(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 999 132**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/4995 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2021 PCT/EP2021/073234**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2022 WO22043245**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2021 E 21766458 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 4203959**

(54) Título: **Composición que comprende proteína de factor tisular truncado con péptido de asparagina-glicina-arginina (ttf-ngr) para usarse en el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos**

(30) Prioridad:

26.08.2020 EP 20192984

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2025

(73) Titular/es:

ANTUREC PHARMACEUTICALS GMBH (100.00%)
An der Hauptwache 7
60313 Frankfurt am Main, DE

(72) Inventor/es:

BERDEL, WOLFGANG E.

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende proteína de factor tisular truncado con péptido de asparagina-glicina-arginina (ttf-ngr) para usarse en el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos

Campo de la Invención

La presente invención se refiere al uso de tTF-NGR y Trabectedina en el tratamiento del cáncer, en particular del sarcoma de tejidos blandos. Los presentes inventores encontraron sorprendentemente que la combinación de tTF-NGR y Trabectedina proporciona una actividad terapéutica mejorada, preferiblemente sinérgica. Sin estar ligado a la teoría, la mejora puede ser causada por varios efectos. La oclusión del tumor vascular por tTF-NGR prolonga la acumulación intratumoral de la Trabectedina, lo que da como resultado una mayor eficacia antitumoral. Además, una mayor actividad procoagulante intratumoral de tTF-NGR puede ser causada por la inducción de apoptosis temprana en células tumorales y células endoteliales tumorales por Trabectedina con niveles de fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés) más altos resultantes en estas células.

Antecedentes de la Invención

El sarcoma de tejido blando (STS, por sus siglas en inglés) es un grupo raro de cánceres mesenquimales heterogéneos que se originan en el tejido conectivo. El STS se compone de más de 100 subtipos distintos, que en conjunto representan el 1% de todos los cánceres en adultos y la incidencia de STS en el sarcoma de Europa oscila entre 2 y 5/100000/año. Ocurren en cualquier parte del organismo, los sitios comunes son extremidades, tronco, retroperitoneo y cabeza/cuello. El diagnóstico histopatológico y la gradación exactos, así como la estadificación del tumor mediante imágenes, son importantes, ya que influyen en la terapia multidisciplinaria, que se lleva a cabo mejor en centros de referencia experimentados. Debido a la heterogeneidad y la rareza de la enfermedad, el diagnóstico suele ser tardío.

La cirugía es la primera línea de tratamiento para el STS en etapa temprana y localizado. Sin embargo, las metástasis a distancia ocurren en muchos pacientes, especialmente en aquellos con tumores de alto grado. Para los pacientes con STS no resecable, la quimioterapia es el tratamiento estándar y el enfoque terapéutico es multidisciplinario. En los casos de enfermedad metastásica, el objetivo terapéutico a menudo se limita a la paliación y/o la prolongación del tiempo de supervivencia libre de progresión en lugar de la curación. La terapia sistémica de primera línea se basa en doxorrubicina sola o en varias combinaciones, como doxorrubicina e ifosfamida. La combinación de gemcitabina y docetaxel parece ser tan eficaz como la doxorrubicina, pero induce una hematotoxicidad más grave y, en ocasiones, se reserva para el tratamiento de segunda línea. Además de la quimioterapia convencional, Trabectedina, pazopanib y eribulina son alternativas para la terapia de segunda línea y posteriores, la eribulina solo en el liposarcoma. Sin embargo, la supervivencia global de los pacientes con STS avanzado sigue siendo pobre en general. Por lo tanto, existe una necesidad médica no satisfecha de nuevos objetivos y agentes terapéuticos en este grupo de enfermedades.

El crecimiento y la diseminación de los tumores dependen de la neovascularización intratumoral para suministrar nutrientes y oxígeno y eliminar los productos de desecho metabólicos. Las células endoteliales tumorales (TEC, por sus siglas en inglés) son esenciales para la construcción de vasos tumorales y, entre otros tipos de células, como los fibroblastos y algunas células mieloides e inmunitarias, pertenecen al estroma de soporte tumoral. Las TEC expresan nuevos objetivos ausentes de las células endoteliales en reposo en la vasculatura madura del organismo. Algunos de estos objetivos TEC son clínicamente relevantes para la terapia antiangiogénica contra el cáncer, lo que condujo a la aprobación de numerosos fármacos para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, bevacizumab (anti-VEGF moAB), aflibercept (VEGF trap), ramucirumab (anti-VEGF-R moAB), sunitinib, sorafenib, pazopanib (ejemplos de inhibidores de tirosina cinasa para receptores de tirosina cinasa TEC)). La actividad terapéutica de estos fármacos se limita a pocos meses, el aumento de la supervivencia y la aparición de resistencias limitan el enfoque.

