(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115666588 A
(43)申请公布日 2023.01.31

(21)申请号 202080091888.8
(22)申请日 2020.11.03
(30)优先权数据
62/930,251 2019.11.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.06.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/058718 2020.11.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/091904 EN 2021.05.14
(71)申请人 美国杰龙生物医药公司
地址 美国加利福尼亚州
申请人 西奈山伊坎医学院
(72)发明人 F·黄 X·王
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 岑晓东
(51)Int.Cl.
A61K 31/7088(2006.01)
A61K 31/7125(2006.01)
A61K 47/54(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

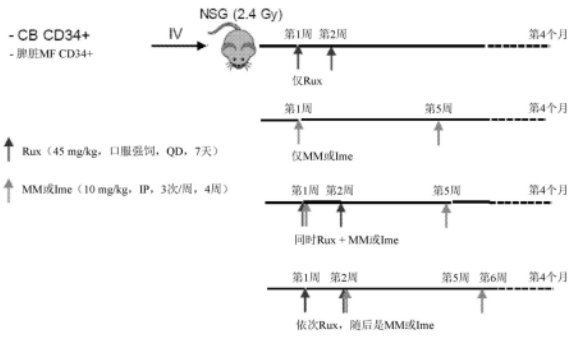
权利要求书7页 说明书29页 附图16页

(54)发明名称

Janus激酶抑制剂和端粒酶抑制剂用于治疗骨髓增殖性肿瘤的用途

(57)摘要

本公开的各方面包含用于治疗骨髓增殖性肿瘤的方法。根据某些实施例的方法包含向受试者共施用Janus激酶(JAK)抑制剂和端粒酶抑制剂,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。还描述了用于通过使骨髓增殖性肿瘤细胞与足以诱导细胞凋亡的量的JAK抑制剂和端粒酶抑制剂接触来诱导所述细胞的细胞凋亡的方法。还提供了用于实践本发明的方法的具有JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的组合物。



CN 115666588 A

1.一种治疗患有骨髓增殖性肿瘤的受试者的方法,所述方法包括向受试者共施用Janus激酶(JAK)抑制剂和端粒酶抑制剂,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述JAK抑制剂和端粒酶抑制剂同时施用。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述JAK抑制剂和所述端粒酶抑制剂依次施用。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂在施用所述JAK抑制剂之后施用。

5.根据权利要求3所述的方法,其中所述JAK抑制剂在所述端粒酶抑制剂之后施用。

6.根据权利要求3到5中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂的同一天施用于所述受试者。

7.根据权利要求3到4中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂之后约0天到约13天施用于所述受试者。

8.根据权利要求3所述的方法,其中所述方法包括:

在第一天,施用一定剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐以及一定剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐;以及

在所述第一天之后,每天一次或两次施用一定剂量的所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐,持续约20天到约27天的持续时间。

9.根据权利要求8所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天一次施用,持续约20天到约27天的持续时间。

10.根据权利要求8所述的方法,其中所述剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天施用两次。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天两次施用,持续约20天到约27天的持续时间。

12.根据权利要求8到11中任一项所述的方法,其中所述方法包括21天。

13.根据权利要求8到11中任一项所述的方法,其中所述方法包括28天。

14.根据权利要求8到13中任一项所述的方法,其中所述方法重复1次或多次。

15.根据权利要求8到13中任一项所述的方法,其中所述方法重复5次或更多次。

16.根据权利要求3所述的方法,其中所述方法包括:

每天一次或两次向所述受试者施用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐,持续约14天到21天的持续时间;以及

在最后一个施用剂量的鲁索替尼(ruxolitinib)或其药学上可接受的盐之后约1到约7天的时间段期间,向所述受试者施用一个或多个剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天一次施用于所述受试者。

18.根据权利要求16所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天两次施用于所述受试者。

19.根据权利要求16到18中任一项所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐施用于所述受试者,持续14天。

20.根据权利要求16到18中任一项所述的方法，其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐施用于所述受试者，持续21天。

21.根据权利要求16到20中任一项所述的方法，其中所述方法重复1次或多次。

22.根据权利要求16到20中任一项所述的方法，其中所述方法重复5次或更多次。

23.根据权利要求3所述的方法，其中所述方法包括：

在第一天，施用一定剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐；以及

在所述第一天之后，每天一次或两次施用一定剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐，持续约20天到约27天的持续时间。

24.根据权利要求23所述的方法，其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天一次施用，持续约20天到约27天的持续时间。

25.根据权利要求23所述的方法，其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天两次施用，持续约20天到约27天的持续时间。

26.根据权利要求23到25中任一项所述的方法，其中所述方法包括21天。

27.根据权利要求23到25中任一项所述的方法，其中所述方法包括28天。

28.根据权利要求23到27中任一项所述的方法，其中所述方法重复1次或多次。

29.根据权利要求23到27中任一项所述的方法，其中所述方法重复5次或更多次。

30.根据权利要求1到29中任一项所述的方法，其中所述JAK抑制剂以约5mg/天到约600mg/天的剂量施用于所述受试者。

31.根据权利要求30所述的方法，其中所述JAK抑制剂以约10mg/天到约400mg/天的剂量施用于所述受试者。

32.根据权利要求1到31中任一项所述的方法，其中所述端粒酶抑制剂以约4mg/kg到10mg/kg的剂量施用于所述受试者。

33.根据权利要求32所述的方法，其中所述端粒酶抑制剂以约7.5mg/kg到约9.4mg/kg的剂量施用于所述受试者。

34.根据权利要求33所述的方法，其中所述端粒酶抑制剂以约9.4mg/kg的剂量施用于所述受试者。

35.根据权利要求32到34中任一项所述的方法，其中所述端粒酶抑制剂经约1小时到约3小时的持续时间通过静脉内输注施用于所述受试者。

36.根据权利要求35所述的方法，其中所述端粒酶抑制剂经约2小时的持续时间通过静脉内输注施用于所述受试者。

37.根据权利要求1到36中任一项所述的方法，其中所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者。

38.根据权利要求37所述的方法，其中所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者，持续约1天到约21天的持续时间。

39.根据权利要求38所述的方法，其中所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者，持续约7天到约14天的持续时间。

40.根据权利要求1到7中任一项所述的方法，其中所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者。

41.根据权利要求40所述的方法，其中所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者，持

续约1天到约21天的持续时间。

42.根据权利要求41所述的方法,其中所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者,持续约7天到约14天的持续时间。

43.根据权利要求1到42中任一项所述的方法,其中所述JAK抑制剂选自由以下组成的组:鲁索替尼、菲卓替尼(fedratinib)、莫莫替尼(momelotinib)、帕瑞替尼(pacritinib)或其药学上可接受的盐。

44.根据权利要求43所述的方法,其中所述JAK抑制剂是鲁索替尼或其药学上可接受的盐。

45.根据权利要求44中任一项所述的方法,其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐以以下剂量施用于受试者:

当所述受试者的基线血小板计数小于约100 x 10^9/L血小板时,5mg,每天两次;

当所述受试者的基线血小板计数为约100 x 10^9/L血小板到约200 x 10^9/L血小板时,15mg,每天两次;以及

当所述受试者的基线血小板计数大于约200 x 10^9/L血小板时,20mg,每天两次。

46.根据权利要求1到7中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂每3周一次施用于所述受试者。

47.根据权利要求1到7中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂每4周一次施用于所述受试者。

48.根据权利要求1到47中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酰胺酯核苷间键。

49.根据权利要求1到48中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分通过连接子与所述寡核苷酸的所述5'和/或3'端连接。

50.根据权利要求49所述的方法,其中所述连接子是甘油或氨基甘油连接子。

51.根据权利要求1到50中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分是棕榈酰基(C16)部分。

52.根据权利要求1到51中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他(imetelstat)或其药学上可接受的盐。

53.根据权利要求52所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。

54.根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括:

每天一次或两次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐,持续0天到21天的持续时间;以及

在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐的7天内,向所述受试者施用一个剂量或更多的伊美司他或其药学上可接受的盐。

55.根据权利要求54所述的方法,其中鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天一次施用于所述受试者。

56.根据权利要求54所述的方法,其中鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天两次施用于所述受试者。

57.根据权利要求54到56中任一项所述的方法,其中伊美司他或其药学上可接受的盐每三周一次施用。

58.根据权利要求54到56中任一项所述的方法,其中伊美司他或其药学上可接受的盐每四周一次施用。

59.根据权利要求1到58中任一项所述的方法,其中所述骨髓增殖性肿瘤选自骨髓纤维化(MF)、骨髓增生异常综合征(MDS)、原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性髓性白血病(CML)、慢性中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性髓性白血病(AML)。

60.根据权利要求59所述的方法,其中所述骨髓增殖性肿瘤是骨髓纤维化。

61.根据权利要求60所述的方法,其中所述骨髓增殖性肿瘤是原发性骨髓纤维化。

62.根据权利要求1到61中任一项所述的方法,其进一步包括将受试者诊断为患有骨髓增殖性肿瘤。

63.根据权利要求62所述的方法,其中所述方法包括将受试者诊断为患有骨髓纤维化。

64.根据权利要求63所述的方法,其中所述方法包括将受试者诊断为患有原发性骨髓纤维化。

65.一种诱导骨髓增殖性肿瘤细胞的细胞凋亡的方法,所述方法包括使所述细胞与足以诱导细胞凋亡的量的Janus激酶(JAK)抑制剂和端粒酶抑制剂接触,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。

66.根据权利要求65所述的方法,其中所述骨髓增殖性肿瘤细胞是骨髓纤维化造血干细胞(HSC)或恶性造血祖细胞(HPC)。

67.根据权利要求65到66中任一项所述的方法,其中所述Janus激酶(JAK)抑制剂和所述端粒酶抑制剂在体外与所述骨髓增殖性肿瘤细胞接触。

68.根据权利要求65到66中任一项所述的方法,其中所述Janus激酶(JAK)抑制剂和端粒酶抑制剂与受试者的所述骨髓增殖性肿瘤细胞接触,并且所述方法包括向所述受试者共施用所述Janus激酶(JAK)抑制剂和所述端粒酶抑制剂。

69.根据权利要求68所述的方法,其中所述JAK抑制剂和端粒酶抑制剂同时施用。

70.根据权利要求68所述的方法,其中所述JAK抑制剂和端粒酶抑制剂依次施用。

71.根据权利要求70所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂在施用所述JAK抑制剂之后施用。

72.根据权利要求70所述的方法,其中所述JAK抑制剂在所述端粒酶抑制剂之后施用。

73.根据权利要求70到72中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂的同一天施用于所述受试者。

74.根据权利要求70到72中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂之后约0天到约13天施用于所述受试者。

75.根据权利要求70所述的方法,其中所述方法包括:

在第一天,施用一定剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐以及一定剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐;以及

在所述第一天之后,每天一次或两次施用一定剂量的所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐,持续约20天到约27天的持续时间。

76.根据权利要求75所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天一次施用,持续约20天到约27天的持续时间。

77.根据权利要求75所述的方法,其中所述剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天施用两次。

78.根据权利要求77所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天两次施用,持续约20天到约27天的持续时间。

79.根据权利要求75到78中任一项所述的方法,其中所述方法包括21天。

80.根据权利要求75到78中任一项所述的方法,其中所述方法包括28天。

81.根据权利要求75到80中任一项所述的方法,其中所述方法重复1次或多次。

82.根据权利要求75到80中任一项所述的方法,其中所述方法重复5次或更多次。

83.根据权利要求70所述的方法,其中所述方法包括:

每天一次或两次向所述受试者施用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐,持续约14天到21天的持续时间;以及

在距最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐后约1天到约7天的时间段期间,向所述受试者施用一个剂量或更多的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐。

84.根据权利要求83所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天一次施用于所述受试者。

85.根据权利要求83所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天两次施用于所述受试者。

86.根据权利要求83到85中任一项所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐施用于所述受试者,持续14天。

87.根据权利要求83到85中任一项所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐施用于所述受试者,持续21天。

88.根据权利要求83到87中任一项所述的方法,其中所述方法重复1次或多次。

89.根据权利要求83到87中任一项所述的方法,其中所述方法重复5次或更多次。

90.根据权利要求70所述的方法,其中所述方法包括:

在第一天,施用一定剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐;以及

在所述第一天之后,每天一次或两次施用一定剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐,持续约20天到约27天的持续时间。

91.根据权利要求90所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天一次施用,持续约20天到约27天的持续时间。

92.根据权利要求90所述的方法,其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述第一天之后每天两次施用,持续约20天到约27天的持续时间。

93.根据权利要求90到92中任一项所述的方法,其中所述方法包括21天。

94.根据权利要求90到92中任一项所述的方法,其中所述方法包括28天。

95.根据权利要求90到94中任一项所述的方法,其中所述方法重复1次或多次。

96.根据权利要求90到94中任一项所述的方法,其中所述方法重复5次或更多次。

97.根据权利要求65到96中任一项所述的方法,其中所述JAK抑制剂以约5mg/天到约600mg/天的剂量施用于所述受试者。

98.根据权利要求97所述的方法,其中所述JAK抑制剂以约10mg/天到约400mg/天的剂量施用于所述受试者。

99.根据权利要求65到96中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂以约4mg/kg到15mg/kg的剂量施用于所述受试者。

100.根据权利要求99所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂以约7.5mg/kg到约9.4mg/kg的剂量施用于所述受试者。

101.根据权利要求100所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂以约9.4mg/kg的剂量施用于所述受试者。

102.根据权利要求99到101中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂经约1小时到约3小时的持续时间通过静脉内输注施用于所述受试者。

103.根据权利要求102所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂经约2小时的持续时间通过静脉内输注施用于所述受试者。

104.根据权利要求65到74中任一项所述的方法,其中所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者。

105.根据权利要求104所述的方法,其中所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者,持续约1天到约21天的持续时间。

106.根据权利要求105所述的方法,其中所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者,持续约7天到约14天的持续时间。

107.根据权利要求65到74中任一项所述的方法,其中所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者。

108.根据权利要求107所述的方法,其中所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者,持续约1天到约21天的持续时间。

109.根据权利要求108所述的方法,其中所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者,持续约7天到约14天的持续时间。

110.根据权利要求65到74中任一项所述的方法,其中所述鲁索替尼以以下剂量施用于受试者:

当所述受试者的基线血小板计数小于约100 x 10^9/L血小板时,5mg,每天两次;

当所述受试者的基线血小板计数为约100 x 10^9/L血小板到约200 x 10^9/L血小板时,15mg,每天两次;以及

当所述受试者的基线血小板计数大于约200 x 10^9/L血小板时,20mg,每天两次。

111.根据权利要求65到74中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂每3周一次施用于所述受试者。

112.根据权利要求65到74中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂每4周一次施用于所述受试者。

113.根据权利要求65到112中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酰胺酯核苷间键。

114.根据权利要求65到113中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分通过连接子与所述寡核苷酸的所述5'和/或3'端连接。

115.根据权利要求114所述的方法,其中所述连接子是甘油或氨基甘油连接子。

116.根据权利要求65到115中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分是棕榈酰基(C16)部分。

117.根据权利要求65到116中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐。

118.根据权利要求117所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。

119.根据权利要求65所述的方法,其中所述方法包括:

每天一次或两次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐,持续0天到21天的持续时间;以及

在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐的7天内,向所述受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐。

120.根据权利要求119所述的方法,其中鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天一次施用于所述受试者。

121.根据权利要求119所述的方法,其中鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天两次施用于所述受试者。

122.根据权利要求119到121中任一项所述的方法,其中伊美司他或其药学上可接受的盐每三周一次施用。

123.根据权利要求119到121中任一项所述的方法,其中伊美司他或其药学上可接受的盐每四周一次施用。

124.一种在根据权利要求1到123中任一项所述的方法中使用的组合物,所述组合物包括JAK抑制剂和端粒酶抑制剂。

125.根据权利要求124所述的组合物,其中所述JAK抑制剂是鲁索替尼或其药学上可接受的盐。

126.根据权利要求124到125中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐。

127.根据权利要求126所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。

Janus激酶抑制剂和端粒酶抑制剂用于治疗骨髓增殖性肿瘤的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年11月4日提交的美国临时申请第62/930,251号的优先权的权益,所述美国临时申请的公开内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 骨髓增殖性肿瘤(MPN)指当身体产生太多的白细胞或红细胞或血小板时发生的一组血液病症。这种骨髓中的血细胞的过度产生可能产生血液量的问题,并且导致各种症状。MPN可能是由骨髓中的骨髓群系的前体引起的。MPN的特征在于无发育异常的骨髓增殖、骨髓细胞过多以及易患血栓形成、出血和骨髓纤维化。

[0004] 伊美司他(imetelstat)或伊美司他钠是以高度亲和力与端粒酶RNA组分的模板区结合的端粒酶抑制剂。研究表明,伊美司他或伊美司他钠抑制端粒酶活性并有效对抗多种不同癌细胞系和人肿瘤中的细胞增殖。伊美司他或伊美司他钠已经用于患有血液系统恶性肿瘤的患者的临床试验中。患有骨髓纤维化的患者的临床试验表明,伊美司他或伊美司他钠能够实现某些患者的完全的临床缓解。在这些患者中,伊美司他导致骨髓纤维化逆转并导致形态学和分子缓解。

发明内容

[0005] 本公开的各方面包含用于治疗骨髓增殖性肿瘤的方法。根据某些实施例的方法包含向受试者共施用Janus激酶(JAK)抑制剂和端粒酶抑制剂,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。还描述了用于通过使骨髓增殖性肿瘤细胞与足以诱导细胞凋亡的量的JAK抑制剂和端粒酶抑制剂接触来诱导所述细胞的细胞凋亡的方法。还提供了用于实践本发明的方法的具有JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的组合物。

[0006] 在一些实施例中,所述JAK抑制剂和所述端粒酶抑制剂同时施用。在其它实施例中,所述JAK抑制剂和所述端粒酶抑制剂依次施用。在一些实例中,所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂之后施用于所述受试者。在一些实例中,所述JAK抑制剂在向所述受试者施用所述端粒酶抑制剂之后施用于所述受试者。在一个实例中,所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂的同一天施用于所述受试者。在另一个实例中,所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂之后13天内,如在向所述受试者施用所述JAK抑制剂之后3天内施用于所述受试者。例如,所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用最后一个剂量的所述JAK抑制剂之后三天内施用。在一些实例中,所述JaK抑制剂在所述端粒酶抑制剂施用于所述受试者之后13天内施用于所述受试者。例如,所述JAK抑制剂在向所述受试者施用最后一个剂量的所述端粒酶抑制剂之后三天内施用,并且此后每日施用两次。

[0007] 给药是以JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的施用周期进行施用的。在一些实施例中,所述周期是21天,在一些实例中,所述周期是28天或更多天。药物施用的周期可以重复1个、2

个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或多于8个剂量周期，持续6个月或1年或2年或3年或4年或更久的总时间段。

[0008] 在某些实施例中，所述JAK抑制剂以约10mg/天到约40mg/天的剂量施用于所述受试者。所述JAK抑制剂可以每天一次或两次施用于所述受试者。在一些实例中，所述JAK抑制剂以一定周期每天一次或两次施用于所述受试者，持续30天、29天、28天、27天、26天、25天、24天、23天、22天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天或1天的持续时间。在一些实例中，所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者，持续约1到约30天的持续时间，如每天一次，持续约1天到约28天、1天到21天、7天到14天的持续时间。在其它实例中，所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者，持续约1天到约30天的持续时间，如每天两次，持续约1天到约28天、1天到21天、7天到14天的持续时间。

[0009] 在某些实施例中，所述JAK抑制剂选自由以下组成的组：鲁索替尼(ruxolitinib)、菲卓替尼(fedratinib)、莫莫替尼(momelotinib)和帕瑞替尼(pacritinib)或其药学上可接受的盐及其组合。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是鲁索替尼或其药学上可接受的盐。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是菲卓替尼或其药学上可接受的盐。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是莫莫替尼或其药学上可接受的盐。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是帕瑞替尼或其药学上可接受的盐。

[0010] 在一些实施例中，根据本公开的方法向所述受试者施用的JAK抑制剂的剂量可以在如约5mg/天到约500mg/天的范围内。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是鲁索替尼或其药学上可接受的盐，并且以以下剂量施用于受试者：当所述受试者的基线血小板计数小于约$100x10^9$/L血小板时，5mg，每天两次；当所述受试者的基线血小板计数为约$100x10^9$/L血小板到约$200x10^9$/L血小板时，15mg，每天两次；并且当所述受试者的基线血小板计数大于约$200x10^9$/L血小板时，20mg，每天两次。

[0011] 在某些实施例中，所述JAK抑制剂是菲卓替尼或其药学上可接受的盐，并且当受试者的基线血小板计数大于或等于约$50x10^9$/L时，以400mg的剂量每天一次施用于所述受试者。在某些实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以300mg每日一次的剂量施用于受试者。在其它实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以200mg每日一次的剂量施用于受试者。在仍其它实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以100mg每日一次的剂量施用于受试者。在又其它实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以小于100mg每日一次的剂量施用于受试者。

[0012] 在其它实施例中，所述JAK抑制剂是莫莫替尼或其药学上可接受的盐，并且以400mg每日一次的剂量施用于受试者。在某些实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以300mg每日一次的剂量施用于受试者。在其它实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以200mg每日一次的剂量施用于受试者。在一些实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以150mg每日两次的剂量施用。在一些实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以100mg每日两次的剂量施用。

[0013] 在其它实施例中，所述JAK抑制剂是帕瑞替尼或其药学上可接受的盐，并且以约50mg到约600mg每日一次，如约100mg到约500mg每日一次，如约150mg到约400mg每日一次，并且包含约200mg到约350mg每日一次的剂量施用于受试者。在某些实例中，所述帕瑞替尼

