

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390689 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.19

(51) Int. Cl. A61K 31/4995 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.23

(54) КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ tTF-NGR, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ
САРКОМЫ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

(31) 20192984.1

(32) 2020.08.26

(33) EP

(86) PCT/EP2021/073234

(87) WO 2022/043245 2022.03.03

(71) Заявитель:
АНТЮРЕК ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Бердель Вольфганг Э. (DE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим трабектедин или белок tTF-NGR, для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии: (a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и (b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR.

A1

202390689

202390689

A1

**КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ tTF-NGR, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ
САРКОМЫ МЯГКИХ ТКАНЕЙ****Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к применению tTF-NGR и трабектедина для лечения рака, в частности, саркомы мягких тканей. Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация tTF-NGR и трабектедина обеспечивает улучшенную, предпочтительно синергетическую, терапевтическую активность. Не привязываясь к теории, улучшение может быть вызвано несколькими эффектами. Оклюзия сосудистой опухоли с помощью tTF-NGR продлевает внутриопухолевое накопление трабектедина, что приводит к более высокой противоопухолевой эффективности. Кроме того, более высокая внутриопухолевая прокоагулянтная активность tTF-NGR может быть вызвана индукцией раннего апоптоза в опухолевых клетках и опухолевых эндотелиальных клетках трабектедином, что приводит к более высоким уровням фосфатидилсерина (PS) в этих клетках.

Предпосылки создания изобретения

Саркома мягких тканей (STS) представляет собой редкую группу гетерогенных мезенхимальных опухолей, происходящих из соединительной ткани. STS состоит из более чем 100 различных подтипов, которые в совокупности составляют 1% всех случаев рака у взрослых, а частота STS при саркоме в Европе колеблется между 2-5/100000 в год. Они возникают в любом месте организма, частыми локализациями являются конечности, туловище, забрюшинное пространство и голова/шея. Точный гистопатологический диагноз и классификация, а также определение стадии опухоли с помощью визуализации важны, поскольку они влияют на междисциплинарную терапию, которую лучше всего проводить в опытных референтных центрах. Из-за гетерогенности и редкости заболевания диагностика часто бывает поздней.

Хирургия является первой линией лечения ранней стадии STS и локализованного STS. Однако отдаленные метастазы встречаются у многих пациентов, особенно у пациентов с опухолями высокой степени злокачественности. Для пациентов с нерезектабельным STS химиотерапия является стандартом лечения, а терапевтический подход является мультидисциплинарным. В случаях с метастатическим заболеванием терапевтическая цель часто ограничивается паллиативным лечением и/или продлением времени выживания без прогрессирования, а не излечением. Системная терапия первой линии основана на монотерапии доксорубицином или в некоторых комбинациях, таких как доксорубицин и ифосфамид. Комбинация гемцитабина и доцетаксела, по-видимому, столь же эффективна, как и доксорубицин, но вызывает более выраженную гематотоксичность и иногда используется для терапии второй линии. Помимо традиционной химиотерапии, трабектедин, пазопаниб и эрибулин являются альтернативой терапии второго и последующих линий, а эрибулин только при липосаркоме. Однако общая выживаемость

пациентов с распространенным STS в целом остается низкой. Таким образом, существует неудовлетворенная медицинская потребность в новых терапевтических мишенях и средствах для лечения этой группы заболеваний.

Рост и распространение опухолей зависят от внутриопухолевой неоваскуляризации для доставки питательных веществ и кислорода и удаления продуктов метаболизма. Опухолевые эндотелиальные клетки (ТЕС) необходимы для построения опухолевых сосудов и среди других типов клеток, таких как фибробласты и некоторые миелоидные и иммунные клетки, относятся к поддерживающей опухоль строме. ТЕС экспрессируют новые мишени, отсутствующие в покоящихся эндотелиальных клетках зрелой сосудистой сети организма. Некоторые из этих мишеней ТЕС клинически значимы для антиангиогенной терапии рака, что привело к многочисленным препаратам, одобренным для лечения рака (например, бевацизумаб (анти-VEGF моАВ), афлиберцепт (ловушка VEGF), рамуцирумаб (анти-VEGF-R моАВ), сунитиниб, сорафениб, пазопаниб (примеры ингибиторов тирозинкиназы для рецепторов тирозинкиназы ТЕС)). Терапевтическая активность этих препаратов ограничивается увеличением выживаемости на несколько месяцев, а появление резистентности ограничивает подход.

Концептуально отличным от антиангиогенного лечения является антисосудистый подход. Противососудистые препараты не только препятствуют формированию сосудов, но и направлены на разрушение новых сосудов, уже присутствующих в опухолях. Denekamp et al. предложили существующие опухолевые сосуды и опухолевые эндотелиальные клетки в качестве носителей-мишеней для антисосудистой терапии (Denekamp et al., *Br.J. Cancer*, 1982). Сосудистая сеть опухоли действительно представляет собой терапевтические мишени для антиангиогенной терапии, разрушения сосудов или окклюзии сосудов и тромбоза с последующим инфарктом опухоли. Huang et al. представили концепцию окклюзии опухолевых сосудов с помощью целевого тканевого фактора (TF) (Huang et al., *Science*, 1997). Pasqualini et al. охарактеризовали небольшие пептиды, содержащие NGR (аспарагин-глицин-аргинин), связывающиеся с аминопептидазой N (APN, также известной как CD13) в качестве мишени для сосудов опухоли (Pasqualini et al., *Cancer Res.*, 2000). Было показано, что CD13 способствует ангиогенезу, росту опухоли и метастазированию (Guzman-Rojas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012), а также было показано, что он имеет прогностическое значение для пациентов с раком некоторых, но не всех исследованных гистологий (Tokuhara et al., *Clin. Cancer Res.*, 2006).

Трабектедин представляет собой тетрагидроизохинолиновый алкалоид, доступный как Yondelis® от компании Pharma Mar, Madrid, Spain. Трабектедин был впервые выделен из карибского асцидия *Ecteinascidia turbinata*, но в настоящее время он производится синтетическим путем и зарегистрирован в Европе и других странах для лечения взрослых пациентов с запущенной саркомой мягких тканей (Germano et al., *Cancer Cell*. 2013; 23(2):249-262). Трабектедин действует как ДНК-связывающий агент, и связывание с двойной спиралью ДНК приводит к интерференции с несколькими факторами транскрипции, ДНК-связывающими белками и путями репарации ДНК, что приводит к

остановке клеточного цикла G2/M и, в конечном итоге, к апоптозу. Кроме того, было обнаружено, что трабектедин обеспечивает терапевтический вариант для метастатической липо- и лейомиосаркомы, а также является многообещающим кандидатом для лечения синовиальных сарком и недифференцированной плеоморфной саркомы высокой степени злокачественности (De Santis et al., Drug Design, Develop. and Therapy 9: 5785-5791, 2015).

Однако тромбогенные средства, нацеленные на сосуды, теоретически могут вызывать серьезные системные побочные эффекты, такие как легочная эмболия или инсульт. Следовательно, разработка безопасных и эффективных режимов дозирования для терапевтического применения агентов, нацеленных на сосуды, имеет огромное доклиническое и клиническое значение.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация tTF-NGR и трабектедина обеспечивает улучшенную, предпочтительно синергетическую, терапевтическую активность.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей трабектедин, для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии:

- (a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и
- (b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR.

Настоящее изобретение относится также к композиции, содержащей белок tTF-NGR, для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии:

- (a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и
- (b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR.

В одном варианте осуществления изобретения рак у индивидуума является неоперабельным, метастатическим или рефрактерным.

В следующем варианте осуществления изобретения рак представляет собой саркому мягких тканей и, предпочтительно, выбран из группы, включающей: недифференцированную липосаркому, миксоидную липосаркому, плеоморфную липосаркому, фибросаркому взрослых, миксофибросаркому, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, ангиосаркому, синовиальную саркому и недифференцированную саркому.

В другом варианте осуществления изобретения композицию, содержащую трабектедин, и композицию, содержащую tTF-NGR, вводят индивидууму посредством внутривенной инфузии.

В еще одном варианте осуществления изобретения композицию, содержащую трабектедин, вводят индивидууму посредством 24-часовой внутривенной инфузии. Предпочтительно, трабектедин вводят в дозе 1,5 мг/м².