Conceptualmente diferente del tratamiento antiangiogénico es el enfoque antivascular. Los fármacos antivasculares no solo interfieren con la formación de vasos, sino que tienen como objetivo destruir los neovasos ya presentes en los tumores. Denekamp *et al.* propusieron vasos tumorales y células endoteliales tumorales existentes como portadores objetivo para la terapia antivascular (Denekamp *et al.*, Br.J. *Cancer*, 1982). De hecho, la vasculatura tumoral presenta objetivos terapéuticos para terapias antiangiogénicas, disrupción vascular u oclusión vascular y trombosis con infarto tumoral subsiguiente. Huang *et al.* introdujo el concepto de oclusión de los vasos tumorales mediante el factor tisular (TF, por sus siglas en inglés) dirigido (Huang *et al.*, *Science*, 1997). Pasqualini *et al.* caracterizó pequeños péptidos que contienen NGR (asparagina-glicina-arginina), que se unen a la aminopeptidasa N (APN, también conocida como CD13) como objetivo vascular tumoral (Pasqualini *et al.*, *Cancer Res.*, 2000). Se ha demostrado que CD13 promueve la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis (Guzman-Rojas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012) y también se ha demostrado que tiene relevancia pronóstica para pacientes con cáncer de algunas, pero no todas las histologías examinadas (Tokuhara *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2006).

La Trabectedina es un alcaloide de tetrahidroisoquinolina disponible como Yondelis® de Pharma Mar, Madrid, España. La

trabectedina se extrajo por primera vez de la ascidia del Caribe *Ecteinascidia turbinata*, pero ahora se produce sintéticamente y está registrada en Europa y otros países para el tratamiento de pacientes adultos con sarcoma de tejido blando avanzado (Germano *et al.*, *Cancer Cell. 2013*; 23(2) :249—262). La trabectedina actúa como un agente de unión al ADN y la unión a la doble hélice del ADN conduce a la interferencia con varios factores de transcripción, proteínas de unión al ADN y vías de reparación del ADN, lo que da como resultado la detención del ciclo celular G2/M y, en última instancia, la apoptosis. Además, se descubrió que la Trabectedina proporciona una opción terapéutica para liposarcoma y leiomiosarcoma metastásico, así como un candidato prometedor para el tratamiento de sarcomas sinoviales y sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grado (De Santis *et al.*, Drug Design, Develop. and Therapy 9: 5785-5791, 2015).

Sin embargo, los agentes de direccionamiento vascular trombogénico teóricamente podrían causar efectos secundarios sistémicos graves, como embolia pulmonar o accidente cerebrovascular. Por lo tanto, el desarrollo de regímenes de dosificación seguros y efectivos para los usos terapéuticos de los agentes dirigidos vasculares es de suma importancia clínica y preclínica.

Breve Descripción de la Invención

Sorprendentemente, la presente invención encontró que la combinación de tTF-NGR y Trabectedina proporciona una actividad terapéutica mejorada, preferiblemente sinérgica.

La presente invención proporciona una composición que comprende Trabectedina para uso en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el tratamiento comprende los siguientes pasos:

(a) administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende Trabectedina, y

(b) administrar posteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende una proteína tTF-NGR.

La presente invención también proporciona una composición que comprende una proteína tTF-NGR para usar en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el tratamiento comprende los siguientes pasos:

(a) administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende Trabectedina, y

(b) administrar posteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende la proteína tTF-NGR.

En una modalidad, el cáncer del individuo es inoperable, metastásico o refractario.

En una modalidad adicional, el cáncer es sarcoma de tejido blando y se selecciona preferiblemente de un grupo que consiste en: liposarcoma desdiferenciado, liposarcoma mixoide, liposarcoma pleomórfico, fibrosarcoma adulto, mixofibrosarcoma, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, angiosarcoma, sarcoma sinovial y sarcoma indiferenciado.

En otra modalidad, la composición que comprende Trabectedina y la composición que comprende tTF-NGR se administran al individuo mediante infusión intravenosa.

En otra modalidad más, la composición que comprende Trabectedina se administra al individuo a través de una infusión intravenosa de 24 horas. Preferentemente, Trabectedina se administra a una dosis de 1.5 mg/m^2.

En una modalidad preferida, la proteína tTF-NGR comprende o tiene la secuencia de SEC ID NO: 2.

