è necessariamente una prevenzione o cura completa per una particolare condizione derivante dalla neoplasia mieloproliferativa, ma può piuttosto comprendere un risultato che include la riduzione o la prevenzione dei sintomi che derivano da un disturbo proliferativo cellulare, la riduzione o la prevenzione del verificarsi di tali sintomi (quantitativamente o qualitativamente), la riduzione della gravità di tali sintomi o i loro effetti fisiologici e/o il miglioramento del recupero dell'individuo dopo che ha esperito sintomi della neoplasia mieloproliferativa.

[0097] In alcuni aspetti, la presente invenzione è diretta a metodi per inibire i sintomi o le condizioni (disabilità, menomazioni) associati a sindrome mielodisplastica (MDS) come descritto in dettaglio sopra. Come tali, non è necessario che tutti gli effetti della condizione siano completamente impediti o invertiti, sebbene gli effetti dei metodi divulgati nella presente possano estendersi a un significativo beneficio terapeutico

per il paziente. Come tale, un beneficio terapeutico non è necessariamente una prevenzione o cura completa per una particolare condizione derivante dalla sindrome mielodisplastica, ma può piuttosto comprendere un risultato che include la riduzione o la prevenzione dei sintomi che derivano da un disturbo proliferativo cellulare, la riduzione o la prevenzione del verificarsi di tali sintomi (quantitativamente o qualitativamente), la riduzione della gravità di tali sintomi o i loro effetti fisiologici e/o il miglioramento del recupero dell'individuo dopo che ha esperito sintomi della sindrome mielodisplastica.

[0098] Come usato nella presente, la frase "alleviare almeno un sintomo associato a" un disturbo, una malattia o una condizione (come MPN o MDS) denota l'inversione, l'inibizione della progressione di, o la prevenzione del disturbo o della condizione a cui si applica tale termine, oppure l'inversione, l'inibizione della progressione di, o la prevenzione di uno o più sintomi del disturbo o della condizione a cui si applica tale termine. Specificamente, una composizione della presente invenzione (come uno qualsiasi dei composti inibitori di telomerasi descritti nella presente), quando somministrata a un individuo, può trattare o prevenire uno o più dei sintomi o condizioni associati a MPN o MDS e/o ridurre o alleviare sintomi di o condizioni associate a questo disturbo. Come tale, proteggere un individuo dagli effetti o dai sintomi derivanti da MPN o MDS include sia la prevenzione o la riduzione dell'occorrenza e/o gravità degli effetti del disturbo, sia il trattamento di un paziente in cui gli effetti del disturbo si stanno già verificando o stanno iniziando a verificarsi. Un

effetto benefico può essere facilmente valutato da un esperto della tecnica e/o da un medico addestrato che sta curando il paziente. Preferibilmente, vi è una differenza positiva o benefica nella gravità o nell'occorrenza di almeno un punteggio, valore o misura clinici o biologici utilizzati per valutare tali pazienti in coloro che sono stati trattati con i metodi della presente invenzione rispetto a quelli che non sono stati trattati.

[0099] Di conseguenza, in alcuni aspetti, forniti nella presente sono metodi per alleviare almeno un sintomo associato a MPN o MDS in un individuo che ne necessita, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi allevia almeno un sintomo associato a MPN o MDS. In alcune forme di realizzazione, il sintomo comprende mal di testa, vertigini o stordimento, dolore al torace, debolezza, svenimento, alterazioni della vista, intorpidimento o formicolio delle estremità, arrossamento, dolore pulsante o bruciante alle estremità (eritromelalgia), milza ingrossata, sangue dal naso, lividi, sanguinamento dalla bocca o dalle gengive, feci sanguinolente, attacco cardiaco (infarto del miocardio) o ictus. In alcune forme di realizzazione, l'inibitore di telomerasi comprende un

oligonucleotide che può essere complementare al componente di RNA della telomerasi e in alcuni casi può avere una lunghezza compresa tra 10-20 paia di basi. In una forma di realizzazione, l'oligonucleotide

comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In altre forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. L'oligonucleotide può anche essere coniugato a una frazione lipidica sulla sua estremità in 5' o 3', facoltativamente tramite un linker (come un linker di glicerolo o amminoglicerolo). In alcune forme di realizzazione, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In ancora un'altra forma di realizzazione, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In altre forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In ancora altre forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico allelico di JAK2 V617F. In alcune forme di realizzazione, l'individuo può essere resistente o intollerante a una precedente terapia non a base di inibitori di telomerasi (inclusi, ma non limitati a, idrossiurea, anagrelide o interferone α -2B). In un'altra forma di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0100] In alcuni aspetti, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi somministrata al paziente è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In altri aspetti, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In un altro aspetto, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione

nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi include almeno circa uno qualsiasi tra 6,5 mg/kg, 6,6 mg/kg, 6,7 mg/kg, 6,8 mg/kg, 6,9 mg/kg, 7 mg/kg, 7,1 mg/kg, 7,2 mg/kg, 7,3 mg/kg, 7,4 mg/kg, 7,5 mg/kg, 7,6 mg/kg, 7,7 mg/kg, 7,8 mg/kg, 7,9 mg/kg, 8 mg/kg, 8,1 mg/kg, 8,2 mg/kg, 8,3 mg/kg, 8,4 mg/kg, 8,5 mg/kg, 8,6 mg/kg, 8,7 mg/kg, 8,8 mg/kg, 8,9 mg/kg, 9 mg/kg, 9,1 mg/kg, 9,2 mg/kg, 9,3 mg/kg, 9,4 mg/kg, 9,5 mg/kg, 9,6 mg/kg, 9,7 mg/kg, 9,8 mg/kg, 9,9 mg/kg, 10 mg/kg, 10,1 mg/kg, 10,2 mg/kg, 10,3 mg/kg, 10,4 mg/kg, 10,5 mg/kg, 10,6 mg/kg, 10,7 mg/kg, 10,8 mg/kg, 10,9 mg/kg, 11 mg/kg, 11,1 mg/kg, 11,2 mg/kg, 11,3 mg/kg, 11,4 mg/kg, 11,5 mg/kg, 11,6 mg/kg, 11,7 mg/kg, 11,8 mg/kg, 11,9 mg/kg, 12 mg/kg, 12,1 mg/kg, 12,2 mg/kg, 12,3 mg/kg, 12,4 mg/kg, 12,5 mg/kg, 12,6 mg/kg, 12,7 mg/kg, 12,8 mg/kg, 12,9 mg/kg, o 13 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi somministrata all'individuo non è 9,4 mg/kg.

[0101] In alcuni aspetti, l'individuo a cui è stata diagnosticata o che si ritiene abbia MPN reca una mutazione di guadagno di funzione di V617F nel gene Janus chinasi 2 (JAK2). Metodi per determinare se un individuo reca questa mutazione, nonché per determinare il carico allelico, sono molti e ben noti nella tecnica (*si veda, ad es.*, domande di

brevetto U.S. nn. 2009/0162849, 2007/0224598, e 2009/0162849. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo.

2. Metodi per ridurre la proliferazione di cellule neoplastiche

[0102] In un altro aspetto, forniti nella presente sono metodi per ridurre la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche in un individuo cui sono diagnosticate o che si sospetta abbia trombocitemia essenziale, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi riduce la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche nell'individuo. In alcune forme di realizzazione, l'inibitore di telomerasi comprende un

oligonucleotide che può essere complementare al componente di RNA della telomerasi e in alcuni casi può avere una lunghezza compresa tra 10-20 paia di basi. In una forma di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In altre forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. L'oligonucleotide può anche essere coniugato a una frazione lipidica sulla sua estremità in 5' o 3', facoltativamente tramite un linker (come un linker di glicerolo o amminoglicerolo). In alcune forme di realizzazione, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In ancora un'altra forma di realizzazione,

l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In altre forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In ancora altre forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico allelico di JAK2 V617F. In alcune forme di realizzazione, l'individuo può essere resistente o intollerante a una precedente terapia non a base di inibitori di telomerasi (inclusi, ma non limitati a, idrossiurea, anagrelide o interferone α -2B). In un'altra forma di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0103] In alcuni aspetti, una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a uno qualsiasi tra circa $600 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $575 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $550 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $525 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $500 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $475 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $450 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $425 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $375 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $350 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $325 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $300 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $275 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $250 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $225 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $200 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $175 \times 10^3 / \mu\text{l}$, or $150 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo, inclusi, compresi valori tra questi numeri. In altri aspetti, una ridotta proliferazione di cellule neoplastiche dà come risultato conte piastriniche ridotte (come una qualsiasi delle conte piastriniche sopra descritte) nel sangue dell'individuo entro una qualsiasi tra circa 24 settimane, 23 settimane, 22 settimane, 21 settimane, 20 settimane, 19 settimane, 18 settimane, 17

settimane, 16 settimane, 15 settimane, 14 settimane, 13 settimane, 12 settimane, 11 settimane, 10 settimane, 9 settimane, 8 settimane, 7 settimane, 6 settimane, 5 settimane, 4 settimane, 3 settimane, o 2 settimane o meno dall'inizio della somministrazione dell'inibitore di telomerasi.

[0104] In alcuni aspetti, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In altri aspetti, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In un altro aspetto, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi include almeno circa uno qualsiasi tra 6,5 mg/kg, 6,6 mg/kg, 6,7 mg/kg, 6,8 mg/kg, 6,9 mg/kg, 7 mg/kg, 7,1 mg/kg, 7,2 mg/kg, 7,3 mg/kg, 7,4 mg/kg, 7,5 mg/kg, 7,6 mg/kg, 7,7 mg/kg, 7,8 mg/kg, 7,9 mg/kg, 8 mg/kg, 8,1 mg/kg, 8,2 mg/kg, 8,3 mg/kg, 8,4 mg/kg, 8,5 mg/kg, 8,6 mg/kg, 8,7 mg/kg, 8,8 mg/kg, 8,9 mg/kg, 9 mg/kg, 9,1 mg/kg, 9,2 mg/kg, 9,3 mg/kg, 9,4 mg/kg, 9,5 mg/kg, 9,6 mg/kg, 9,7 mg/kg, 9,8 mg/kg, 9,9 mg/kg, 10 mg/kg, 10,1 mg/kg, 10,2 mg/kg, 10,3 mg/kg,

10,4 mg/kg, 10,5 mg/kg, 10,6 mg/kg, 10,7 mg/kg, 10,8 mg/kg, 10,9 mg/kg, 11 mg/kg, 11,1 mg/kg, 11,2 mg/kg, 11,3 mg/kg, 11,4 mg/kg, 11,5 mg/kg, 11,6 mg/kg, 11,7 mg/kg, 11,8 mg/kg, 11,9 mg/kg, 12 mg/kg, 12,1 mg/kg, 12,2 mg/kg, 12,3 mg/kg, 12,4 mg/kg, 12,5 mg/kg, 12,6 mg/kg, 12,7 mg/kg, 12,8 mg/kg, 12,9 mg/kg, o 13 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi somministrata all'individuo non è 9,4 mg/kg.

[0105] In alcuni aspetti, l'individuo a cui è stata diagnosticata o che si ritiene abbia ET reca una mutazione di guadagno di funzione di V617F nel gene Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo.

3. Metodi per mantenere livelli normali di piastrine circolanti

[0106] In altri aspetti, forniti nel presente documento per mantenere conte piastriniche del sangue tra meno di circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue di un individuo a cui è stata diagnosticata o che si sospetta abbia trombocitemia essenziale, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi mantiene la conta piastrinica a meno di circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nell'individuo. In alcune forme di realizzazione, l'inibitore di telomerasi comprende un

oligonucleotide che può essere complementare al componente di RNA

della telomerasi e in alcuni casi può avere una lunghezza compresa tra 10-20 paia di basi. In una forma di realizzazione, l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA. In altre forme di realizzazione, l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di tiofosforamidato N3'→ P5'. L'oligonucleotide può anche essere coniugato a una frazione lipidica sulla sua estremità in 5' o 3', facoltativamente tramite un linker (come un linker di glicerolo o amminoglicerolo). In alcune forme di realizzazione, la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16). In ancora un'altra forma di realizzazione, l'inibitore di telomerasi è imetelstat. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita megacariocitica dipendente dalle citochine. In altre forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita megacariocitica indipendente dalle citochine. In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega. In ancora altre forme di realizzazione, l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico allelico di JAK2 V617F. In alcune forme di realizzazione, l'individuo può essere resistente o intollerante a una precedente terapia non a base di inibitori di telomerasi (inclusi, ma non limitati a, idrossiurea, anagrelide o interferone α -2B). In un'altra forma di realizzazione, l'individuo è un essere umano.

[0107] In alcuni aspetti, la somministrazione degli inibitori di telomerasi (come uno qualsiasi degli inibitori di telomerasi descritti nella presente) mantiene la conta piastrinica a livelli fisiologicamente normali.