В предпочтительном варианте осуществления изобретения белок tTF-NGR содержит или имеет последовательность SEQ ID NO: 2. В альтернативном варианте осуществления изобретения белок tTF-NGR имеет последовательность SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 содержит SEQ ID NO: 1 и N-концевую His-метку, которая содержит 46 N-концевых аминокислотных остатков. Хотя N-концевая His-метка сохранялась в белке, используемом в приведенных ниже примерах, понятно, что это не является необходимым для активности белка. SEQ ID NO: 1 и 2 дополнительно содержат последовательность tTF, аминокислоты с 47 по 264 из SEQ ID NO: 2, и последовательность NGR, аминокислоты с 265 по 271 из SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления изобретения первое введение белка tTF-NGR начинают между 1 минутой и 1 часом после окончания введения трабектедина. Предпочтительно, белок tTF-NGR вводят индивидууму посредством 1-часовой внутривенной инфузии. Более предпочтительно, введение белка tTF-NGR повторяют один раз в день в течение следующих 4 последовательных дней после введения трабектедина.

В следующем варианте осуществления изобретения белок tTF-NGR вводят в дозе 3 мг/м²/день. Предпочтительно, белок tTF-NGR вводят в 0,9% растворе NaCl в общем объеме инфузии 100 мл. Более предпочтительно, белок tTF-NGR вводят через центральный венозный порт.

Описание фигур

Фигура 1: схематическая иллюстрация структуры ведущего соединения tTF-NGR с N-концевой His-меткой для детекции и очистки полноразмерного tTF и целевого пептида с NGR-мотивом на C-конце.

Фигура 2: иллюстрация нацеливания и аккумуляции активности TF на сосудистую сеть опухоли, индукции тромбоза опухолевых сосудов и инфаркта, приводящих к гибели опухолевых клеток. **A**, Компоненты инфаркта опухолевых сосудов в начале терапии, и **B**, во время свертывания опухолевых сосудов. FXa, фактор X активирован (голубой), FVIIa, фактор VII активирован (синий).

Фигура 3: иллюстрация терапевтической активности и способов действия tTF-NGR с помощью различных методов визуализации. **1.** Голубоватая окраска опухоли (**A**, слева: tTF-NGR. **A**, справа: контроль носителя) через несколько часов после инъекции tTF-NGR, макроскопически визуализирующий скопление крови и нарушение сосудов. **2.** Внутрисосудистая магнитно-резонансная томография (МРТ) с усилением контраста опухоли, показывающая анатомию опухоли (**A**, **B**) и резкое снижение кровотока с высокого кровотока (**C**) до низкого (**D**) через несколько часов после применения tTF-NGR. Доля сосудистого объема количественно определялась как уменьшение $>1 \log$. **3.** Окрашивание H&E ткани ксенотрансплантата саркомы (**A**, тромбоз, скопление крови и нарушение сосудов после tTF-NGR; **B**, контроль солевым раствором с нормальной сосудистой сетью). **4.** Визуализация флуоресцентного отражения *in vivo*, показывающая сосудистую анатомию с помощью внутрисосудистого флуоресцентного фибрина после tTF-NGR (**B**). **A**, перед tTF-NGR; **B**, через 1 час после tTF-NGR; **C**, нарушение сосудов через 24 часа после tTF-NGR.

Фигура 4: иллюстрация синергической активности tTF-NGR и трабектедина в эндотелиальных клетках сосудов человека (HUVEC). **А,** Один из примеров эксперимента по проточной цитометрии, показывающий активацию PS с помощью трабектедина на клеточных мембранах HUVEC. PS обнаруживается флуоресцентным PS-связывающим аннексином V-FITC. PS-позитивные клетки показаны в правом нижнем квадранте (LR) и увеличиваются с 7,21% без трабектедина до 29,22% с трабектедином (15 нМ, 8 ч инкубации). **В,** Оценка 7 различных экспериментов с различными дозами трабектедина, индуцирующими активацию PS в HUVEC через 8 и 12 часов за счет увеличения дозы трабектедина (значения P для всех временных точек <0,0001 по сравнению с контролем без трабектедина (NTC)). В качестве контроля внутреннего некроза использовали пропидий йодид. **С,** Трабектедин-зависимое повышение прокоагулянтной активности HUVEC при связывании tTF-NGR (черный, без трабектедина, серый, с трабектедином (10 нМ, 8 ч)) и полное устранение этого эффекта за счет маскирования PS аннексином V в разных дозах. Средние значения 3 экспериментов с не менее чем 4-кратным анализом в каждом+стандартная ошибка и p-значения.

Фигура 5: иллюстрация синергической активности tTF-NGR и трабектедина в клетках саркомы человека HT1080. **А,** Оценка 6 различных экспериментов с 10 нМ трабектедина (серый) и 8-часовым временем инкубации, показывающая значительную активацию PS на клетках саркомы HT1080 по сравнению с контролем без трабектедина (черный). Среднее значение+стандартная ошибка (значение $p=0,001$). В качестве контроля внутреннего некроза использовали пропидий йодид. **В,** Трабектедин-зависимое повышение прокоагуляционной активности саркомы HT1080 при связывании tTF-NGR (черный, без трабектедина, серый, с трабектедином (10 нМ, 8ч)) и полная отмена этого эффекта путем маскирования PS аннексином V при различных дозах. Средние значения 4 экспериментов+стандартная ошибка и p-значения.

Фигура 6: терапевтические результаты комбинации трабектедина с tTF-NGR *in vivo* в модели ксенотрансплантата HT1080 STS. **Контроль,** PBS в/в; **tTF-NGR** 1 мг/кг, день 0; **трабектедин** 0,1 мг/кг день 0; **комбинация,** трабектедин плюс tTF-NGR (5 ч после трабектедина) с идентичными дозами и временным режимом (контроль n=8, tTF-NGR n=9, трабектедин n=9, комбинация n=11).

Подробное описание изобретения

Противососудистые соединения в виде бифункциональных молекул, нацеленных на специфическую структуру ТЕС с одним фрагментом и имеющих противоопухолевую полезную нагрузку в качестве второго фрагмента, были известны из предшествующего уровня техники. Этот класс соединений, нацеленных на сосуды, направлен на нацеливание более чем на один тип опухоли через общую сосудистую сеть опухоли. Препараты, нацеленные на опухолевые клетки, содержащие только один гистологический объект, были одобрены для лечения конкретных опухолей, таких как моАВ к молекулам, связанным с опухолевыми клетками, несущим токсины (брентуксимаб ведотин (CD30+ болезнь Ходжкина), трастузумаб эмтансин (HER2+ рак молочной железы)).

Был разработан еще один класс слитых белков, названный tTF-NGR, где неспецифический мембранный якорь тканевого фактора (TF) заменен мотивом NGR, связывающим CD13. CD13 представляет собой аминопептидазу, избирательно встречающуюся на стимулированных и растущих ЕС, как и на ТЕС, с низкой экспрессией в других тканях (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000166825-ANPEP/tissue>). В некоторых нормальных тканях, таких как мелкие желчные протоки, экспрессия CD13, кроме того, более чем присутствует, но не мешает применению CD13-направленного TF, поскольку эта молекула активна только в коагуляционно-компетентном месте, например, в кровеносных сосудах, а не где-либо еще. С этим слитым белком (фигура 1) активность TF направлена и накапливается в сосудистой сети опухоли, и индуцируются тромбоз опухолевых сосудов и инфаркт, что приводит к гибели опухолевых клеток (фигура 2).

Эти слитые белки были протестированы *in vitro* и *in vivo* на основные терапевтические свойства, такие как прокоагулянтная активность, специфическое связывание с соответствующими молекулами-мишенями на стимулированных эндотелиальных клетках (ЕС) или перидитах, внутриопухолевая аккумуляция *in vivo*, внутриопухолевая активация коагуляции *in vivo*, окклюзия сосудов опухоли и ингибирование кровотока, фармакодинамические свойства, включая терапевтическую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатах опухолей человека различного гистологического происхождения, и, наконец, безопасность для грызунов и животных, не относящихся к грызунам, и токсикологию. Как показали экспериментальные результаты, сохраняя полную прокоагулянтную активность, tTF-NGR специфически связывается с CD13 на растущих ЕС, что приводит к окклюзии опухолевых сосудов и инфаркту с последующим торможением роста опухоли и регрессией (фигура 3). Доклиническая терапевтическая активность tTF-NGR не зависела от гистологии опухоли (например, меланомы, легкого, молочной железы, саркомы, глиобластомы). Повторные циклы лечения не выявили развития резистентности.