En una modalidad alternativa, la proteína tTF-NGR tiene la secuencia de SEC ID NO: 1. SEC ID NO: 2 comprende SEC ID NO: 1 y la etiqueta His N-terminal, que comprende el N-terminal 46 amino residuos de ácido. Si bien la etiqueta His N-terminal se mantuvo en la proteína usada en los ejemplos siguientes, se entiende que esto no es necesario para la actividad de la proteína. SEC ID NO: 1 y 2 comprenden además la secuencia de tTF, aminoácidos 47 a 264 de SEC ID NO: 2, y la secuencia NGR, aminoácidos 265 a 271 de SEC ID NO: 2.

En otra modalidad, la primera administración de la proteína tTF-NGR se inicia entre 1 minuto y 1 hora después de finalizar la administración de Trabectedina. Preferiblemente, la proteína tTF-NGR se administra al individuo a través de una infusión intravenosa de 1 hora. Más preferiblemente, la administración de la proteína tTF-NGR se repite una vez al día durante los siguientes 4 días consecutivos después de la administración de Trabectedina.

En otra modalidad, la proteína tTF-NGR se administra a una dosis de 3 mg/m^2/día. Preferiblemente, la proteína tTF-NGR se administra en una solución de NaCl al 0.9% en un volumen de infusión total de 100 ml. Más preferiblemente, la proteína tTF-NGR se infunde a través de un puerto de acceso venoso central.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: ilustración de la estructura esquemática del compuesto principal tTF-NGR con una etiqueta His N-

terminal para la detección y purificación, tTF de longitud completa y el péptido dirigido con el motivo NGR en el extremo C-terminal.

Figuras 2A y 2B: ilustración del direccionamiento y acumulación de actividad de TF en la vasculatura tumoral y la inducción de trombosis vascular tumoral e infarto que conducen a la muerte de células tumorales. La Figura 2A, Componentes del infarto vascular del tumor al inicio de la terapia y la Figura 2B, durante la coagulación vascular del tumor. FXa, factor X activado (azul claro), FVIIa, factor VII activado (azul).

Figuras 3A-3G ilustración de la actividad terapéutica y modos de acción de tTF-NGR por diferentes técnicas de imagen. 1. Coloración azulada del tumor (Fig. 3A, izquierda: tTF-NGR. Fig. 3A, derecha: control del vehículo) pocas horas después de la inyección de tTF-NGR que visualiza macroscópicamente la acumulación de sangre y la interrupción vascular. 2. Imagen de resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés) intravascular mejorada con contraste del tumor que muestra la anatomía de los tumores (Fig. 3A, Fig. 3B) y una disminución drástica del flujo sanguíneo de alto (Fig. 3C) a bajo (Fig. 3D) pocas horas después de la aplicación de tTF-NGR. La fracción de volumen vascular se cuantificó para disminuir > 1 log. 3. Tinción H&E de tejido de xenoinjerto de sarcoma (Fig. 3E, trombosis, acumulación de sangre y alteración vascular después de tTF-NGR; Fig. 3F, control de solución salina con vasculatura normal). 4. Imágenes de reflectancia de fluorescencia *in vivo* que muestran la anatomía vascular por fibrina fluorescente intravascular después de tTF-NGR (Fig. 3F). Fig. 3E, antes de tTF-NGR; Fig. 3F, 1 hora después de tTF-NGR; Fig. 3G, interrupción vascular 24 horas después de tTF-NGR.

Figuras 4A-4C: ilustración de la actividad sinérgica de tTF-NGR y Trabectedina en células endoteliales vasculares humanas (HUVEC, por sus siglas en inglés). Figura 4A, un ejemplo de un experimento de citometría de flujo que muestra la regulación al alza de PS por Trabectedina en membranas celulares HUVEC. La PS se detecta mediante la anexina V-FITC de unión a PS fluorescente. Las células positivas para PS se muestran en el cuadrante inferior derecho (LR) y aumentan del 7.21% sin a 29.22% con Trabectedina (15 nM, 8h de incubación). Figura 4B, la evaluación de 7 experimentos diferentes con diferentes dosis de Trabectedina que inducen la regulación al alza de PS en HUVEC después de 8 y después de 12h aumentando las dosis de Trabectedina (valores de P para todos los puntos de tiempo <0.0001 en comparación con el control sin Trabectedina (NTC). Se usó yoduro de propidio como control de necrosis interna. Figura 4C, aumento de la actividad procoaguladora de las HUVEC dependiente de trabectedina tras la unión de tTF-NGR (negro, sin trabectedina, gris, con trabectedina (10 nM, 8h)) y anulación completa de este efecto enmascarando PS con anexina V a diferentes dosis. Medias de 3 experimentos con al menos 4 ensayos cada uno + error estándar y valores de p.