In alcune forme di realizzazione, la somministrazione degli inibitori di telomerasi mantiene conte piastriniche inferiori a circa $600 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $575 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $550 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $525 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $500 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $475 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $450 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $425 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $375 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $350 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $325 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $300 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $275 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $250 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $225 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $200 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $175 \times 10^3 / \mu\text{l}$, o $150 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo, inclusi, compresi valori tra questi numeri. In altri aspetti, la somministrazione degli inibitori di telomerasi mantiene conte piastriniche tra uno qualsiasi di circa $100-400 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $150-200 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $150-250 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $150-300 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $150-350 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $150-400 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $200-250 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $200-300 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $200-350 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $200-400 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $250-300 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $250-350 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $250-400 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $300-350 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $300-400 \times 10^3 / \mu\text{l}$, o da 350 a $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo.

[0108] In ancora altri aspetti, il mantenimento delle conte piastriniche del sangue a livelli fisiologicamente normali richiede la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non più di una volta al giorno, a giorni alterni, ogni tre giorni, ogni settimana, ogni 11 giorni, ogni due settimane, ogni tre settimane, ogni mese, ogni sei settimane, ogni due mesi o più, inclusi, compresi i periodi di tempo tra questi.

[0109] In alcuni aspetti, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da $7,5 \text{ mg/kg}$ a $9,3 \text{ mg/kg}$. In altri aspetti, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da $9,5 \text{ mg/kg}$ a $11,7 \text{ mg/kg}$. In un altro aspetto, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da $7,5 \text{ mg/kg}$ a $11,7 \text{ mg/kg}$. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace di un

inibitore di telomerasi include almeno circa uno qualsiasi tra 6,5 mg/kg, 6,6 mg/kg, 6,7 mg/kg, 6,8 mg/kg, 6,9 mg/kg, 7 mg/kg, 7,1 mg/kg, 7,2 mg/kg, 7,3 mg/kg, 7,4 mg/kg, 7,5 mg/kg, 7,6 mg/kg, 7,7 mg/kg, 7,8 mg/kg, 7,9 mg/kg, 8 mg/kg, 8,1 mg/kg, 8,2 mg/kg, 8,3 mg/kg, 8,4 mg/kg, 8,5 mg/kg, 8,6 mg/kg, 8,7 mg/kg, 8,8 mg/kg, 8,9 mg/kg, 9 mg/kg, 9,1 mg/kg, 9,2 mg/kg, 9,3 mg/kg, 9,4 mg/kg, 9,5 mg/kg, 9,6 mg/kg, 9,7 mg/kg, 9,8 mg/kg, 9,9 mg/kg, 10 mg/kg, 10,1 mg/kg, 10,2 mg/kg, 10,3 mg/kg, 10,4 mg/kg, 10,5 mg/kg, 10,6 mg/kg, 10,7 mg/kg, 10,8 mg/kg, 10,9 mg/kg, 11 mg/kg, 11,1 mg/kg, 11,2 mg/kg, 11,3 mg/kg, 11,4 mg/kg, 11,5 mg/kg, 11,6 mg/kg, 11,7 mg/kg, 11,8 mg/kg, 11,9 mg/kg, 12 mg/kg, 12,1 mg/kg, 12,2 mg/kg, 12,3 mg/kg, 12,4 mg/kg, 12,5 mg/kg, 12,6 mg/kg, 12,7 mg/kg, 12,8 mg/kg, 12,9 mg/kg, o 13 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi somministrata all'individuo non è 9,4 mg/kg.

[0110] In alcuni aspetti, l'individuo a cui è stata diagnosticata o che si ritiene abbia ET reca una mutazione di guadagno di funzione di V617F nel gene Janus chinasi 2 (JAK2). In alcune forme di realizzazione, la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico di allele JAK2 V617F nell'individuo.

G. Somministrazione di inibitori della telomerasi

[0111] In alcune forme di realizzazione, l'inibitore di telomerasi (come uno qualsiasi dei composti inibitori di telomerasi descritti nella presente) viene somministrato sotto forma di iniezione. L'iniezione può comprendere il composto in combinazione con un eccipiente o un

veicolante iniettabile acquoso. Esempi non limitativi di eccipienti o veicolanti iniettabili acquosi adatti sono ben noti agli esperti della tecnica e questi, e i metodi di formulazione delle formulazioni, possono essere trovati in riferimenti standard come Alfonso AR: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed., Mack Publishing Company, Easton Pa., 1985. Eccipienti o veicolanti iniettabili acquosi adatti includono acqua, soluzione salina acquosa, soluzione acquosa di destrosio e simili, facoltativamente contenenti esaltatori di dissoluzione come mannitolo al 10% o altri zuccheri, glicina al 10% o altri amminoacidi. La composizione può essere iniettata per via sottocutanea, intraperitoneale o endovenosa.

[0112] In alcune forme di realizzazione, viene utilizzata la somministrazione endovenosa e può essere un'infusione endovenosa continua per un periodo da pochi minuti a un'ora o più, come circa quindici minuti. La quantità somministrata può variare ampiamente a seconda del tipo di inibitore della telomerasi, della dimensione di un dosaggio unitario, del tipo di eccipienti o di veicolanti, e di altri fattori ben noti agli esperti della tecnica. L'inibitore della telomerasi può comprendere, ad esempio, da circa lo 0,001% a circa il 10% (p/p), da circa lo 0,01% a circa l'1%, da circa lo 0,1% a circa lo 0,8%, o un qualsiasi intervallo in essi, con il resto comprendendo l'eccipiente/i o il veicolante/i.

[0113] Per la somministrazione orale, l'inibitore della telomerasi può assumere la forma, ad esempio, di compresse o capsule preparate mediante mezzi convenzionali con eccipienti o veicolanti farmaceuticamente accettabili come agenti leganti; cariche; lubrificanti;

disgreganti; o agenti umettanti. Le preparazioni liquide per la somministrazione orale possono assumere la forma, per esempio, di soluzioni, sciroppi o sospensioni, oppure possono essere presentate come prodotto secco per la costituzione con acqua o altro veicolo adatto prima dell'uso. Tali preparazioni liquide possono essere preparate mediante mezzi convenzionali con additivi farmaceuticamente accettabili come agenti di sospensione (ad esempio, sciroppo di sorbitolo, derivati di cellulosa o grassi alimentari idrogenati); agenti emulsionanti (ad esempio, lecitina o acacia); veicoli non acquosi (ad esempio olio di mandorle, esteri oleosi, alcol etilico o oli vegetali frazionati); e conservanti (ad esempio, metil- o propil p-idrossibenzoati o acido sorbico). Le preparazioni possono anche contenere sali tampone, aromi e colorante come appropriato.

[0114] In alcune forme di realizzazione, l'inibitore di telomerasi può essere somministrato mediante inalazione attraverso uno spray di aerosol o un nebulizzatore che può includere un propellente adatto come, ad esempio, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, biossido di carbonio o una loro combinazione. In un esempio non limitativo, un'unità di dosaggio per un aerosol pressurizzato può essere erogata attraverso una valvola dosatrice. In un'altra forma di realizzazione, capsule e cartucce di gelatina, per esempio, possono essere usate in un inalatore e possono essere formulate per contenere una miscela in polvere del composto con una base di polvere adatta come, ad esempio, amido o lattosio.

[0115] In alcune forme di realizzazione, la quantità di inibitore della telomerasi somministrata all'individuo è inclusa in uno dei seguenti intervalli: da circa 0,5 a circa 5 mg, da circa 5 a circa 10 mg, da circa 10 a circa 15 mg, da circa 15 a circa 20 mg, da circa 20 a circa 25 mg, da circa 20 a circa 50 mg, da circa 25 a circa 50 mg, da circa 50 a circa 75 mg, da circa 50 a circa 100 mg, da circa 75 a circa 100 mg, da circa 100 a circa 125 mg, da circa 125 a circa 150 mg, da circa 150 a circa 175 mg, da circa 175 a circa 200 mg, da circa 200 a circa 225 mg, da circa 225 a circa 250 mg, da circa 250 a circa 300 mg, da circa 300 a circa 350 mg, da circa 350 a circa 400 mg, da circa 400 a circa 450 mg, o da circa 450 a circa 500 mg. In alcune forme di realizzazione, la quantità di inibitore della telomerasi nella quantità efficace somministrata all'individuo (ad es. una forma di dosaggio unitario) è nell'intervallo da circa 5 mg a circa 500 mg, come da circa 30 mg a circa 300 mg o da circa 50 mg a circa 200 mg. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di inibitore della telomerasi somministrato all'individuo è diluita (circa 0,1 mg/ml) o concentrata (circa 180 mg/ml), tra cui per esempio uno qualsiasi da circa 0,1 a circa 200 mg/ml, da circa 0,1 a circa 180 mg/ml, da circa 0,1 a circa 160 mg/ml, da circa 0,1 a circa 140 mg/ml, da circa 0,1 a circa 120 mg/ml, da circa 0,1 a circa 100 mg/ml, da circa 0,1 a circa 80 mg/ml, da circa 0,1 a circa 60 mg/ml, da circa 0,1 a circa 40 mg/ml, da circa 0,1 a circa 20 mg/ml, da circa 0,1 a circa 10 mg/ml da circa 2 a circa 40 mg/ml, da circa 4 a circa 35 mg/ml, da circa 6 a circa 30 mg/ml, da circa 8 a circa 25 mg/ml, da circa 10 a circa 20 mg/ml, da circa 12 a circa 15 mg/ml, o uno

qualsiasi tra circa 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1 mg/ml, 1,1 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,7 mg/ml, 1,8 mg/ml, 1,9 mg/ml, 2 mg/ml, 2,1 mg/ml, 2,2 mg/ml, 2,3 mg/ml, 2,4 mg/ml, o 2,5 mg/ml. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di inibitore della telomerasi è almeno uno qualsiasi circa tra 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml, 26 mg/ml, 27 mg/ml, 28 mg/ml, 29 mg/ml, 30 mg/ml, 31 mg/ml, 32 mg/ml, 33 mg/ml, 33.3 mg/ml, 34 mg/ml, 35 mg/ml, 36 mg/ml, 37 mg/ml, 38 mg/ml, 39 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 170 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml, 200 mg/ml, 210 mg/ml, 220 mg/ml, 230 mg/ml, 240 mg/ml, o 250 mg/ml.

[0116] Quantità efficaci esemplificative di un inibitore della telomerasi somministrato all'individuo includono, tuttavia senza limitazione, almeno circa uno qualsiasi tra 25 mg/m², 30 mg/m², 50 mg/m², 60 mg/m², 75 mg/m², 80 mg/m², 90 mg/m², 100 mg/m², 120 mg/m², 125 mg/m², 150 mg/m², 160 mg/m², 175 mg/m², 180 mg/m², 200 mg/m², 210 mg/m², 220 mg/m², 250 mg/m², 260 mg/m², 300 mg/m², 350 mg/m², 400 mg/m², 500 mg/m², 540 mg/m², 750 mg/m², 1000 mg/m², o 1080 mg/m². In varie forme di realizzazione, la quantità di inibitore della

telomerasi somministrato all'individuo include meno di circa uno qualsiasi tra 350 mg/m², 300 mg/m², 250 mg/m², 200 mg/m², 150 mg/m², 120 mg/m², 100 mg/m², 90 mg/m², 50 mg/m², o 30 mg/m² di un inibitore della telomerasi . In alcune forme di realizzazione, la quantità di inibitore della telomerasi per la somministrazione è inferiore a circa uno qualsiasi tra 25 mg/m², 22 mg/m², 20 mg/m², 18 mg/m², 15 mg/m², 14 mg/m², 13 mg/m², 12 mg/m², 11 mg/m², 10 mg/m², 9 mg/m², 8 mg/m², 7 mg/m², 6 mg/m², 5 mg/m², 4 mg/m², 3 mg/m², 2 mg/m², o 1 mg/m². In alcune forme di realizzazione, la quantità di un inibitore della telomerasi somministrato all'individuo è inclusa in uno qualsiasi dei seguenti intervalli: da circa 1 a circa 5 mg/m², da circa 5 a circa 10 mg/m², da circa 10 a circa 25 mg/m², da circa 25 a circa 50 mg/m², da circa 50 a circa 75 mg/m², da circa 75 a circa 100 mg/m², da circa 100 a circa 125 mg/m², da circa 125 a circa 150 mg/m², da circa 150 a circa 175 mg/m², da circa 175 a circa 200 mg/m², da circa 200 a circa 225 mg/m², da circa 225 a circa 250 mg/m², da circa 250 a circa 300 mg/m², da circa 300 a circa 350 mg/m², o da circa 350 a circa 400 mg/m². In alcune forme di realizzazione, la quantità di un inibitore della telomerasi somministrato all'individuo è da circa 5 a circa 300 mg/m², come da circa 20 a circa 300 mg/m², da circa 50 a circa 250 mg/m², da circa 100 a circa 150 mg/m², circa 120 mg/m², circa 130 mg/m², o circa 140 mg/m², o circa 260 mg/m².