或其药学上可接受的盐以约50mg到约600mg每日两次，如约100mg到约500mg每日两次，如约150mg到约400mg每日两次，并且包含约200mg到约350mg每日两次的剂量施用于受试者。在其它实例中，所述帕瑞替尼或其药学上可接受的盐以100mg每日一次或约100mg每日两次或200mg每日两次的剂量施用于受试者。

[0014] 根据某些实施例的方法还包含在向受试者施用所述JAK抑制剂之前确定所述受试者的所述基线血小板计数。在这些实施例中，方法可以包含确定所述受试者的基线血小板计数，并且基于所述受试者的所述基线血小板计数确定用于施用于所述受试者的所述JAK抑制剂的量。

[0015] 向所述受试者施用的端粒酶抑制剂的剂量可以在如约4.0mg/kg到约10mg/kg、约7.5mg/kg到9.4mg/kg的范围内。在某些实施例中，所述端粒酶抑制剂以以下剂量施用于所述受试者：4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7.0mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8.0mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9.0mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10.0mg/kg。

[0016] 所述剂量的所述端粒酶抑制剂可以以一定周期施用于所述受试者，其中所述端粒酶抑制剂每周一次、每两周(14天)一次、每三周(21天)一次或每四周(28天)一次、每6周一次、每8周一次、每10周一次、每12周一次施用。在某些实施例中，可以施用伊美司他或药学上可接受的盐，持续1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或多于8个剂量周期。在某些实施例中，每个周期包含：每三周一次静脉内施用约4-10mg/kg伊美司他或药学上可接受的盐，每四周一次静脉内施用约4-10mg/kg伊美司他或伊美司他钠，每两周一次静脉内施用约4-10mg/kg伊美司他或伊美司他钠或每三周一次静脉内施用约7.5-9.4mg/kg伊美司他或伊美司他钠。在某些实例中，每个剂量周期包含每四周静脉内施用约7.5-9.4mg/kg伊美司他或伊美司他钠一次。在一些情况下，每个剂量周期包含约每三周静脉内施用约9.4mg/kg伊美司他或伊美司他钠一次。

[0017] 在一些实例中，所述端粒酶抑制剂的所述寡核苷酸包含至少一个N3'→P5'硫代磷酰胺酯核苷间键。在一些实例中，所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分通过连接子，如甘油或氨基甘油连接子与所述寡核苷酸的5'和/或3'端连接。在一些实例中，所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分是棕榈酰基(C16)部分。在某些实施例中，所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐，如伊美司他钠。

[0018] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的21天施用周期治疗受试者，其中方法包含：每天一次或两次施用所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐，持续21天；以及在所述21天施用周期的第一天，向所述受试者施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐(即，在所述21天周期的第一天，向所述受试者施用所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐两者)。在某些实例中，方法包含鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学

上可接受的盐的21天施用周期，其中每天一次施用所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐，持续21天，并且在所述21天周期的第一天，施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐。在其它实例中，方法包含鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的21天施用周期，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天两次施用，持续21天，并且在所述21天周期的第一天，施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐。根据这些实施例的施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的21天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在鲁索替尼和伊美司他的所述21天施用周期重复1次或多次的情况下，每个21天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的鲁索替尼和伊美司他的21天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约1.5个月或更长时间，如3个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0019] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的28天施用周期治疗受试者。在这些实施例中，方法包含：每天一次或两次施用所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐，持续28天；以及在所述28天周期的第一天，向所述受试者施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐(即，在所述28天周期的第一天，向所述受试者施用所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐两者)。在某些实例中，方法包含鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的28天施用周期，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天一次施用，持续28天，并且在所述28天周期的第一天，施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐。在其它实例中，方法包含鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的28天施用周期，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天两次施用，持续28天，并且在所述28天周期的第一天，施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐。

[0020] 根据这些实施例的施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的28天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在鲁索替尼和伊美司他的所述28天施用周期重复1次或多次的情况下，每个28天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的鲁索替尼和伊美司他的28天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约2个月或更长时间，如4个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，或更多地，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0021] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用鲁索替尼或其药学上可接受的盐和

伊美司他或其药学上可接受的盐的施用周期治疗受试者，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天一次或两次施用于所述受试者，持续14天或21天，随后在所述施用周期内最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后1天到7天，向所述受试者施用一个剂量或更多的伊美司他或其药学上可接受的盐。在一个实例中，方法包含施用周期，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天一次施用于所述受试者，持续14天，随后在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后的1天到7天，施用所述一个剂量或更多的伊美司他或其药学上可接受的盐。在另一个实例中，方法包含施用周期，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天一次施用于所述受试者，持续21天，随后在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后的1天到7天，施用一个剂量或更多的伊美司他或其药学上可接受的盐。在又另一个实例中，方法包含施用周期，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天两次施用于所述受试者，持续14天，随后在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后的1天到7天，施用一个剂量或更多的伊美司他或其药学上可接受的盐。在仍另一个实例中，方法包含施用周期，其中所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐每天两次施用于所述受试者，持续21天，随后在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后的1天到7天，施用一个剂量或更多的伊美司他或其药学上可接受的盐。在这些实施例中，在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后1天到7天，如在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后1天，如在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后2天，如在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后3天，如在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后4天，如在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后5天，如在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后6天，向所述受试者施用一个剂量或更多的伊美司他或其药学上可接受的盐，并且包含在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐之后7天，施用一个剂量的伊美司他或其药学上可接受的盐。根据这些实施例的鲁索替尼或其药学上可接受的盐和伊美司他或其药学上可接受的盐的所述施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。

[0022] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用伊美司他或其药学上可接受的盐和鲁索替尼或其药学上可接受的盐的21天施用周期治疗受试者，其中方法包含在所述21天施用周期的第一天，向所述受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后在所述21天周期的每个后续天，每天一次或两次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐(即，在所述21天周期的第一天，向所述受试者施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐，并且在所述21天施用周期的第2到21天，每天一次或两次施用所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐)。在某些实例中，方法包含在所述21天施用周期的第一天，向所述受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后在所述21天周期的每个后续天，每天一次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐。在其它实例中，方法包含在所述21天施用周期的第一天，向所述受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后在所述21天周期的每个后续天，每天两次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐。根据这些实施例的施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后是鲁索替尼或其药学上可接受的盐的21天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6

次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在伊美司他和鲁索替尼的所述21天施用周期重复1次或多次的情况下，每个21天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的伊美司他和鲁索替尼的21天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约1.5个月或更长时间，如3个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，或更多地，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0023] 在其它实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用伊美司他或其药学上可接受的盐和鲁索替尼或其药学上可接受的盐的28天施用周期治疗受试者，其中方法包含在所述28天施用周期的第一天，向所述受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后在所述28天周期的每个后续天，每天一次或两次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐(即，在所述28天周期的第一天，向所述受试者施用所述伊美司他或其药学上可接受的盐，并且在所述28天施用周期的第2到28天，每天一次或两次施用所述鲁索替尼或其药学上可接受的盐)。在某些实例中，方法包含在所述28天施用周期的第一天，向所述受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后在所述28天周期的每个后续天，每天一次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐。在其它实例中，方法包含在所述28天施用周期的第一天，向所述受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后在所述28天周期的每个后续天，每天两次向所述受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐。根据这些实施例的施用伊美司他或其药学上可接受的盐，随后是鲁索替尼或其药学上可接受的盐的28天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在伊美司他和鲁索替尼的所述28天施用周期重复1次或多次的情况下，每个28天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的伊美司他和鲁索替尼的28天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约2个月或更长时间，如4个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，或更多地，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0024] 在其它实施例中，方法包含施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐持续预定持续时间(1天到21天)，在向所述受试者施用最后一个剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐的7天内(例如，2天、1天或在同一天)停止施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐并且施用伊美司他。此施用周期可以重复如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。

[0025] 在一些实施例中，所述骨髓增殖性肿瘤是骨髓纤维化(MF)，如原发性骨髓纤维化，或在先前ET或PV(ETMF后或PVMF后)之后的骨髓纤维化。在其它实施例中，所述骨髓增殖性

肿瘤包含原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性骨髓性白血病(AML)。在其它实施例中,所述骨髓增殖性肿瘤是骨髓增生异常综合征(MDS)。在仍其它实施例中,所述骨髓增殖性肿瘤是具有分离del(5q)的骨髓增生异常综合征(MDS)。骨髓增生异常综合征(MDS)包含疾病,如难治性贫血、具有过度母细胞的难治性贫血、具有多谱系发育异常的难治性血细胞减少症、具有单谱系发育异常的难治性血细胞减少症和慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)。根据某些实施例的方法还包含将受试者诊断为患有骨髓增殖性肿瘤。在一个实例中,方法包含将受试者诊断为患有骨髓纤维化,如原发性骨髓纤维化。在一些实施例中,受试者先前尚未施用JAK抑制剂(即,未用JAK抑制剂治疗过)。在其它实施例中,受试者先前尚未施用端粒酶抑制剂(例如,未用端粒酶抑制剂治疗过)。在又其它实施例中,受试者先前尚未施用JAK抑制剂或端粒酶抑制剂(即,未用JAK抑制剂和端粒酶抑制剂两者治疗过)。

附图说明

[0026] 图1描绘了根据某些实施例的伊美司他处理与鲁索替尼的组合的体内处理设计。

[0027] 图2描绘了根据某些实施例的在体外用伊美司他处理与鲁索替尼的组合的造血祖细胞(HPC)测定。

[0028] 图3描绘了根据某些实施例的伊美司他处理与鲁索替尼的组合的体外处理设计。

[0029] 图4描绘了根据某些实施例的正常$CD34^+$细胞与伊美司他和鲁索替尼的短期体外组合处理。如本文描述的,将正常CB $CD34^+$细胞用仅媒剂、仅鲁索替尼(Rux,50nM)、仅错配的寡核苷酸(MM,1.8uM)或伊美司他(Ime,1.8uM)、同时和依次地Rux和MM或Ime进行处理。将细胞暴露于Rux,持续3天,并且暴露于MM或Ime,持续7天。对培养物中产生的细胞进行表型表征并且针对HPC进行测定。示出了在暴露于各种处理的正常$CD34^+$细胞的培养物中产生的Lin^-CD34^+细胞(图4,图A)、所有类别的可测定HPC(图4,图B)以及$CD15^+CD34^-$(图4,图C)细胞的绝对数量相对于在暴露于对应的仅媒剂的培养物中产生的细胞的绝对数量的百分比。n=3。全部$P>0.05$,含有仅媒剂的培养物对含有Rux的培养物;含有MM的培养物对含有Ime的对应培养物。

[0030] 图5描绘了根据某些实施例的在体外用伊美司他和鲁索替尼进行的长期组合处理中观察到的针对正常HSC/HPC的加性抑制作用的缺乏。如本文描述的,将正常CB $CD34^+$细胞用仅媒剂、仅鲁索替尼(Rux,50nM)、仅错配的寡核苷酸(MM,1.8uM)或伊美司他(Ime,1.8uM)、同时和依次地Rux和MM或Ime进行处理。将细胞暴露于Rux,持续3天,并且暴露于MM或Ime,持续14天。示出了在暴露于各种处理的正常$CD34^+$细胞的培养物中产生的Lin^-CD34^+细胞(图5,图A)、所有类别的可测定HPC(图5,图B)以及$CD15^+CD34^-$(图5,图C)细胞的绝对数量相对于在暴露于对应的仅媒剂的培养物中产生的细胞的绝对数量的百分比。n=3。除非另有说明,否则全部$P>0.05$,含有仅媒剂的培养物对含有Rux的培养物;含有MM的培养物对含有Ime的对应培养物。

[0031] 图6描绘了根据某些实施例的通过在体外用伊美司他和鲁索替尼进行的同时或依次的短期组合处理对MF HSC/HPC的加性抑制作用的缺乏。将MF脾脏$CD34^+$细胞以与CB $CD34^+$细胞相同的方式用这两种药物进行处理。将细胞暴露于Rux,持续3天,并且暴露于MM或Ime,持续7天。对培养之后产生的细胞进行表型表征并且针对HPC进行测定。示出了在暴露于各

种处理的MF脾脏CD34$^+$细胞的培养物中产生的Lin-CD34$^+$细胞(图6,图A)、所有类别的可测定HPC(图6,图B)以及CD15$^+$CD34$^-$(图6,图C)细胞的绝对数量相对于在暴露于对应的仅媒剂的培养物中产生的细胞的绝对数量的百分比。JAK2V617F+MF,n＝3;JAK2V617F-MF,n＝4。除非另有说明,否则全部P>0.05,含有仅媒剂的培养物对含有Rux的培养物;含有MM的培养物对含有Ime的对应培养物。

[0032] 图7描绘了根据某些实施例的在体外用伊美司他和鲁索替尼进行的依次的长期组合处理对MF HSC/HPC的加性抑制活性。将MF脾脏CD34$^+$细胞以与CB CD34$^+$细胞相同的方式用这两种药物单独地和组合地进行处理。将细胞暴露于Rux,持续3天,并且暴露于MM或Ime,持续14天。对培养之后产生的细胞进行表型表征并且针对HPC进行测定。示出了在暴露于各种处理的MF脾脏CD34$^+$细胞的培养物中产生的Lin-CD34$^+$细胞(图7,图A)、所有类别的可测定HPC(图7,图B)以及CD15$^+$CD34$^-$(图7,图C)细胞的绝对数量相对于在暴露于对应的仅媒剂的培养物中产生的细胞的绝对数量的百分比。JAK2V617F$^+$MF,n＝3;JAK2V617F$^-$MF,n＝4。P值如所指示的,否则P>0.05,图A:媒剂对仅Rux,Rux+MM对Rux+Ime;图C:Rux+MM对Rux+Ime。

[0033] 图8描绘了根据某些实施例的在体外用伊美司他和鲁索替尼进行的依次的长期组合处理实现的JAK2V617F$^+$造血祖细胞的减少。(图8,图A)挑取来自暴露于各种处理的2名JAK2V617F$^+$MF患者的单个集落(CFU-GM)并且使用嵌套的等位基因特异性聚合酶链式反应(PCR)针对JAK2V617F进行基因分型。然后确定JAK2V617F$^+$CFU-GM的百分比。(图8,图B和C)通过将在每个培养物中产生的CFU-GM的总数乘以图A中所示的JAK2V617F$^+$CFU-GM的百分比来计算JAK2V617F$^+$CFU-GM的绝对数量。将来自两名患者的脾脏CD34$^+$细胞先用Rux、随后用伊美司他进行的依次的长期组合处理对恶性MF HPC具有加性抑制活性。

[0034] 图9描绘了根据某些实施例的通过在体内用伊美司他和鲁索替尼进行的同时或依次的组合处理对正常NSG再殖细胞(SRC)的作用的缺乏。(图9,图A和D)示出了代表性FACS绘图,其示出了在小鼠骨髓中产生的人(h)CD45$^+$细胞嵌合现象(图9,图A)和hCD34$^+$细胞(图9,图D)。(图9,图B-C;图9,图E-F)在移植后4个月,在NSG小鼠的骨髓(图9,图B和E)和脾脏(图9,图C和F)中产生的hCD45$^+$(图9,图B-C)和hCD34$^+$细胞(图9,图E-F)的绝对数量。将正常CB CD34$^+$细胞移植给NSG小鼠,并且在移植后一周用各种药物单独地或组合地进行处理。这些处理导致接受者小鼠的骨髓和脾脏中的hCD45+细胞嵌合现象和hCD34+细胞产生的程度的最小程度的减少(脾脏中的hCD45$^+$细胞:Rux+Ime;脾脏中的hCD34+细胞:仅Ime,Rux+Ime)。

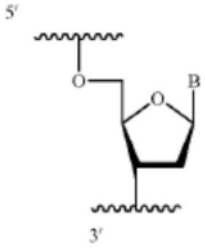
[0035] 图10描绘了根据某些实施例的在体内用伊美司他和鲁索替尼进行的组合处理对耗尽骨髓纤维化NSG再殖细胞(SRC)的加性作用。(图10,图A和D)示出了FACS绘图,其示出了在小鼠骨髓中产生的人(h)CD45$^+$细胞嵌合现象(图10,图A)和hCD34$^+$细胞(图10,图D)。(图10,图B-C;图10,图E)在移植后4个月,在NSG小鼠的骨髓(图10,图B和E)和脾脏(图10,图C)中产生的hCD45$^+$(图10,图B-C)和hCD34$^+$细胞(图10,图E)的绝对数量。示出了相对于接受仅媒剂的小鼠产生的细胞,接受每种药物处理的小鼠的骨髓和脾脏中产生的hCD45$^+$和hCD34$^+$细胞的绝对数量的百分比。如本文所述,将Pt5的脾脏CD34$^+$细胞移植给NSG小鼠,并且在移植后一周用各种药物单独地或组合地进行处理。先用Rux,随后用伊美司他进行的依次处理在耗尽Pt5的MF长期SRC方面产生加性活性。

[0036] 图11描绘了根据某些实施例的在体内用伊美司他和鲁索替尼进行的组合处理来耗尽骨髓纤维化NSG再殖细胞(SRC)中的协同活性。将Pt10的脾脏CD34细胞移植给NSG小鼠,

并且由于来自此患者的CD34+细胞的有限可用性，用仅Rux、仅Ime以及Rux，随后用伊美司他进行处理。示出了相对于接受仅媒剂的小鼠产生的细胞，在接受药物处理的小鼠的骨髓中检测到的hCD45+细胞的绝对数量。先用Rux，随后用伊美司他进行的依次处理在耗尽Pt10的MF长期SRC方面具有协同活性。

[0037] 图12A和12B描绘了根据某些实施例的来自伊美司他和鲁索替尼与仅伊美司他的体内组合处理的副作用的比较。(图12A，图12B)将正常的CB(图12A)或MF(图12B)脾脏$CD34^+$细胞移植给NSG小鼠。移植后一周，开始将小鼠用仅媒剂，仅45mg/kg的Rux进行处理，持续7天，或者用10mg/kg的MM或伊美司他进行处理，持续4周，或者同时或依次组合地用Rux和MM或伊美司他进行处理。移植后4个月(W17)，将小鼠处死。与相等的10mg/kg剂量的仅伊美司他治疗相比，接受正常CB(图12A)或MF(图12B)脾脏$CD34^+$细胞的小鼠的依次组合处理并未导致小鼠体重的进一步减轻。此外，在处死移植有MF脾脏$CD34^+$细胞(Pt5)的小鼠时，接受依次是45mg/kg Rux和10mg/kg剂量的伊美司他(6.5％)的小鼠的体重减轻的程度小于相等剂量的仅伊美司他(9.6％)或30mg/kg剂量的仅伊美司他(13.1％)的小鼠的体重减轻的程度。X轴表示移植后周数。

[0038] 精选的定义

[0039] 术语“核苷”是指具有以下一般结构的部分：

其中B表示核碱基，并且2’碳可以如下所述被取代。当并入到低聚物或聚合物中时，3’碳进一步与氧或氮原子连接。核苷可以包含2’-脱氧和2’-羟基(即，脱氧核糖和核糖)形式及其类似物。在某些实例中，5’-NH基团可以取代5’-氧。关于核苷的“类似物”包含具有经修饰的核碱基部分(参见以下“核碱基”的定义)和/或经修饰的糖部分，如2’-氟糖以及其它类似物的合成核苷。此类类似物通常被设计成影响结合性质，例如稳定性、特异性等。术语核苷包含天然核苷，包含2’-脱氧和2’-羟基形式，例如，如在Komberg和Baker，《DNA复制(DNA Replication)》，第2版(弗里曼，旧金山(Freeman，San Francisco)，1992)中描述的，和类似物。关于核苷的“类似物”包含具有经修饰的核碱基部分(参见下文“碱基”的定义)和/或经修饰的糖部分的合成核苷，例如，通常由Scheit，《核苷酸类似物(Nucleotide Analogs)》(约翰威立公司(John Wiley)，纽约(New York)，1980)描述的。此类类似物包含被设计成增强结合性质，例如稳定性、特异性等的合成核苷，如由Uhlmann和Peyman，《化学评论(Chemical reviews)》90:543-584，1990所公开的)。含有此类核苷并且通常含有合成的抗核酸酶的核苷间键的寡核苷酸本身可以被称为“类似物”。

[0040] “多核苷酸”或“寡核苷酸”是指具有介于约2到约200个连续亚基之间的核糖和/或脱氧核糖核苷亚基聚合物或低聚物。核苷亚基可以通过各种亚基间键来连接，包含但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸脂、P3’→N5’磷酰胺酯、N3’→P5’磷酰胺酯、N3→P5’硫代磷酰胺酯和硫代磷酸酯键。所述术语还包含具有糖(例如，2’取代)、碱基、以及3’和5’端的修饰的此类聚合物或低聚物。在寡核苷酸部分包含多个亚基间键的实施例中，每个键可以

使用同一化学物质或键化学物质的混合物形成。当寡核苷酸由字母序列,如“ATGUCCTG”表示时,应当理解的是,核苷酸呈从左到右5’→3’顺序。以此方式表示寡核苷酸的碱基序列并不暗示在寡核苷酸中使用任何特定类型的核苷间亚基。

[0041] “核碱基”包含:(i)天然DNA和RNA核碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶);(ii)经修饰的核碱基或核碱基类似物(例如,5-甲基胞嘧啶、5-溴尿嘧啶或肌苷);以及(iii)核碱基类似物。核碱基类似物是分子结构模拟典型的DNA或RNA碱基的分子结构的化合物。