Figuras 5A-5B: ilustraciones de la actividad sinérgica de tTF-NGR y Trabectedina en células de sarcoma humano HT1080. Figura 5A, evaluación de 6 experimentos diferentes con 10 nM de Trabectedina (gris) y un tiempo de incubación de 8h que muestra una regulación positiva significativa de PS en células de sarcoma HT1080 en comparación con el control sin Trabectedina (negro). Medias + error estándar (valor p = 0.001). Se usó yoduro de propidio como control de necrosis interna. Figura 5B, aumento dependiente de trabectedina de la actividad procoaguladora del sarcoma HT1080 tras la unión de tTF-NGR (negro, sin trabectedina, gris, con trabectedina (10 nM, 8 h)) y anulación completa de este efecto enmascarando PS con anexina V a diferentes dosis. Medias de 4 experimentos + error estándar y valores de p.

Figura 6: resultados terapéuticos de la combinación de Trabectedina con tTF-NGR *in vivo* en un modelo de xenoinjerto HT1080 STS. Control, PBS iv; tTF-NGR 1 mg/kg, día 0; Trabectedina 0.1 mg/kg día 0; combinación, Trabectedina más tTF-NGR (5 h después de Trabectedina) con dosis y horario idénticos (control n=8, tTF-NGR n=9, Trabectedina n=9, combinación n=1 1).

Descripción Detallada de la Invención

Los compuestos antivasculares en forma de moléculas bifuncionales que se dirigen a una estructura específica en TECs con un resto y que tienen una carga útil antitumoral como segundo resto se conocían en la técnica anterior. Esta clase de compuestos de direccionamiento vascular tiene como objetivo dirigirse a más de un solo tipo de tumor a través de la vasculatura tumoral común. Se han aprobado fármacos dirigidos a células tumorales que contienen una sola entidad histológica para el tratamiento de tumores específicos, como los moAB a moléculas asociadas a células tumorales que transportan toxinas (brentuximab vedotina (enfermedad de Hodgkins CD30+), trastuzumab emtansina (cáncer de mama HER2+)).

Se había desarrollado una clase adicional de proteínas de fusión, que se denominó tTF-NGR, en la que el anclaje de membrana no específico del factor tisular (TF) se reemplaza por el CD13 de unión al motivo NGR. CD13 es una aminopeptidasa que ocurre selectivamente en EC estimuladas y en crecimiento, como en TEC, con baja expresión en otros tejidos (http://www.proteinatlas.org/ENSG00000166825-ANPEP/tissue). En algunos tejidos normales, como los conductos biliares pequeños, la expresión de CD13 está presente, pero no interfiere con la aplicación de TF dirigido a

CD13, ya que esta molécula es activa solo en una ubicación competente para la coagulación, como en los vasos sanguíneos, y no en otros lugares. Con esta proteína de fusión (Figura 1), la actividad de TF se dirige y acumula en la vasculatura del tumor y se inducen trombosis e infarto vasculares del tumor que conducen a la muerte de las células tumorales (Figuras 2A y 2B).

Estas proteínas de fusión se probaron *in vitro* e *in vivo* en busca de propiedades terapéuticas esenciales, como actividad procoaguladora, unión específica a sus respectivas moléculas objetivo en células endoteliales estimuladas (EC) o pericitos, acumulación intratumoral *in vivo*, activación intratumoral *in vivo* de la coagulación, oclusión vascular tumoral e inhibición del flujo sanguíneo, propiedades farmacodinámicas, incluida la actividad antitumoral terapéutica en xenotrasplantes de tumores humanos de diferente origen histológico, y finalmente seguridad y toxicología de roedores y animales no roedores. Como se demostró en los resultados experimentales, mientras retiene la actividad procoaguladora completa, tTF-NGR se une específicamente a CD13 en el crecimiento de EC, conduce a la oclusión de los vasos del tumor y al infarto con la consiguiente inhibición y regresión del crecimiento del tumor (Figuras 3A-3G). La actividad terapéutica preclínica de tTF-NGR fue independiente de la histología del tumor (por ejemplo, melanoma, pulmón, mama, sarcoma, glioblastoma). Las rondas repetidas de tratamiento no mostraron desarrollo de resistencia.