[0117] In alcune forme di realizzazione di uno qualsiasi degli aspetti precedenti, la quantità efficace di un inibitore della telomerasi somministrato all'individuo include almeno circa uno qualsiasi tra 1 mg/kg,

2,5 mg/kg, 3,5 mg/kg, 5 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 9,4 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, o 20 mg/kg. In varie forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore della telomerasi somministrata all'individuo include meno di circa uno qualsiasi tra 350 mg/kg, 300 mg/kg, 250 mg/kg, 200 mg/kg, 150 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 30 mg/kg, 25 mg/kg, 20 mg/kg, 10 mg/kg, 7,5 mg/kg, 6,5 mg/kg, 5 mg/kg, 3,5 mg/kg, 2,5 mg/kg, o 1 mg/kg di un inibitore della telomerasi. In altre forme di realizzazione di uno qualsiasi degli aspetti sopra indicati, la quantità efficace di un inibitore della telomerasi somministrata all'individuo comprende almeno circa uno qualsiasi tra 6,5 mg/kg, 6,6 mg/kg, 6,7 mg/kg, 6,8 mg/kg, 6,9 mg/kg, 7 mg/kg, 7,1 mg/kg, 7,2 mg/kg, 7,3 mg/kg, 7,4 mg/kg, 7,5 mg/kg, 7,6 mg/kg, 7,7 mg/kg, 7,8 mg/kg, 7,9 mg/kg, 8 mg/kg, 8,1 mg/kg, 8,2 mg/kg, 8,3 mg/kg, 8,4 mg/kg, 8,5 mg/kg, 8,6 mg/kg, 8,7 mg/kg, 8,8 mg/kg, 8,9 mg/kg, 9 mg/kg, 9,1 mg/kg, 9,2 mg/kg, 9,3 mg/kg, 9,4 mg/kg, 9,5 mg/kg, 9,6 mg/kg, 9,7 mg/kg, 9,8 mg/kg, 9,9 mg/kg, 10 mg/kg, 10,1 mg/kg, 10,2 mg/kg, 10,3 mg/kg, 10,4 mg/kg, 10,5 mg/kg, 10,6 mg/kg, 10,7 mg/kg, 10,8 mg/kg, 10,9 mg/kg, 11 mg/kg, 11,1 mg/kg, 11,2 mg/kg, 11,3 mg/kg, 11,4 mg/kg, 11,5 mg/kg, 11,6 mg/kg, 11,7 mg/kg, 11,8 mg/kg, 11,9 mg/kg, 12 mg/kg, 12,1 mg/kg, 12,2 mg/kg, 12,3 mg/kg, 12,4 mg/kg, 12,5 mg/kg, 12,6 mg/kg, 12,7 mg/kg, 12,8 mg/kg, 12,9 mg/kg, o 13 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi somministrata all'individuo non è 9,4 mg/kg. In altre forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi somministrata all'individuo è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg. In un'altra forma

di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In ancora altre forme di realizzazione, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg. In alcune forme di realizzazione nella presente, la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg.

[0118] Frequenze di dosaggio esemplificative per le composizioni farmaceutiche (come una composizione farmaceutica contenente uno qualsiasi degli inibitori della telomerasi divulgati nella presente) includono, tuttavia senza limitazione, quotidianamente; a giorni alterni; due volte a settimana; tre volte alla settimana; settimanalmente senza interruzione; settimanalmente, tre settimane su quattro; una volta ogni tre settimane; una volta ogni due settimane; settimanalmente, due settimane su tre. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica viene somministrata circa una volta alla settimana, una volta ogni 2 settimane, una volta ogni 3 settimane, una volta ogni 4 settimane, una volta ogni 6 settimane o una volta ogni 8 settimane. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata almeno circa uno qualsiasi tra 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x o 7x (*vale a dire*, ogni giorno) la settimana o tre volte al giorno, due volte al giorno. In alcune forme di realizzazione, gli intervalli tra ciascuna somministrazione sono inferiori a circa 6 mesi, 3 mesi, 1 mese, 20 giorni, 15 giorni, 12 giorni, 10 giorni, 9 giorni, 8 giorni, 7 giorni, 6 giorni, 5 giorni, 4 giorni, 3 giorni, 2

giorni o 1 giorno. In alcune forme di realizzazione, gli intervalli tra ciascuna somministrazione sono più o meno di circa 1 mese, 2 mesi, 3 mesi, 4 mesi, 5 mesi, 6 mesi, 8 mesi o 12 mesi. In alcune forme di realizzazione, non vi è interruzione nel programma di dosaggio. In alcune forme di realizzazione, l'intervallo tra ciascuna somministrazione non è più di circa una settimana.

[0119] In altri aspetti, la composizione farmaceutica (come una composizione farmaceutica contenente uno qualsiasi degli inibitori della telomerasi divulgati nella presente) viene somministrata per mantenere una conta piastrinica da circa $150 \times 10^3 / \mu\text{l}$ a $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue di un individuo a cui è stata diagnosticata o che si sospetta abbia trombocitemia essenziale. In queste condizioni, gli intervalli tra ciascuna somministrazione possono essere settimanali, ogni 2 settimane, ogni 3 settimane o ogni 4 settimane o più. In alcune forme di realizzazione, gli intervalli per la somministrazione dell'inibitore della telomerasi possono essere ridotti nel tempo se la conta piastrinica nell'individuo rimane $< 400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo. In alcuni aspetti, è fornito un metodo per determinare la frequenza di somministrazione dell'inibitore della telomerasi per il trattamento di ET comprendente a) misurare la conta piastrinica di un individuo mediante un qualsiasi mezzo noto nella tecnica e b) somministrare l'inibitore della telomerasi se le conte piastriniche nell'individuo sono maggiori di $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$.

[0120] La somministrazione della composizione farmaceutica (come una composizione farmaceutica contenente uno qualsiasi degli

inibitori della telomerasi divulgati nella presente) può essere prolungata per un periodo di tempo prolungato (come durante una terapia di mantenimento), come da circa un mese a circa sette anni. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata per un periodo di almeno circa 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 o 84 mesi. In altre forme di realizzazione, la composizione viene somministrata per il resto della vita dell'individuo.

ESEMPI

Esempio 1: Preparazione e coniugazione lipidica di oligonucleotidi

N3' → P5' fosforamidati (NP) o N3' → P5' tiofosforamidati (NPS)

[0121] Questo esempio mostra come sintetizzare Oligonucleotide coniugato a lipide N3' → P5' Fosforamidati (NP) o N3' → P5' Tiofosforamidati (NPS).

Materiali e metodi

Composti di partenza

[0122] Questi composti possono essere preparati come descritto, ad esempio, in McCurdy et al., Tetrahedron Letters 38: 207-210 (1997) o Pongracz e Gryaznov, Tetrahedron Letters 49: 7661-7664 (1999). I monomeri nucleosidici 3'-amminici di partenza possono essere preparati come descritto in Nelson et al., J. Org. Chem. 62: 7278-7287 (1997) o mediante i metodi descritti in Gryaznov et al., pubblicazione di domanda di brevetto US n. 2006/0009636.

Attacco lipidico

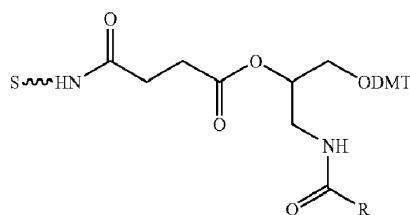
[0123] Una varietà di approcci sintetici può essere usata per

coniugare una frazione lipidica L all'oligonucleotide, a seconda della natura del legame selezionato; si veda, ad esempio, Mishra et al., *Biochim. et Biophys. Acta* 1264: 229-237 (1995), Shea et al., *Nucleic Acids Res.* 18: 3777-3783 (1995), o Rump et al., *Bioconj. Chem.* 9: 341-349 (1995). Tipicamente, la coniugazione è ottenuta attraverso l'uso di un gruppo funzionale adatto a un terminale di oligonucleotide. Ad esempio, il gruppo 3'-amminico presente al terminale in 3'degli oligonucleotidi di NP e NPS può essere fatto reagire con acidi carbossilici, cloruri acidi, anidridi ed esteri attivi, usando opportuni catalizzatori di accoppiamento, per formare un legame ammidico. I gruppi tiolici sono adatti anch'essi come gruppi funzionali (si veda Kupihar et al., *Bioorg. Med. Chem.* 9: 1241-1247 (2001)). Sono disponibili in commercio vari modificatori funzionalizzati con amminoacidi e tioli funzionalizzati di diverse lunghezze di catena per la sintesi di oligonucleotidi.

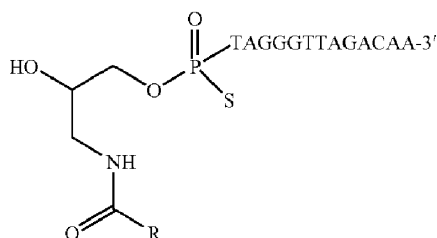
[0124] Approcci specifici per attaccare gruppi lipidici a un terminale di un oligonucleotide di NP o NPS includono quelli descritti nella pubblicazione di domanda di brevetto US n. 2005/0113 325. Oltre ai legami ammidici sopra menzionati, ad esempio, lipidi possono anch'essi essere attaccati alla catena oligonucleotidica usando un derivato fosforamididico del lipide, per produrre un legame di fosforamidato o tiosfosforamidato che collega il lipide e l'oligonucleotide. Anche l'ammino in 3' libero dell'oligonucleotide legato al supporto completamente protetto può essere fatto reagire con una aldeide lipidica adatta, seguita dalla riduzione con cianoboroidruro di sodio, che produce

un legame amminico.

[0125] Per l'attacco di un lipide al terminale 5', come descritto anche nella pubblicazione di domanda di brevetto US n. 2005/0113325, l'oligonucleotide può essere sintetizzato usando un supporto solido contenente lipidi modificato. La reazione di 3'-ammino-1,2-propandiolo con un acilcloruro grasso (RC(O)Cl), seguita dalla dimetossitritilazione dell'alcol primario e succinilazione dell'alcol secondario, fornisce un intermedio che è quindi accoppiato, tramite il gruppo carbossilico succinilico libero, al solido supporto. Nel seguito è mostrato un esempio di supporto modificato, dove S- rappresenta un supporto di CPG di alchilammina a catena lunga e R rappresenta un lipide.



[0126] Questa procedura è seguita dalla sintesi dell'oligonucleotide nella direzione da 5' a 3', come descritto, ad esempio, in Pongracz e Gryaznov (1999), a partire dalla deprotezione e dalla fosfilatazione del gruppo -ODMT. Questo è efficace per produrre, ad esempio, la seguente struttura, dopo il clivaggio dal supporto solido:



[0127] La struttura precedente, quando -R è $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

(palmitoile), è designata nella presente come GRN163L (Imetelstat o Imetelstat sodio).

Saggio FlashPlate™

[0128] Questo saggio è stato condotto essenzialmente come descritto in Asai et al., Cancer Research 63: 3931-3939 (2003). In breve, il saggio rileva e/o misura l'attività della telomerasi misurando l'aggiunta di ripetizioni telomeriche TTAGGG a un primer di substrato di telomerasi biotinilato. I prodotti biotinilati sono catturati su piastre di microtitolazione rivestite con streptavidina, e una sonda oligonucleotidica complementare a 3,5 ripetizioni di telomeri, etichettata con ³³P, viene usata per misurare i prodotti della telomerasi. La sonda non legata è rimossa mediante lavaggio, e la quantità di appaiamento della sonda sui prodotti di telomerasi catturati viene determinata mediante conta a scintillazione.

Esempio 2: Imetelstat inibisce la crescita spontanea di CFU-Meg *in vitro* da pazienti con trombocitemia essenziale e pazienti con mielofiosi ma non da individui sani

[0129] Questo esempio dimostra una soppressione dose-dipendente di megacariociti di unità formanti colonia (CFU-Mega) da parte di imetelstat in pazienti con trombocitemia essenziale o mielofiosi indipendente dallo stato mutazionale di JAKV617F o dalla terapia citoriduttiva, suggerendo una specificità di imetelstat per le cellule megacariocitarie maligne.

Materiali e metodi

[0130] Per determinare l'effetto imetelstat sulla crescita e la

differenziazione dei megacariociti sono stati utilizzati i seguenti metodi: (1) cellule del sangue cordonale (CB) sono state arricchite con cellule esprimenti CD34+ usando un sistema di separazione cellulare negativo; (2) le cellule sono state incubate con imetelstat (1-15 μ M) in terreno liquido privo di siero, StemSpan® SFEM, contenente una formulazione di citochina progettata per lo sviluppo di cellule progenitrici di megacariociti; (3) le cellule del sangue cordonale sono state coltivate per un totale di 17 giorni; e (4) in vari punti temporali, le cellule sono state enumerate e valutate mediante citometria a flusso per marcatori di differenziazione (CD41) e per attività di telomerasi mediante saggio TRAP.

[0131] Per determinare le curve di risposta alle dosi di CFU-Mega, le cellule mononucleate (MNC) da 3 individui sani e da 11 pazienti con ET e un paziente mielofibrotico (MF) (determinato secondo i criteri dell'OMS 2009) sono state isolate dal sangue periferico e sospese in IMDM o placcate in collagene \pm citochine (TPO, IL3, IL6, SCF, EPO) e trattate con imetelstat 0, 0,1, 1 e 10 μ M o un controllo di appaiamento errato e incubate per diverse ore (sospensioni cellulari) o 10-12 giorni (collagene più il 5% di CO₂) 37 °C. I megacariociti sono stati colorati e il numero di CFU-Meg è stato segnato. L'analisi di dose-risposta ha utilizzato un modello log-logistico a 4 parametri per Log₁₀ (conta delle colonie) per dose. L'attività di telomerasi è stata misurata in MNC mediante saggio TRAP.