Помимо конкретных преимуществ tTF-NGR авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация tTF-NGR и трабектедина может проявлять синергетическую терапевтическую активность. Трабектедин представляет собой противоопухолевый препарат, первоначально выделенный из *Ecteinascidia turbinata*, морской асидии. Препарат проявляет свою противоопухолевую активность, связываясь с малой бороздкой ДНК в процессе репликации, вызывая двухцепочечные разрывы двойной спирали. Более того, было обнаружено, что трабектедин обладает плеiotропным механизмом действия в регуляции медиаторов воспаления в микроокружении опухоли. Этот эффект возможно достигается за счет селективного ингибирования продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6), хемокиновый лиганд 2 (CCL2), связывающий матрикс белок пентраксин 3 (PTX3) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Кроме того, трабектедин истощает макрофаги в опухолевой ткани, и нацеливание на макрофаги, по-видимому, является ключевым компонентом его противоопухолевой активности. Трабектедин в качестве монотерапии обычно используется

в качестве стандартной терапии 2-й линии метастатического или рефрактерного STS. В комбинации tTF-NGR с трабектедином, как показано в настоящем изобретении, оба препарата продемонстрировали повышенную антисаркомную активность по сравнению со стандартной монотерапией трабектедином или монотерапией tTF-NGR в модели ксенотрансплантата. Учитывая этот многократный механизм действия трабектедина на опухолевые клетки и различные клетки и молекулярные компоненты стромы опухоли, комбинированная терапевтическая эффективность трабектедина с tTF-NGR была непредвиденной. tTF-NGR продемонстрировал доклиническую активность в ксенотрансплантатах STS человека при окклюзии сосудов опухоли и инфаркте и может улучшать противоопухолевую активность трабектедина в этих моделях *in vivo* путем захвата трабектедина внутри опухоли, что приводит к более сильной противоопухолевой активности с большей продолжительностью. Наоборот, трабектедин увеличивает прокоагулянтную эффективность tTF-NGR в сосудистой сети опухоли. Сторона связывания tTF-NGR, CD13, сильно экспрессируется в сосудистой системе и/или на опухолевых клетках STS человека. Это обеспечивает биомаркер для отбора пациентов для этой комбинации, который можно дополнительно изучить для прогнозирования активности комбинированного лечения.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к клиническим режимам дозирования для использования tTF-NGR и трабектедина в комбинированной терапии для лечения пациентов с раком, в частности, саркомой мягких тканей.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей трабектедин для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии:

(a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и

(b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR (предпочтительно, содержащий или имеющий SEQ ID NO: 2).

Настоящее изобретение относится также к композиции, содержащей белок tTF-NGR, для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии:

(a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и

(b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR (предпочтительно, содержащий или имеющий SEQ ID NO: 2).

В другом варианте осуществления изобретения композицию, содержащую трабектедин, и композицию, содержащую tTF-NGR, (предпочтительно, содержащий или имеющий SEQ ID NO: 2) вводят индивидууму посредством внутривенной инфузии.

В одном варианте осуществления изобретения композицию, содержащую трабектедин, вводят индивидууму посредством 24-часовой внутривенной инфузии. Предпочтительно, трабектедин вводят в дозе 1,5 мг/м².

В одном варианте осуществления изобретения белок tTF-NGR имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

Первую дозу белка tTF-NGR можно вводить через 1 минуту и 1 час после окончания введения трабектедина. Предпочтительно, белок tTF-NGR вводят индивидууму посредством 1-часовой внутривенной инфузии. Более предпочтительно, введение белка tTF-NGR повторяют один раз в день в течение следующих 4 последовательных дней после введения трабектедина, например: трабектедин с 8:00 понедельника до 8:00 вторника, затем tTF-NGR во вторник не позднее 9:00 утра и в последующие дни (последний tTF-NGR в пятницу).

В следующем варианте осуществления изобретения белок tTF-NGR вводят в дозе 3 мг/м²/день. Предпочтительно, белок tTF-NGR вводят в 0,9% растворе NaCl в общем объеме инфузии 100 мл. Более предпочтительно, белок tTF-NGR вводят через центральный венозный порт.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится, таким образом, к композиции, содержащей трабектедин или белок tTF-NGR, для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии:

(а) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и

(b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR, имеющий SEQ ID NO: 2; и

где трабектедин вводят индивидууму посредством 24-часовой внутривенной инфузии; и

где первое введение белка tTF-NGR начинают между 1 минутой и 1 часом после окончания введения трабектедина; и

где белок tTF-NGR вводят индивидууму посредством 1-часовой внутривенной инфузии; и

где введение белка tTF-NGR повторяют один раз в день в течение следующих 4 последовательных дней после введения трабектедина.

Предпочтительно, продолжительность цикла лечения составляет 3 недели. Пациентов лечат повторяющимися циклами до определенного прогрессирования заболевания (iRECIST; Seymour L, *Lancet Oncol.* 2017) при отсутствии других критериев отмены и до тех пор, пока ни пациент, ни исследователь не требуют прекращения лечения.

В одном варианте осуществления изобретения рак у индивидуума является неоперабельным, метастатическим или рефрактерным. В следующем варианте осуществления изобретения рак представляет собой саркому мягких тканей и, предпочтительно, выбран из группы, включающей: дедифференцированную липосаркому, миксоидную липосаркому, плеоморфную липосаркому, фибросаркому взрослых, миксофибросаркому, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, ангиосаркому, синовиальную саркому и недифференцированную саркому.

Если не указано иное, для целей настоящей заявки предполагается, что следующие термины имеют значения, указанные ниже, как они используются в описании и формуле изобретения.

«Пациенты» относятся к млекопитающим, предпочтительно, к человеку. В некоторых вариантах осуществления пациентами являются пациенты, у которых стандартное лечение 1-й линии оказалось неэффективным или которые не подходят для стандартного лечения.

«Терапевтически эффективное количество» означает количество соединения, которое при введении субъекту для лечения болезненного состояния достаточно для осуществления улучшения такого болезненного состояния.

«Трабектин» относится к регистрационному номеру CAS тетрагидроизохинолинового алкалоида (Chemical Abstracts Service) 0114899-77-3, описанному в литературе (например, в работе Germano et al., *Cancer Cell*. 2013; 23(2):249-262) и доступному как Yondelis® от компании Pharma Mar, Madrid, Spain.

«Лечение/излечение» означает любое введение терапевтически эффективного количества соединения и включает:

ингибирование заболевания у людей, которые испытывают или проявляют патологию или симптоматику заболевания (то есть замедление дальнейшего развития патологии и/или симптоматики), или

облегчение течения заболевания у людей, у которых наблюдается или проявляются патология или симптоматика заболевания (то есть реверсирование патологии и/или симптоматики).

«iRECIST» относится к серии модификаций «Критериев оценки ответа при солидных опухолях» (RECIST версии 1.1), которые учитывают очевидный рост опухоли, который иногда происходит до того, как опухолевая нагрузка начинает уменьшаться - явление, известное как псевдопрогрессия. Эти реакции возникают у небольшой, но значимой части пациентов, получающих ингибиторы контрольных точек и другие иммуномодулирующие агенты. Руководство iRECIST (Seymour L, *Lancet Oncol*. 2017) было разработано группой под руководством Лесли Сеймура, доктора медицинских наук, онколога из Канадской группы исследований рака, базирующейся в Королевском университете в Кингстоне, Онтарио.

«PFS» относится к выживаемости без прогрессирования в соответствии с iRECIST на 15 неделе (то есть после 5 циклов), затем на 24, 33, 42 и 51 неделях (то есть каждые 9 недель или после 3 циклов с поправкой на продолжительность цикла 3 недели), а затем каждые 3 месяца. Причина использования iRECIST модификации RECIST для оценки заключается в наблюдении в рамках доклинических исследований и клинических случаев, что при применении tTF-NGR может возникать внутриопухолевый отек из-за скопления крови и разрыва сосудов, что приводит к псевдопрогрессированию.

«OS» относится к общей выживаемости через 12 и 18 месяцев.

«CR» относится к полному ответу, что означает исчезновение всех поражений-мишеней. Любые патологические лимфатические узлы (как целевые, так и нецелевые) должны иметь редукцию по короткой оси до <10 мм.