[0042] 术语“脂质”在本文中广泛地用于涵盖在有机溶剂中可溶但在水(如果有的话)中微溶的物质。术语脂质包含但不限于烃、油、脂肪(如脂肪酸和甘油酯)、固醇、类固醇以及这些化合物的衍生物形式。在一些实施例中,脂质是脂肪酸及其衍生物;烃及其衍生物;以及固醇,如胆固醇。脂肪酸通常在直链中含有偶数个碳原子(通常为12-24个碳),并且可以是饱和或不饱和的,并且可以含有或可以被改性成含有多种取代基。为了简单起见,术语“脂肪酸”还涵盖脂肪酸衍生物,如脂肪或酯。在一些实施例中,术语“脂质”还包含含有脂质和亲水性部分两者的两亲性化合物。

[0043] “个体”或“患者”或“受试者”可以是哺乳动物,如任何常见的实验室模型生物体。哺乳动物包含但不限于人和非人灵长类动物、农场动物、运动动物、宠物、小鼠、大鼠和其它啮齿动物。在一些实施例中,个体或患者或受试者是人。在某些实施例中,受试者或患者在某些实施例之前先前未接受过JAK抑制剂疗法和/或端粒酶抑制剂疗法,此类患者分别“未用JAK抑制剂治疗过”或“未用端粒酶抑制剂治疗过”。

[0044] “有效量”或“治疗有效量”或“临床有效量”是指作为单一剂量或一系列剂量的一部分施用于哺乳动物受试者的治疗化合物,如JAK抑制剂或端粒酶抑制剂的有效产生所期望的治疗效果的量。本发明的一个优点是,当与JAK抑制剂组合施用时,端粒酶抑制剂可以以低于单剂剂量的剂量施用,从而降低化合物的副作用和总体毒性,同时实现相当或优异的治疗效果。在某些实施例中,当端粒酶抑制剂与根据本文所述的实施例的JAK抑制剂共施用时,实现治疗有效响应所需的JAK抑制剂的量可以减少1重量%或更多,如2重量%或更多,如3重量%或更多,如5重量%或更多,如10重量%或更多,如15重量%或更多,如25重量%或更多,并且包含将实现治疗有效响应所需的JAK抑制剂的量减少50重量%或更多。换言之,与实现治疗有效响应所需的单独的JAK抑制剂的量相比,实现治疗有效响应所需的JAK抑制剂的剂量减少1重量%或更多。在其它实施例中,当JAK抑制剂与根据本文所述的实施例的端粒酶抑制剂共施用时,实现治疗有效响应所需的端粒酶抑制剂的量可以减少1重量%或更多,如2重量%或更多,如3重量%或更多,如5重量%或更多,如10重量%或更多,如15重量%或更多,如25重量%或更多,并且包含将实现治疗有效应答所需的端粒酶抑制剂的量减少50重量%或更多。换言之,与实现治疗有效响应所需的单独的端粒酶抑制剂的量相比,实现治疗有效响应所需的端粒酶抑制剂的量减少1重量%或更多,如2重量%或更多,如3重量%或更多,如5重量%或更多,如10重量%或更多,如15重量%或更多,如25重量%或更多,并且包含50重量%或更多。

[0045] 本文所使用的,“肿瘤细胞”是指表现出相对自主生长的细胞,使得所述细胞表现出特征在于细胞增殖的控制的显著丧失的异常生长表型。肿瘤细胞包括可以活跃地复制或处于暂时非复制静息状态(G_1或G_0)的细胞;类似地,肿瘤细胞可以包括具有分化良好的表

型、分化不良的表型或两种类型细胞的混合物的细胞。因此，并不是所有肿瘤细胞都是在给定时间点必须复制的细胞。“肿瘤细胞”涵盖良性肿瘤中的此类细胞和恶性肿瘤中的细胞。

[0046] 如本文所使用的，“肿瘤祖细胞”是指具有变成肿瘤的能力的细胞组合物的细胞。

[0047] 如本文所使用的，术语“肿瘤”或“肿瘤形成”或“肿瘤”是指异常的新细胞生长。与增生不同，即使在没有原始刺激的情况下，肿瘤增殖也会持续存在。

[0048] 如本文所使用的，除非另有说明，否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包含复数指示物。

[0049] 贯穿本说明书给出的每个最大数值限制旨在包含每个较低的数值限制，如同这种较低的数值限制在本文中明确写出一样。贯穿本说明书给出的每一小数值限制将包含每一较高数值限制，如同这种较高的数值限制在本文中明确写出一样。贯穿本说明书给出的每一数值范围将包含落在这样的较宽数值范围内的每一较窄数值范围，如同这种较窄数值范围在本文中明确写出一样。

[0050] 在进一步描述本发明之前，应理解的是，本发明不限于所描述的特定实施例，因为这些实施例当然可以变化。还应理解，本文所使用的术语仅用于描述特定实施例的目的，并且不旨在是限制性的，因为本发明的范围仅受所附权利要求限制。

[0051] 在提供了值范围的情况下，应当理解的是，介于所述范围的上限与下限之间的每个中间值(到下限的单位的十分之一，除非另外明确说明)以及所述范围中的任何其它所陈述或中间值均涵盖于本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包含在更小的范围中，并且也涵盖在本发明内，这受制于所陈述的范围中的任何明确排除的限值。在所陈述的范围包含限值中的一个或两个限值的情况下，排除那些被包含在内的限值中的任一个或两个限值的范围也包含在本发明内。

[0052] 应当理解，为了清楚起见，在单独实施例的背景下描述的本发明的某些特征还可以以组合形式提供在单个实施例中。相反地，为了简便起见，在单个实施例的背景下描述的本公开的不同特征也可以单独地或以任何适合的子组合提供。与本发明有关的实施例的所有组合被本发明具体地涵盖并且公开于本文中，正如同每个组合单独且明确地公开一样，在某种程度上，此类组合涵盖例如作为稳定化合物的化合物的本发明的物质(即，可以被制备、分离、表征和测试生物活性的化合物)。另外，本发明还具体地涵盖了各个实施例及其元素(例如，描述此类变量的实施例中所列出的化学组的元素)的所有子组合并且公开于本文中，就如同每个子组合和每个这种子组合在本文中单独且明确地公开一样。

[0053] 本文中使用的全部技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同，除非另有定义。尽管与本文中描述的方法和材料类似或相当的任何方法和材料也可以用于实践或测试本发明，但现在描述的是所关注方法和材料。本文中提及的所有出版物通过引用并入本文中，从而公开和描述与所列出版物相关的方法和/或材料。

[0054] 必须注意，除非上下文另外明确指示，否则如在本文和所附权利要求中所使用的，单数形式“一个”、“一种”和“所述”包含复数指代物。应进一步注意，权利要求可以被撰写为排除任何任选要素。因此，此陈述旨在充当结合权利要求要素的叙述使用如“单独(solely)”、“仅(only)”等排他性术语或使用“否定型(negative)”限制的前置基础。

[0055] 应当理解，为了清楚起见，在单独实施例的背景下描述的本发明的某些特征还可

以以组合形式提供在单个实施例中。相反地，为了简便起见，在单个实施例的背景下描述的本公开的不同特征也可以单独地或以任何适合的子组合提供。

[0056] 本文所讨论的出版物仅被提供用于在本申请的提交日之前对其进行公开。本文中的任何内容均不应被理解为承认本发明不能由于现有发明而有权先于这种出版物。另外，所提供的公开日期可能与实际公开日期不同，实际公开日期可能需要独立地确认。

[0057] 本文所描述的化合物可以通过本领域已知方法中的任何方法纯化，所述方法包含色谱方法，如高效液相色谱(HPLC)、制备型薄层色谱、快速柱色谱和离子交换色谱。可以使用包含正相和反相以及离子树脂在内的任何合适的固定相。参见例如，《现代液相色谱导论(Introduction to Modern Liquid Chromatography)》，第2版，L.R.Snyder和J.J.Kirkland编辑，约翰·威利父子出版社(John Wiley and Sons)，1979；以及《薄层色谱(Thin Layer Chromatography)》，E.Stahl编辑，施普林格出版社(Springer-Verlag)，纽约，1969。

[0058] 本文所述的化合物可以含有一个或多个手性中心和/或双键，并且因此可以作为立体异构体存在，如双键异构体(即，几何异构体)、对映异构体或非对映异构体。因此，化合物的所有可能的对映异构体和立体异构体，包含立体异构纯形式(例如，几何学纯的、对映异构体纯的或非对映异构体纯的)以及对映异构体和立体异构体混合物都包含在本文的化合物的描述中。对映异构体和立体异构体混合物可以使用本领域的技术人员熟知的分离技术或手性合成技术拆分成其组分对映异构体或立体异构体。化合物还可以以若干互变异构体形式存在，包含烯醇形式、酮形式及其混合物。因此，本文所描绘的化学结构涵盖所展示化合物的所有可能的互变异构体形式。所描述的化合物还包含同位素标记的化合物，其中一个或多个原子的原子质量与通常在自然界中常规发现的原子质量不同。可以并入到本文所公开的化合物中的同位素的实例包含但不限于^{2}H、^{3}H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}O、^{17}O等。化合物可以以非溶剂化形式以及溶剂化形式，包含水合形式存在。通常，化合物可以是水合的或溶剂化的。某些化合物可以以多种晶态或无定形形式存在。通常，所有物理形式对于本文所设想的用途是等效的，并且旨在处于本公开的范围内。

具体实施方式

[0059] 本公开的各方面包含用于治疗骨髓增殖性肿瘤的方法。根据某些实施例的方法包含向受试者共施用Janus激酶(JAK)抑制剂和端粒酶抑制剂，所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。在一些实例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含诱导骨髓增殖性肿瘤细胞的细胞凋亡，如体外诱导骨髓增殖性肿瘤细胞的细胞凋亡。在其它实例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含诱导受试者的骨髓增殖性肿瘤细胞的细胞凋亡。在一些实施例中，所述骨髓增殖性肿瘤细胞是恶性造血干细胞(HSC)。在其它实施例中，所述骨髓增殖性肿瘤细胞是恶性造血祖细胞(HPC)。根据本发明的方法治疗的骨髓增殖性肿瘤可以包含例如骨髓纤维化(MF)，如原发性骨髓纤维化，或在先前的ET或PV(ETMF后或PVMF后)之后的骨髓纤维化。在其它实施例中，所述骨髓增殖性肿瘤包含原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性骨髓性白血病(AML)。在其它实施例中，所述骨髓增殖性肿瘤是骨髓增生异常综合征(MDS)。在仍其它实施例中，所述骨髓增殖性肿瘤是具有分离del(5q)的

骨髓增生异常综合征(MDS)。骨髓增生异常综合征(MDS)包含疾病,如难治性贫血、具有过度母细胞的难治性贫血、具有多谱系发育异常的难治性血细胞减少症、具有单谱系发育异常的难治性血细胞减少症和慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)。

[0060] 在一些实施例中,共施用JAK抑制剂和端粒酶抑制剂包含同时施用JAK抑制剂和端粒酶抑制剂。在同时施用JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的一些情况下,JAK抑制剂和端粒酶抑制剂共调配(例如,组合成单一剂型,如片剂、可注射剂、冻干剂、静脉内流体(intravenous fluid)等)并且以单一剂量施用于受试者。在同时施用JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的其它情况下,JAK抑制剂和端粒酶抑制剂被调配成两种不同的组合物并同时施用于受试者。

[0061] 在其它实施例中,共施用JAK抑制剂和端粒酶抑制剂包含依次施用JAK抑制剂和端粒酶抑制剂。在一些实施例中,首先向受试者施用JAK抑制剂,随后向受试者施用端粒酶抑制剂。在一个实例中,所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂的同一天施用于所述受试者。在另一个实例中,所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用所述JAK抑制剂之后13天内施用于所述受试者。例如,所述端粒酶抑制剂在向所述受试者施用最后一个剂量的所述JAK抑制剂之后三天内施用。

[0062] 在实施例中,端粒酶抑制剂可以在向受试者施用JAK抑制剂,如施用端粒酶抑制剂之后约14天内施用于受试者,如在施用JAK抑制剂之后约0天到约13天,如约1天到约12天,如约2天到约11天,如约3天到约10天,如约4天到约9天,如约5天到约8天,并且包含在施用JAK抑制剂之后约6天到约7天,向受试者施用端粒酶抑制剂。在一些实施例中,端粒酶抑制剂在施用JAK抑制剂之后3天内施用。在某些实例中,向受试者施用JAK抑制剂持续预定持续时间(例如,持续0天到7天的持续时间,如下文更详细地描述的),并且端粒酶抑制剂在最后一个剂量的JAK抑制剂之后约14天内施用于受试者,如在最后一个剂量的JAK抑制剂之后约0天到约13天,如约1到约12天,如约2天到约11天,如约3天到约10天,如约4天到约9天,如约5天到约8天向受试者施用端粒酶抑制剂,并且包含在最后一个剂量的JAK抑制剂之后约6天到约7天向受试者施用端粒酶抑制剂。在一些实例中,端粒酶抑制剂在最后一个剂量的JAK抑制剂之后3天内施用。

[0063] 在一些实施例中,首先向受试者施用端粒酶抑制剂,随后向受试者施用JAK抑制剂。在一些实例中,所述JAK抑制剂在所述端粒酶抑制剂施用于所述受试者之后13天内施用于所述受试者。例如,所述JAK抑制剂在向所述受试者施用最后一个剂量的所述端粒酶抑制剂之后三天内施用,并且此后每日施用两次。

[0064] 给药是以JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的施用周期进行施用的。在一些实施例中,所述周期是21天,在一些实例中,所述周期是28天或更多天。药物施用的周期可以重复1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或多于8个剂量周期,持续6个月或1年或2年或3年或4年或更久的总时间段。

[0065] 在某些实施例中,治疗骨髓增殖性肿瘤包含用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的21天施用周期治疗受试者,其中方法包含:每天一次或两次施用所述JAK抑制剂,持续21天;以及在所述21天施用周期的第一天,向所述受试者施用所述端粒酶抑制剂(即,在所述21天周期的第一天,向所述受试者施用所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐两者)。在某些实例中,方法包含JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的21天

施用周期，其中每天一次施用JAK抑制剂，持续21天，并且在21天周期的第一天施用端粒酶抑制剂。在其它实例中，方法包含JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的21天施用周期，其中每天施用JAK抑制剂两次，持续21天，并且在21天周期的第一天施用端粒酶抑制剂。根据这些实施例的施用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的21天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的所述21天施用周期重复1次或多次的情况下，每个21天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的21天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约1.5个月或更长时间，如3个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，或更多地，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0066] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的28天施用周期治疗受试者，其中方法包含：每天一次或两次施用所述JAK抑制剂，持续28天；以及在所述28天施用周期的第一天，向所述受试者施用所述端粒酶抑制剂(即，在所述28天周期的第一天，向所述受试者施用所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐两者)。在某些实例中，方法包含JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的28天施用周期，其中每天一次施用JAK抑制剂，持续28天，并且在28天周期的第一天施用端粒酶抑制剂。在其它实例中，方法包含JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的28天施用周期，其中每天施用JAK抑制剂两次，持续28天，并且在28天周期的第一天施用端粒酶抑制剂。根据这些实施例的施用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的28天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的所述28天施用周期重复1次或多次的情况下，每个28天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的JAK抑制剂和端粒酶抑制剂的28天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约2个月或更长时间，如4个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，或更多地，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0067] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的施用周期治疗受试者，其中所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天一次或两次施用于所述受试者，持续14天或21天，随后一个或多个

剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐在所述施用周期内在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后1天到7天的时间段期间施用于所述受试者。在一个实例中，方法包含施用周期，其中JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天一次施用于受试者，持续14天，随后在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后1天到7天的时间段期间，施用一个或多个剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐。在另一个实例中，方法包含施用周期，其中JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天一次施用于受试者，持续21天，随后在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后1天到7天的时间段期间，施用一个或多个剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐。在又另一个实例中，方法包含施用周期，其中JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天两次施用于受试者，持续14天，随后在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后1天到7天的时间段期间，施用一个或多个剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐。在仍另一个实例中，方法包含施用周期，其中JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天两次施用于受试者，持续21天，随后在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后1天到7天的时间段期间，施用一个或多个剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐。在这些实施例中，一个或多个剂量的端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后1天到7天，如在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后1天，如在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后2天，如在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后3天，如在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后4天，如在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后5天，如在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后6天施用于受试者，并且包含端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐在最后一个施用剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐之后7天施用。根据这些实施例的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐和端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐的施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。

[0068] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐和JAK抑制剂或其药学上可接受的盐的21天施用周期治疗受试者，其中方法包含所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐在所述21天施用周期的第一天施用于所述受试者，随后所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述21天周期的每个后续天每天一次或两次施用于所述受试者(即，所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐在所述21天周期的第一天施用于所述受试者，并且所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐在所述21天施用周期的第2到21天每天一次或两次施用)。在某些实例中，方法包含在所述21天施用周期的第一天，向所述受试者施用所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐，随后在所述21天周期的每个后续天，每天一次向所述受试者施用所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐。在其它实例中，方法包含在所述21天施用周期的第一天，向所述受试者施用所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐，随后在所述21天周期的每个后续天，每天两次向所述受试者施用所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐。在21天周期中，JAK抑制剂或其药学上可接受的盐的施用可以在每天施用一次或两次之前延迟1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天。根据这些实施例的施用端粒酶或其药学上可接受的盐，随后是JAK抑制剂或其药学上可

接受的盐的21天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在端粒酶抑制剂和JAK抑制剂的所述21天施用周期重复1次或多次的情况下，每个21天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的端粒酶抑制剂和JAK抑制剂的21天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约1.5个月或更长时间，如3个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，或更多地，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0069] 在某些实施例中，治疗骨髓增殖性肿瘤包含用端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐和JAK抑制剂或其药学上可接受的盐的28天施用周期治疗受试者，其中方法包含所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐在所述28天施用周期的第一天施用于所述受试者，随后在所述28天周期的每个后续天，所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐每天一次或两次施用于所述受试者(即，所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐在所述28天周期的第一天施用于所述受试者，并且在所述28天施用周期的第2到28天，每天一次或两次施用所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐)。在某些实例中，方法包含在所述28天施用周期的第一天，向所述受试者施用所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐，随后在所述28天周期的每个后续天，每天一次向所述受试者施用所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐。在其它实例中，方法包含在所述28天施用周期的第一天，向所述受试者施用所述端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐，随后在所述28天周期的每个后续天，每天两次向所述受试者施用所述JAK抑制剂或其药学上可接受的盐。在28天周期中，JAK抑制剂或其药学上可接受的盐的施用可以在每天施用一次或两次之前延迟1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天。根据这些实施例的施用端粒酶或其药学上可接受的盐，随后是JAK抑制剂或其药学上可接受的盐的28天施用周期可以重复1次或多次，如2次或更多次，如3次或更多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。在端粒酶抑制剂和JAK抑制剂的所述28天施用周期重复1次或多次的情况下，每个28天施用周期之间的持续时间可以是0天或更长时间，如1天或更长时间，如2天或更长时间，如3天或更长时间，如4天或更长时间，如5天或更长时间，如6天或更长时间，并且包含7天或更长时间。取决于所采用的端粒酶抑制剂和JAK抑制剂的28天施用周期的数量以及每个周期之间的持续时间，根据这些实施例的所述受试者的治疗持续时间可以为约2个月或更长时间，如4个月或更长时间，如6个月或更长时间，如1年或更长时间，如2年或更长时间，如3年或更长时间，如4年或更长时间，如5年或更长时间，如6年或更长时间，如7年或更长时间，如8年或更长时间，或更多地，如9年或更长时间，并且包含10年或更长时间。

[0070] 在其它实施例中，方法包含施用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐持续预定持续时间(1天到21天)，在向所述受试者施用最后一个剂量的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐的7天内(例如，2天、1天或在同一天)停止施用JAK抑制剂或其药学上可接受的盐并且施用伊端粒酶抑制剂或其药学上可接受的盐。此施用周期可以重复如2次或更多次，如3次或更