Aparte de las ventajas particulares de tTF-NGR, la presente invención encontró sorprendentemente que la combinación de tTF-NGR y Trabectedina puede mostrar actividad terapéutica sinérgica. La Trabectedina es un fármaco antineoplásico aislado originalmente de Ecteinascidia turbinata, un chorro de mar. El fármaco ejerce su actividad antineoplásica al unirse al surco menor del ADN durante la replicación, provocando roturas de doble cadena en la doble hélice. Además, se ha descubierto que la Trabectedina tiene un mecanismo de acción pleiotrópico en la regulación de los mediadores inflamatorios en el microambiente tumoral. Este efecto posiblemente se logra mediante la inhibición selectiva de la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6), el ligando de quimiocina 2 (CCL2), la proteína aglutinante de matriz pentraxina 3 (PTX3) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Además, la Trabectedina agota los macrófagos en el tejido tumoral y la orientación a los macrófagos parece ser un componente clave de su actividad antineoplásica. La Trabectedina como agente único se usa comúnmente como tratamiento estándar de segunda línea de STB metastásico o refractario. En una combinación de tTF-NGR con Trabectedina como se demuestra en la presente invención, ambos fármacos mostraron una mayor actividad antisarcoma en comparación con la monoterapia estándar de Trabectedina o la monoterapia con tTF-NGR en un modelo de xenoinjerto. Dado este modo de acción múltiple de Trabectedina sobre las células tumorales y las diferentes células y componentes moleculares del estroma tumoral, era imprevisible una eficacia terapéutica combinatoria de Trabectedina con tTF-NGR. tTF-NGR ha mostrado actividad preclínica en xenoinjertos de STS humanos por oclusión vascular tumoral e infarto y puede mejorar la actividad antitumoral de Trabectedina en estos modelos *in vivo* al atrapar Trabectedina dentro del tumor, lo que conduce a una actividad antitumoral más fuerte y de mayor duración. Viceversa, la Trabectedina aumenta la eficacia procoaguladora de tTF-NGR en la vasculatura tumoral. El lado de unión de tTF-NGR, CD13, se expresa fuertemente en el sistema vascular y/o en las células tumorales de STS humano. Esto proporciona un biomarcador para la selección de pacientes para esta combinación que puede estudiarse más a fondo para predecir la actividad del tratamiento de combinación.

La presente invención proporciona además regímenes de dosis clínicas para usar tTF-NGR y Trabectedina en una terapia de combinación para tratar pacientes con cáncer, en particular sarcoma de tejido blando.

La presente invención proporciona una composición que comprende Trabectedina para uso en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el tratamiento comprende los siguientes pasos:

(a) administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende Trabectedina, y

(b) administrar posteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende una proteína tTF-NGR (preferiblemente que comprende o tiene SEC ID NO: 2).

La presente invención también proporciona una composición que comprende una proteína tTF-NGR para usar en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el tratamiento comprende los siguientes pasos:

(a) administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende Trabectedina, y

(b) administrar posteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende la proteína tTF-NGR (preferiblemente que comprende o tiene SEC ID NO: 2).

En otra modalidad, la composición que comprende Trabectedina y la composición que comprende tTF-NGR (preferiblemente que comprende o tiene SEC ID NO: 2) se administran al individuo mediante infusión intravenosa.

En una modalidad, la composición que comprende Trabectedina se administra al individuo a través de una infusión intravenosa de 24 horas. Preferentemente, la Trabectedina se administra a una dosis de 1.5 mg/m^2.

En una modalidad, la proteína tTF-NGR tiene la secuencia de SEC ID NO: 2.

La primera dosis de proteína tTF-NGR puede administrarse entre 1 minuto y 1 hora después de finalizar la administración de Trabectedina. Preferiblemente, la proteína tTF-NGR se administra al individuo a través de una infusión intravenosa de 1 hora. Más preferiblemente, la administración de la proteína tTF-NGR se repite una vez al día durante los siguientes 4 días consecutivos después de la administración de Trabectedina, es decir: Trabectedina el lunes 8 am al martes 8 am seguido de tTF-NGR el martes a más tardar a las 9 am y en los días siguientes (última tTF-NGR el viernes).

En otra modalidad, la proteína tTF-NGR se administra a una dosis de 3 mg/m^2/día. Preferiblemente, la proteína tTF-NGR se administra en una solución de NaCl al 0.9% en un volumen de infusión total de 100 ml. Más preferiblemente, la proteína tTF-NGR se infunde a través de un puerto de acceso venoso central.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona una composición que comprende Trabectedina o una proteína tTF-NGR para usar en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el tratamiento comprende los siguientes pasos:

(a) administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende Trabectedina, y

(b) administrar posteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende la proteína tTF-NGR que tiene SEC ID NO: 2; y

en donde la Trabectedina se administra al individuo a través de una infusión intravenosa de 24 horas; y

en donde la primera administración de la proteína tTF-NGR se inicia entre 1 minuto y 1 hora después del final de la administración de Trabectedina; y

en donde la proteína tTF-NGR se administra al individuo a través de una infusión intravenosa de 1 hora; y

en donde la administración de la proteína tTF-NGR se repite una vez al día durante los siguientes 4 días consecutivos después de la administración de Trabectedina.