«PR» относится к частичному ответу, что означает уменьшение суммы диаметров поражений-мишеней не менее чем на 30% с использованием исходных суммарных диаметров в качестве эталона.

«PD» относится к прогрессирующему заболеванию, что означает не менее чем 20-процентное увеличение суммы диаметров поражений-мишеней с использованием наименьшей суммы в исследовании в качестве эталона (включая исходную сумму, если она является наименьшей в исследовании). Помимо относительного увеличения на 20%, сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм. (Примечание: появление одного или нескольких новых поражений также считается прогрессированием; необходимо соблюдать правила, описанные в главе 6.1.1, прежде чем можно будет использовать прогрессирование для прекращения лечения пациента).

«SD» относится к стабильному заболеванию, что означает, что не наблюдается ни достаточного уменьшения, чтобы квалифицировать PR, ни достаточного увеличения, чтобы квалифицировать PD, с использованием наименьших суммарных диаметров в качестве эталона в исследовании.

«TF» относится к тканевому фактору, известному белку тканевого фактора, описанному в предшествующем уровне техники, например, в работе Huang et al., *Science*, 1997.

«tTF» относится к известной укороченной активной форме аминокислот с 33 по 251, белку тканевого фактора, также описанному in Huang et al., *Science*, 1997. Последовательность tTF охватывается последовательностью слитого белка SEQ ID NO: 1 и 2 (аминокислоты с 47 по 264 из SEQ ID NO: 2).

Пример 1. Улучшенная терапевтическая активность tTF-NGR и трабектедина

Научная гипотеза сочетания tTF-NGR и трабектедина заключается в том, что проапоптотическая активность трабектедина в отношении клеток эндотелия сосудов человека (HUVEC), а также опухолевых клеток значительно увеличивает присутствие фосфатидилсерина (PS) на внешней листке фосфолипидного двойного слоя, образующего клеточную мембрану (см. фиг. 4 А и В для HUVEC в качестве примера), и за счет этой оптимизированной фосфолипидной среды во внешней клеточной мембране усиливается прокоагулянтная эффективность tTF-NGR в комплексе tTF-NGR:фактор VIIa:фактор X на клеточной мембране (фиг. 4 С). Этот эффект особенно зависит от присутствия PS, поскольку его можно полностью устранить, маскируя PS путем предварительной инкубации с аннексином V.

Поскольку в опухолевых тканях часть внутреннего сосудистого клеточного слоя новой сосудистой сети образована не эндотелиальными клетками, а также опухолевыми клетками, что называется «сосудистой мимикрией», аналогичные эксперименты проводились также с клетками саркомы человека HT1080 вместо HUVEC (см. фигуру 5).

Чтобы использовать улучшенную активность в обоих направлениях, комбинацию трабектедина с tTF-NGR исследовали с использованием фармакокинетического подхода, применяя tTF-NGR прибл. через 5 часов после введения трабектедина. Результаты

показывают значительное улучшение терапевтической активности по сравнению с двумя отдельными препаратами в модели ксенотрансплантата STS человека HT1080 (фигура 6).

Пример 2. Клиническая фаза I исследования tTF-NGR

tTF-NGR был получен с использованием E. coli с помощью производственного процесса клинического качества и 4-ступенчатой очистки путем ВЭЖХ. Производственный процесс и объект GMP одобрены региональным правительством (разрешение производителя Regierungspräsidium) и федеральным институтом Пауля Эрлиха (PEI). Завершена оценка токсичности в соответствии с рекомендациями ЕС S6 и S9 на мышах, крысах, морских свинках и собаках. Ограничивающей токсичностью у наиболее чувствительных видов (мыши) была легочная эмболия, у этого вида tTF-NGR имеет окно терапевтической безопасности 1:4 (терапевтическая доза:доза LD10=1:5).

Обзор клинической фазы I исследования с tTF-NGR представлен в таблице 1.

Идентификационный номер исследования	Дизайн исследования/цели	Популяция/количество субъектов	Режимы дозирования
<u>EudraCT-No:</u> <u>NCT02902237</u>	2016-003042-85 Фаза I исследования tTF-NGR tTF-NGR через центральный венозный доступ в виде ежедневных 1-часовых инфузий в течение 5 дней, каждые 22 дня; допускается внутрииндивидуальное повышение дозы в последующих циклах. Пациентов в рамках этапа повышения дозы лечили последовательно, а не параллельно. Основная цель: Оценка максимальной переносимой дозы (MTD) и дозоограничивающей токсичности (DLT) внутривенных (в/в) инфузионных ежедневных аппликаций tTF-NGR в течение 5 дней каждые 3 недели у пациентов с рецидивирующим или рефрактерным раком, которые получили все стандартное	Пациенты с солидными опухолями и лимфомами на поздних стадиях не поддаются стандартному лечению. <u>Количество субъектов:</u> 24 24 из которых 17 фактически лечили tTF NGR	<u>Начальная доза:</u> 1 мг/м² в день <u>DLT:</u> Дозолимитирующая токсичность (DLT) при 4 и 5 мг/м² в день <u>Группа проверки:</u> RPIID группа проверки с 3,0 мг/м² tTF-NGR в день (x5)

	лечение, известное для их нозологической формы, до включения в исследование. Второстепенные цели: 1. Определение перфузию и объемную долю сосудов измеряемых опухолевых поражений по сравнению с нормальной эталонной тканью до и после применения tTF-NGR с помощью MPT и/или CEUS в качестве биологического суррогатного параметра биологической активности IMP у пациентов, получавших лечение в проверочных когортах. 2. Получение фармакокинетических данных.	
--	---	--

Таблица 1: Клиническое исследование фазы I, проведенное в процессе разработки tTF-NGR.

Было проведено клиническое испытание фазы I (EudraCT-No.: 2016-003042-85; NCT02902237) с применением tTF-NGR в виде 1-часовой инфузии, растворенной в 0,9% NaCl, через центральную венозную магистраль у пациентов с раком на поздней стадии. Это исследование было первым в своем классе, которое проводилось под контролем повторного ультразвукового исследования с контрастным усилением (CEUS) и MPT для оценки снижения кровотока в сигнальных очагах опухоли. В дизайне исследования использовался график «5-день каждые 22 дня».

При дозе 4 мг/м²/день наблюдалась дозолимитирующая токсичность (DLT), так как временный уровень тропонина Tns повышался без каких-либо клинических последствий. Эта чувствительная лабораторная DLT была быстро обратимой и позволяет проводить ранний мониторинг для последующей корректировки дозы в будущих исследованиях. Кроме того, один тромбоз глубоких вен нижних конечностей II степени по CTCAE (у 1 пациента, полностью устранен) также наблюдался при дозе 5 мг/м², тромбоз центральной вены, связанный с катетером, наблюдался при дозе 4 мг/м² (CTCAE II степени и устраненный), а транзиторная ишемическая атака (CTCAE II устраненный) у пациента с ангиосаркомой в левом предсердии наблюдалась при дозе 3 мг/м², события, разумно связанные, но не обязательно вызванные только tTF-NGR. Таким образом, исследование было завершено с рекомендуемой дозой для фазы II (RPID) в 3 мг/м²/день×5, QD 22. Исследуемый лекарственный препарат (IMP) вводят через центральный венозный доступ

PORT в 100 мл 0,9% NaCl в виде инфузии с контролируемой скоростью продолжительностью 1 час.

Фармакокинетические исследования показали, что средний конечный период полувыведения tTF-NGR составляет 8,99 часа. Не было аккумуляции при повторных циклах, так как уровни до лечения всегда достигались до начала следующего цикла.

У больных наблюдалось специфическое угнетение опухолевого кровотока (внутриопухолевого кровообращения), определяемое с помощью CEUS и MRI без снижения кровотока в нормальных органах. Ингибирование кровотока в опухоли достигало >1 логарифмического шага. Далее, в некоторых метастазах при MPT наблюдалось быстрое развитие участков, интерпретируемых как внутриопухолевые кровотоки и участки некроза, аналогичные наблюдениям в моделях ксенотрансплантата. Ни у одного из пациентов, получавших лечение до сих пор, не наблюдалось CR или PR. Однако у двух пациентов было стабильное заболевание (SD) в течение нескольких месяцев после лечения. У нескольких пациентов были обнаружены человеческие антитела к белку слияния (HAFa) без признаков клинических симптомов (анафилактических или анафилктоидных реакций) или нейтрализующей способности при корреляции с ингибированием кровотока в опухоли при MPT или CEUS.