多次，如4次或更多次，如5次或更多次，如6次或更多次，如7次或更多次，如8次或更多次，如9次或更多次，并且包含10次或更多次。

[0071] 本文所使用的术语Janus激酶(JAK)抑制剂是指抑制一种或多种Janus激酶的活性的化合物，如Janus激酶1(JAK1)、Janus激酶2(JAK2)、Janus激酶3(JAK3)和酪氨酸激酶2(TYK2)。在某些实施例中，所关注的JAK抑制剂干扰Janus激酶/信号转导子和转录激活因子(JAK-STAT)途径。JAK抑制剂的实例包含但不限于鲁索替尼((3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)吡唑-1-基]丙腈)；托法替尼(Tofacitinib)(3-[(3R,4R)-4-甲基-3-[甲基(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基]哌啶-1-基]-3-氧代丙腈)；奥拉西替尼(Oclacitinib)(N-甲基{反式-4-[甲基(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基]环己基}甲磺酰胺)；巴瑞替尼(Baricitinib)(2-[1-乙基磺酰基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)吡唑-1-基]氮杂环丁烷-3-基]乙腈)；培菲替尼(Peficitinib)(4-[[(1R,3S)-5-羟基-2-金刚烷基]氨基]-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-5-甲酰胺)；菲卓替尼(N-叔丁基-3-{5-甲基-2-[4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯氨基]-嘧啶-4-基氨基}-苯磺酰胺)；乌帕替尼(Upadacitinib)((3S,4R)-3-乙基-4-(3H-咪唑并[1,2-a]吡咯并[2,3-e]吡嗪-8-基)-N-(2,2,2-三氟乙基)吡咯烷-1-甲酰胺)；非戈替尼(Filgotinib)(N-[5-[4-[(1,1-二氧-1,4-噻嗪-4-基)甲基]苯基]-[1,2,4]三唑[1,5-a]吡啶-2-基]环丙烷甲酰胺)；塞度替尼(Cerdulatinib)(4-(环丙基氨基)-2-[4-(4-乙基磺酰基哌嗪-1-基)苯胺基]嘧啶-5-甲酰胺)；甘多替尼(Gandotinib)(3-(4-氯-2-氟苄基)-2-甲基-N-(5-甲基-1H-吡唑-3-基)-8-(吗啉代甲基)咪唑并[1,2-b]哒嗪-6-胺)；来他替尼(Lestaurtinib)((5S,6S,8R)-6-羟基-6-(羟甲基)-5-甲基-7,8,14,15-四氢-5H-16-氧杂-4b,8a,14-三氮杂-5,8-甲二苯并[b,h]环辛烷[jkl]环戊二烯[e]-as-indacen-13(6H)-酮)；莫莫替尼(N-(氰基甲基)-4-{2-[4-(吗啉-4-基)苯胺基]嘧啶-4-基}苯甲酰胺)；以及帕瑞替尼((16E)-11-[2-(1-吡咯烷基)乙氧基]-14,19-二氧杂-5,7,26-三氮杂四环[19.3.1.12,6.18,12]七氧杂-1(25),2(26),3,5,8,10,12(27),16,21,23-癸烯)及其药学上可接受的盐。在某些实施例中，所述JAK抑制剂选自由以下组成的组：鲁索替尼、菲卓替尼、莫莫替尼和帕瑞替尼或其药学上可接受的盐及其组合。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是鲁索替尼或其药学上可接受的盐。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是菲卓替尼或其药学上可接受的盐。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是莫莫替尼或其药学上可接受的盐。在某些实施例中，所述JAK抑制剂是帕瑞替尼或其药学上可接受的盐。

[0072] 在实施例中，如本文所使用的术语端粒酶抑制剂是指能够降低或抑制哺乳动物细胞中的端粒酶逆转录酶活性的化合物。在一些实例中，所关注的端粒酶抑制剂包含包括寡核苷酸的hTR模板抑制剂。“hTR模板抑制剂”是阻断人端粒酶的RNA组分的模板区并且可以抑制酶的活性的化合物。在一些实施例中，寡核苷酸包含有效与此区的更具体部分杂交的序列，所述序列具有序列为5’-CUAACCCUAAC-3’。

[0073] 所关注的端粒酶抑制剂包含寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5’和/或3’端连接的脂质部分。在一些实施例中，端粒酶抑制剂包含具有“抗核酸酶键”的寡核苷酸，其中所述抗核酸酶键具有拥有亚基键的主链，所述亚基键基本上抗由胞外和胞内核酸酶以非杂交或杂交形式进行的核酸酶切割。在一些实例中，寡核苷酸在生理条件下显示很少或没有核酸酶切割。

[0074] 在一些实施例中，靶向hTR序列的治疗性寡核苷酸的区与对应的hTR序列互补。在某些实施例中，寡核苷酸的碱基序列包含与hTR靶标互补的5个或更多个核苷酸的序列，如与hTR靶标互补的8个或更多个核苷酸，如10个或更多个核苷酸，如12个或更多个核苷酸，如15个或更多个核苷酸。在某些实施例中，本公开的端粒酶抑制剂中的寡核苷酸与hTR靶序列完全互补，如其中寡核苷酸的全长与hTR靶序列互补。

[0075] 端粒酶抑制剂包含核苷间键，如磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸脂、P3'→N5'磷酰胺酯、N3'→P5'磷酰胺酯、N3→P5'硫代磷酰胺和硫代磷酸酯键。在某些实施例中，所关注的端粒酶抑制剂包含至少一个N3'→P5'磷酰胺酯(NP)或N3'→P5'硫代磷酰胺酯(NPS)键，所述键可以由以下结构表示：3'-(-NH--P(=O)(--XR)--O-)-5'，其中X表示O或S，并且R选自由以下组成的组：氢、烷基和芳基；及其药学上可接受的盐，当XR是OH或SH时。在其它实施例中，寡核苷酸包含所有NP，或在一些实施例中，包含所有NPS键。在一个实施例中，hTR模板抑制剂寡核苷酸的序列是与SEQ ID NO:1(GGGUUGCGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCCGCGCGCUGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCUUCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUCGCCUCCCCGGGGACCUGCGGCGGGUCGCCUGCCCAGCCCCCGAACCCCGCCUGGAGCCGCGGUCGGCCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGCGAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGUUCACCGUUUCAGGCCGCAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCCGCGGCGCGAUUCCCUGAGCUGUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACACAUGCAGUUCGCUUUCCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCACCCCUCGCCGGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCUGACUGACUGGGCCAGUGUGCU)的核苷酸42-54互补的序列。在某些实施例中，寡核苷酸包含与具有序列5'-CUAACCCUAAC-3'的11-核苷酸区的一些部分互补或接近互补的序列。具有此序列(TAGGGTTAGACAA;SEQ ID NO:12)和N3'→P5'硫代磷酰胺酯(NPS)键的寡核苷酸在本文中指定为GRN163。参见例如Asai等人，《癌症研究(Cancer Research)》63:3931-3939(2003)以及Gryaznov等人，《核苷、核苷酸和核酸(Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids)》22(5-8):577-81(2003)。另一个靶区是跨越hTR的核苷酸137-179的区(参见Pruzan等人，《核酸研究(Nucl.Acids Research)》,30:559-568,2002)。在此区内，跨越141-153的序列是优选的靶标。PCT公开WO98/28442描述了使用长度为至少7个核苷酸的寡核苷酸来抑制端粒酶，其中寡核苷酸被设计成与模板区之外的hTR序列的可接近部分，包含hTR的核苷酸137-196、290-319和350-380互补。下文给出了优选的hTR靶向序列，并且通过SEQ ID NO:2-22鉴定。在某些实施例中，端粒酶抑制剂的寡核苷酸具有靶向人端粒酶RNA(hTR)的序列，包含但不限于以下序列：

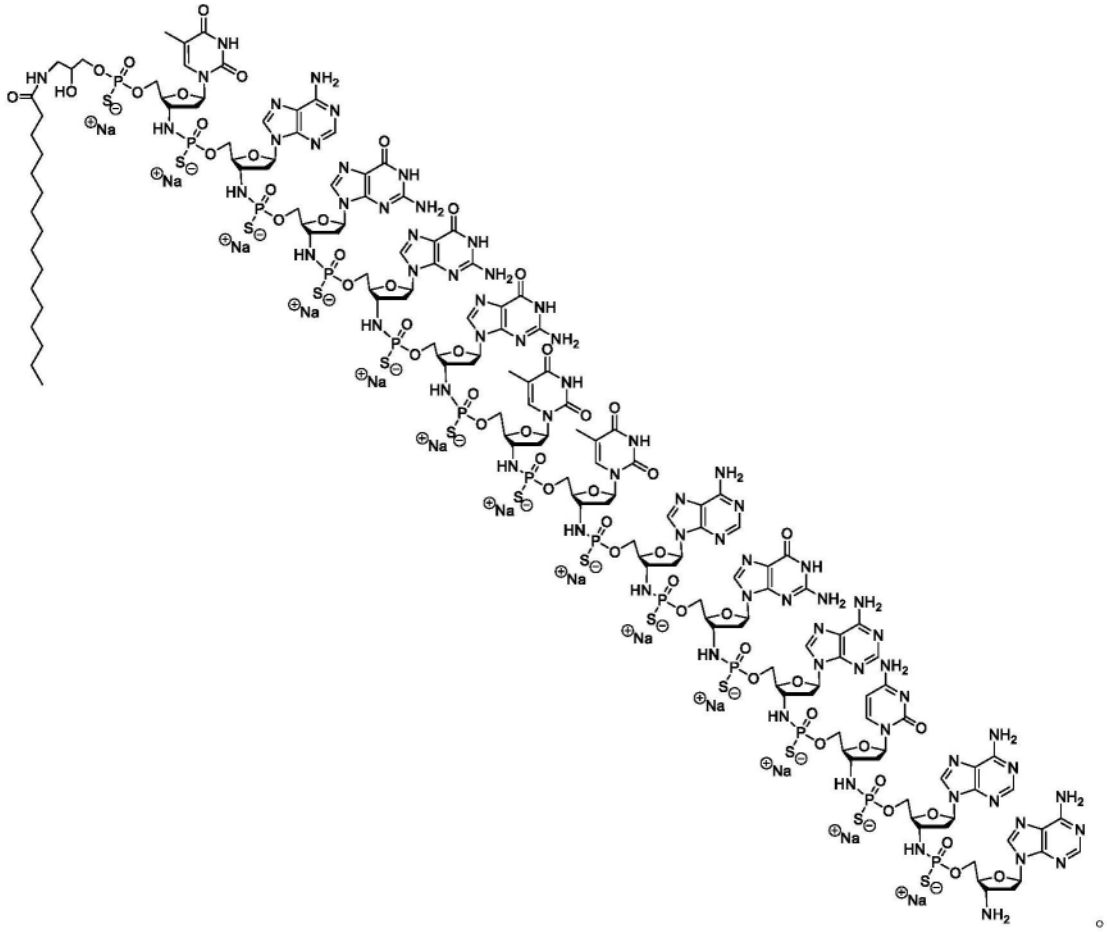
[0076]

hTR靶向序列	SEQ ID NO: 1的区	SEQ ID NO:
ACATTTTTTGTTTGCTCTAG	160-179	2
GCTCTAGAATGAACGGTGGAAGGCGGCAGG	137-166	3
GTGGAGGCGGCAGG	137-151	4
GGAAGGCGGCAGG	137-149	5
GTGGAAGGCGGCA	139-151	6
GTGGAAGGCGG	141-151	7
CGGTGGAAGGCGG	141-153	8
ACGGTGGAAGGCG	142-154	9
AACGGTGGAAGGCGGC	143-155	10
ATGAACGGTGGAAGGCGG	144-158	11
TAGGGTTAGACAA	42-54	12
CAGTTAGGGTTAG	46-58	13
TAGGGTTAGACA	42-53	14
TAGGGTTAGAC	42-52	15
GTTAGGGTTAG	46-56	16
GTTAGGGTTAGAC	44-56	17
GTTAGGGTTAGACAA	42-56	18
GGGTTAGAC	44-52	19
CAGTTAGGG	50-58	20
CCCTTCTCAGTT	54-65	21
CGCCCTTCTCAG	56-67	22

[0077] 本公开的端粒酶抑制剂包含与寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。在一些实例中,结构基团提供了优异的细胞摄取性质,使得与未经修饰的形式相比,使用更少量的缀合的寡核苷酸可以获得等效的生物效应。脂质部分可以是脂肪族烃或脂肪酸,如烃和脂肪酸的衍生物。例如,脂质部分可以是具有14-20个碳的饱和直链化合物,如肉豆蔻酸(十四烷酸)、棕榈酸(十六烷酸)和硬脂酸(十八烷酸)及其对应的脂肪族烃形式——十四烷、十六烷和十八烷。其它脂质部分的实例包含固醇,如胆固醇,以及经取代的脂肪酸和烃,特别是这些基团的多氟化形式。在某些实施例中,脂质部分包含脂质部分的一种或多种衍生物,如胺、酰胺、酯和氨基甲酸酯衍生物。在一个实例中,脂质部分是棕榈酰基(C16)部分,如棕榈酰胺。脂质部分可以通过连接子,如甘油或氨基甘油连接子与寡核苷酸缀合。

[0078] 在一些实施例中,端粒酶抑制剂是如在美国专利第9,375,485号中所描述的化合物,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。在某些实施例中,端粒酶抑制剂是伊美司他(由序列5'-TAGGGTTAGACAA-3'构成的5'棕榈酰化13-聚硫代磷酰胺酯寡核苷酸)或其药

学上可接受的盐，如伊美司他钠(GRN163L)：

[0079] 

[0080] 在实践本发明的方法时，施用于受试者的JAK抑制剂或其药学上可接受的盐的量可以在以下范围内变化：约1mg/天到约600mg/天，如约10mg/天到约550mg/天，如10mg/天到约400mg/天，如约15mg/天到约300mg/天，如约20mg/天到约200mg/天，如约25mg/天到约100mg/天，并且包含约30mg/天到约35mg/天。在某些实施例中，施用于受试者的JAK抑制剂的量为约10mg/天到约400mg/天。

[0081] 施用于受试者的鲁索替尼或药学上可接受的盐的每个剂量可以在以下范围内变化：约5mg到约40mg，如约7.5mg到约27.5mg，如约10mg到约25mg，如约12.5mg到约22.5mg，并且包含约15mg到约20mg。在某些实施例中，施用于受试者的JAK抑制剂的剂量为5.0mg、5.1mg、5.2mg、5.3mg、5.4mg、5.5mg、5.6mg、5.7mg、5.8mg、5.9mg、6.0mg、6.1mg、6.2mg、6.3mg、6.4mg、6.5mg、6.6mg、6.7mg、6.8mg、6.9mg、7mg、7.1mg、7.2mg、7.3mg、7.4mg、7.5mg、7.6mg、7.7mg、7.8mg、7.9mg、8mg、8.1mg、8.2mg、8.3mg、8.4mg、8.5mg、8.6mg、8.7mg、8.8mg、8.9mg、9mg、9.1mg、9.2mg、9.3mg、9.4mg、9.5mg、9.6mg、9.7mg、9.8mg、9.9mg、10mg、10.1mg、10.2mg、10.3mg、10.4mg、10.5mg、10.6mg、10.7mg、10.8mg、10.9mg、11mg、11.1mg、11.2mg、11.3mg、11.4mg、11.5mg、11.6mg、11.7mg、11.8mg、11.9mg、12mg、12.1mg、12.2mg、12.3mg、12.4mg、12.5mg、12.6mg、12.7mg、12.8mg、12.9mg、13mg、13.1mg、13.2mg、13.3mg、13.4mg、13.5mg、13.6mg、13.7mg、13.8mg、13.9mg、14mg、14.1mg、14.2mg、14.3mg、14.4mg、14.5mg、14.6mg、14.7mg、14.8mg、14.9mg或15mg。

[0082] 在某些实施例中，JAK抑制剂鲁索替尼以以下剂量施用于受试者：当所述受试者的

基线血小板计数小于约100x10^9/L血小板时，5mg，每天两次；当所述受试者的基线血小板计数为约100x10^9/L血小板到约200x10^9/L血小板时，15mg，每天两次；并且当所述受试者的基线血小板计数大于约200x10^9/L血小板时，20mg，每天两次。

[0083] 在某些实施例中，所述JAK抑制剂是菲卓替尼或其药学上可接受的盐，并且当受试者的基线血小板计数大于或等于约50x10^9/L时，以400mg的剂量每天一次施用于所述受试者。在某些实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以300mg每日一次的剂量施用于受试者。在其它实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以200mg每日一次的剂量施用于受试者。在仍其它实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以100mg每日一次的剂量施用于受试者。在又其它实例中，所述菲卓替尼或其药学上可接受的盐以小于100mg每日一次的剂量施用于受试者。

[0084] 在其它实施例中，所述JAK抑制剂是莫莫替尼或其药学上可接受的盐，并且以400mg每日一次的剂量施用于受试者。在某些实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以300mg每日一次的剂量施用于受试者。在其它实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以200mg每日一次的剂量施用于受试者。在一些实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以150mg每日两次的剂量施用。在仍其它实例中，所述莫莫替尼或其药学上可接受的盐以100mg每日一次的剂量施用于受试者。

[0085] 在其它实施例中，所述JAK抑制剂是帕瑞替尼或其药学上可接受的盐，并且以约50mg到约600mg每日一次，如约100mg到约500mg每日一次，如约150mg到约400mg每日一次，并且包含约200mg到约350mg每日一次的剂量施用于受试者。在某些实例中，所述帕瑞替尼或其药学上可接受的盐以约50mg到约600mg每日两次，如约100mg到约500mg每日两次，如约150mg到约400mg每日两次，并且包含约200mg到约350mg每日两次的剂量施用于受试者。在其它实例中，所述帕瑞替尼或其药学上可接受的盐以100mg每日一次或约100mg每日两次或200mg每日两次的剂量施用于受试者。

[0086] 根据某些实施例的方法还包含在向受试者施用所述JAK抑制剂之前确定所述受试者的所述基线或预处理血小板计数。在这些实施例中，方法可以包含确定所述受试者的基线或预处理血小板计数，并且基于所述受试者的所述基线或预处理血小板计数确定用于施用于所述受试者的所述JAK抑制剂的量。可以使用任何方便的血液学方案来确定受试者的基线或预处理血小板计数，如用手动或自动血液学分析仪或用血细胞计数器。根据本文所述的方法的实施例，可以在向受试者施用JAK抑制剂剂量之前1分钟或更长时间，如2分钟或更长时间，如5分钟或更长时间，如10分钟或更长时间，如15分钟或更长时间，如30分钟或更长时间，如60分钟或更长时间，如2小时或更长时间，如3小时或更长时间，如6小时或更长时间，如12小时或更长时间确定受试者的基线或预处理血小板计数(以及待施用的JAK抑制剂的量)，并且包含在向受试者施用JAK抑制剂之前24小时，确定受试者的基线或预处理血小板计数。

[0087] 每个剂量的JAK抑制剂可以每天一次或多次，如每天两次，如每天三次并且包含每天四次施用于受试者。在某些实施例中，方法包含JAK抑制剂每天一次施用于受试者。在其它实施例中，方法包含JAK抑制剂每天两次施用于受试者。在一些实例中，所述JAK抑制剂以一定周期每天一次或多次施用于所述受试者，持续30天、29天、28天、27天、26天、25天、24天、23天、22天、21天、20天、19天、18天、17天、16天、15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天、

8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天或1天的持续时间。在一些实例中，所述JAK抑制剂每天一次施用于所述受试者，持续约1到约30天的持续时间，如每天一次，持续约1天到约28天、1天到21天、7天到14天的持续时间。在其它实例中，所述JAK抑制剂每天两次施用于所述受试者，持续约1天到约30天的持续时间，如每天一次，持续约1天到约28天、1天到21天、7天到14天的持续时间。

[0088] 所述JAK抑制剂可以每天一次或多次施用于受试者，持续约1天到约21天，如2天到约20天，如约3天到约19天，如约4天到约18天，如约5天到约17天，如约6天到约16天并且包含约7天到约14天的持续时间。在一个实例中，方法包含JAK抑制剂每天一次施用于受试者，持续约1天到约21天，如2天到约20天，如约3天到约19天，如约4天到约18天，如约5天到约17天，如约6天到约16天的持续时间，并且包含每天一次向受试者施用JAK抑制剂，持续约7天到约14天的持续时间。在另一个实例中，方法包含JAK抑制剂每天两次施用于受试者，持续约1天到约21天，如2天到约20天，如约3天到约19天，如约4天到约18天，如约5天到约17天，如约6天到约16天的持续时间，并且包含每天两次向受试者施用JAK抑制剂，持续约7天到约14天的持续时间。在某些实施例中，所述JAK抑制剂以以下剂量施用于所述受试者：当所述受试者的基线血小板计数小于约$100x10^9$/L血小板时，约5mg，每天两次；当所述受试者的基线血小板计数为约$100x10^9$/L血小板到约200×10^9/L血小板时，约15mg，每天两次；或当所述受试者的基线血小板计数大于约$200x10^9$/L血小板时，约20mg，每天两次。

[0089] 施用于受试者的端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠的剂量可以在以下范围内变化：约4mg/kg到约15mg/kg，如约4.0mg/kg到约10mg/kg，如约6mg/kg到约14mg/kg，如约7mg/kg到约13mg/kg，如约8mg/kg到约12mg/kg，如约7.5mg/kg到9.4mg/kg并且包含约9mg/kg到约11mg/kg。在一些实施例中，施用于受试者的端粒酶抑制剂的剂量为约7.5mg/kg到约9.4mg/kg。例如，端粒酶抑制剂的剂量可以为4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.1mg/kg、10.2mg/kg、10.3mg/kg、10.4mg/kg、10.5mg/kg、10.6mg/kg、10.7mg/kg、10.8mg/kg、10.9mg/kg、11mg/kg、11.1mg/kg、11.2mg/kg、11.3mg/kg、11.4mg/kg、11.5mg/kg、11.6mg/kg、11.7mg/kg、11.8mg/kg、11.9mg/kg、12mg/kg、12.1mg/kg、12.2mg/kg、12.3mg/kg、12.4mg/kg、12.5mg/kg、12.6mg/kg、12.7mg/kg、12.8mg/kg、12.9mg/kg、13mg/kg。在某些实施例中，施用于受试者的端粒酶抑制剂的剂量为约9.4mg/kg。

[0090] 可以以一定周期每周一次、每两周(14天)一次、每三周(21天)一次或每四周(28天)一次、每6周一次、每8周一次、每10周一次、每12周一次向受试者施用所述剂量的端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠。在所述方法的某些实施例中，施用伊美司他，持续1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或多于8个剂量周期，每个周期包括：每三周一次静脉内施用约4-10mg/kg伊美司他，每四周一次静脉内施用约4-10mg/kg伊美司他，每两周一次静脉内

施用约4-10mg/kg伊美司他或每三周一次静脉内施用约7.5-9.4mg/kg伊美司他。在某些实例中，每个剂量周期包括每四周静脉内施用约7.5-9.4mg/kg伊美司他一次。在一些情况下，每个剂量周期包括约每三周静脉内施用约9.4mg/kg伊美司他一次。