Preferiblemente, la duración del ciclo del tratamiento es de 3 semanas. Los pacientes son tratados en ciclos repetidos hasta la progresión definitiva de la enfermedad (iRECIST; Seymour L, *Lancet Oncol.* 2017) en ausencia de otros criterios de retirada, y siempre que ni el paciente ni el investigador soliciten la suspensión del tratamiento.

En una modalidad, el cáncer del individuo es inoperable, metastásico o refractario. En una modalidad adicional, el cáncer es sarcoma de tejido blando y se selecciona preferiblemente de un grupo que consiste en: liposarcoma desdiferenciado, liposarcoma mixoide, liposarcoma pleomórfico, fibrosarcoma adulto, mixofibrosarcoma, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, angiosarcoma, sarcoma sinovial y sarcoma indiferenciado.

A menos que se indique lo contrario, para los fines de la presente solicitud, se pretende que los siguientes términos tengan los significados indicados a continuación tal como se usan en la Descripción y las reivindicaciones.

"Pacientes" se refiere a mamíferos, preferiblemente humanos. En algunas modalidades, los pacientes son aquellos que han fracasado en el tratamiento estándar de primera línea o que no son elegibles para el tratamiento estándar.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para tratar un estado de enfermedad, es suficiente para efectuar tal mejora del estado de enfermedad.

"Trabectedina" se refiere a un alcaloide de tetrahidroisoquinolina con número de registro CAS (Chemical Abstracts Service) 0114899-77-3 descrito en la literatura (por ejemplo, en Germano *et al.*, Cancer Cell. 2013; 23(2):249—262) y disponible como YondeliS@ de Pharma Mar, Madrid, España.

"Tratamiento/tratar" significa cualquier administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, e incluye:

• inhibir la enfermedad en humanos que experimentan o muestran la patología o sintomatología de la enfermedad (es decir, retrasando el desarrollo posterior de la patología y/o sintomatología), o

• mejorar la enfermedad en humanos que están experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad (es decir, revirtiendo la patología y/o sintomatología).

"iRECIST" se refiere a una serie de modificaciones a los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST versión 1.1) que explican el crecimiento aparente del tumor que a veces ocurre antes de que la carga tumoral comience a disminuir, un fenómeno conocido como pseudoprogresión. Estas respuestas ocurren en una pequeña pero importante fracción de pacientes que reciben inhibidores de puntos de control y otros agentes inmunomoduladores. Las

pautas de iRECIST (Seymour L, *Lancet Oncol.* 2017) han sido desarrolladas por un equipo dirigido por Lesley Seymour, MD, PhD, oncóloga del Canadian Cancer Trials Group con sede en Queen's University en Kingston, Ontario.

"PFS" se refiere a la supervivencia libre de progresión, según iRECIST en la semana 15 (es decir, después de 5 ciclos), luego en las semanas 24, 33, 42 y 51 (es decir, cada 9 semanas o después de 3 ciclos ajustados a la duración del ciclo de 3 semanas), y cada 3 meses a partir de entonces. La razón para usar la modificación iRECIST de RECIST para la evaluación se basa en la observación dentro de estudios preclínicos y casos clínicos, que tras la aplicación de tTF-NGR puede producirse hinchazón intratumoral por acumulación de sangre y alteración vascular y dar lugar a pseudoprogresiones.

"OS" se refiere a la tasa de supervivencia general a los 12 y 18 meses.

"CR" se refiere a la respuesta completa, lo que significa la desaparición de todas las lesiones objetivo. Cualquier ganglio linfático patológico (ya sea objetivo o no objetivo) debe tener una reducción en el eje corto a <10 mm.

"PR" se refiere a una respuesta parcial, lo que significa una disminución de al menos un 30 % en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo, usando la suma de los diámetros de referencia como referencia.

"PD" se refiere a enfermedad progresiva, lo que significa un aumento de al menos un 20% en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo, usando como referencia la suma más pequeña del estudio (esto incluye la suma inicial si es la más pequeña del estudio). Además del aumento relativo del 20%, la suma también debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm. (Nota: la aparición de una o más lesiones nuevas también se considera progresión; se deben observar las reglas descritas en el capítulo 6.1.1 antes de que se pueda usar una progresión para finalizar el tratamiento en un paciente.