В заключение, tTF-NGR можно безопасно применять, и наблюдения в фазе I представляют собой доказательство принципа ингибирования кровотока опухоли в клинической ситуации и многообещающий терапевтический диапазон. Кроме того, существует несколько эффективных методов противодействия теоретически возникающей системной токсичности (гепарин, COX-ингибиторы, двойное ингибирование тромбоцитов аспирином и ингибиторами P2Y₁₂, фибринолиз).

Пример 3. Дизайн клинического исследования для проверки антисаркомной активности комбинации tTF-NGR и трабектедина.

3.1 Дизайн исследования

Дизайн исследования состоит из фазы II/III открытого рандомизированного контролируемого исследования у субъектов с метастатической или рефрактерной саркомой мягких тканей в течение общей продолжительности 36 месяцев.

Участниками исследования являются пациенты в возрасте от 18 до 75 лет с распространенной или метастатической саркомой мягких тканей после неэффективности антрациклинсодержащей терапии 1-й линии или с противопоказаниями к этим препаратам. Пациенты должны иметь гистологические доказательства распространенной нерезектабельной или метастатической саркомы мягких тканей высокой степени злокачественности (степень 2-3) в соответствии с системой классификации FNCLCC, включая следующие типы опухолей: дедифференцированная липосаркома, миксоидная липосаркома (высокой степени злокачественности), плеоморфная липосаркома, фибросаркома взрослых, миксофибросаркома (высокой степени злокачественности), лейомиосаркома, рабдомиосаркома (альвеолярная, плеоморфная), ангиосаркома, синовиальная саркома, недифференцированная саркома. Положительный результат по

CD13 в центральной гистологии (степень 1+; Kessler T et al. Translational Oncology 2018) является обязательным условием для включения в исследование. Участники должны иметь как минимум одно одномерное поражение, поддающееся измерению с помощью компьютерной томографии, как определено критерием 1.1 iRECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; Seymour L, Lancet Oncol. 2017). Это поражение не должно было подвергаться облучению во время предыдущих процедур. Также требуется, чтобы ожидаемая продолжительность жизни участников составляла не менее 3 месяцев с ECOG ≤ 2 и отсутствовали противопоказания для трабектедина. Зарегистрировано 120 поддающихся оценке пациентов, которые параллельно распределяются в соотношении 1:1 в одну из двух разных групп, как указано ниже. Рандомизация будет разделена на составную оценку CD13 1+/2+ по сравнению с CD13 3+.

Исследование разделено на 2 части, которые выполняются последовательно:

Часть II фазы:

Перед рандомизированной частью III фазы исследования имеется когорта безопасности фазы II, состоящая из 6 пациентов, получающих не менее 3 циклов каждой из комбинаций, указанных в группе 2 (см. ниже, 1,5 мг/м² трабектедина плюс 3 мг/м² tTF-NGR), чтобы подтвердить безопасность этой комбинации. В случае дозолимитирующей токсичности (DLT) в этой когорте фазы II планируется протокол изменения дозы для tTF-NGR до 2 мг/м², а в случае дальнейших проблем с переносимостью планируется дальнейшая деэскалация с шагом 0,5 мг/м² tTF-NGR. Затем безопасная доза переносится на рандомизированную фазу III исследования. Окончательная доза tTF-NGR, признанная безопасной в этой комбинации, должна быть применена к 6 пациентам с 3 циклами для каждого. Рандомизированная (фаза III) часть исследования будет открыта после оценки безопасности в когорте фазы II DSMB.

Часть III фазы:

В части III фазы этого исследования 120 пациентов были рандомизированы 1:1 в две разные группы. Первичной целью является оценка эффективности tTF-NGR в комбинации с трабектедином, измеряемой как медиана выживаемости без прогрессирования в группе комбинированного лечения (группа 2) по сравнению с монотерапией трабектедином (группа 1).

ГРУППА 1: Пациенты получают 1,5 мг/м² трабектедина в виде 24-часовой центральной внутривенной (в/в) инфузии в 1-й день, QD 22× до прогрессирования заболевания или появления противопоказаний к дальнейшему применению (премедикация в соответствии с институциональными рекомендациями: например, 20 мг дексаметазона).

ГРУППА 2: Пациенты получают стандартный трабектедин в соответствии с группой 1 плюс 3 мг/м² tTF-NGR (1-часовая инфузия с регулируемой скоростью, PORT центральный венозный доступ, 100 мл NaCl) в день в течение 4 дней подряд после каждого цикла трабектедина (<1 часовой интервал между окончанием инфузии трабектедина и tTF-NGR: например: трабектедин в понедельник с 8:00 до вторника 8:00, затем tTF-NGR во вторник в

9:00 и в последующие дни (последний tTF-NGR в пятницу), QD 22× до прогрессирования заболевания или появления противопоказаний к дальнейшему применению.

Поскольку оценка результатов исследования основана на назначении лечения, все пациенты после рандомизации являются частью популяции эффективности, согласно оценке центральной оценки iRECIST после окончания исследования.

Терапия в обеих группах может проводиться амбулаторно. Некоторым пациентам может потребоваться госпитализация на 24 часа инфузии трабектедина. Все пациенты получают наилучшую поддерживающую терапию (BSC) в соответствии с институциональными рекомендациями.

Противораковую активность оценивают клинически на 9-й неделе, а также клинически и с помощью визуализации на 15-й неделе, а затем каждые 9 недель (с поправкой на продолжительность цикла в 3 недели) до 51-й недели и затем каждые 3 месяца. Решение о применении следующего цикла на 9 неделе принимается клинически. Начиная с 15-й недели следует визуализация и решение, основанное на клинических данных. Эта процедура подробно описана ниже. Рассчитываются медиана PFS, показатели PFS (iRECIST) и DCR на 15, 24, 33, 42 и 51 (то есть каждые 9 недель или после 3 циклов с поправкой на продолжительность цикла в 3 недели), а затем с 3-месячными интервалами, mOS, частота OS через 12 и 18 месяцев и ORR.

3.2 Оценка безопасности

Оценка безопасности проводится на постоянной основе во время участия в исследовании, включая стандартные лабораторные оценки. Частота АЕ будет суммироваться по степени тяжести у всех пациентов, принимавших хотя бы один раз исследуемое лекарственное средство.

Пациентов лечат повторяющимися циклами до тех пор, пока не будет достигнут один из следующих критериев (при отсутствии каких-либо других критериев отмены):

- 1) неприемлемая токсичность, исключающая дальнейшую терапию,
- 2) прогрессирование заболевания (как описано ниже),
- 3) пациент или исследователь требует прекращения лечения.

Пациенты, прекратившие прием исследуемого препарата при отсутствии прогрессирующего заболевания, не должны получать дальнейшую линейную терапию рака до прогрессирования заболевания, за исключением случаев, когда есть явные причины для продолжения альтернативных методов лечения.

Применение следующего цикла терапии может быть отложено на срок до 21 дня по следующим причинам:

- 1) в связи с клиническим состоянием пациента или
- 2) по решению исследователя после обсуждения с главным исследователем проф.

Шлиманом.

Подробные контрольные визиты после начала терапии проводятся на 9-й и 15-й неделе, затем каждые 9 недель (с поправкой на продолжительность цикла 3 недели) до 51-й недели, а затем с 3-месячными интервалами.

3.3 Оценка противораковой активности комбинации tTF-NGR и трабектедина

В исследовании используется модификация iRECIST для определения прогрессирования и ВБП по аналогии с исследованиями с ингибиторами контрольных точек (Seymour L, Lancet Oncol. 2017). Окончательная оценка iRECIST и сравнение ВБП между обеими группами проводится после окончания исследования слепым методом в независимой основной лаборатории визуализации на кафедре радиологии, LMU, Munich (проф. M. Wildgruber). Специальная оценка iRECIST для определения безопасной ЕОТ для отдельных пациентов проводится местными исследователями в местных исследовательских центрах.

Противораковую активность (модификация iRECIST) оценивают (клинически и визуализируя) на 9-й и 15-й неделе, затем каждые 9 недель (с поправкой на продолжительность цикла 3 недели) до 51-й недели и затем каждые 3 месяца.

Общий ответ оценивается по аналогии с критериями RECIST версии 1.1:

Полный ответ (CR): Исчезновение всех поражений-мишеней. Любые патологические лимфатические узлы (как целевые, так и нецелевые) должны иметь редукцию по короткой оси до <10 мм.