[0091] 在一些实施例中，施用于个体的端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠的量为约0.5到约5mg、约5到约10mg、约10到约15mg、约15到约20mg、约20到约25mg、约20到约50mg、约25到约50mg、约50到约75mg、约50到约100mg、约75到约100mg、约100到约125mg、约125到约150mg、约150到约175mg、约175到约200mg、约200到约225mg、约225到约250mg、约250到约300mg、约300到约350mg、约350到约400mg、约400到约450mg或约450到约500mg。在一些实施例中，以有效量施用于个体的端粒酶抑制剂的量(例如，单位剂型)在以下范围内：约5mg到约500mg，如约30mg到约300mg或约50mg到约200mg。在一些实施例中，施用于个体的端粒酶抑制剂的浓度是稀释的(约0.1mg/ml)或浓缩的(约180mg/ml)，包含例如以下中的任一个：约0.1到约200mg/ml、约0.1到约180mg/ml、约0.1到约160mg/ml、约0.1到约140mg/ml、约0.1到约120mg/ml、约0.1到约100mg/ml、约0.1到约80mg/ml、约0.1到约60mg/ml、约0.1到约40mg/ml、约0.1到约20mg/ml、约0.1到约10mg/ml、约2到约40mg/ml、约4到约35mg/ml、约6到约30mg/ml、约8到约25mg/ml、约10到约20mg/ml、约12到约15mg/ml，或者以下中的任一个：约0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml或2.5mg/ml。在一些实施例中，端粒酶抑制剂的浓度为至少约以下中的任一个：0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、1.3mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、33.3mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、160mg/ml、170mg/ml、180mg/ml、190mg/ml、200mg/ml、210mg/ml、220mg/ml、230mg/ml、240mg/ml或250mg/ml。

[0092] 在实施例中，每个剂量的端粒酶抑制剂每7天或更长时间一次，如每10天或更长时间一次，如每14天或更长时间一次，如每21天或更长时间一次，如每28天或更长时间一次，并且包含每35天或更长时间一次施用于受试者。在一些实施例中，端粒酶抑制剂每两周一次施用于受试者。在其它实施例中，端粒酶抑制剂每三周一次施用于受试者。在又其它实施例中，端粒酶抑制剂每4周一次施用。在一些实例中，每个剂量的端粒酶抑制剂经以下持续时间施用于受试者：约0.1小时到约6小时，如约0.5小时到约5小时，如约1小时到约4小时，并且包含经约2小时到约3小时的持续时间。在某些实例中，端粒酶抑制剂经约2小时的持续时间施用于受试者。

[0093] 在一些实施例中，用于治疗骨髓增殖性肿瘤的方法包含：向受试者施用JAK抑制剂持续预定持续时间；暂停施用JAK抑制剂；以及在最后一个剂量的JAK抑制剂之后的预定时间段内，向受试者施用端粒酶抑制剂。在这些实施例中，可以施用JAK抑制剂，持续约0天到约28天，如约1天到约21天，如约2天到约14天并且包含约2天到约7天的持续时间。可以每日

一次、每日两次，每日三次或每日四次施用JAK抑制剂。端粒酶抑制剂在最后一个剂量的JAK抑制剂的7天内，如6天内，如5天内，如4天内并且包含在停止施用JAK抑制剂制后3天内施用于受试者。

[0094] 在一些实施例中，用于治疗骨髓增殖性肿瘤的方法包含：向受试者施用端粒酶抑制剂持续预定持续时间；停止施用端粒酶抑制剂；以及在停止施用端粒酶抑制剂之后的预定时间段内，向受试者施用JAK抑制剂。在这些实施例中，可以施用JAK抑制剂，持续约0天到约28天，如约1天到约21天，如约2天到约14天并且包含约2天到约7天的持续时间。可以每日一次、每日两次，每日三次或每日四次施用JAK抑制剂。此周期可以重复2次、3次、4次、5次、6次或更多次。

[0095] 在某些实施例中，方法包含：每天一次向受试者施用鲁索替尼或其药学上可接受的盐，持续0天到14天的持续时间；以及在最后一个施用剂量的鲁索替尼或其药学上可接受的盐的3天内(例如，2天、1天或同一天)，向受试者施用伊美司他或其药学上可接受的盐。然后，在这些实施例中，可以每两周一次、每三周一次或每四周一次施用伊美司他或其药学上可接受的盐。

[0096] 每种药物组合物的施用可以延长延长时间段(如在维持疗法期间)，如约一个月到约七年。在一些实施例中，可以在约2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、18个、24个、30个、36个、48个、60个、72个或84个月中的任一个的时间段内施用JAK抑制剂组合物和端粒酶抑制剂组合物中的一种或多种。在其它实施例中，施用JAK抑制剂组合物和端粒酶抑制剂组合物中的一种或多种，持续受试者寿命的剩余时间。

[0097] 在实施例中，适合于实践本发明的方法的JAK抑制剂组合物和端粒酶抑制剂组合物可以被调配成口服、静脉内、皮下、肌内、局部、腹膜内、鼻内、吸入或眼内施用中的一种或多种。在某些实施例中，用于施用JAK抑制剂组合物和端粒酶抑制剂组合物的期望方案和如本文所述的适当剂量可以由有资格的健康护理专业人员(例如，医师)确定。

[0098] 药物组合物可以包含一种或多种药学上可接受的载体。药学上可接受的赋形剂已在各种出版物中充分描述，所述出版物包含例如：A.Gennaro(2000)《雷明顿：药学的科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》，第20版，利平科特·威廉斯·威尔金斯出版社(Lippincott,Williams,&Wilkins)；《药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)》(1999)H.C.Ansel等人编辑，第7版，利平科特·威廉斯·威尔金斯出版社；以及《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(2000)A.H.Kibbe等人编辑，第3版，美国药剂师协会(Amer.Pharmaceutical Assoc)。例如，所述一种或多种赋形剂可以包含蔗糖、淀粉、甘露醇、山梨醇、乳糖、葡萄糖、纤维素、滑石、磷酸钙或碳酸钙、粘合剂(例如，纤维素、甲基纤维素、羟甲基纤维素、聚丙烯吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、阿拉伯树胶、聚(乙二醇)、蔗糖或淀粉)、崩解剂(例如，淀粉、羧甲基纤维素、羟丙基淀粉、低取代的羟丙基纤维素、碳酸氢钠、磷酸钙或柠檬酸钙)、润滑剂(例如，硬脂酸镁、轻质无水硅酸、滑石或十二烷基硫酸钠)、调味剂(例如，柠檬酸、薄荷醇、甘氨酸或橙色粉末)、防腐剂(例如，苯甲酸钠、亚硫酸氢钠、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、稳定剂(例如，柠檬酸、柠檬酸钠或乙酸)、悬浮剂(例如，甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或硬脂酸铝)、分散剂(例如，羟丙基甲基纤维素)、稀释剂(例如，水)和底蜡(例如，可可脂、白凡士林或聚乙二醇)。

[0099] 在一些实施例中，所关注的组合物包含水性缓冲液。合适的水性缓冲液包含但不限于浓度为约5mM到约100mM的乙酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐缓冲液。在一些实施例中，水性缓冲液包含提供等渗溶液的试剂。此类试剂包含但不限于氯化钠；以及糖，例如甘露醇、葡聚糖、蔗糖等。在一些实施例中，水性缓冲液进一步包含非离子表面活性剂，如聚山梨酯20或80。在一些实例中，所关注的组合物进一步包含防腐剂。合适的防腐剂包含但不限于苯甲醇、苯酚、氯丁醇、苯扎氯铵等。在许多情况下，组合物储存在约4℃下。调配物也可以冻干，在这种情况下，所述调配物通常包含冷冻保护剂，如蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇等。冻干调配物可以储存延长时间段，甚至在环境温度下。

[0100] 在一些实施例中，组合物包含其它添加剂，如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉；粘合剂，如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；崩解剂，如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠；润滑剂，如滑石或硬脂酸镁；并且如果需要，还包含稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和调味剂。

[0101] 当组合物被调配成用于注射时，组合物可以通过以下来调配：将JAK抑制剂或端粒酶抑制剂溶解、悬浮或乳化于水性溶剂或非水性溶剂如植物油或其它类似的油、合成的脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸的酯或丙二醇中；并且如果需要，与常规添加剂，如助溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂一起。

[0102] 实例

[0103] 提出以下实例以便向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开和描述，并且不旨在限制诸位发明人考虑作为其发明的范围，也不旨在表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。已经做出努力来确保关于所使用的数字(例如，量、温度等)的准确性，但仍应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明，否则份数是重量份，分子量是重均分子量，温度是以摄氏度为单位，并且压力是在大气压下或接近大气压。“平均”意指算术平均值。可以使用标准缩写，例如，bp：碱基对；kb：千碱基；pl：皮升；s或sec：秒；min：分钟；h或hr：小时；aa：氨基酸；kb：千碱基；bp：碱基对；nt，核苷酸；i.m.：肌内(地)；i.p.：腹膜内(地)；s.c.：皮下(地)；等。

[0104] 材料和方法

[0105] 化合物：伊美司他钠(GRN163L)是由序列5’-TAGGGTTAGACAA-3’构成的5’棕榈酰化13-聚硫代磷酰胺酯寡核苷酸。错配的寡核苷酸(MM)是由序列5’-TAGGTGTAAGCAA-3’构成的5’棕榈酰化13-聚硫代磷酰胺酯寡核苷酸。两种化合物由杨森公司研发部(Janssen Research&Development,LLC)(美国新泽西州拉里坦(Raritan,NJ,USA))提供。鲁索替尼((3R)-3-环戊基-3-[4-(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)吡唑-1-基]丙腈)购自赛立克化学品有限责任公司(Selleck Chemicals LLC)(美国德克萨斯州休斯顿(Houston,TX,USA))。

[0106] 患者样本和细胞制备：从需要进行治疗性脾切除术的患有晚期MF的13位患者(表1)的外科手术去除的脾脏制备单细胞悬浮液。表1示出了这些患者中的每个患者的突变JAK2、CALR和MPL。脐带血(CB)收集由纽约血液中心(New York Blood Center)提供。使用$CD34^+$细胞选择试剂盒(加拿大不列颠哥伦比亚省温哥华的干细胞技术公司(StemCell Technologies,Vancouver,BC,Canada)从单核细胞中选择$CD34^+$细胞。在每个实验中使用如使用FACSCanto流式细胞仪分析的纯度≥90％的$CD34^+$细胞。

[0107] 表1

[0108]

患者	性别	年龄	诊断	JAK2V617F 等位基因负荷（%）*	CALR 状态*	MPL 突变*
1	F	70	PV- MF	85.0	N/A	WT
2	M	64	PMF	0	WT	WT
3	M	79	PMF	2.4	WT	WT
4	M	67	PMF	0	46-bp 缺失	WT
5	F	45	PV- MF	90.0	WT	WT
6	F	64	PV- MF	78.0	WT	WT
7	M	76	PMF	24.9	WT	WT
8	M	73	PMF	85.1	WT	WT
9	F	52	ET-MF	0	缺失	WT
10	M	58	PV-MF	0	WT	N/A
11	M	66	PMF	0	WT	WT
12	F	73	ET-MF	0.3	WT	WT
13	M	51	PMF	28.0	N/A	WT

[0109] *通过利用实时等位基因特异性聚合酶链式反应(AS-PCR)测定分析PB粒细胞来确定每个MF患者的JAK2V617F状态。通过对DNA的区进行测序来进行CALR的突变分析，其中先前已经描述了CALR的已知突变。通过AS-PCR检测MPLW515L/K突变。WT:野生型。N/A:不适用。

[0110] 用单独和组合的各种药物直接治疗移植有正常或MF脾脏CD34+细胞的NOD/SCID/IL2R无效(NSG)小鼠：为了鉴定NSG小鼠耐受并且最低限度地影响正常$CD34^+$细胞的行为的单独的伊美司他的剂量，将来自8-10个供体的CB $CD34^+$细胞合并(n＝3)并且通过尾静脉移植(5×105/小鼠)到八周到九周龄亚致死辐照(240cGy)的NSG小鼠体内。然后，在移植后一周，每周向这些小鼠腹膜内(IP)注射5mg/kg、15mg/kg、30mg/kg的伊美司他或MM三次，持续4-8周。在停止伊美司他或MM施用后两到三个月，将小鼠处死并从股骨、胫骨、肱骨的骨髓(BM)中回收细胞。通过mAb染色和流式细胞术分析来确定人(h)$CD45^+$、$CD41a^+$和$CD34^+$细胞的存在。

[0111] 为了检查伊美司他对MF HSC的影响，示出了MF脾脏$CD34^+$细胞(3-5×105/小鼠，n＝3)在移植到NSG小鼠体内后4个月实现显著程度的人细胞嵌合现象。将来自这些脾脏的$CD34^+$细胞移植到NSG小鼠体内，并且在一周后用伊美司他或MM以15mg/kg的剂量处理，持续4周。在停止药物处理后三个月，对接受者小鼠的BM中属于各种人造血细胞谱系的细胞的存在进行定量。另外，使用FACSAria细胞分选仪选择接受者小鼠的BM中的$hCD45^+$细胞。使用定量实时(RT)-聚合酶链式反应(PCR)和等位基因辨别方法，确定来自接受来自具有85.1％的粒细胞JAK2V617F等位基因负荷的患者的脾脏$CD34^+$细胞的小鼠的所选择$hCD45^+$细胞的基因组DNA中存在的$JAK2V617F/JAK2_{总}$的百分比。如果$hCD45^+$细胞在小鼠BM中以≥0.1％的有核细胞存在，则人移植被视为已经在NSG小鼠中发生。

[0112] 如图1所描绘的，用单独和组合的鲁索替尼和伊美司他进行体内研究。将来自12个供体($2.5×10^5$/小鼠)的CB $CD34^+$细胞(n＝1)或来自2名患者的MF脾脏$CD34^+$细胞($3-5×10^5$/小鼠)通过尾静脉移植到八周到九周龄亚致死辐照(240cGy)的NSG小鼠体内，已经针对仅伊美司他处理对MF HSC的影响而对这些患者进行评估。移植后一周，将经移植的小鼠随机分为8个2-3只小鼠的处理组，并且如下进行处理：组1：仅Rux；组2：仅伊美司他或MM；组3：

同时施用Rux和伊美司他或MM(Rux+Ime)；组4:Rux，随后是伊美司他或MM(Rux→Ime或MM)；组5:仅媒剂。通过口服强饲以45mg/kg的剂量每日给药Rux一次，持续1周，并且通过I.P.注射以10mg/kg一周给药伊美司他或MM三次，持续4周。移植后四个月，将小鼠处死并如上所述进行分析。

[0113] 蛋白质印迹:将原发性CB和脾脏MF $CD34^+$细胞裂解。然后通过如先前所述的4-20％SDS-PAGE分析蛋白质裂解物。兔抗hTERT和对应HRP缀合的二级抗体购自细胞信号转导技术公司(Cell Signaling Technology Inc.)(马萨诸塞州丹弗斯(Danvers,MA))。通过增强的化学发光检测(ECL，新泽西州皮斯卡塔韦的安玛西亚法玛西亚生物技术公司(Amersham Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ))使蛋白质可视化。

[0114] 端粒酶活性(TA)测定:使用定量端粒酶检测试剂盒来测量TA。通过在存在端粒特异性序列寡核苷酸底物的情况下监测端粒重复序列合成，在0.01-0.1μg细胞裂解物中测量TA。然后通过PCR检测新合成的DNA。将结果绘制为检测由与所得PCR产物结合产生的SYBR绿色荧光所需的实时PCR阈值循环(C_T)的数量。在每个实验条件下，将热灭活的端粒酶用作细胞提取物的阴性对照。TA的增加与双链DNA合成的增加相关，所述双链DNA合成需要较少的PCR循环(C_T)(例如，C_T数越低，TA越高)。

[0115] 端粒酶长度分析:为了分析端粒长度，用端粒PNA试剂盒/FITC进行流式荧光原位杂交(Flow-FISH)用于流式细胞术。在不存在没有FITC缀合的肽核酸(PNA)端粒探针的杂交溶液的情况下或在含有探针的杂交溶液中，将等量的原发性MF或正常CB $CD34^+$细胞再悬浮于微型离心管中。将管置于调节至82℃的预热加热块中10分钟，使样品DNA变性。然后将管在室温(RT)下置于黑暗中过夜，以使探针与TTAGGG端粒重复序列杂交。杂交后，用40℃的洗涤溶液进行两次10分钟的杂交后洗涤。在最后一个洗涤步骤之后，将细胞用CD34和CD38 mAb进行染色，并且在流式细胞术分析之前用DNA溶液温育2-3小时。来自每个样品的$CD34^+$、$CD34^+CD38^-$和$CD34^+CD38^+$细胞的端粒荧光强度(TFI)计算如下:TFI＝具有探针的FITC-PNA的平均荧光强度(MFI)-无探针的FITC-PNA的MFI。TFI越高，端粒越长。

[0116] 用单独和组合剂量的Rux和伊美司他处理MF和正常$CD34^+$细胞:体外研究表明，虽然CB $CD34^+$细胞的数量在用不同剂量的Rux(50-500nM)处理后仅减少到有限程度，但MF脾脏$CD34^+$细胞的绝对数量以剂量依赖性方式减少。通过使用150nM Rux实现MF $CD34^+$细胞增殖和CFU-GM形成的50％抑制。基于这些观察结果和来自伊美司他的体外研究结果，选择50nM Rux和1.8μM伊美司他，以确定这两种药物的依次或同时组合是否对MF HSC/HPC具有加性或协同作用。图2描绘了体外组合研究设计的示意图，并且图3示出了药物处理策略。简而言之，CB(n＝3)或MF($JAK2V617F^+$，n＝3;将$JAK2V617F^-$，n＝4)(2.5×10^4/mL)$CD34^+$细胞在补充有50ng/ml SCF、100ng/ml FLT-3配体(FLT-3L)、100ng/ml TPO和50ng/ml IL-3(李连生物制品公司(Gemini Bio-products))的无血清扩增培养基(SFEM，干细胞技术公司)中温育，在仅存在Rux(50nM)的情况下持续3天或者在仅存在伊美司他(1.8uM)的情况下持续7天(短期处理)或14天(长期处理)。对于同时组合处理，将$CD34^+$细胞暴露于Rux和伊美司他3天并且洗涤。然后将细胞再次暴露于伊美司他，持续另外4天或11天。对于依次组合处理，将$CD34^+$细胞在仅存在Rux的情况下温育3天，随后在仅存在伊美司他的情况下温育7或14天。对于含有伊美司他的三种处理策略，将细胞用伊美司他总共给药三次。在Rux单独处理后三天以及在用伊美司他每次处理后7或14天，对细胞进行计数并用CD34、谱系混合物(lineage

cocktail)和CD15 mAb进行染色,并用流式细胞术进行分析。通过将总活细胞数乘以$CD34^+$ Lin^-和$CD15^+CD34^-$细胞的百分比,计算培养物中产生的Lin^-CD34^+(表型定义的HSC/HPC)和$CD15^+CD34^-$(髓样)细胞的绝对数量。另外,进行单独添加MM或媒剂的平行培养。

[0117] HPC测定:还根据制造商的说明书(干细胞技术公司)在添加了细胞因子混合物的甲基纤维素中分析从上述培养物中采集的一部分细胞。在温育12到14天之后,对菌落数量进行计数。挑取单独的CFU-GM菌落(20-38个菌落/处理组/患者),并且使用嵌套式等位基因特异性PCR分析JAK2V617F的存在。然后确定$JAK2V617F^+$CFU-GM的百分比。

[0118] 统计分析:结果报告为平均值±SD。使用双尾学生t测试确定统计显著性。所有P值都是双侧的,并且P值小于0.05被认为是显著的。

[0119] 结果和讨论

[0120] 用伊美司他与Rux的组合进行的依次处理对MF HSC和HPC产生加性抑制活性。如图4-5所示,仅Rux(50nM)、仅伊美司他(1.8μM)、这些药物的同时或依次的短期(图4)或长期(图5)组合的剂量都不影响正常的表型定义的CB HSC和功能定义的HPC的产生数量以及正常髓样细胞的生成数量。评估单独和组合的这两种药物对MF HSC/HPC的影响。如图6-7所示,仅Rux减少了在脾脏MF CD34+细胞培养物中产生的可测定HPC的数量(CFU-GM+BFU-E+CFU-GEMM,P=9.69E-06,图6-7,图B)和成熟髓样细胞的数量(图6-7,图C,P=0.001)。然而,无论是短期仅伊美司他,还是短期同时或依次的药物组合处理,都不会影响表型定义的MF HSC、功能定义的所产生的HPC和和髓样细胞产生的数量。相比之下,用50nM剂量的Rux,随后用1.8μM剂量的伊美司他对脾脏MF $CD34^+$细胞进行顺序长期处理导致Lin^-CD34^+细胞、可测定HPC和成熟髓样细胞的数量显著减少(图7)。这种依次组合处理将MF Lin^-CD34^+细胞(P=0.001对仅Rux;P=0.059对仅伊美司他,图7,图A)和可测定HPC(P=0.02对仅Rux;P=0.05对仅伊美司他,图7,图B)的产生抑制至比任一单独的药物处理更大的程度。在暴露于使用同一药物组合的依次的长期处理的培养物中产生的$CD15^+CD34^-$细胞的数量减少到与在存在仅Rux或仅伊美司他的情况下的培养物中产生的细胞类似的程度(图6,图C,图7,图C)。然而,在接受使用同一药物组合的长期同时处理的培养物中未观察到对Lin^-CD34^+细胞和可检测HPC的这种抑制作用(图7)。这些发现表明,先用Rux,随后用伊美司他进行的依次处理对表型定义的MF HSC和功能定义的MF HPC产生加性抑制作用,但不影响其正常对应物。为了确定这种组合处理是否选择性地影响突变MF HPC,选择所产生的单独的CFU-GM菌落,并针对JAK2V617F的存在对其进行基因分型。如图8所示,用Rux和伊美司他对SP7 $CD34^+$细胞进行依次的长期组合处理导致$JAK2V617F^+$髓样祖细胞的百分比(仅媒剂:94.2%;Rux→MM:88.9%;Rux→伊美司他:75%,图8,图A)和绝对数量两者均减少(相对于仅媒剂:Rux→MM:50.3%;Rux→伊美司他:22.7%,图8,图B),这甚至低于仅伊美司他处理(相对于仅媒剂:72.4%,图8,图B)或同时组合处理(相对于仅媒剂:60.3%,图8,图B)。相对于另一个患者细胞,还观察到$JAK2V617F^+$髓样祖细胞的绝对数量的减少(Pt13,相对于仅媒剂的绝对数量:Rux→MM:97.5%;Rux→伊美司他:44.1%,图8,图C)。这些发现表明,对恶性MF HPC的加性抑制活性可以通过先用Rux,随后用伊美司他进行依次处理来实现。