Risultati

[0132] Le figure 1A e 1B mostrano che imetelstat non inibisce la crescita o la differenziazione di megacariociti in donatori sani.

[0133] La tabella 1 mostra la crescita spontanea di CFU-Mega e l'inibizione da parte di imetelstat.

| Tabella 1: % di CFU-Mega in pazienti con trombocitemia essenziale | | | | |
|--|---------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| ID paziente | 0 μ M [%] | 0,1 μ M [%] \pm DS | 1 μ M [%] \pm DS | 10 μ M [%] \pm DS |
| 1* | 100 | 138 \pm 5,7 | 119 \pm 3,8 | 46 \pm 1,9 |
| 2* | 100 | 106 \pm 4,3 | 48 \pm 4,3 | 39 \pm 4,3 |
| 3* | 100 | 104 \pm 5,7 | 96 \pm 11,3 | 44 \pm 5,7 |
| 4* | 100 | 77 \pm - | 3 \pm - | 14 \pm - |
| 5 | 100 | 138 \pm 33,7 | 81 \pm 23,6 | 52 \pm 6,7 |
| 6 | 100 | 117 \pm 4,9 | 52 \pm - | 45 \pm 45,6 |
| 7 | 100 | 33 \pm 5,9 | 29 \pm 0,0 | 13 \pm 2,9 |
| 8* | 100 | 141 \pm 9,6 | 49 \pm 13,4 | 14 \pm - |
| 9* | 100 | 80 \pm 14,1 | 40 \pm 7,1 | 40 \pm - |
| 10 | 100 | 130 \pm 1,6 | 66 \pm 8,1 | 3 \pm 0,4 |
| 11* | 100 | 114 \pm 0 | 95 \pm 34,4 | 49 \pm 7,6 |
| N = 11 | 100 | 107 \pm 8,6 | 79 \pm 11,8 | 33 \pm 9,4 |
| * JAK2 V617F-positivo | | | | |

[0134] La Tabella 2 mostra la crescita di CFU-Mega stimolata da citochine e nessuna inibizione da parte di imetelstat.

| Tabella 2: CFU-Meg (%) in individui sani | | | | |
|---|------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| ID di donatore | 0 μ M [%] C+ | 0,1 μ M [%] \pm DS [%] C+ | 1 μ M [%] \pm DS [%] C+ | 10 μ M [%] \pm DS [%] C+ |
| 1 | 100 | 93 \pm 10 | 96 \pm 5 | 86 \pm 10 |
| 2 | 100 | 109 \pm 58 | 109 \pm 51 | 173 \pm 13 |
| 3 | 100 | 111 \pm 47 | 122 \pm 20 | 78 \pm 16 |
| N=3 | 100 | 104 \pm 38 | 109 \pm 25 | 112 \pm 13 |

[0135] La Figura 7 mostra che imetelstat inibisce la crescita o la differenziazione dei megacariociti in un paziente con mielofibrosi.

[0136] Le curve di risposta alle dosi in Figura 2 e i risultati in Figura 7 mostrano che imetelstat riduce la proliferazione di progenitrici neoplastiche. CFU-Mega da sangue periferico indica che imetelstat inibisce la crescita (spontanea) dei megacariociti neoplastici da pazienti con ET e MF, ma non inibisce la crescita normale dei megacariociti (dipendente da citochine) da individui sani. Questa soppressione dose-dipendente della formazione di CFU-Mega da parte di imetelstat in pazienti con ET è indipendente dallo stato mutazionale di JAKV617F o dalla terapia citoriduttiva.

Esempio 3: Sperimentazione di fase II per valutare l'attività di Imetelstat (GRN163L) in pazienti con trombocitemia essenziale che necessitano di citoriduzione e hanno fallito o sono intolleranti alla terapia precedente o che rifiutano la terapia standard (studio di fase II di Imetelstat ET)

[0137] Questo esempio dimostra che imetelstat induce

rapidamentee mantiene risposte ematologiche e molecolari sostanziali in pazienti con trombocitemia essenziale (ET) refrattari o intolleranti a una terapia precedente.

Materiali e metodi

Progetto di sperimentazione clinica

[0138] I pazienti con ET che avevano fallito o erano intolleranti ad almeno una precedente terapia (o che avevano rifiutato la terapia standard) e che richiedevano citoriduzione sono stati indotti con Imetelstat 7,5 - 11,7 mg/kg somministrato come infusione endovenosa di 2 ore settimanalmente, con dosi titolate sulla risposta piastrinica. Quando è stata ottenuta una conta piastrinica di $250-300 \times 10^3/\mu\text{l}$, il dosaggio di mantenimento con imetelstat è stato quindi iniziato con dosi aumentate o diminuite in base alla risposta piastrinica e alla tossicità, con l'obiettivo di un dosaggio meno frequente nella fase di mantenimento.

[0139] I criteri di inclusione dei pazienti specifici per ET erano (1) una diagnosi confermata di ET secondo i criteri dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS); (2) il paziente con ET richiedeva citoriduzione e aveva fallito o era intollerante ad almeno una terapia precedente (o aveva rifiutato la terapia standard). I criteri di laboratorio (entro 14 giorni dalla prima somministrazione del farmaco in studio) erano: (1) piastrine $600,000/\mu\text{l}$; (2) ANC $\geq 1500/\mu\text{l}$; (3) emoglobina $\geq 10\text{g/dl}$.

[0140] I criteri generali per tutti i pazienti erano: (1) disposti e in grado di firmare un modulo di consenso informato; (2) maschio o

femmina, di età pari o superiore a 18 anni; (3) stato delle prestazioni ECOG di 0-2. I criteri di laboratorio per tutti i pazienti erano (entro 14 giorni dalla prima somministrazione del farmaco in studio): (1) INR (or PT) e aPTT $< 1,5 \times$ il limite superiore della norma (ULN); (2) creatina sierica ≤ 2 mg/dl; (3) bilirubina sierica < 2.0 mg/dl (pazienti con sindrome di Gilbert: bilirubina sierica $< 3 \times$ ULN); (4) AST (SGOT) e ALT (SGPT) $\leq 2,5 \times$ ULN; (5) fosfatasi alcalina $< 2,5$ ULN; (6) qualsiasi tossicità clinicamente significativa derivante da precedenti trattamenti antitumorali e/o intervento chirurgico importante deve essere stata ripristinata al Grado 0-1 prima dell'inizio del trattamento in studio.

[0141] I pazienti che hanno soddisfatto uno dei seguenti criteri sono stati esclusi dallo screening e dall'ingresso allo studio: (1) donne in gravidanza o in allattamento; (2) precedente trapianto di cellule staminali; (3) terapia investigativa entro 4 settimane prima della prima somministrazione del farmaco in studio; (4) malattia o condizione cardiovascolare clinicamente significativa, tra cui: (a) insufficienza cardiaca congestizia non controllata (CHF); (b) necessità di terapia antiaritmica per aritmia ventricolare; (c) disturbo di conduzione grave clinicamente significativo a discrezione dello sperimentatore; (d) angina pectoris in corso che richiede terapia; (e) malattia cardiovascolare di classe II, III o IV secondo la New York Heart Association (NYHA); (f) sierologia positiva nota per virus dell'immunodeficienza umana (HIV); (g) gravi condizioni mediche di comorbilità, incluso sanguinamento attivo o cronicamente ricorrente, infezione attiva clinicamente pertinente, cirrosi

e malattia polmonare cronica ostruttiva o restrittiva cronica a discrezione dello sperimentatore; o (h) qualsiasi altra condizione medica o psichiatrica grave, acuta o cronica, anomalia di laboratorio o difficoltà a rispettare i requisiti del protocollo che possono aumentare il rischio associato alla partecipazione allo studio o la somministrazione di farmaci o interferire con l'interpretazione dei risultati dello studio e, a giudizio dell'Investigatore, renderebbero il paziente inappropriato per lo studio.

[0142] La misura di esito primario era il miglior tasso di risposta ematologica complessiva (RR) (risposta completa (CR) + risposta parziale (PR)). L'intervallo di tempo è stato dal tempo della prima dose (ciclo 1 giorno 1) fino alla fine dello studio (12 mesi dopo la somministrazione all'ultimo partecipante).

[0143] Gli obiettivi secondari dell'endpoint erano determinare la durata della risposta ematologica, determinare la risposta molecolare (pazienti JAK2 V617F / MPL W515^{mt}) ed esaminare la sicurezza e la tollerabilità monitorando il numero di pazienti con tossicità ematologiche, eventi avversi di Grado 3 e 4 non eme (AE, eventi avversi) ed eventi emorragici. L'intervallo di tempo era dal tempo della prima dose (ciclo 1 giorno 1) fino alla fine dello studio (12 mesi dopo la somministrazione all'ultimo partecipante). L'obiettivo esplorativo era la crescita spontanea di CFU-Mega (solo siti selezionati).

[0144] La Tabella 3 espone le definizioni di risposta per lo studio. I criteri europei di risposta alla leucemia sono stati adattati da Barosi et al., Blood (2009). La risposta eme è stata contata come l'ultima delle 4

settimane.

| Tabella 3: Definizioni di risposta | |
|--|--|
| Grado di risposta ematologica | Definizione |
| Risposta completa (CR) | Normalizzazione delle piastrine ($\leq 400 \times 10^3/\mu\text{L}$) mantenuta per almeno 4 settimane consecutive, in assenza di eventi tromboembolici. |
| Risposta parziale (PR) | Piastrine ($\leq 600 \times 10^3/\mu\text{l}$) o una riduzione del 50% delle piastrine mantenuta per almeno in 4 settimane consecutive, in assenza di eventi tromboembolici. |
| Grado di risposta molecolare | Definizione |
| Risposta completa (CR) | Riduzione di eventuale anomalia molecolare specifica a livelli non rilevabili. |
| Risposta parziale (PR)* * | 1) Una riduzione del $\geq 50\%$ dal valore basale in pazienti con un carico allelico mutante $< 50\%$ all'OR basale |
| Vale per pazienti con un valore al basale di carico allelico mutante $\geq 10\%$ | 2) Una riduzione del $\geq 25\%$ dal valore basale in pazienti con un carico allelico mutante $\geq 50\%$ al basale |
| Nessuna risposta (NR) | Una qualsiasi risposta che non soddisfi una risposta completa o parziale. |

[0145] I dati demografici dei pazienti sono forniti nella seguente

Tabella 4.

| Tabella 4: Dati demografici del paziente | |
|---|---|
| Mediana caratteristica (intervallo) | Totale (N = 14) |
| Età | 59,5 anni (21 - 83) |
| Anni dalla diagnosi iniziale | 5,8 (0,3 - 24,9) |
| Conta piastrinica al basale mediana | 787,5 x 10 ³ /μl (521 - 1359) |
| Conta dei globuli bianchi al basale mediana | 6,6 x 10 ³ /μl (3,0 - 14,6) |
| Pts con JAK2 V617F Pts con MPL515 ^{mt} | 7 (50%) 2 (14,3%) |
| Più di una terapia precedente (anagrelide +/- IFN)* *Tutti e 14 i pazienti hanno ricevuto prima idrossiurea (6 resistenti, 8 intolleranti) | 9 (64%) |
| Resistente ad ameno una terapia precedente | 7 (50%) |
| Intollerante a o che ha rifiutato almeno una terapia precedente | 11 (71%) |

Risultati

[0146] La Figura 3 mostra una risposta ematologica complessiva del 100% in tutti e 14 i pazienti con ET che avevano fallito o erano

intolleranti alle terapie convenzionali. Una risposta completa è stata raggiunta in 13 pazienti su 14 (92,9%) e una risposta parziale in 1 paziente su 14 (7,1%). Tutti i pazienti che hanno raggiunto una CR ematologica rimangono in trattamento. I dati hanno indicato che il tempo a una prima occorrenza della conta piastrinica $\leq 400 \times 10^3/\mu\text{LE}$ (contrassegnata per ogni paziente con un diamante) aveva un valore mediano di 3,1 settimane (da 2,1 a 23,1 settimane), mentre il tempo alla risposta completa ha avuto un valore mediano di 6,1 settimane (da 5,1 a 14,1 settimane) (Figura 3).

[0147] I dati sulla frequenza di dosaggio per i 13 pazienti che hanno avuto una risposta ematologica completa e hanno iniziato una terapia di mantenimento sono forniti nella Tabella 5 nel seguito. La frequenza di dosaggio di mantenimento è generalmente diminuita nel tempo (l'intervallo è stato settimanale a Q7 settimane) con la maggioranza (l'84,6% o 11/14) dei pazienti che hanno ricevuto imetelstat ogni 2 settimane o meno frequentemente (in base alla mediana). L'85,7% dei pazienti (6/7) idonei a rimanere in terapia dopo 1 anno hanno continuato la terapia di mantenimento.

| Tabella 5: Frequenza di dosaggio nel mantenimento | |
|--|---------------|
| Frequenza mediana di terapia | N = 13 |
| Settimanalmente | 2 (15,4%) |
| Ogni 2 settimane | 3 (23,1%) |
| Ogni 3 settimane | 2 (15,4%) |
| > Ogni 3 settimane | 6 (46,1%) |

[0148] Come mostrato nella Figura 4A, il carico allelico % di JAK2 V617F è diminuito nel tempo in tutti i pazienti, mentre la Figura 4B mostra che le risposte molecolari (PR) sono state raggiunte in 6/7 (85,7%) pazienti testati con JAK2 V617F in un intervallo di 3-6 mesi.