Частичный ответ (PR): уменьшение суммы диаметров целевых поражений не менее чем на 30% с использованием исходных суммарных диаметров в качестве эталона.

Прогрессирующее заболевание (PD): Увеличение суммы диаметров целевых поражений не менее чем на 20% с использованием наименьшей суммы в исследовании в качестве эталона (включая исходную сумму, если она является наименьшей в исследовании). Помимо относительного увеличения на 20%, сумма также должна демонстрировать абсолютное увеличение не менее чем на 5 мм.

Стабильное заболевание (SD): Ни достаточное уменьшение, чтобы квалифицировать PR, ни достаточное увеличение, чтобы квалифицировать PD, используя наименьшие суммарные диаметры в качестве эталона в исследовании.

Лимфатические узлы, идентифицированные как целевые поражения, всегда должны иметь фактическое измерение по короткой оси (измеряемое в той же анатомической плоскости, что и исходное исследование), даже если узлы регрессируют до менее 10 мм в исследовании. Это означает, что, когда лимфатические узлы включены в качестве целевых поражений, «сумма» поражений может быть не нулевой, даже если выполняются критерии CR, поскольку нормальный лимфатический узел определяется как имеющий короткую ось <10 мм. Таким образом, CRF или другие методы сбора данных могут быть разработаны таким образом, чтобы целевые узловое поражения регистрировались в отдельном разделе, где для того, чтобы квалифицироваться как CR, каждый узел должен достигать короткой оси <10 мм. Для PR, SD и PD фактическое измерение узлов по короткой оси должно быть включено в сумму целевых поражений.

3.4 Оценка медианы выживаемости без прогрессирования заболевания (mPFS) и показателей выживаемости без прогрессирования заболевания

Время PFS оценивается для всех рандомизированных субъектов. Продолжительность определяется от рандомизации до прогрессирования или смерти от любой причины. Рассчитывается медиана PFS (mPFS). Показатель PFS по шкале iRECIST оценивают на 15-й неделе (после 5 циклов), затем на 24-й, 33-й, 42-й и 51-й неделях (то есть каждые 9 недель или после 3 циклов с поправкой на продолжительность цикла 3 недели), а затем с 3-месячными интервалами.

3.5 Оценка медианы общей выживаемости (mOS) и показателей общей выживаемости

Выживаемость (mOS) и общая выживаемость

Время OS оценивается для всех рандомизированных пациентов. Продолжительность определяется от рандомизации до смерти от любой причины. Рассчитывают среднее время OS и показатель OS через 12 и 18 месяцев. После этого за выживаемостью пациентов следят во время регулярных контрольных визитов в течение 3 месяцев.

Ссылки:

Denekamp and Hobson, Endothelial-Cell proliferation in experimental tumours, Br.J.Cancer(1982)46,711

De Santis R, Marrari A, Marchetti S, Mussi C, Balzarini L, Lutman FR, Daolio P, Bastoni S, Bertuzzi AF, Quagliuolo V, Santoro A: Efficacy of trabectedin in advanced soft tissue sarcoma: beyond lipo- and leiomyosarcoma. Drug Design, Develop. and Therapy 9: 5785-5791, 2015

Kessler T, Baumeier A, Brand C, Grau M, Angenendt L, Harrach S, Stalman U, Schmidt LH, Gosheger G, Hardes J, Andreou D, Dreischalück J, Lenz G, Wardelmann E, Mesters RM, Schwöppe C, Berdel WE*, Hartmann W*, Schliemann C*: Amino peptidase N (CD13): expression, prognostic impact, and use as therapeutic target for tissue factor induced tumor vascular infarction in soft tissue sarcoma. Translational Oncol. 11 (6): 1271-1282, 2018

Guzman-Rojas et al., Cooperative effects of amino peptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment, PNAS January 31, 2012 109 (5) 1637-1642

Huang et al., Tumor Infarction in Mice by Antibody-Directed Targeting of Tissue Factor to Tumor Vasculature *Science* 24 Jan 1997: Vol. 275, Issue 5299, pp. 547-550

Pasqualini et al., Amino peptidase N is a Receptor for Tumor-homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis, CANCER RESEARCH 60, 722-727, February 1, 2000

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая трабектедин, для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии:

(a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и

(b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR.

2. Композиция, содержащая белок tTF-NGR, для применения при лечении рака у индивидуума, где лечение включает следующие стадии:

(a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей трабектедин, и

(b) последующее введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей белок tTF-NGR.

3. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по п.1 или п.2, где рак у индивидуума является неоперабельным, метастатическим или рефрактерным.

4. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-2, где рак представляет собой саркому мягких тканей и, предпочтительно, выбран из группы, включающей: дедифференцированную липосаркому, миксоидную липосаркому, плеоморфную липосаркому, фибросаркому взрослых, миксофибросаркому, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, ангиосаркому, синовиальную саркому и недифференцированную саркому.

5. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-4, где композицию, содержащую трабектедин, и композицию, содержащую tTF-NGR, вводят индивидууму посредством внутривенной инфузии.

6. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-5, где композицию, содержащую трабектедин, вводят индивидууму посредством 24-часовой внутривенной инфузии.

7. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-6, где трабектедин вводят в дозе 1,5 мг/м².

8. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-7, где белок tTF-NGR содержит или имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

9. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-8, где первое введение белка tTF-NGR начинают между 1 минутой и 1 часом после окончания введения трабектедина.

10. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-9, где белок tTF-NGR вводят индивидууму посредством 1-часовой внутривенной инфузии.

11. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-10, где введение белка tTF-NGR повторяют один раз в день в течение следующих 4 последовательных дней.

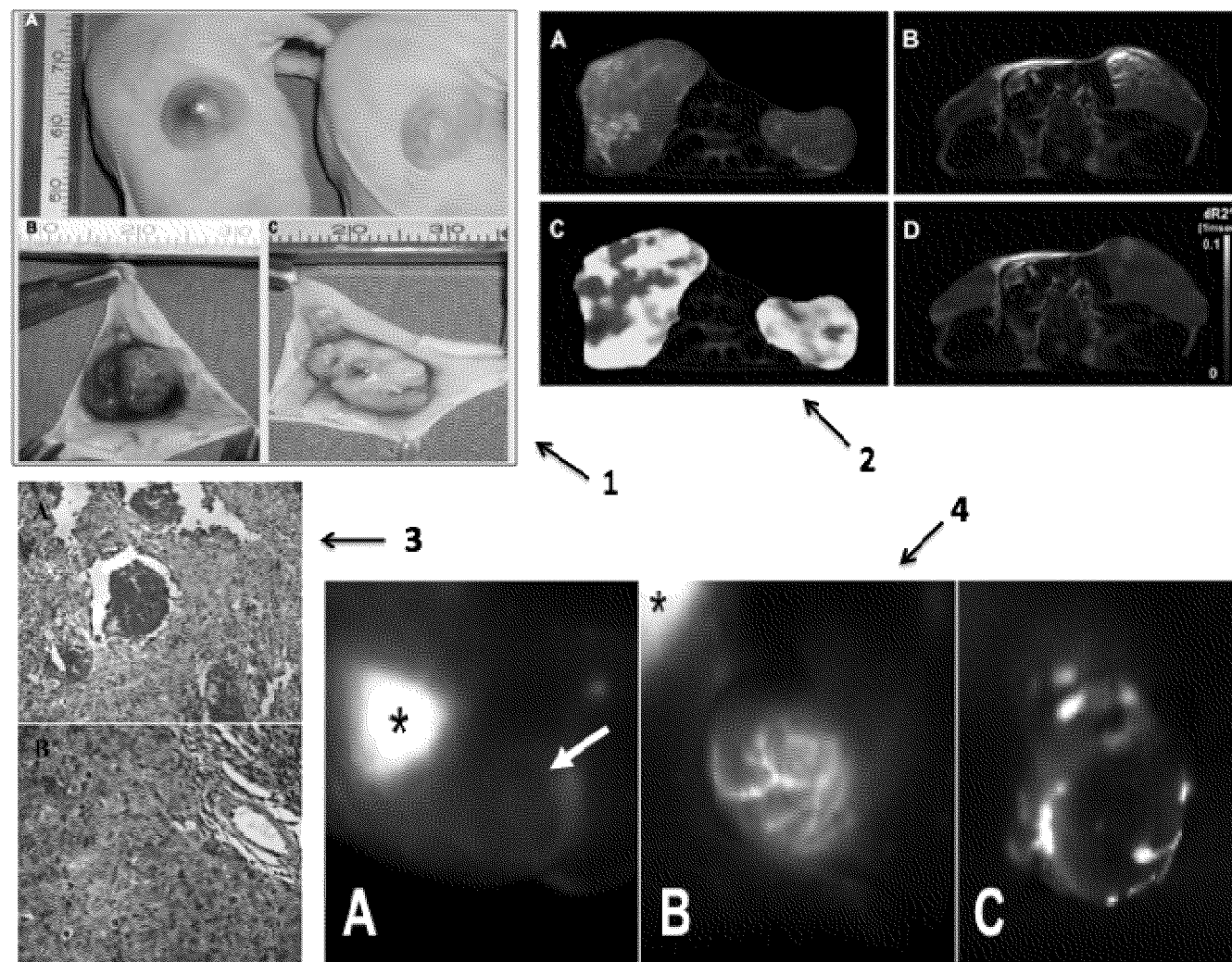
12. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-11, где белок tTF-NGR вводят в дозе 3 мг/м²/день.

13. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-12, где белок tTF-NGR вводят в 0,9% растворе NaCl в общем объеме инфузии 100 мл.

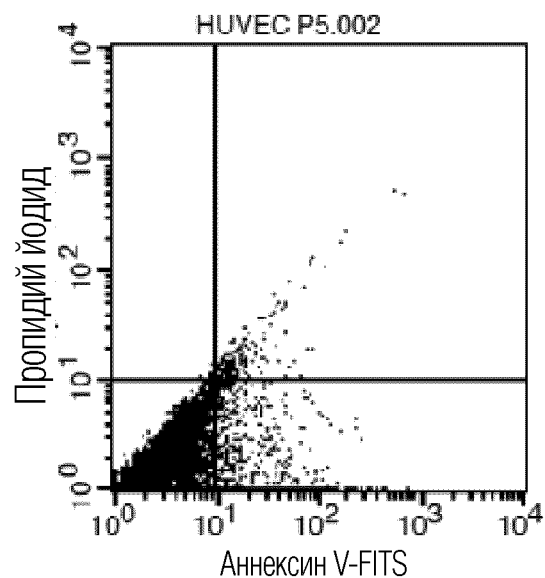
14. Композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей по любому из пп.1-13, где белок tTF-NGR вводят через центральный венозный порт.

По доверенности



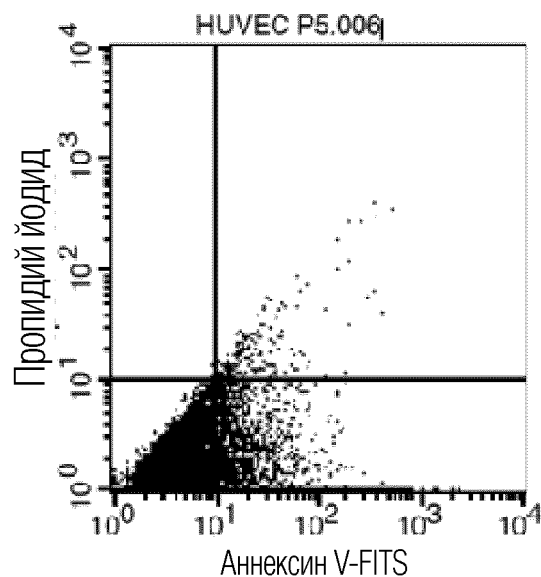


ФИГ. 3



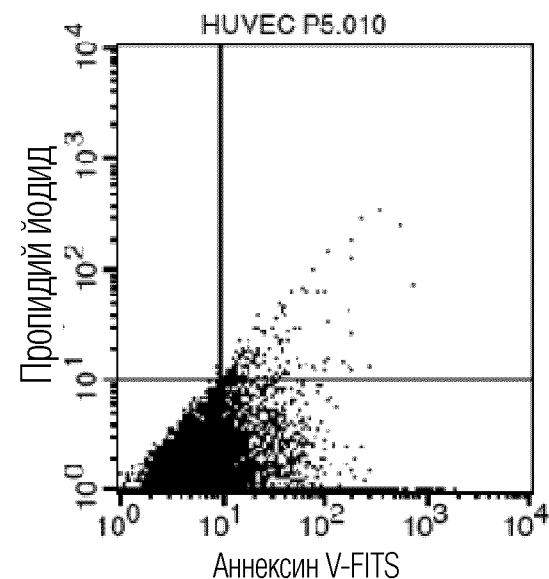
Файл: HUVEC P5.002
 Образец ID: 0nM_8h
 ID пациента: Аннексин V-FITS
 Дата Приобретения: 07-Feb-18
 Всего событий: 10000

Квад	События	% Ворота	% Всего
UL	12	0.12	0.12
UR	168	1.68	1.68
LL	9099	90.99	90.99
LR	721	7.21	7.21



Файл: HUVEC P5.006
 Образец ID: 10nM_8h
 ID пациента: Аннексин V-FITS
 Дата Приобретения: 07-Feb-18
 Всего событий: 10000

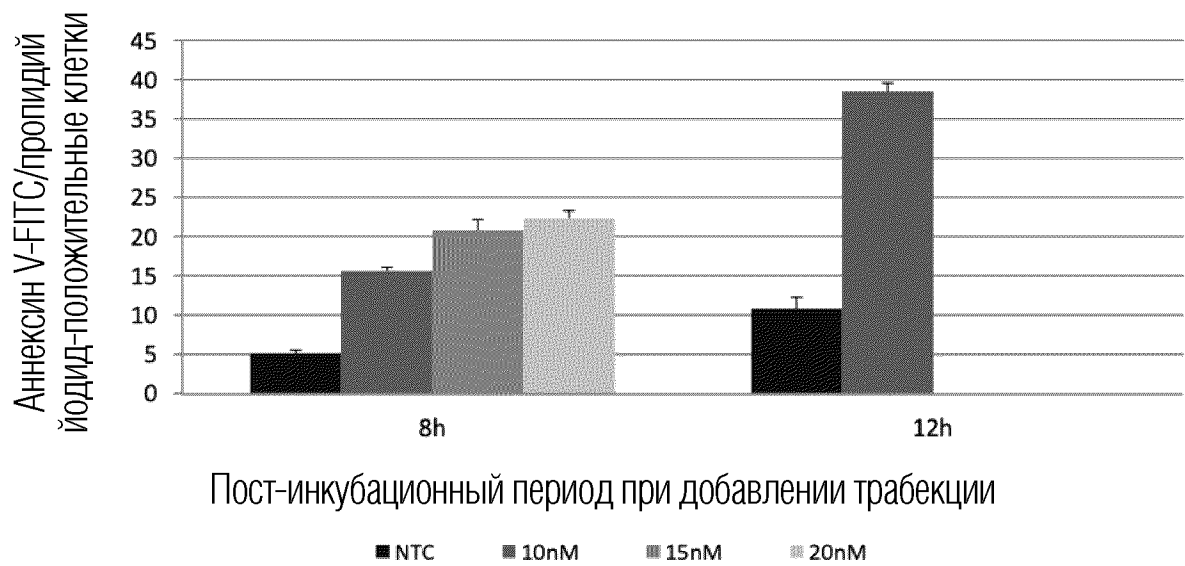
Квад	События	% Ворота	% Всего
UL	5	0.05	0.05
UR	188	1.88	1.88
LL	7540	75.40	75.40
LR	2267	22.67	22.67