[0121] 用伊美司他和Rux进行的依次组合处理对MF SRC具有加性抑制活性:通过用伊美司他(10mg/kg)和Rux(45mg/kg)直接处理移植有CB或MF $CD34^+$细胞的NSG小鼠来评估用这两种药物的组合处理对正常或MF HSC是否产生加性作用。图9,图A和D示出了用单独或组合

的这些药物处理后，移植有CB CD34$^+$细胞的小鼠的骨髓中存在的hCD45$^+$(图9，图A)和hCD34$^+$细胞(图9，图D)的FACS绘图。这些处理没有或仅导致接受正常CB移植物的接受者小鼠的骨髓(图9，图B、E)和脾脏(图9，图C、F)中的hCD45$^+$细胞嵌合现象和hCD34$^+$细胞产生的程度轻微降低。相比之下，与任一单独的药物处理相比，对移植有来自使用相等剂量的Rux和伊美司他的Pt5的脾脏CD34$^+$细胞的小鼠进行同时和依次组合处理两者导致骨髓(图10，图B)和脾脏(图10，图C)中的hCD45$^+$细胞的绝对数量的更大减少。此外，与同时组合处理相比，依次组合处理导致hCD45$^+$细胞的数量甚至更大减少(图10，图B-C)。此外，在移植有Pt 5CD34$^+$细胞的小鼠的骨髓中，与任一单独的药物处理相比，使用依次而不是同时组合处理观察到hCD34$^+$细胞的绝对数量的更大减少(图10，图E)。由于在移植有来自Pt 5的移植物的小鼠的脾脏中未检测到hCD34+细胞，因此无法评估这些处理对移植小鼠的脾脏中的hCD34$^+$细胞的影响。在接受来自另一名患者Pt10的脾脏CD34$^+$细胞的小鼠中也通过依次组合处理实现了对MF SRC的耗尽(图11)，而使用任一单独药物的处理对来自此患者的MF SRC的抑制作用有限。这些发现表明，先用一定剂量的Rux随后用伊美司他进行的依次处理在耗尽MF长期HSC方面至少具有加性活性。这种同一依次药物方案并不影响正常的HSC功能。另外，如图12A-12B所示，与接受同一剂量(10mg/kg)的仅伊美司他的小鼠相比，用一定剂量的每种药物进行的依次组合处理导致接受正常(图12A)或MF脾脏CD34$^+$细胞(图12B)的小鼠的体重发生类似的降低。总的来说，这些观察结果表明，先用Rux，随后用伊美司他进行的依次处理表示一种能够消除具有可接受的毒性特征的MF干细胞的有效治疗策略。

[0122] 尽管已经出于清楚理解的目的通过说明和举例的方式较为详细地描述了前述发明，但是本领域的技术人员根据本发明的教导很容易明白的是，在不偏离所附权利要求的精神或范围的情况下，可以对其进行某些改变和修改。

[0123] 因此，先前内容仅说明本发明的原理。应理解的是，本领域的技术人员将能够设计不同的布置，所述不同的布置尽管没有在本文中明确地描述或显示，但体现本发明的原理并且被包含在其精神和范围之内。此外，本文中叙述的所有实例和条件性语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和诸位发明人所贡献的概念以推动本领域发展，并且将被解释为而不限于这种特别叙述的实例和条件。此外，本文中叙述本发明的原理、方面和实施例以及其特定实例的所有陈述旨在涵盖其结构等效物和功能等效物两者。另外地，这种等效物旨在包含当前已知的等效物以及将来开发的等效物两者，即，所开发的执行相同功能的任何要素，而不论结构如何。此外，本文所公开的任何内容均并非旨在贡献给公众，无论这种公开内容是否在权利要求中被明确叙述。

[0124] 因此，本发明的范围不旨在受限于本文所示出和描述的示例性实施例。相反，本发明的范围和精神由所附权利要求体现。在权利要求中，35U.S.C.§112(f)或35U.S.C.§112(6)被明确定义为仅当在权利要求中的这种特征的开头处叙述确切短语“用于…的装置(means for)”或确切短语“用于…的步骤(step for)”时才针对权利要求中的特征援引；如果在权利要求中的特征中未使用这种确切短语，则不援引35U.S.C.§112(f)或35U.S.C.§112(6)。

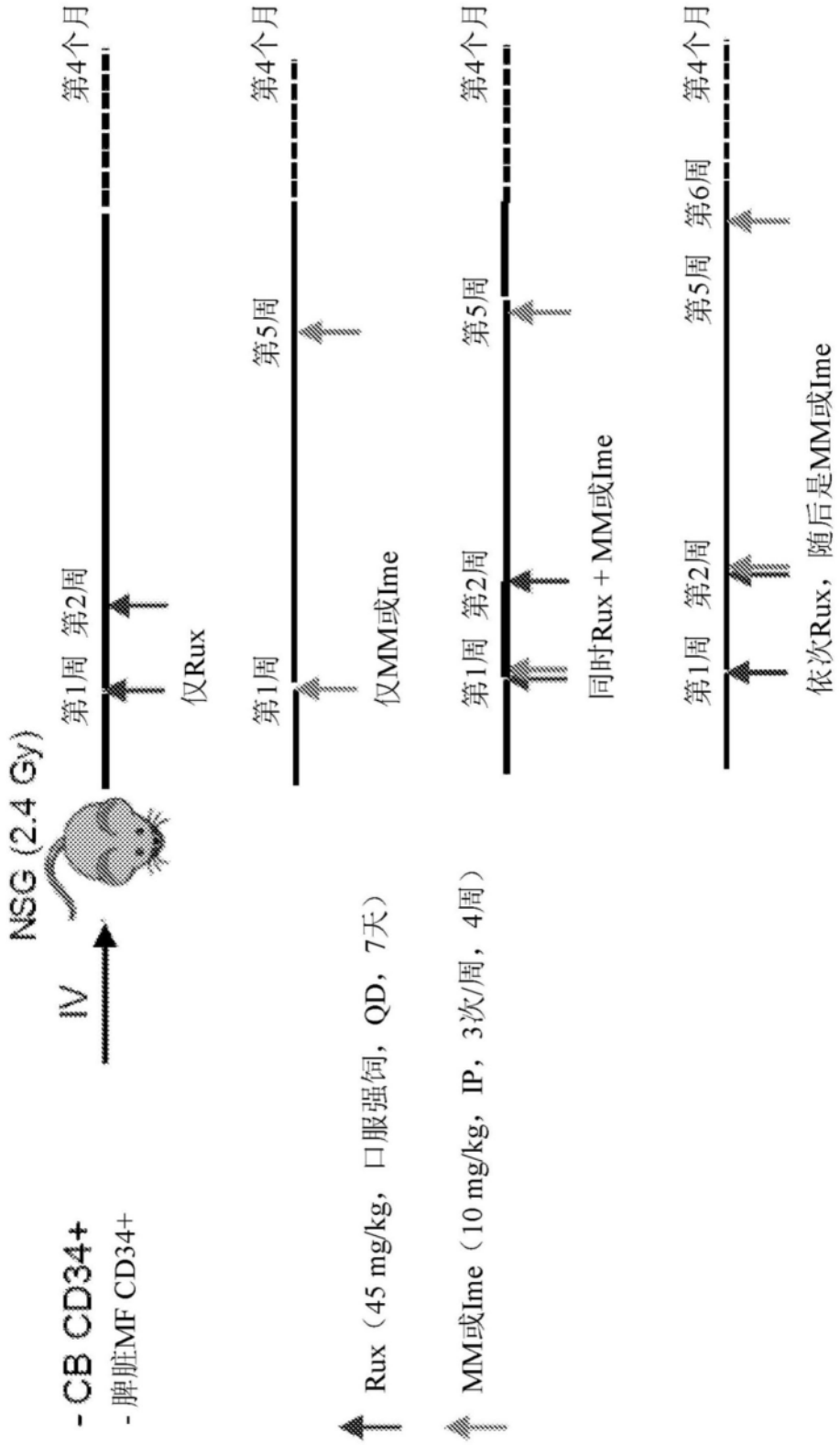

- CB CD34+
- 脾脏MF CD34+
IV
NSG (2.4 Gy)
第1周 第2周 第4个月
仅Rux
第1周 第5周 第4个月
仅MM或Ime
第1周 第2周 第5周 第4个月
同时Rux + MM或Ime
第1周 第2周 第5周 第6周 第4个月
依次Rux，随后是MM或Ime
Rux（45 mg/kg，口服强饲，QD，7天）
MM或Ime（10 mg/kg，IP，3次/周，4周）

图1

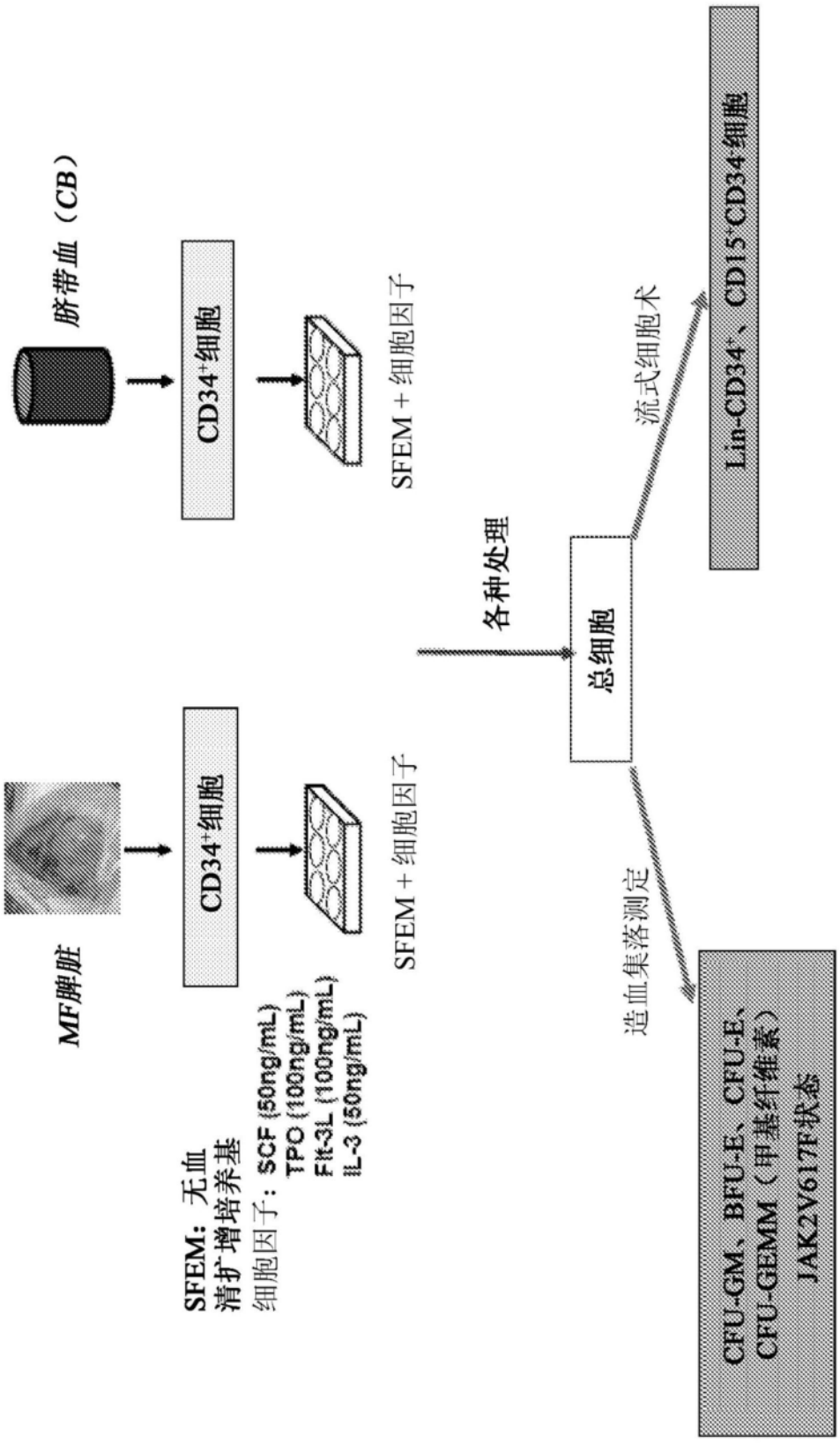

脐带血（CB）
CD34⁺细胞
SFEM + 细胞因子
MF脾脏
CD34⁺细胞
SFEM：无血
清扩增培养基
细胞因子：SCF (50ng/mL)
TPO (100ng/mL)
Flt-3L (100ng/mL)
IL-3 (50ng/mL)
SFEM + 细胞因子
各种处理
总细胞
流式细胞术
Lin-CD34⁺、CD15⁺CD34⁺细胞
造血集落测定
CFU-GM、BFU-E、CFU-E、
CFU-GEMM（甲基纤维素）
JAK2V617F状态

图2

低剂量：Rux：50nM
Ime或MM：1.8 uM
短期：在存在Ime或MM的情况下的任何培养，持续7天
长期：在存在Ime或MM的情况下的任何培养，持续14天
仅Rux
Rux
第0天
第3天
仅Ime或MM
Ime或MM
Ime或MM
第0天
第3天
第7天
第14天
同时Rux和Ime或MM（Rux + Ime或MM）
Rux + Ime或MM
仅Ime或MM
第0天
第3天
第7天
第14天
仅Ime或MM
依次Rux，随后是Ime或MM（Rux→Ime或MM）
Rux
仅Ime或MM
仅Ime或MM
第0天
第3天
第6天
第7天
第10天
第14天
第17天
仅Ime或MM

图3

B
可测定造血集落的数量
（相对于媒剂的%）
140
120
100
80
60
40
20
0
媒剂
仅Rux
媒剂
仅MM
仅Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime
媒剂
Rux→MM
Rux→Ime
A
Lin-CD34+细胞的数量
（相对于媒剂的%）
250
200
150
100
50
0
C
CD15+CD34-细胞的数量
（相对于媒剂的%）
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0

图4

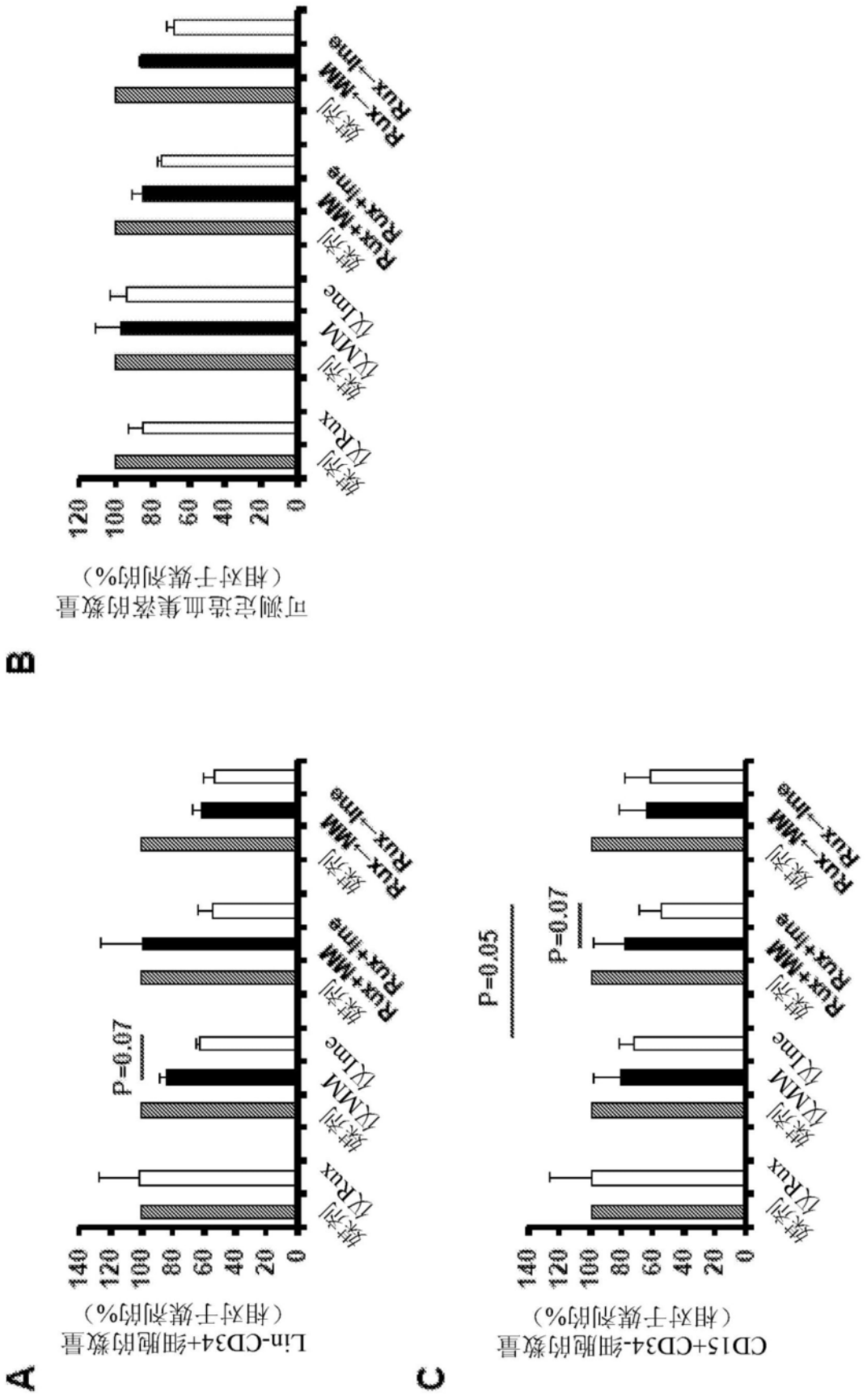

A
Lin-CD34+细胞的数量
（相对于媒剂的%）
0
20
40
60
80
100
120
140
P=0.07
媒剂
仅Rux
媒剂
仅MM
仅Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime
B
可测定造血集落的数量
（相对于媒剂的%）
0
20
40
60
80
100
120
媒剂
仅Rux
媒剂
仅MM
仅Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime
C
CD15+CD34-细胞的数量
（相对于媒剂的%）
0
20
40
60
80
100
120
140
P=0.05
P=0.07
媒剂
仅Rux
媒剂
仅MM
仅Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime

图5

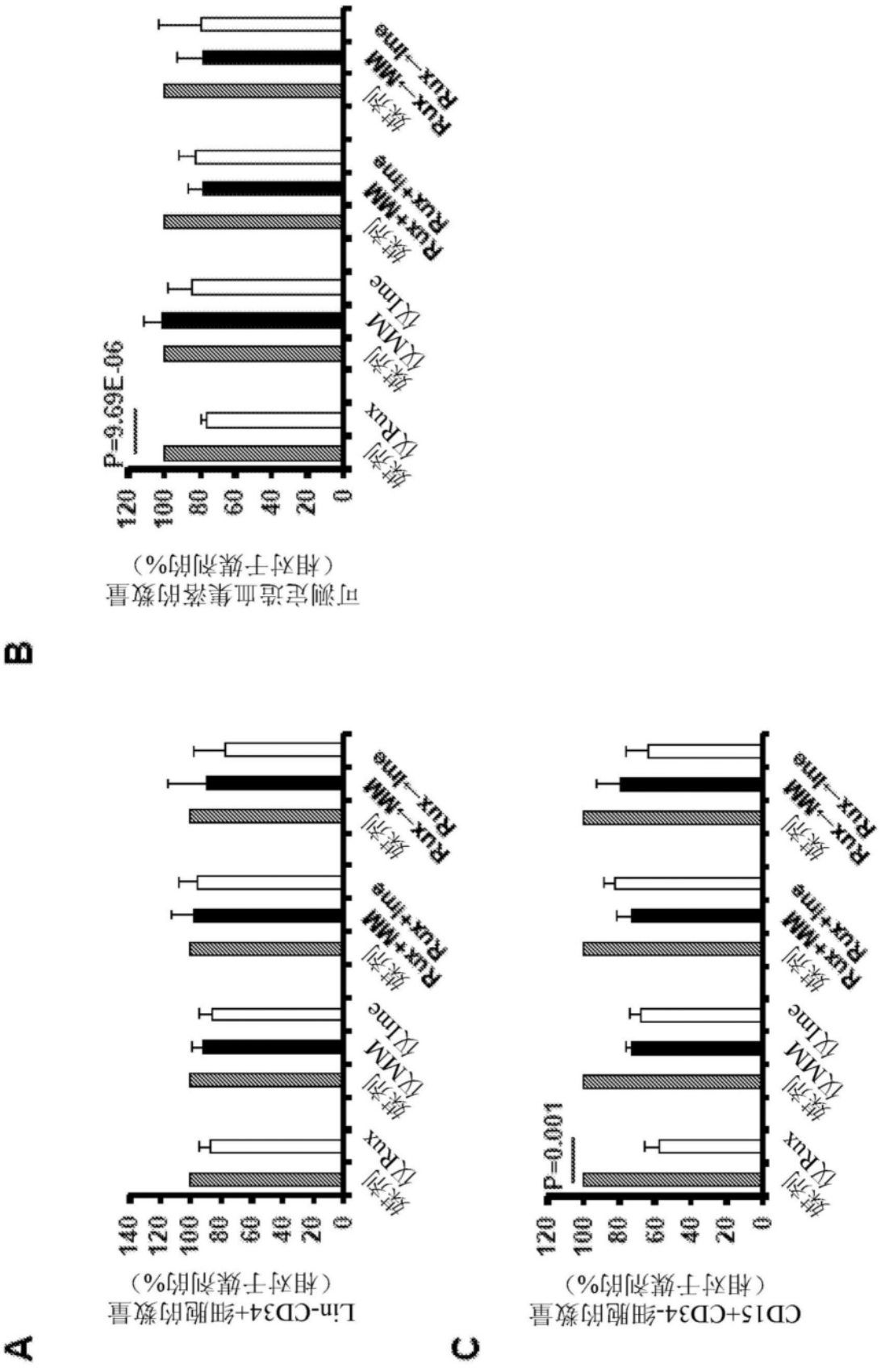

B
可测定造血集落的数量
（相对于媒剂的%）
P=9.69E-06
媒剂
仅Rux
媒剂
仅MM
仅Lime
媒剂
Rux+MM
媒剂
Rux+lime
媒剂
Rux—MM
Rux—lime
A
Lin-CD34+细胞的数量
（相对于媒剂的%）
C
CD15+CD34-细胞的数量
（相对于媒剂的%）
P=0.001