[0149] La tabella 6 mostra i risultati relativi all'endpoint esplorativo (CFU-Mega). Una ridotta crescita spontanea di CFU-Mega *ex vivo* è stata dimostrata nei due pazienti testati (riduzione del 93% e 96% dal basale, rispettivamente), confermando i precedenti dati *ex vivo*.

| Tabella 6: Risultati per l'endpoint esplorativo - CFU-Mega | | |
|---|---------------|---------------|
| N° paziente | Basale | 1 mese |
| 4 | 22,7 | 1,7 |
| 8 | 8,0 | 0,3 |

[0150] La Figura 5 mostra che la crescita spontanea di CFU-Mega non corrispondeva alla riduzione del carico allelico di JAK2 in un paziente (paziente n. 4).

[0151] I dati suggeriscono che imetelstat ha un effetto inibitorio relativamente selettivo sulla crescita del/i clone/i neoplastico/i che guida/no le neoplasie mieloproliferative (MPN) come la trombocitemia essenziale e ha il potenziale di modificare la biologia sottostante della malattia.

[0152] La Tabella 7 mostra eventi avversi non ematologici frequenti clinicamente significativi.

| Tabella 7: Eventi avversi non ematologici frequenti clinicamente significativi | | |
|---|-------------------------------|-------------------------|
| Eventi avversi non ematologici frequenti | Tutti i gradi (N = 14) | Grado 3 (N = 14) |
| Eventi GI (nausea/diarrea/stipsi) | 14 (100%) | 0 |
| Infezioni | 12(85,7%) | 1* (7,1%) |
| Affaticamento | 9 (64,3%) | 1 (7,1%) |
| Disturbi muscoloscheletrici | 9 (64,3%) | 0 |
| Eventi di sanguinamento | 8 (57,1%) | 1**(7,1%) |
| Mal di testa | 7 (50%) | 1 (7,1%) |
| Tosse | 7 (50%) | 0 |
| Diminuzione dell'appetito | 7 (50%) | 0 |
| Capogiri | 6 (42,9%) | |
| Reazioni all'infusione | 4 (28,6%) | 1***(7,1%) |
| Un evento avverso di grado 4: frattura del collo non correlata a imetelstat. Non sono stati riportati eventi avversi di grado 5 ed eventi tromboembolici. | | |
| * Cellulite/infezione di ferita di grado 3 | | |
| ** Anemia emorragica post-operatoria di grado 3 | | |
| *** Sincope di grado 3; il paziente rimane in trattamento | | |

[0153] La Tabella 8 mostra le anomalie di laboratorio:

| | |
|---|--|
| Tabella 8: Sicurezza - Anomalie di laboratorio | |
|---|--|

| Parametro di laboratorio | Tutti i gradi (N = 14) | Grado 3 (N = 14) | Grado 4 |
|--|-------------------------------|-------------------------|----------------|
| ALT/AST (variazione dal grado basale) | 13 (92,9%) | 2 (14,3%) | 0 |
| Neutropenia | 11 (78,6%) | 4 (28,6%) | 2 (14,3%) |
| Anemia (variazione dal grado basale) | 9 (64,3%) | 1 (7,1%)* | 0 |
| Trombocitopenia | 6 (42,9%) | 0 | 0 |
| Nessun caso di neutropenia febbrile riportato. | | | |
| *Anemia emorragica post-operatoria | | | |

Esempio 4: uno studio pilota in aperto sull'efficacia e la sicurezza di Imetelstat (GRN163L) in pazienti con DIPSS più mielofibrosi Intermedia-2 o primaria ad alto rischio (PMF), mielofibrosi post-policitemia vera (post-PV MF) o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale (post -ET MF)

Materiali e metodi

Progetto di sperimentazione clinica

[0154] Pazienti con DIPSS più mielofibrosi Intermedia-2 o primaria ad alto rischio (PMF), mielofibrosi post-policitemia vera (post-PV MF) o mielofibrosi post-trombocitemia essenziale (post -ET MF) che non erano in terapia standard attiva sono stati indotti con 9,4 mg/kg di Imetelstat somministrato per infusione endovenosa di 2 ore una volta

ogni 21 giorni (coorte A). In alternativa, ai pazienti è stata somministrata un'infusione di 2 ore (9,4 mg/kg) alla settimana per 3 settimane seguita da una volta ogni 21 giorni (coorte B). I pazienti possono ricevere un trattamento per un massimo di 9 cicli. I pazienti possono continuare la terapia oltre 9 cicli.

[0155] I criteri di inclusione dei pazienti specifici per PMF erano (1) una diagnosi confermata di ET secondo i criteri dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS); (2) proliferazione dei megacariociti con atipia accompagnata da reticolina e/o fibrosi del collagene o (4) non conforme ai criteri di OMS per LMC, PV, MDS o altre neoplasie mieloidi o (5) nessuna evidenza di fibrosi del midollo reattiva.

[0156] I criteri di inclusione dei pazienti specifici per post-PV MF erano: (1) una diagnosi confermata di PV secondo i criteri dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS); (2) fibrosi del midollo osseo di grado 2-3 (su una scala di 0-3) o di grado 3-4 (su una scala di 0-4) e (3) due o più tra (a) anemia o perdita sostenuta di richiesta di flebotomia in assenza di terapia citoriduttiva o (b) quadro ematico periferico leucoeritroblastico o (c) aumentata splenomegalia definita come aumento della splenomegalia palpabile di ≥ 5 cm o la comparsa di una splenomegalia nuova palpabile o (d) sviluppo di ≥ 1 tre dei sintomi costituzionali: perdita di peso del 10% in 6 mesi, sudorazione notturna, febbre inspiegata ($37,5$ °C).

[0157] I criteri di inclusione dei pazienti specifici per post-ET MF erano: (1) una diagnosi confermata di ET secondo i criteri

dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS); (2) fibrosi del midollo osseo di grado 2-3 (su una scala di 0-3) o di grado 3-4 (su una scala di 0-4) e (3) due o più tra (a) anemia e una diminuzione di $\geq 2\text{g/dl}$ dal livello di emoglobina al basale o (b) quadro ematico periferico leucoeritroblastico o (c) aumentata splenomegalia definita come un aumento della splenomegalia palpabile di $\geq 5\text{ cm}$ o la comparsa di una splenomegalia nuova palpabile o (d) aumento di castato deidrogenasi o (e) sviluppo di ≥ 1 dei tre sintomi costituzionali: perdita di peso del 10% in 6 mesi, sudorazione notturna, febbre inspiegata ($37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

[0158] I criteri generali per tutti i pazienti erano: (1) disposti e in grado di firmare un modulo di consenso informato; (2) maschio o femmina, di età pari o superiore a 18 anni; (3) stato delle prestazioni ECOG di 0-2. I criteri di laboratorio per tutti i pazienti erano (entro 14 giorni dalla prima somministrazione del farmaco in studio): (1) AST (SGOT) e ALT (SGPT) $\leq 2,5 \times \text{ULN}$; (2) creatina $\leq 3\text{ mg/dl}$; (3) conta dei neutrofili assoluta $\geq 1000/\mu\text{l}$; (4) conta piastrinica $\geq 50,000/\mu\text{l}$; (5) assenza di trattamento attivo con anticoagulazione sistemica e PT e aPTT al basale che non superano $1,5 \times \text{UNL}$.

[0159] I pazienti che hanno soddisfatto uno dei seguenti criteri sono stati esclusi dallo screening e dall'ingresso allo studio: (1) donne in gravidanza o in allattamento; (2) qualsiasi chemioterapia

di terapia farmacologica immunomodulatoria, terapia immunosoppressiva, corticosteroidi $.10\text{ mg/die}$ di prednisone o

equivalente, trattamento con fattore di crescita o terapia con inibitori di JAK \leq 14 giorni prima della registrazione; (4) soggetti con un'altra neoplasia maligna attiva. (5) Stato positivo noto per HIV (6) qualsiasi tossicità non risolta maggiore o pari al grado 2 da una precedente terapia antitumorale (6) recupero incompleto da qualsiasi precedente procedura chirurgica, (7) presenza di infezione acuta attiva che richiede antibiotici, (8) malattia non controllata intercorrente o qualsiasi condizione concorrente che comprometterebbe la sicurezza del paziente o la compliance con il protocollo.

[0160] La misura di esito primario era il miglior tasso di risposta complessiva (RR) (miglioramento clinico (CI) o risposta completa (CR) o risposta parziale (PR)). L'intervallo di tempo è stato dal momento della prima dose (ciclo 1 giorno 1) per i primi 9 cicli di trattamento.

[0161] Gli obiettivi dell'endpoint secondario erano di determinare gli (a) eventi avversi, (b) la risposta della milza: definita come una riduzione minima del 50% della splenomegalia palpabile di una milza che è almeno 10 cm al basale o una milza che è palpabile a più di 5 cm al baseline (c) indipendenza trasfusionale: dove la dipendenza trasfusionale è definita come una storia di almeno 2 unità di trasfusioni di globuli rossi nell'ultimo mese per un livello di emoglobina inferiore a 85 g/l che non era associato a sanguinamento clinicamente evidente. L'intervallo di tempo è stato dal momento della prima dose (ciclo 1 giorno 1) fino alla fine dello studio. L'obiettivo esplorativo era (a) la valutazione istologica del midollo osseo di inversione della fibrosi del midollo osseo

a un grado inferiore e (b) la porzione di pazienti con leucocitosi e trombocitosi al basale che ottengono una riduzione di almeno il 50% della conta alla fine dei cicli 3, 6 e 9.

[0162] La Tabella 9 espone le definizioni di risposta per lo studio. Sono stati utilizzati i criteri di consenso del gruppo di lavoro internazionale (IWG, International Working Group) per la risposta al trattamento nella mielofibrosi con metaplasia mieloide.

| Tabella 9: Definizioni di risposta | |
|---|---|
| | Definizione |
| Remissione completa (CR) | <p>Risoluzione completa di sintomi e segni correlati alla malattia, tra cui epatosplenomegalia palpabile.</p> <p>Remissione della conta ematica periferica definita come un livello di emoglobina almeno di 110 g/l, conta piastrinica almeno di $100 \times 10^9/l$, e conta di neutrofili assoluta almeno di $1,0 \times 10^9/l$. In aggiunta, tutte e 3 le conte ematiche non dovrebbero essere superiori al limite normale superiore.</p> <p>Il differenziale di leucociti normale inclusa la scomparsa di globuli rossi nucleati, blasti e cellule mieloidi immature nello striscio periferico, in assenza di splenectomia. Remissione istologica del midollo osseo definita come la presenza di normocellularità regolata in base all'età, non più del 5% di mieloblasti e un grado di osteomielifibrosi non superiore a 1.</p> |

| | |
|----------------------------|---|
| Remissione parziale (PR) | <p>Richiede tutti i precedenti criteri per CR, tranne il requisito di remissione istologica del midollo osseo.</p> <p>Tuttavia, una ripetizione della biopsia del midollo osseo è richiesta nella valutazione di PR e può o meno mostrare variazioni favorevoli che tuttavia non soddisfano i criteri per CR.</p> |
| Miglioramento clinico (CI) | <p>Richiede uno dei seguenti in assenza sia di progressione della malattia sia di assegnazione di CR/PR:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. un aumento minimo di 20 g/l del livello di emoglobina o il diventare indipendente dalla trasfusione (applicabile solo per pazienti con livello di emoglobina pertrasfusione al basale di 100g/l) 2. una riduzione minima del 50% della splenomegalia palpabile di una milza che è almeno 10 cm al basale o una milza che è palpabile a più di 5 cm al basale diventa non palpabile 3. un aumento minimo del 100% della conta piastrinica e una conta piastrinica assoluta di almeno $50.000 \times 10^9/l$ (applicabile solo per pazienti con conta piastrinica al basale inferiore a $50 \times 10^9/l$) 4. un aumento minimo del 100% di ANC e un ANC di almeno $0,5 \times 10^9/l$ (applicabile solo per pazienti con conta dei neutrofili al basale di $1 \times 10^9/l$). |

| | |
|----------------------------|---|
| Malattia progressiva (PD)) | <p>Richiede uno dei seguenti:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Splenomegalia progressiva che definita dalla comparsa di una splenomegalia precedentemente assente che è palpabile a più di 5 cm al di sotto del margine costale sinistro o un aumento minimo del 100% nella distanza palpabile per la splenomegalia al basale di 5-10 cm o un aumento minimo del 50% della distanza palpabile per splenomegalia al basale superiore a 10 cm 2. Trasformazione leucemica confermata da una conta dei blasti del midollo osseo di almeno il 20% 3. Un aumento della percentuale di blasti del sangue periferico di almeno il 20% che dura per almeno 8 settimane. |
| Malattia stabile | Nessuno dei precedenti |
| Recidiva | Perdita di CR, PR o CI |

Risultati

[0163] È stato osservato un beneficio clinico nei pazienti arruolati nello studio. Trentatré pazienti sono stati reclutati; sono presentati i primi 18 pazienti arruolati e seguiti per un minimo di 3 mesi o per i quali lo studio è stato interrotto: 11 pazienti nella coorte A e 7 pazienti nella coorte B; 44% di PMF, 33% di post-PV MF e 22% di post-ET MF. L'età media era di 68 anni e il rischio al basale era alto nel 56% e intermedio-2 nel 44%. Sette pazienti erano dipendenti dalla trasfusione. La

dimensione mediana della milza era di 13 cm e 11 pazienti presentavano sintomi costituzionali. Il cariotipo era anomalo in 7 pazienti e l'89% aveva JAK2 mutato. Quindici pazienti (l'83%) erano stati precedentemente trattati, di cui 7 con un inibitore di JAK e 3 con pomalidomide.