"SD" se refiere a enfermedad estable, lo que significa que no se observa una contracción suficiente para calificar para PR ni un aumento suficiente para calificar para PD, usando los diámetros de suma más pequeños como referencia en el estudio.

"TF" se refiere al factor tisular, la proteína del factor tisular conocida descrita en la técnica anterior, por ejemplo, en Huang *et al.*, Science, 1997.

"tTF" se refiere a una forma activa truncada conocida de los aminoácidos 33 a 251 de la proteína del factor tisular también descrita en Huang *et al.*, Science, 1997. La secuencia de tTF está abarcada por la secuencia de la proteína de fusión de SEC ID NO: 1 y 2 (aminoácidos 47 a 264 de SEC ID NO: 2).

Ejemplo 1. Actividad terapéutica mejorada de tTF-NGR y Trabectedina

La hipótesis científica de combinar tTF-NGR y Trabectedina radica en que la actividad proapoptótica de Trabectedina sobre las células endoteliales vasculares humanas (HUVEC) y también las células tumorales aumentan significativamente la presencia de fosfatidilserina (PS) en la hoja externa de la bicapa de fosfolípidos que construye la membrana celular (ver Figuras 4A y 4B para HUVEC como ejemplo) y mediante este medio optimizado de fosfolípidos en la membrana celular externa potencia la eficacia procoaguladora de tTF-NGR dentro del complejo tTF-NGR: Factor VIIa: Factor X en la membrana celular (Figura 4C). Este efecto depende específicamente de la presencia de PS, ya que puede eliminarse por completo enmascarando PS mediante preincubación con anexina V.

Como en los tejidos tumorales parte de la capa celular vascular interna de la neovasculatura no está formada por células endoteliales, sino también por células tumorales, lo que se denomina "mimetismo vascular", también se realizaron experimentos análogos con células de sarcoma humano HT1080 en lugar de HUVEC (ver Figuras 5A y 5B).

Para aprovechar la actividad mejorada en ambas direcciones, se investigó una combinación de Trabectedina con tTF-NGR usando un enfoque farmacocinético, mediante la aplicación de tTF-NGR aproximadamente 5 horas después de la inyección de Trabectedina. Los resultados muestran una mejora considerable de la actividad terapéutica en comparación con los dos fármacos individuales en un xenoinjerto STS humano modelo HT1080 (Figura 6).

Ejemplo 2. Estudio clínico fase I de tTF-NGR

El tTF-NGR se produjo usando *E. coli* a través de un proceso de producción de grado clínico y una purificación por HPLC de 4 pasos. El proceso de producción y la instalación GMP están aprobados por el gobierno regional (Autorización del fabricante por Regierungspräsidium) y el Instituto federal Paul Ehrlich (PEI, por sus siglas en inglés). Se ha completado la evaluación de toxicidad según las directrices de la UE S6 y S9 en ratones, ratas, cobayos y perros. La toxicidad limitante en las especies más sensibles (ratón) fue la embolia pulmonar, en esta especie tTF-NGR tiene una ventana de seguridad terapéutica de 1:4 (dosis terapéutica: dosis LD10 = 1:5).

La descripción general del estudio clínico de fase I con tTF-NGR se presenta en la tabla 1 (no exigir

algo).

Tabla 1: Estudio clínico de fase I realizado durante el desarrollo de tTF-NGR.

Identificación del estudio	Diseño del estudio/Objetivos	Población/No. de sujetos	Regímenes de dosis
EudraCT-No.: NCT02902237	2016-003042-85		
	Estudio de fase I de tTF-NGR tTF-NGR a través de acceso venoso central como infusiones diarias de 1 hora durante 5 días, q día 22; se permiten aumentos de dosis intraindividuales en los ciclos de seguimiento. Los pacientes dentro de la parte de escalada de dosis fueron tratados en secuencia y no en paralelo.	Pacientes con tumores sólidos y linfomas en etapa tardía más allá de todo tratamiento estándar. **No. de sujetos** **24** 24 de los cuales 17 fueron tratados con tTF NGR	**Dosis inicial:** 1 mg/m^2 por día **DLT:** Toxicidad limitante de dosis a 4 y 5 mg/m^2 por día **Grupo de verificación:** Grupo de verificación RPIID con 3.0 mg/m^2 tTF-NGR por día (x5)
	Objetivo primario: Para evaluar la dosis máxima tolerada (MTD) y la toxicidad limitante de la dosis (DLT) de las aplicaciones diarias infundidas por vía intravenosa (iv) de tTF-NGR durante 5 días cada 3 semanas en pacientes con cáncer en recaída o refractario, que habían obtenido todo el tratamiento estándar conocido para su entidad de enfermedad antes de ingresar al estudio.		
	Objetivos secundarios: **1.**Para determinar la perfusión y la fracción de volumen vascular de lesiones tumorales medibles frente a tejido de referencia normal antes y después de la aplicación de tTF-NGR por MRI y/o CEUS como parámetro biológico sustituto de la actividad biológica del IMP en los pacientes tratados dentro de las cohortes de verificación. **2.**Para obtener datos farmacocinéticos.		