图6

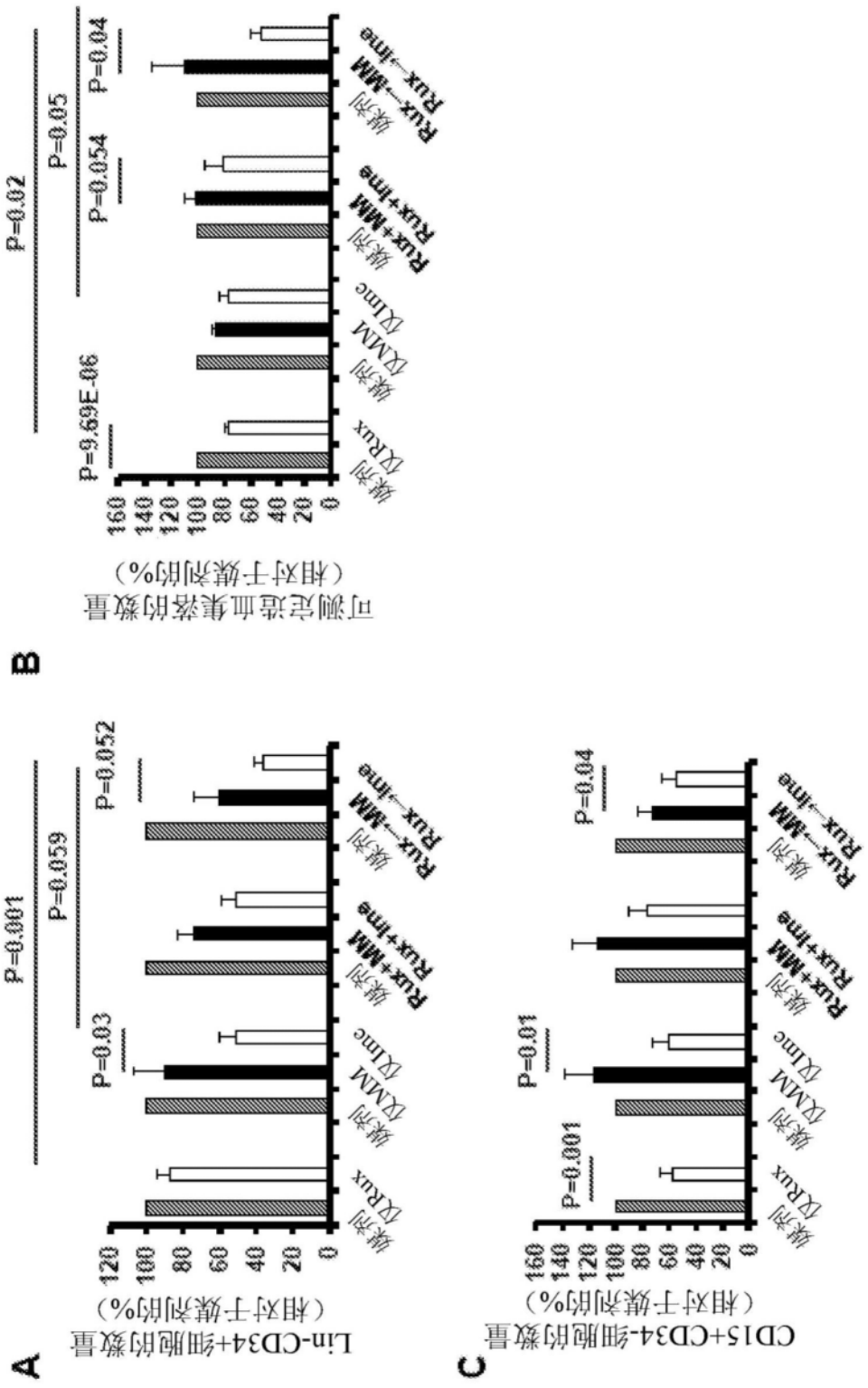

A
Lin-CD34+细胞的数量
（相对于媒剂的%）
P=0.0001
P=0.059
P=0.052
P=0.03
媒剂
仅Rux
媒剂
仅MM
仅lme
媒剂
Rux+MM
Rux+lme
媒剂
Rux→MM
Rux→lme
B
可测定造血集落的数量
（相对于媒剂的%）
P=0.02
P=0.05
P=9.69E-06
P=0.054
P=0.04
C
CD15+CD34-细胞的数量
（相对于媒剂的%）
P=0.001
P=0.01
P=0.04

图7

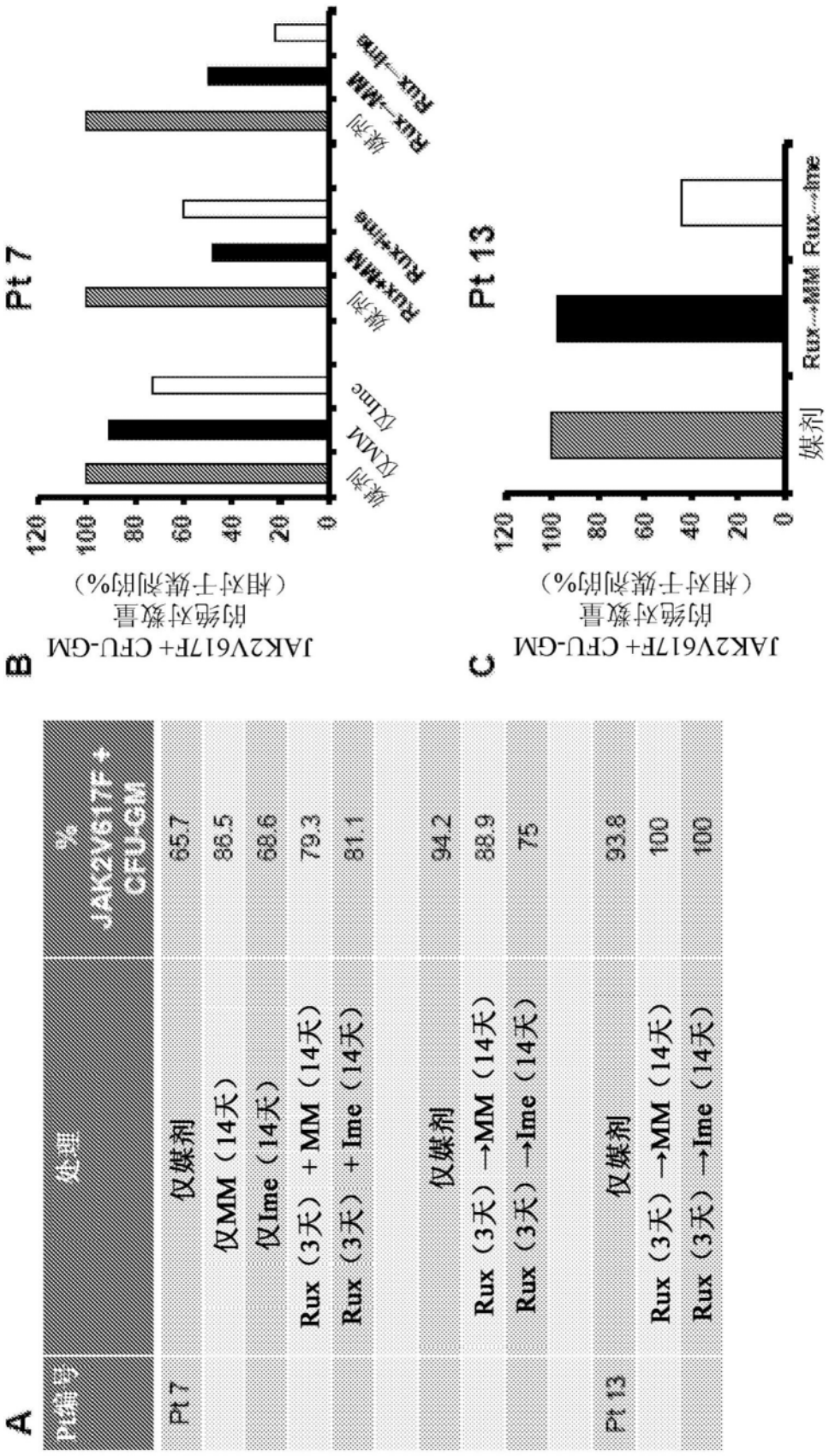

A
Pt编号
处理
% JAK2V617F + CFU-GM
Pt 7
仅媒剂
65.7
仅MM（14天）
86.5
仅Ime（14天）
68.6
Rux（3天）+ MM（14天）
79.3
Rux（3天）+ Ime（14天）
81.1
仅媒剂
94.2
Rux（3天）→MM（14天）
88.9
Rux（3天）→Ime（14天）
75
Pt 13
仅媒剂
93.8
Rux（3天）→MM（14天）
100
Rux（3天）→Ime（14天）
100
B
JAK2V617F+ CFU-GM 的绝对数量（相对于媒剂的%）
Pt 7
媒剂
仅MM
仅Ime
媒剂
Rux+MM
Rux+Ime
媒剂
Rux→MM
Rux→Ime
C
JAK2V617F+ CFU-GM 的绝对数量（相对于媒剂的%）
Pt 13
媒剂
Rux→MM
Rux→Ime

图8

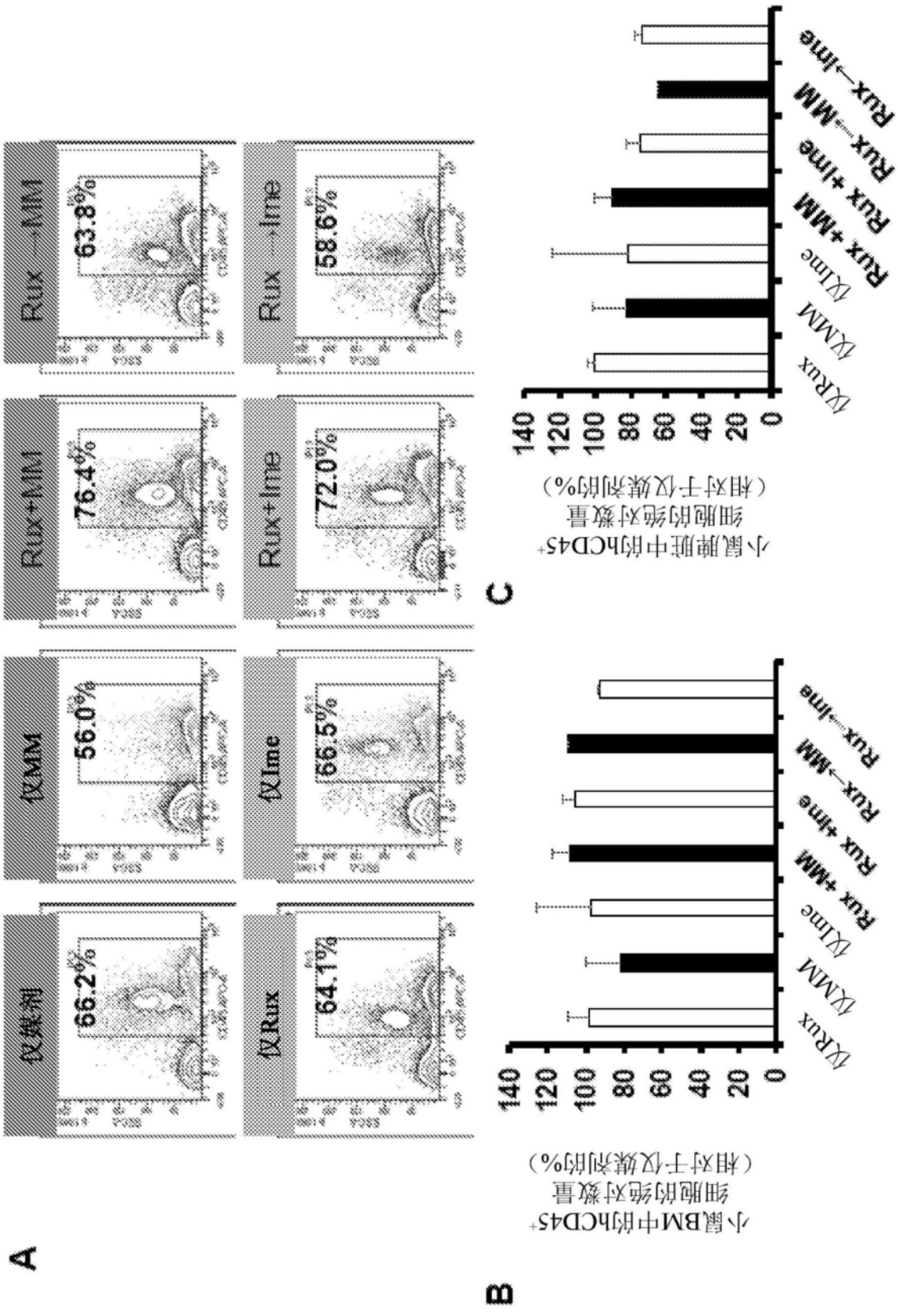

A
仅载剂
66.2%
仅MM
56.0%
仅Ime
66.5%
仅Rux
64.1%
Rux+MM
76.4%
Rux+Ime
72.0%
Rux→MM
63.8%
Rux→Ime
58.6%
B
小鼠BM中的hCD45+
细胞的绝对数量
（相对于仅媒剂的%）
仅Rux
仅MM
仅Ime
Rux+MM
Rux+Ime
Rux→MM
Rux→Ime
C
小鼠脾脏中的hCD45+
细胞的绝对数量
（相对于仅媒剂的%）
仅Rux
仅MM
仅Ime
Rux+MM
Rux+Ime
Rux→MM
Rux→Ime

图9

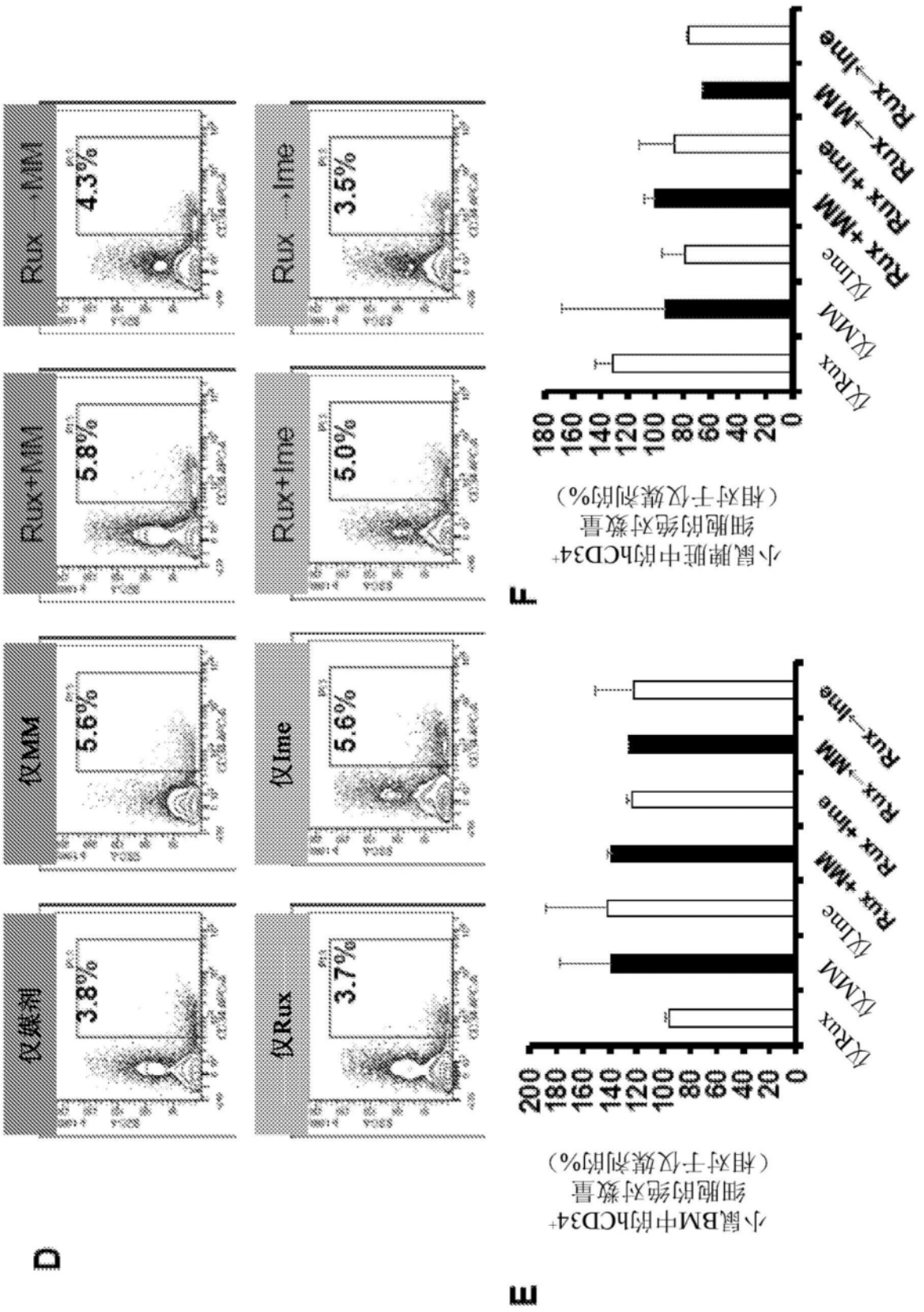

D
仅载剂
3.8%
仅Rux
3.7%
仅MM
5.6%
仅Ime
5.6%
Rux+MM
5.8%
Rux+Ime
5.0%
Rux→MM
4.3%
Rux→Ime
3.5%
E
小鼠BM中的hCD34+
细胞的绝对数量
（相对于仅媒剂的%）
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
仅Rux
仅MM
仅Ime
Rux+MM
Rux+Ime
Rux→MM
Rux→Ime
F
小鼠脾脏中的hCD34+
细胞的绝对数量
（相对于仅媒剂的%）
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
仅Rux
仅MM
仅Ime
Rux+MM
Rux+Ime
Rux→MM
Rux→Ime