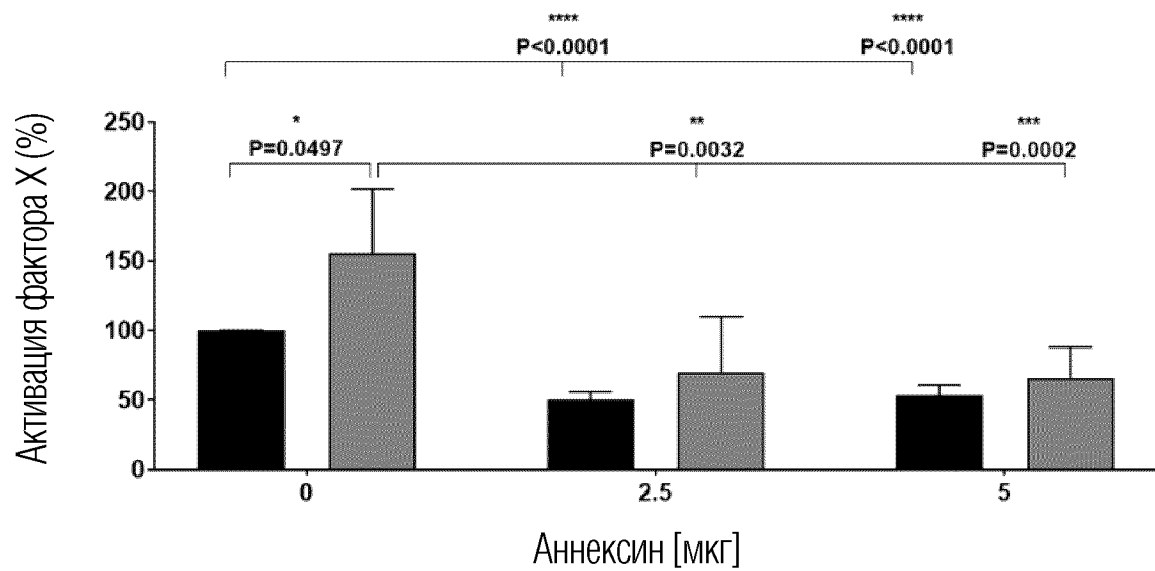
Файл: HUVEC P5.010
 Образец ID: 15nM_8h
 ID пациента: Аннексин V-FITS
 Дата Приобретения: 07-Feb-18
 Всего событий: 10000

Квад	События	% Ворота	% Всего
UL	7	0.07	0.07
UR	168	1.68	1.68
LL	6914	69.14	69.14
LR	2911	29.11	29.11

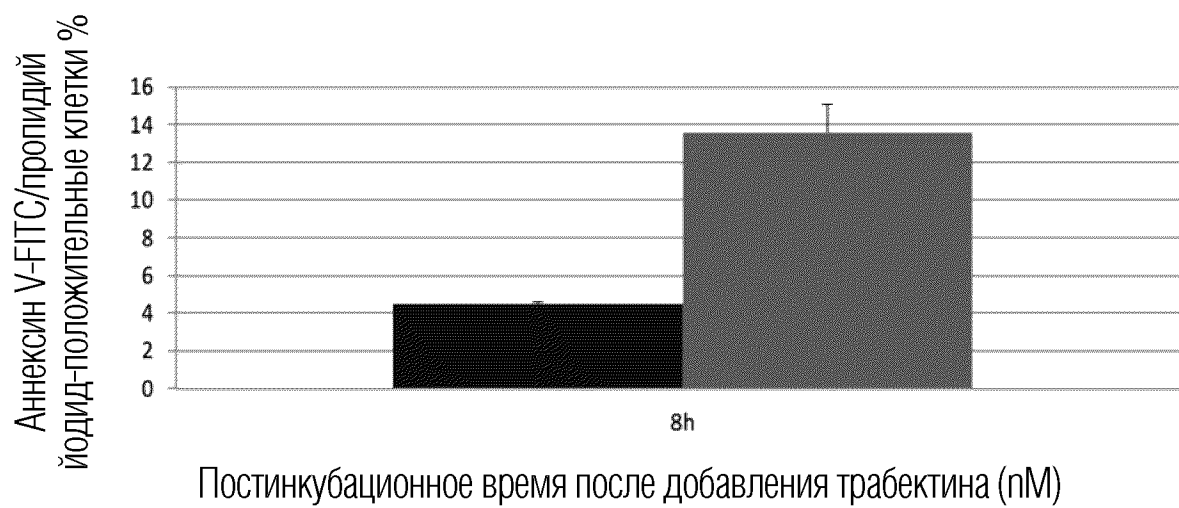
ФИГ. 4А



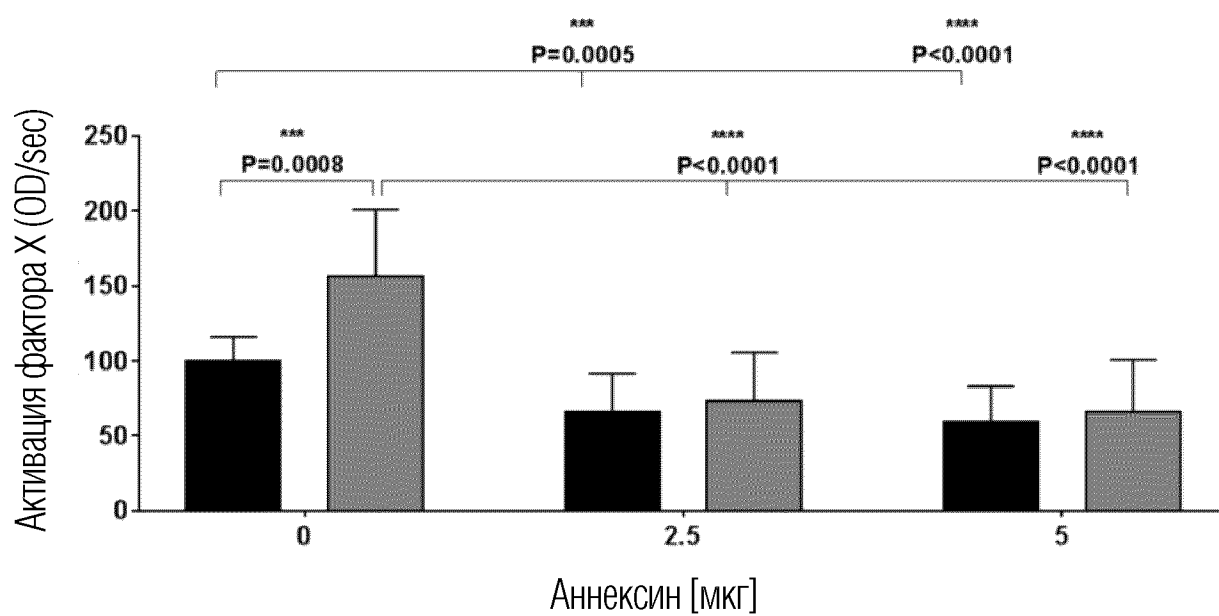
ФИГ. 4В



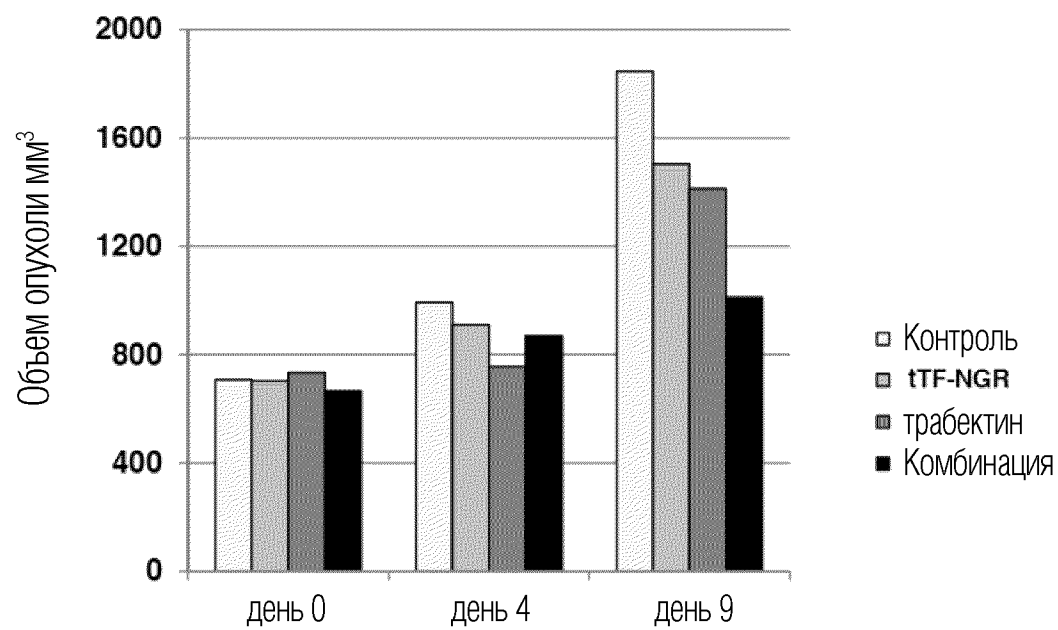
ФИГ. 4С



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 6