Tossicità

[0164] Ad un follow-up mediano di 3,2 mesi, 16 pazienti (l'89%) rimangono in trattamento; le due interruzioni sono state dovute a un decesso non correlato e a una progressione della malattia. Nella coorte A, non vi sono stati eventi avversi correlati al trattamento di grado 4; gli eventi di grado 3 sono stati limitati alla trombocitopenia nel 27% e all'anemia nel 9%. Nella coorte B, due (29%) pazienti hanno esperito trombocitopenia di grado 4; gli eventi di grado 3 sono stati limitati a trombocitopenia, neutropenia e anemia in un paziente ciascuno. La riduzione della dose è stata necessaria solo in due (11%) pazienti a causa di mielosoppressione di grado 3 o 4.

Efficacia

[0165] Il tasso di risposta complessivo è stato del 44%. Ciò ha incluso cinque pazienti (il 28%) che soddisfacevano i criteri BM e i criteri morfologici di sangue periferico per la risposta completa (CR) (n = 4) o parziale (PR) (n = 1) e 3 pazienti con miglioramento clinico, in attesa di validazione della durata della risposta e risoluzione della trombocitopenia di grado 1 indotta da farmaci. I quattro pazienti (22%) con CR hanno manifestato inversione della fibrosi del midollo osseo (BM) e recupero della normale morfologia dei megacariociti. Due pazienti con CR erano

dipendenti da trasfusione al basale e sono diventati indipendenti da trasfusione. Risposte molecolari complete sono state documentate in 2 pazienti con CR: uno aveva il 10% di JAK2V617F e l'altro il 50% di JAK2V617F. Tra 13 pazienti con leucocitosi, 10 (77%) hanno normalizzato la conta o hanno avuto una riduzione > 50%. Undici pazienti (il 61%) hanno avuto una risoluzione completa o parziale della leucoeritroblastosi.

[0166] È stata condotta un'analisi successiva e più completa di 22 pazienti arruolati nel braccio A e nel braccio B. La Tabella 10 mostra i risultati.

| Tabella 10: Endpoint primario: Sommario della risposta complessiva secondo i criteri di IWG-MRT del 2013 Tutti i pazienti eleggibili nei Bracci A e B | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|---|
| | Braccio A (N = 11) | Braccio B (N = 11) | Totale (N = 22) |
| Risposta migliore secondo IWG-MRT | N (%) | N (%) | N (%) |
| Risposta complessiva (CR+PR+CI) | 4(36,4%) | 6 (54,5%) | 10 (45,5%) (95% di intervallo di confidenza: 24,4%-67,8%) |
| Remissione (CR+PR) | 2 (18,2%) | 3 (27,3%) | 5 (22,7%) |

| | | | |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|-----------|
| Remissione completa | 2 (18,2%) [§] | 1 (9,1%) | 3 (13,6%) |
| Remissione parziale | | 2(18,2%) | 2 (9,1%) |
| PR con remissioni di BM | | 1 (9,1%) | 1 (4,5%) |
| PR senza remissioni di BM | | 1 (9,1%) | 1 (4,5%) |
| Miglioramento clinico | 2 (18,2%) | 3 (27,3%) | 5 (22,7%) |
| CI-secondo risposta di anemia | 1 (9,1%) | 1 (9,1%) | 2 (9,1%) |
| CI-secondo risposta epatica | | 1 (9,1%) [§] | 1 (4,5%) |
| CI-secondo risposta della milza | 1 (9,1%) | 1 (9,1%) | 2 (9,1%) |
| Solo risposta della milza | 1 (9,1%) | | 1 (4,5%) |
| Malattia stabile | 6 (54,5%) [¥] | 5 (45,5%) [¥] | 11 (50%) |

§ Due pazienti sono in attesa di valutazione della durabilità su 12 settimane.

¥ Due pazienti la cui migliore risposta erano SD avevano sviluppato una malattia progressiva e avevano interrotto lo studio, uno a causa della trasformazione in CMML (Braccio A) e l'altro a causa dello sviluppo di splenomegalia (Braccio B).

Il tempo alla risposta iniziale (mediana) per CR/PR/CI è di 2,4 mesi.

Il tempo alla risposta iniziale (mediana) per CR/PR è di 2,8 mesi.

Esempio 5: Imetelstat inibisce la crescita spontanea di cellule CD34+ *in vitro* da pazienti affetti da leucemia mieloide acuta ma non da individui sani

[0167] Questo esempio dimostra una soppressione dose-dipendente delle cellule CD34+ da parte di imetelstat in pazienti con leucemia mieloide acuta, suggerendo una specificità di imetelstat per cellule CD34+ maligne.

Materiali e metodi

[0168] Per determinare l'effetto di imetelstat sono stati usati i seguenti metodi: (1) cellule del midollo osseo sono state incubate con imetelstat (0,1-10 μ M) in un saggio di formazione di colonie e in coltura liquida per un totale di 14 giorni e in vari punti temporali, le cellule sono state enumerate e valutate.

[0169] Per determinare le curve di risposta alle dosi di CFU, le cellule del midollo osseo da 4 soggetti sani o da 5 pazienti con LMA sono state isolate dal sangue periferico piastrato e trattate con imetelstat 0,

0,1, 1 e 10 μM o con un controllo di erroneo appaiamento. Il CFU-GM (unità formanti colonie - granulociti, macrofagi) e BFU-E (unità formanti scoppi - eritroidi) sono state colorate e al numero di CFU-GM e BFU-E è stato assegnato un punteggio.

Risultati

[0170] Imetelstat non ha ridotto la CFU dal midollo osseo di un donatore sano in un test di CFU di 14 giorni.

[0171] Una riduzione delle CFU di cellule del midollo osseo da un paziente con LMA è stata osservata dopo trattamento con imetelstat in un saggio di CFU di 14 giorni.

[0172] Imetelstat ha ridotto la crescita cellulare da cellule del midollo osseo di pazienti con LMA appena diagnosticata in un saggio in coltura liquida di 14 giorni.

[0173] Imetelstat ha ridotto la crescita di cellule CD34+ derivate da cellule del midollo osseo di un paziente con LMA, ma non dal midollo osseo di un paziente normale. **La Figura 6** illustra la percentuale di crescita cellulare in coltura dopo trattamento *in vitro* con Imetelstat di cellule CD34+ ottenute da un donatore sano e cellule CD34+ da un paziente con LMA al giorno 5, giorno 7 e giorno 9.

[0174] Gli aspetti dell'invenzione divulgata nella presente sono come segue:

1. Un metodo per alleviare almeno un sintomo associato a neoplasie mieloproliferative o sindrome mielodisplastica in un individuo che ne necessita, il metodo comprendendo: somministrare una quantità

cl clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi allevia almeno un sintomo associato a neoplasie mieloproliferative o sindrome mielodisplastica.

2. Metodo del paragrafo 1, in cui la neoplasia mieloproliferativa è scelta dal gruppo costituito da trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), leucemia mieloide cronica (CML), mielofibrosi (MF), leucemia neutrofila cronica, leucemia eosinofila cronica e leucemia mieloide cronica (LMA).

3. Il metodo del paragrafo 2, in cui il sintomo comprende mal di testa, vertigini o stordimento, dolore al torace, debolezza, svenimento, alterazioni della vista, intorpidimento o formicolio delle estremità, arrossamento, dolore pulsante o bruciante alle estremità (eritromelalgia), milza ingrossata, sangue dal naso, lividi, sanguinamento dalla bocca o dalle gengive, feci sanguinolente o ictus.

4. Il metodo del paragrafo 2, in cui la neoplasia mieloproliferativa (MPN) è trombocitemia essenziale (ET) o policitemia vera (PV).

5. Il metodo del paragrafo 2, in cui la neoplasia mieloproliferativa (MPN) è mielofibrosi (MF).

6. Il metodo del paragrafo 2, in cui la neoplasia mieloproliferativa (MPN) è leucemia mieloide acuta (LMA).

7. Il metodo del paragrafo 1, in cui la sindrome mielodisplastica è scelta dal gruppo costituito da anemia refrattaria, anemia refrattaria con eccesso di blasti, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare, e leucemia mielomonocitica

cronica (CMML).

8. Il metodo del paragrafo 7, in cui la sindrome mielodisplastica è leucemia mielomonocitica cronica (CMML).

9. Metodo per ridurre la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche in un individuo cui è diagnosticata o che si sospetta abbia neoplasia mieloproliferativa o sindrome mielodisplastica, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi riduce la proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche nell'individuo.

10. Metodo del paragrafo 9, in cui la neoplasia mieloproliferativa è scelta dal gruppo costituito da trombocitemia essenziale (ET), policitemia vera (PV), leucemia mieloide cronica (CML), mielofibrosi (MF), leucemia neutrofila cronica, leucemia eosinofila cronica e leucemia mieloide cronica (LMA).

11. Il metodo del paragrafo 10, in cui la neoplasia mieloproliferativa (MPN) è trombocitemia essenziale (ET) o policitemia vera (PV).

12. Il metodo del paragrafo 10, in cui la neoplasia mieloproliferativa (MPN) è mielofibrosi (MF).

13. Il metodo del paragrafo 10, in cui la neoplasia mieloproliferativa (MPN) è leucemia mieloide acuta (LMA).

14. Il metodo del paragrafo 9, in cui la sindrome mielodisplastica è scelta dal gruppo costituito da anemia refrattaria, anemia refrattaria con

eccesso di blasti, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare, e leucemia mielomonocitica cronica (CMML).

15. Il metodo del paragrafo 11, in cui una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $600 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue dell'individuo.

16. Il metodo del paragrafo 9, in cui l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia non basata su inibitore di telomerasi.

17. Un metodo per mantenere conte piastriniche del sangue tra meno di circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue di un individuo a cui è stata diagnosticata o che si sospetta abbia trombocitemia essenziale, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi mantiene la conta piastrinica a meno di circa $400 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nell'individuo.

18. Il metodo del paragrafo 17, in cui l'inibitore di telomerasi è somministrato non più di una volta ogni due settimane.

19. Metodo per ridurre la fibrosi del midollo osseo in un individuo cui è diagnosticata o che si sospetta abbia neoplasia mieloproliferativa o sindrome mielodisplastica, il metodo comprendendo: somministrare una quantità clinicamente efficace di un inibitore di telomerasi all'individuo, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi riduce la fibrosi del midollo osseo nell'individuo.

20. Il metodo del paragrafo 9, in cui l'inibitore di telomerasi

comprende un oligonucleotide.

21. Il metodo del paragrafo 13, in cui l'oligonucleotide è complementare al componente di RNA di telomerasi.

22. Il metodo del paragrafo 14, in cui l'oligonucleotide è di 10-20 paia di basi di lunghezza.

23. Il metodo del paragrafo 15, in cui l'oligonucleotide comprende la sequenza TAGGGTTAGACAA.

24. Il metodo del paragrafo 10, in cui l'oligonucleotide comprende almeno un legame internucleosidico di N3'→ P5' tiosforamidato.

25. Il metodo del paragrafo 24, in cui l'oligonucleotide comprende legami internucleosidici di N3'→ P5' tiosforamidato.

26. Il metodo del paragrafo 20, in cui l'oligonucleotide comprende inoltre una frazione lipidica legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide.

27. Il metodo del paragrafo 26, in cui la frazione lipidica è legata all'estremità in 5' e/o 3' dell'oligonucleotide tramite un linker.

28. Il metodo del paragrafo 27, in cui il linker è un linker di glicerolo o di amminoglicerolo.

29. Il metodo del paragrafo 27, in cui la frazione lipidica è una frazione di palmitoile (C16).

30. Il metodo di uno qualsiasi dei paragrafi 9, in cui l'inibitore di telomerasi è imetelstat.

31. Il metodo del paragrafo 9, in cui l'inibitore di telomerasi è somministrato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

32. Il metodo del paragrafo 9, in cui l'inibitore di telomerasi è formulato per somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, per inalazione o intraoculare.