图9续

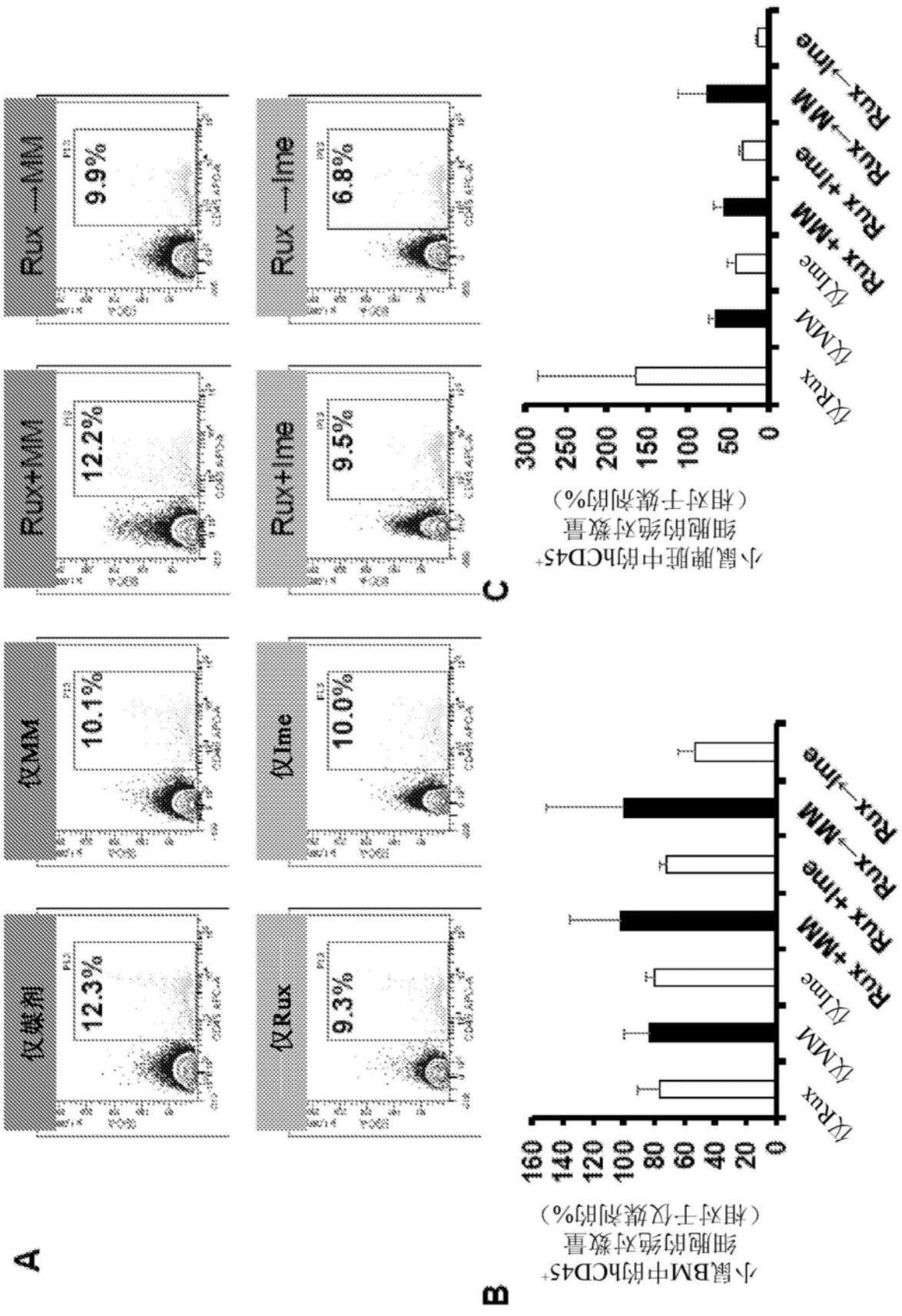

A
仅载剂
12.3%
仅MM
10.1%
仅Ime
10.0%
仅Rux
9.3%
Rux+MM
12.2%
Rux+Ime
9.5%
Rux →MM
9.9%
Rux →Ime
6.8%
C
小鼠脾脏中的hCD45+
细胞的绝对数量
（相对于媒剂的%）
300
250
200
150
100
50
0
仅Rux
仅MM
仅Ime
Rux +MM
Rux +Ime
Rux →MM
Rux →Ime
B
小鼠BM中的hCD45+
细胞的绝对数量
（相对于仅媒剂的%）
160
140
120
100
80
60
40
20
0
仅Rux
仅MM
仅Ime
Rux +MM
Rux +Ime
Rux →MM
Rux →Ime

图10

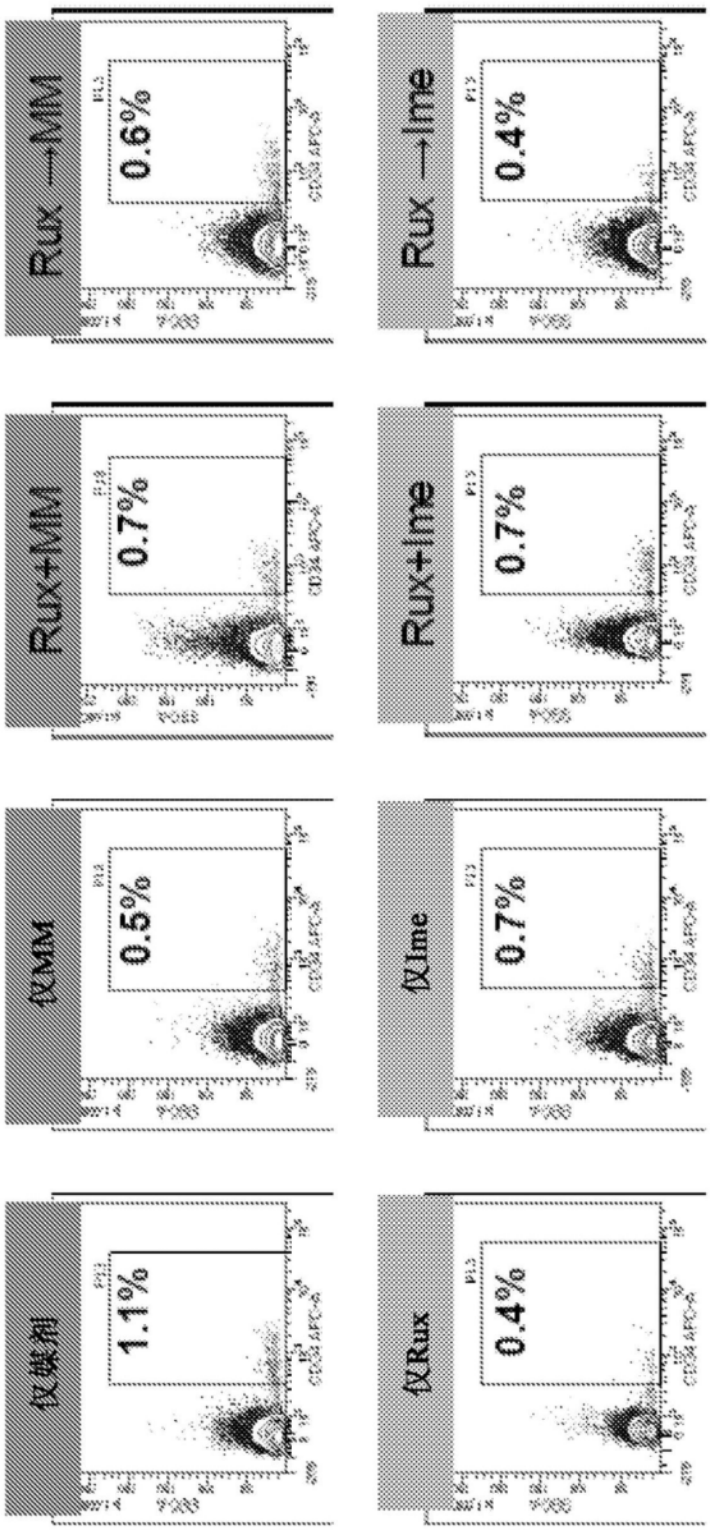

D
仅载剂
1.1%
仅MM
0.5%
仅Ime
0.7%
仅Rux
0.4%
Rux+MM
0.7%
Rux+Ime
0.7%
Rux →MM
0.6%
Rux →Ime
0.4%

图10续

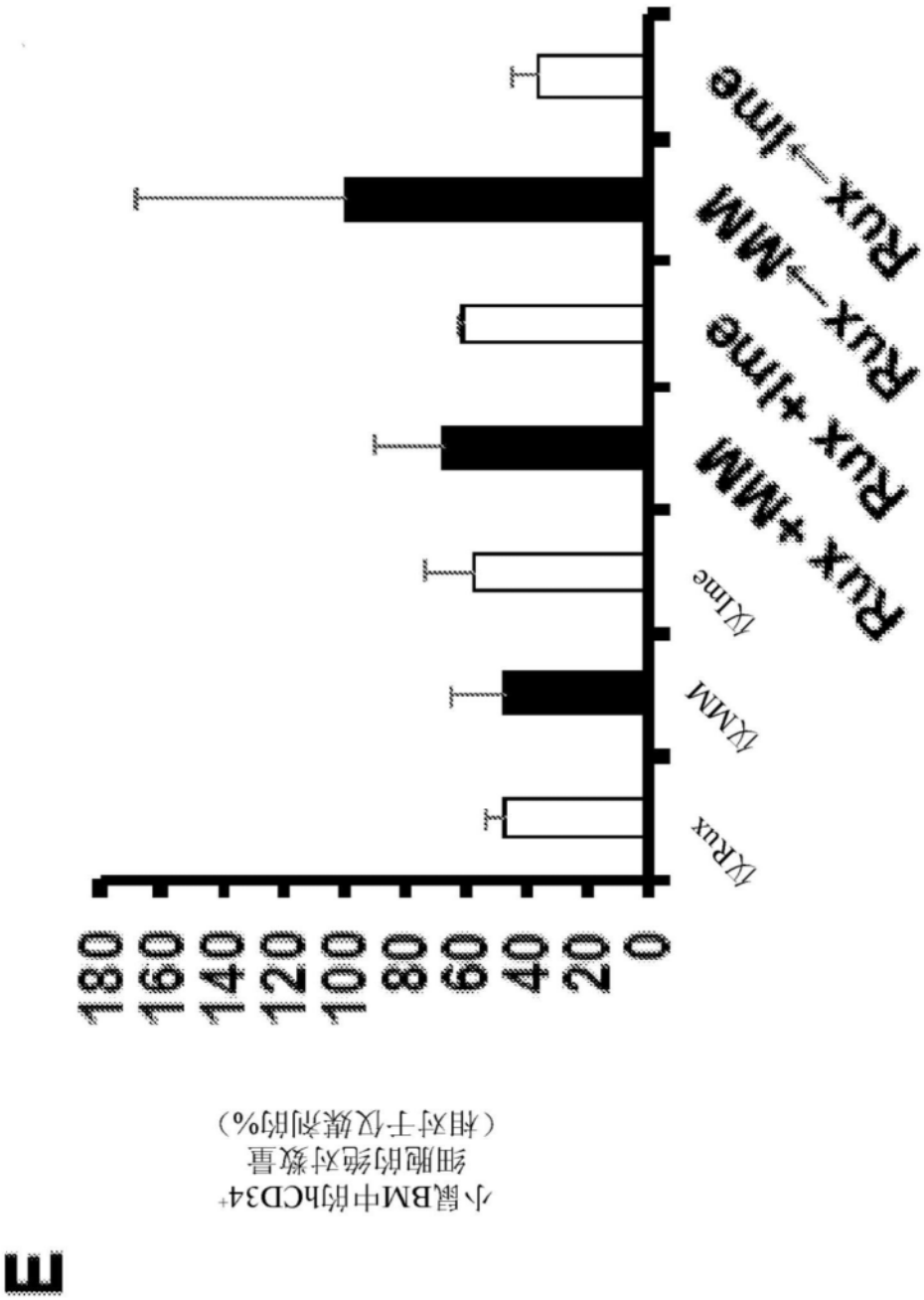

小鼠BM中的hCD34+
细胞的绝对数量
（相对于仅媒剂的%）
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
仅Rux
仅MM
仅Lime
Rux +MM
Rux +lime
Rux→MM
Rux→lime

图10续

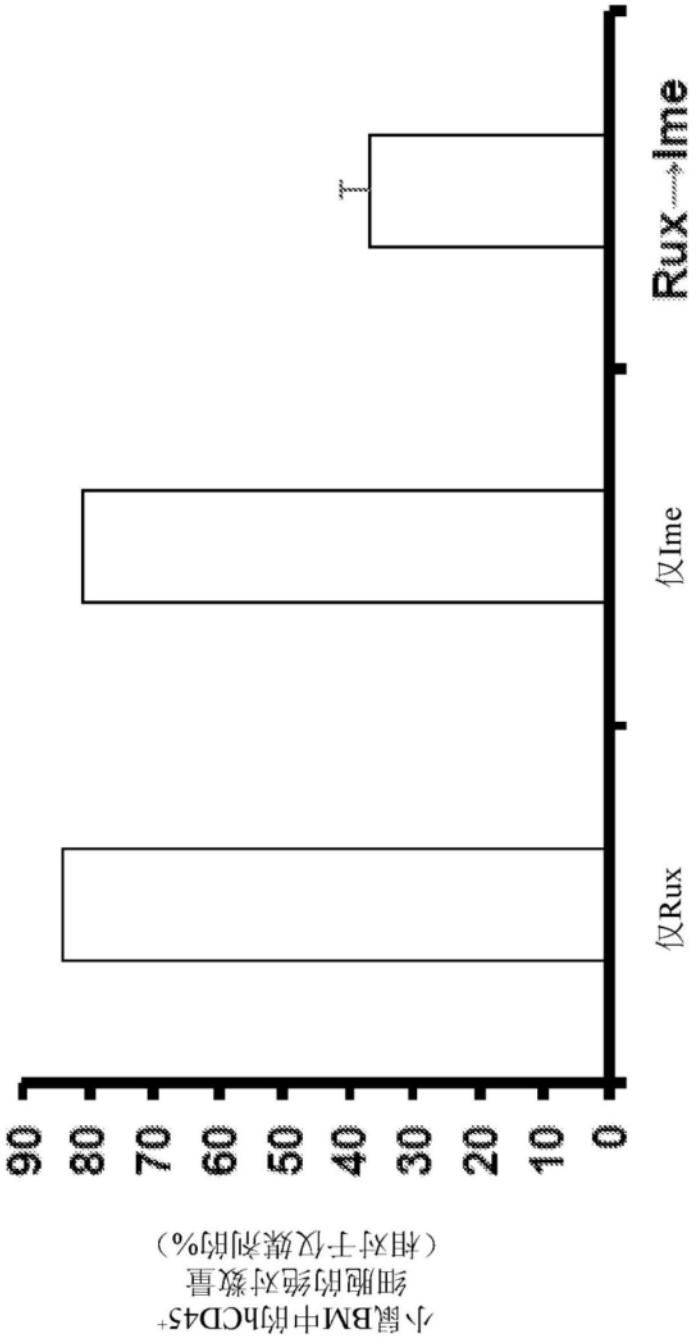

小鼠BM中的hCD45+
细胞的绝对数量
（相对于仅媒剂的%）
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
仅Rux
仅Ime
Rux⟶Ime

图11

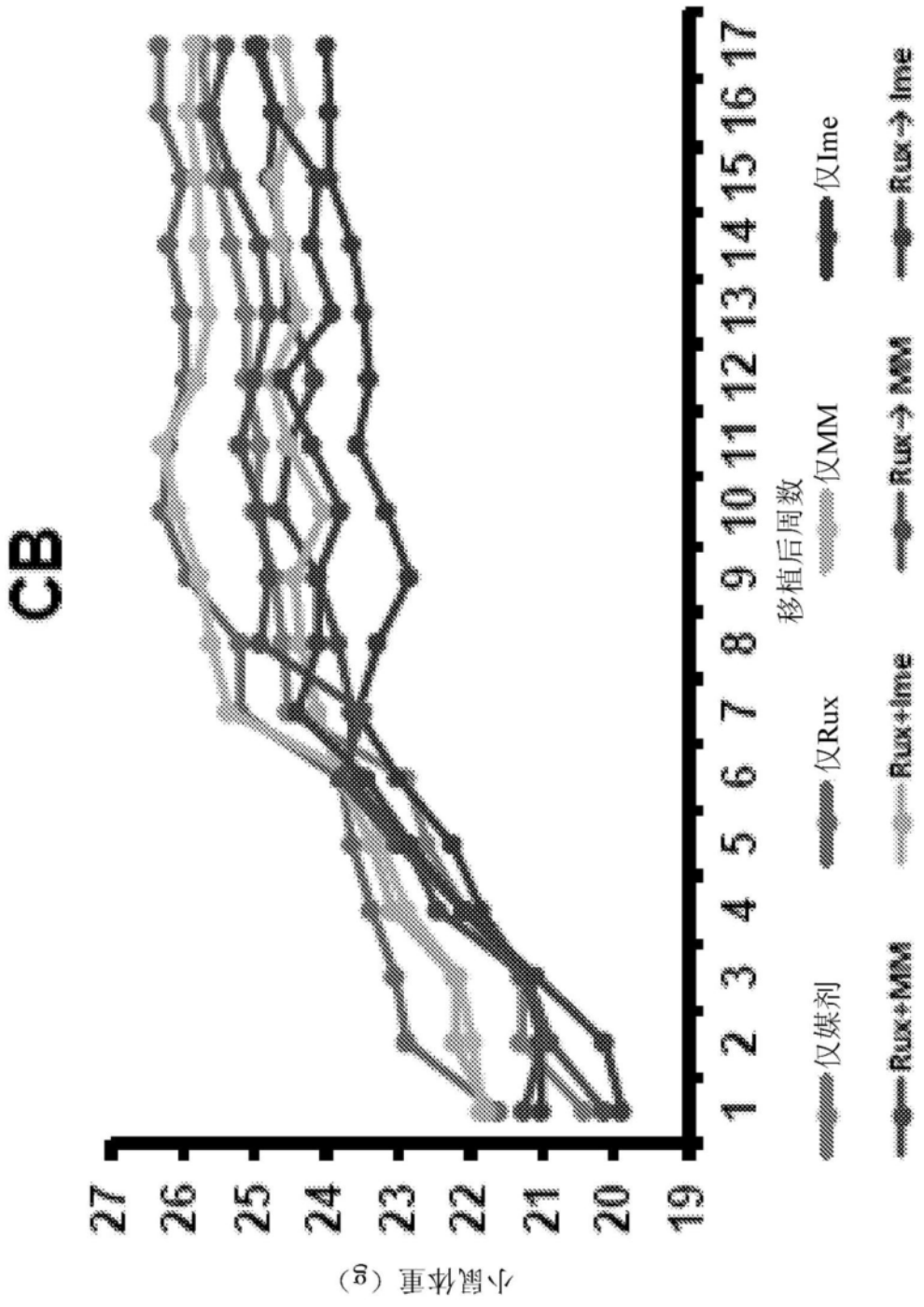

CB
小鼠体重（g）
27
26
25
24
23
22
21
20
19
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
移植后周数
仅媒剂
仅Rux
Rux+Ime
Rux+MM
仅MM
仅Ime
Rux→ MM
Rux→ Ime

图12A

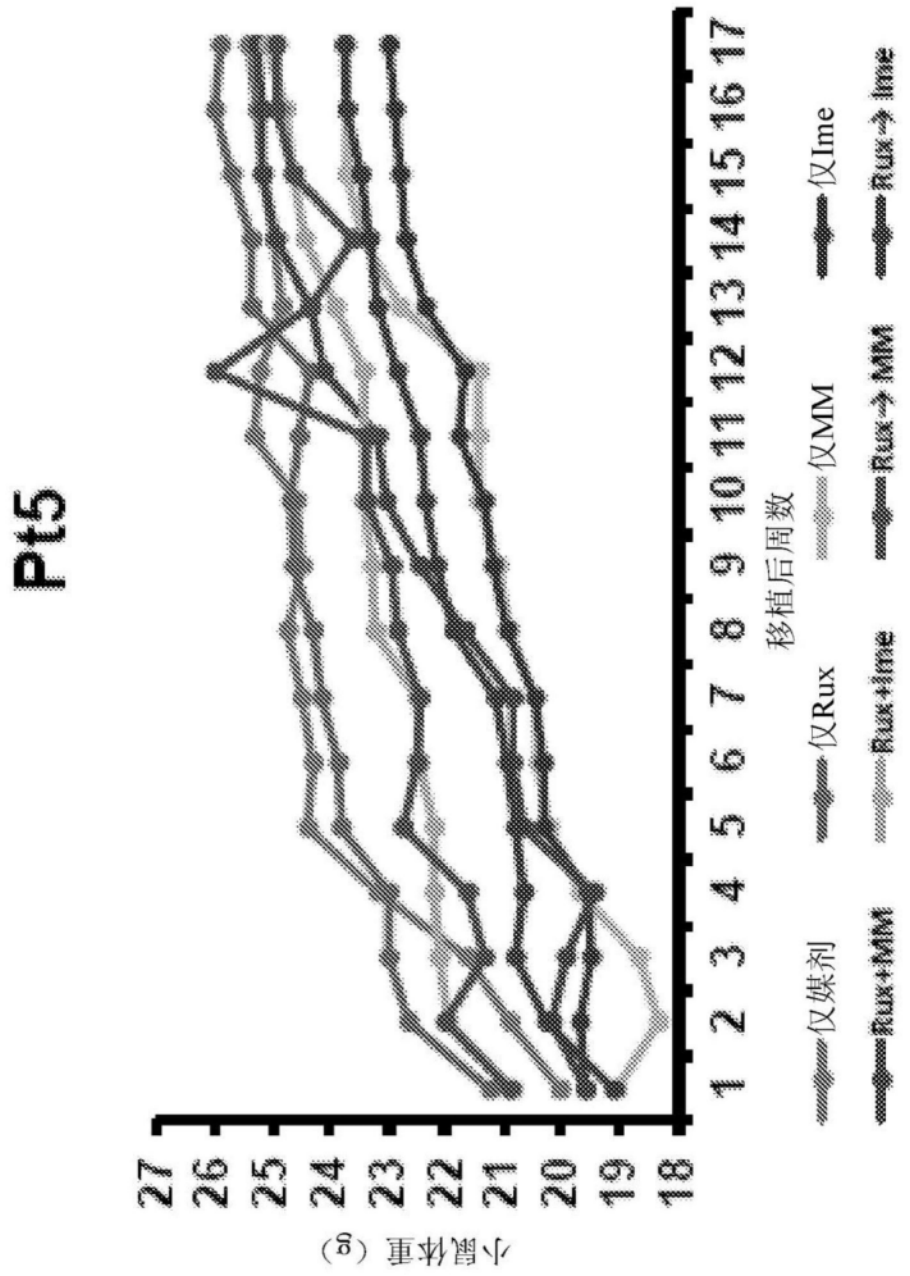

Pt5
小鼠体重（g）
27
26
25
24
23
22
21
20
19
18
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
移植后周数
仅媒剂
仅Rux
仅MM
仅Ime
Rux+MM
Rux+Ime
Rux→ MM
Rux→ Ime

图12B