33. Il metodo del paragrafo 9, in cui la somministrazione della quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di telomerasi comprende la messa in contatto di una o più cellule progenitrici neoplastiche con l'inibitore di telomerasi.

34. Il metodo del paragrafo 30, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,3 mg/kg.

35. Il metodo del paragrafo 30, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

36. Il metodo del paragrafo 9, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi non inibisce la crescita di megacariociti dipendente da citochine.

37. Il metodo del paragrafo 9, in cui l'individuo reca una mutazione del guadagno di funzione di V617F nel gene di Janus chinasi 2 (JAK2).

38. Il metodo del paragrafo 37, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico allelico di JAK2 V617F nell'individuo.

39. Il metodo del paragrafo 9, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce la crescita di megacariociti indipendente da citochine.

40. Il metodo del paragrafo 9, in cui la somministrazione dell'inibitore di telomerasi inibisce CFU-mega.

41. Il metodo del paragrafo 40, in cui l'inibizione di CFU-Mega è indipendente dalla riduzione del carico allelico di JAK2.

RIVENDICAZIONI

1. Inibitore di telomerasi per uso nell'alleviare almeno un sintomo risultante da sindrome mielodisplastica in un individuo, in cui l'inibitore di telomerasi è imetelstat o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

2. Inibitore di telomerasi per uso della rivendicazione 1, in cui l'almeno un sintomo comprende respiro corto, affaticamento, debolezza, svenimento, epistassi, lividi, sanguinamento da bocca o gengive, feci sanguinolente, petecchie o ictus.

3. Inibitore di telomerasi per uso della rivendicazione 1, in cui la sindrome mielodisplastica è scelta dal gruppo costituito da anemia refrattaria, anemia refrattaria con eccesso di blasti, citopenia refrattaria con displasia multilineare, citopenia refrattaria con displasia unilineare, e leucemia mielomonocitica cronica (CMML).

4. Inibitore di telomerasi per uso della rivendicazione 3, in cui la sindrome mielodisplastica (MDS) è leucemia mielomonocitica cronica (CMML).

5. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 1, in cui l'inibitore riduce una proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche in un individuo cui è diagnosticata o che si sospetta abbia la sindrome mielodisplastica.

6. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 5, in cui una ridotta proliferazione di cellule progenitrici neoplastiche dà come risultato conte piastriniche inferiori a circa $600 \times 10^3 / \mu\text{l}$ nel sangue

dell'individuo.

7. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 1, in cui l'inibitore riduce fibrosi di midollo osseo in un individuo con cui è diagnosticata o che si sospetta abbia la sindrome mielodisplastica.

8. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 1, in cui l'individuo ha l'anemia e richiede trasfusioni di sangue.

9. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 8, in cui l'individuo reca una mutazione di acquisizione di funzione V617F nel gene Janus chinasi 2 (JAK2) e l'uso dell'inibitore di telomerasi diminuisce la percentuale di carico allelico di V617F di JAK2 nell'individuo.

10. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 9, in cui l'individuo è resistente o intollerante a una precedente terapia basata su inibitori di non telomerasi.

11. Inibitore di telomerasi per l'uso secondo una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui l'inibitore di telomerasi è usato con un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

12. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui l'inibitore di telomerasi è formulato per somministrazione orale, endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, topica, intraperitoneale, intranasale, inalatoria o intraoculare.

13. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui una o più cellule progenitrici neoplastiche sono a contatto con l'inibitore di telomerasi.

14. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 3,5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

15. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

16. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

17. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg.

18. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

19. Inibitore di telomerasi per l'uso secondo una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui l'inibitore di telomerasi non inibisce alcuna crescita di megacariociti dipendenti da citochine.

20. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui l'inibitore di telomerasi inibisce una crescita di megacariociti indipendenti da citochine.

21. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui l'inibitore di telomerasi inibisce CFU-Mega.

22. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 21, in

cui un'inibizione di mega di UFC è indipendente da riduzione di carico allelico di JAK2.

23. Inibitore di telomerasi per l'uso di una qualsiasi di rivendicazioni da 1 a 10, in cui l'inibitore di telomerasi è imetelstat sodico.

24. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 23, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 3,5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

25. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 23, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

26. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 23, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 6,5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

27. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 23, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 7,5 mg/kg a 9,4 mg/kg.

28. Inibitore di telomerasi per l'uso della rivendicazione 23, in cui la quantità efficace di un inibitore di telomerasi è da 9,5 mg/kg a 11,7 mg/kg.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLE 1-9/9

Figure 1-7

“Figure” = Figura

TAVOLA 1/9

Figura 1A

“Total CB cells” = Cellule CB totali

“Day **” = Giorno *

“Standard Control” = Controllo standard

“Solvent Control” = Controllo di solvente

TAVOLA 2/9

Figura 1B

“% C41+cells (Megs)” = % C41+cellule (Megs)

“Day **” = Giorno *

“Standard Control” = Controllo standard

“Solvent Control” = Controllo di solvente

TAVOLA 3/9

Figura 2

“Dose-Response Curves” = Curve dose-risposta

“CFU-Mega Spontaneous Growth (%) (Transformed Log10)” = Crescita spontanea di CFU-Mega (%) (Log10 trasformato)

“Imetelstat Dose” = Dose di imetelstat

“Healthy” = Sano

TAVOLA 4/9

Figura 3

“Time to Hematologic Response” = Tempo alla risposta ematologica

“Patient Number” = Paziente numero

“Month **” = Mese *

“Patients achieving CR” = Paziente che ottiene CR

“Patients achieving PR” = Paziente che ottiene PR

“Time to 1st occurrence of platelet count” = Tempo alla prima occorrenza di conta piastrinica

“median = 3.1 weeks (2.1 to 23.1 weeks)” = mediana = 3,1 settimane (da 2,1 a 23,1 settimane)

“Time to CR” = Tempo a CR

“median = 6.1 weeks (5.1 to 14.1 weeks)” = mediana = 6,1 settimane (da 5,1 a 14,1 settimane)

TAVOLA 5/9

Figura 4A

“JAK2 V617F % Allelic Burden” = Carico allelico di JAK2 V617F %

“Month” = Mese

TAVOLA 6/9

Figura 4B

“Median JAK2 V617F % Change” = Variazione % di JAK2 V617F mediana

“Baseline” = Basale

“Month” = Mese

“% Cng” = % di Cng

TAVOLA 7/9

Figura 5

“JAK2 V617F % Allelic Burden” = Carico allelico di JAK2 V617F %

“Month” = Mese

“Dosing of imetelstat” = Dosaggio di imetelstat

“CFU-Mega count” = Conta di CFU-Mega

TAVOLA 8/9

Figura 6

“CD34+ cells from healthy donor” = Cellule CD34+ da donatore sano

“Day *” = Giorno *

“% cell growth” = % di crescita cellulare

“CD34+ cells from AML patient (Blast cells)” = Cellule CD34+ da paziente
con LMA (blasti)

TAVOLA 9/9

Figura 7

“PMF, 52-year-old; male” = PMF, di 52 anni, maschio

“destroyed during fixation” = distrutto durante il fissaggio

“Mismatch Oligo” = Erroneo appaiamento di oligo

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

Figure 1

A

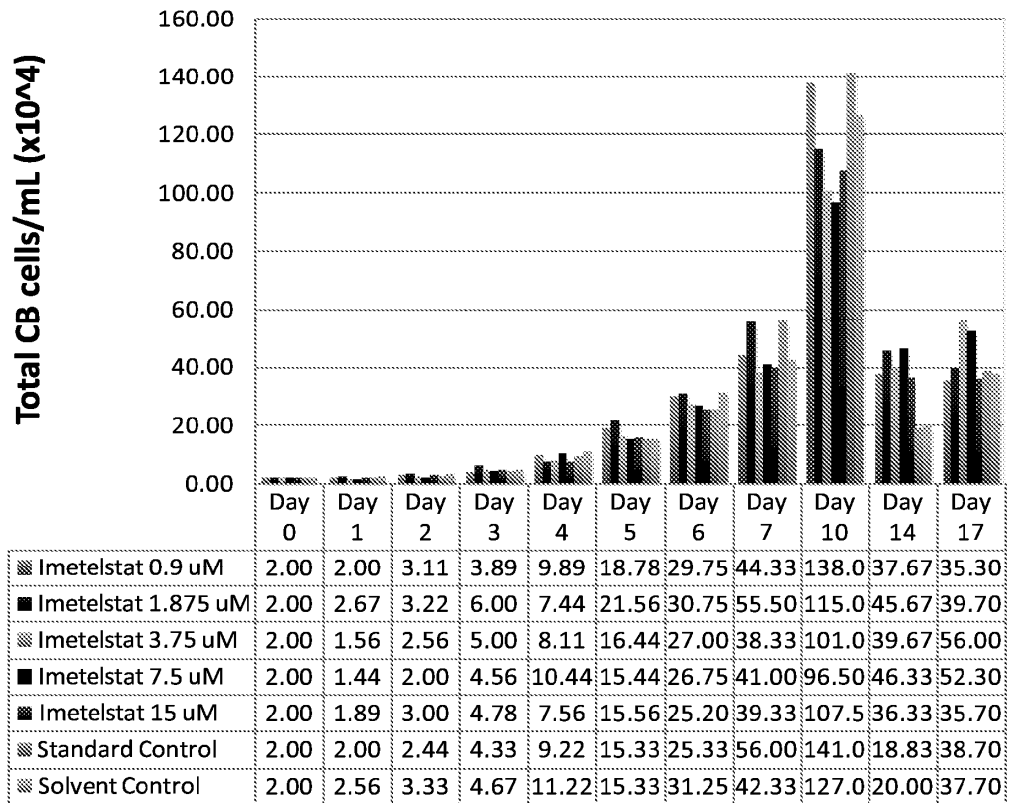


Figure 1

B

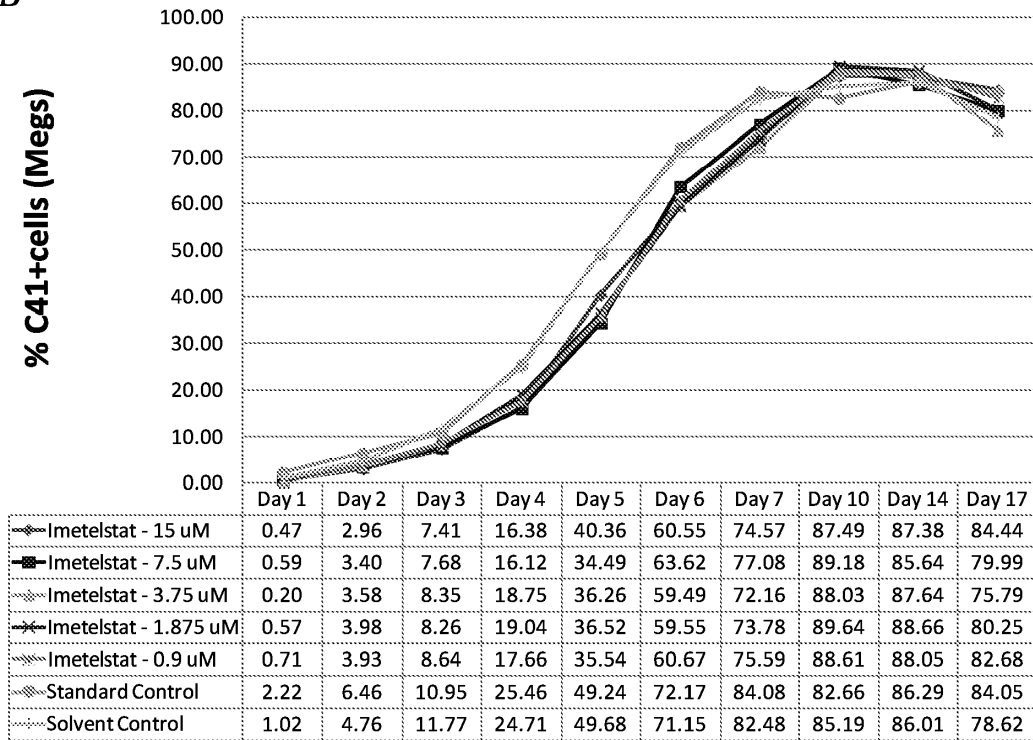


Figure 2

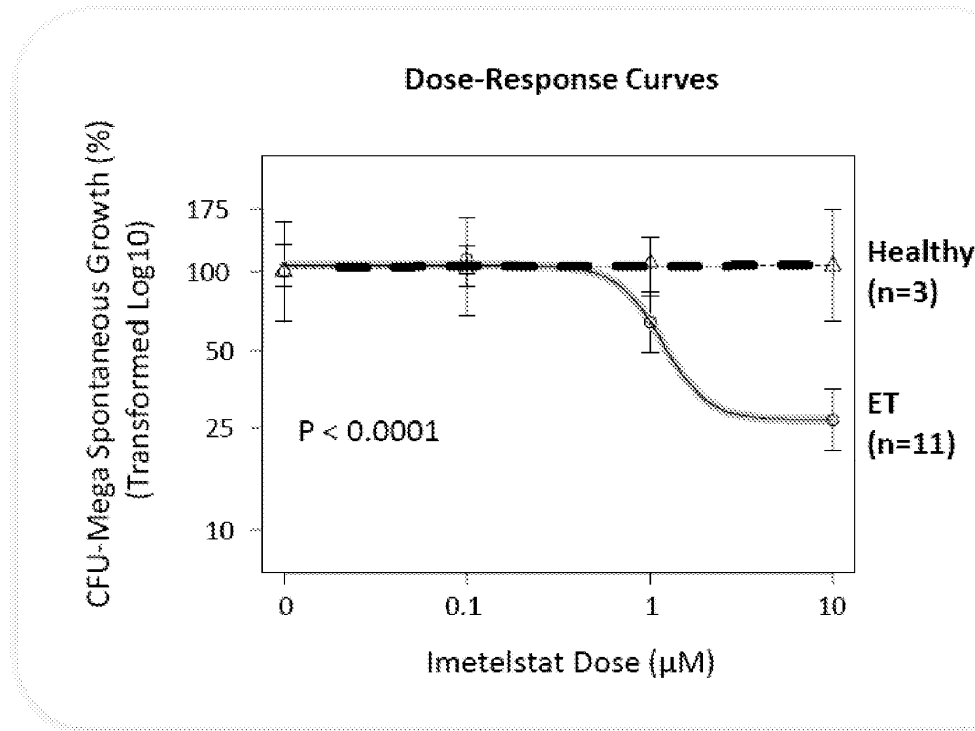


Figure 3

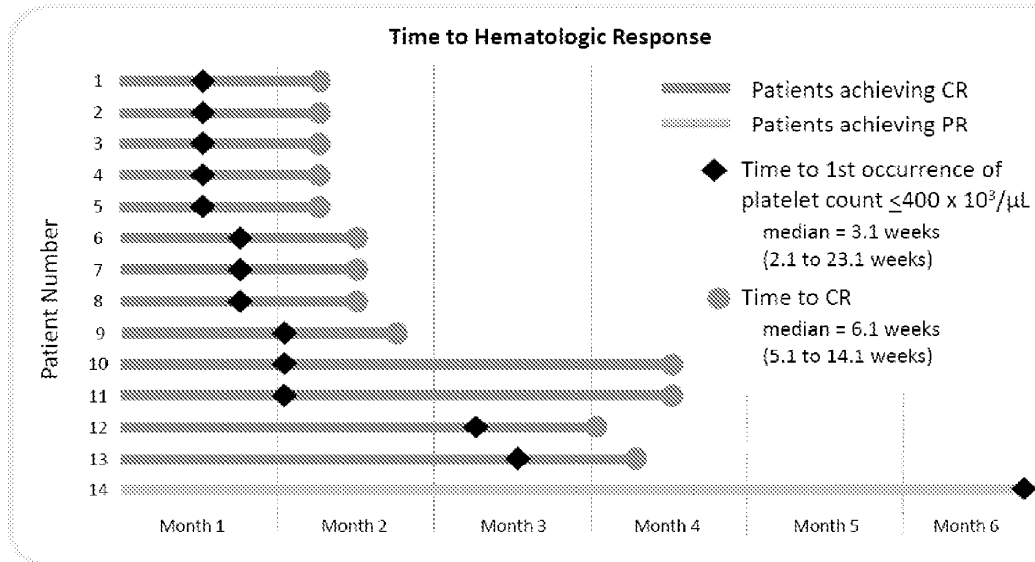


Figure 4

A

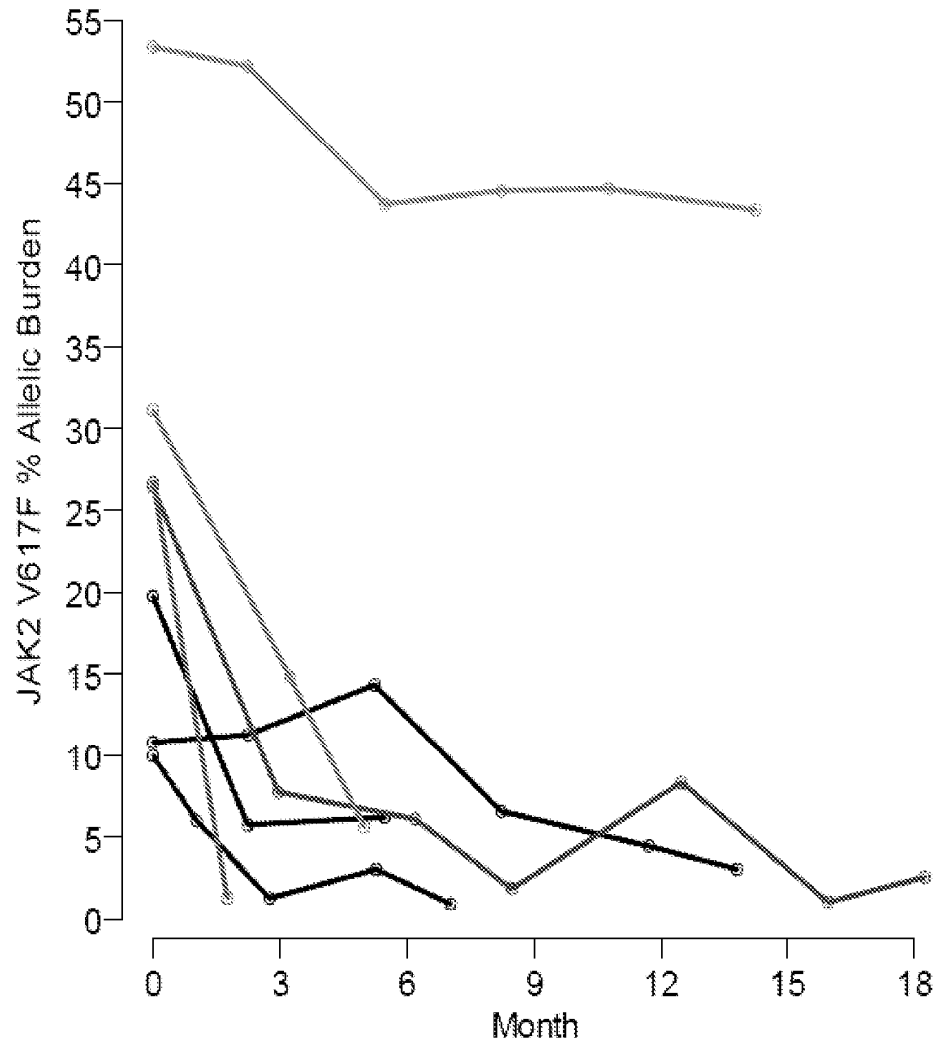


Figure 4

B

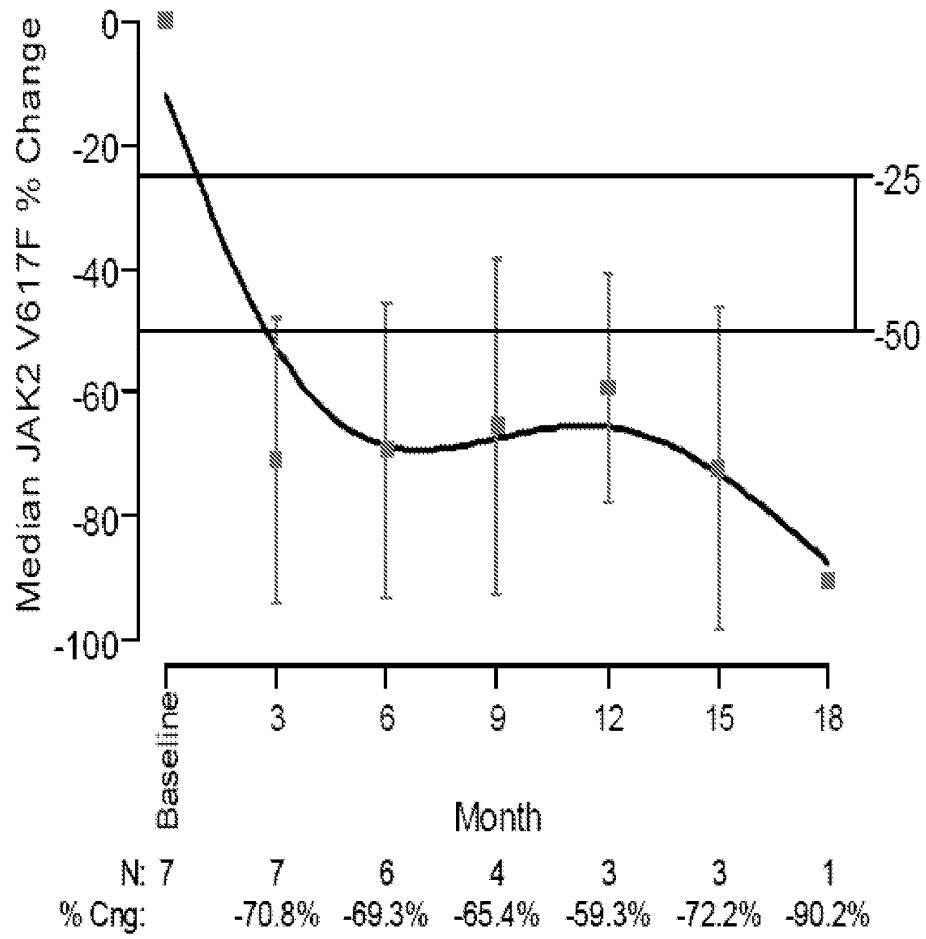


Figure 5

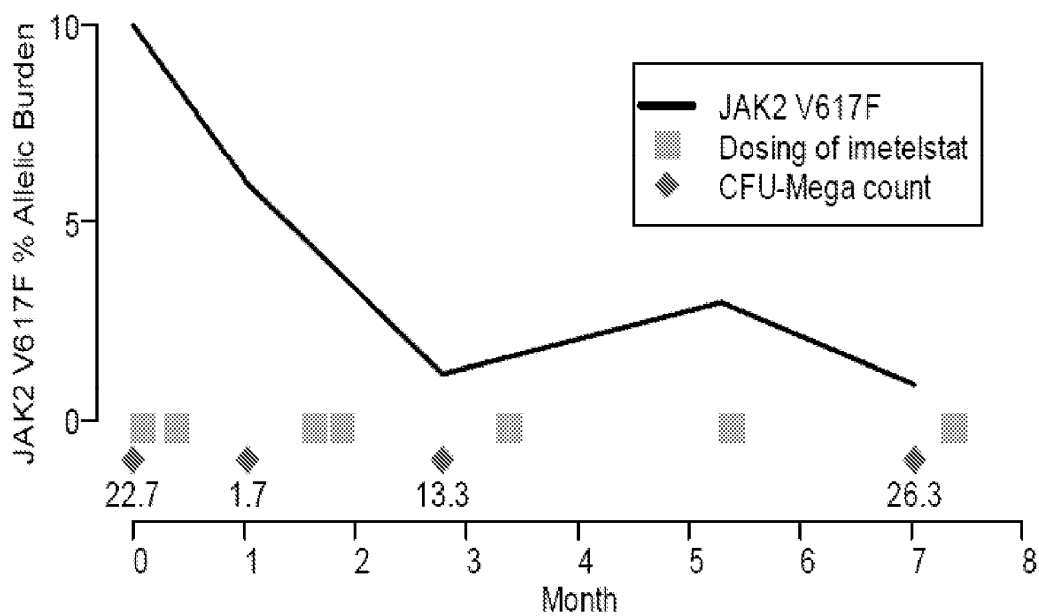
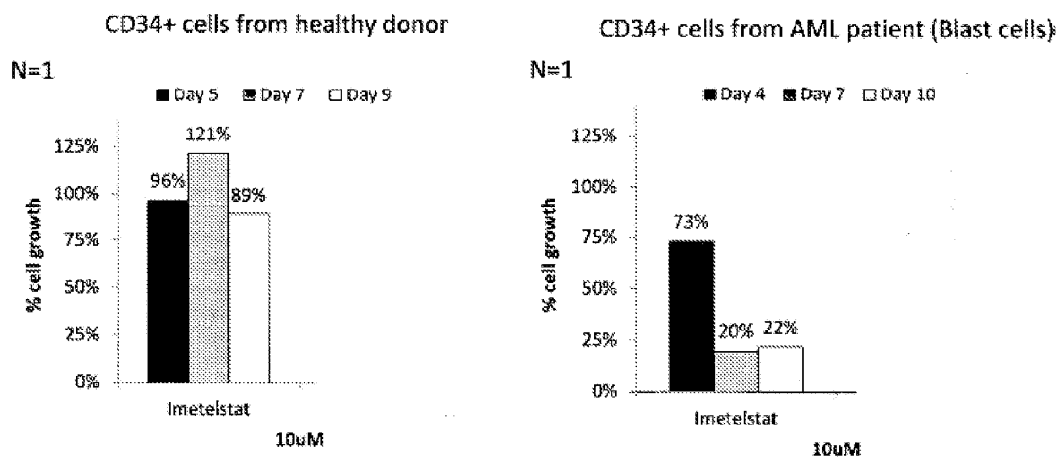


Figure 6



PMF, 52-year-old; male

Figure 7