Se realizó un ensayo clínico de fase I (EudraCT-No.: 2016-003042-85; NCT02902237) con tTF-NGR aplicado como infusión de 1 hora disuelto en NaCl al 0.9% a través de una vía venosa central en pacientes con cáncer en etapa avanzada. Este ensayo fue el primero en su clase, que se guió por ultrasonido mejorado con contraste (CEUS) repetido y resonancia magnética para evaluar la disminución del flujo sanguíneo en las lesiones de señal tumoral. En el diseño del estudio se usó un programa de "5 días q día 22".

A 4 mg/m^2/día, se observó una toxicidad limitante de la dosis (DLT) ya que la troponina T hs mostró un aumento temporal sin secuelas clínicas. Esta DLT de laboratorio sensible fue rápidamente reversible y permite un control temprano para el ajuste de dosis posterior en ensayos futuros. Además, también se observó una trombosis venosa profunda de miembros inferiores de grado II de CTCAE (1 paciente, completamente resuelta) con 5 mg/m^2, una trombosis venosa relacionada con catéter venoso central con 4 mg/m^2 (grado II de CTCAE y resuelta), y se observó un ataque isquémico transitorio (CTCAE II resuelto) en un paciente con un angiosarcoma en la aurícula izquierda del corazón a 3 mg/m^2, eventos

razonablemente relacionados, pero no necesariamente causados únicamente por tTF-NGR. Por lo tanto, el ensayo se completó con una dosis recomendada para la fase II (RPIID) de 3 mg/m^2/día x 5, q d 22. El producto de medicamento en investigación se administra a través de un acceso venoso central PORT en 100 ml de NaCl al 0.9%, durante una infusión de velocidad controlada con una duración de 1 hora.

Los estudios farmacocinéticos del estudio han indicado una vida media terminal media de tTF-NGR de 8.99 h. No hubo acumulación con ciclos repetidos, ya que los niveles antes del tratamiento siempre se alcanzaron antes de que comenzara el siguiente ciclo.

Se observó una inhibición específica del flujo sanguíneo tumoral (circulación sanguínea intratumoral) en los pacientes medible con CEUS y MRI sin disminución del flujo sanguíneo en los órganos normales. La inhibición del flujo sanguíneo tumoral fue de hasta >1 paso logarítmico. Además, en algunas metástasis se observó un desarrollo rápido de áreas con resonancia magnética, interpretado como sangrado intratumoral y áreas necróticas, similar a las observaciones en los modelos de xenoinjerto. En ninguno de los pacientes tratados hasta ahora se pudo observar una RC o una PR. Sin embargo, dos pacientes tuvieron enfermedad estable (SD) durante varios meses después del tratamiento. Se detectaron anticuerpos humanos anti-proteína de fusión (HAFA) en pocos pacientes sin evidencia de síntomas clínicos (reacciones anafilácticas o anafilactoides) o capacidad neutralizante cuando se correlacionó con la inhibición del flujo sanguíneo tumoral en MRI o CEUS.

En conclusión, tTF-NGR se puede aplicar de manera segura y las observaciones en la fase I representan una prueba de principio para la inhibición del flujo sanguíneo tumoral en la situación clínica y un intervalo terapéutico prometedor. Además, existen múltiples métodos efectivos para antagonizar la toxicidad sistémica teórica (heparina, inhibidores de la COX, inhibición plaquetaria dual con aspirina e inhibidores de P2Y12, fibrinolisis).

Ejemplo 3. El diseño del estudio clínico para probar la actividad antisarcoma de la combinación de tTF-NGR y Trabectedina.

3.1 Diseño del estudio

El diseño del estudio consiste en un estudio de fase II/III, abierto, aleatorizado y controlado en sujetos con sarcoma de tejidos blandos metastásico o refractario, durante una duración total de reclutamiento de 36 meses.

Los participantes en el estudio son pacientes entre 18-75 años de edad, con sarcoma de tejido blando avanzado o metastásico después del fracaso de la terapia de 1era línea que contiene antraciclinas o con contraindicaciones para estos medicamentos. Los pacientes deben tener evidencia histológica de sarcoma de tejido blando metastásico o irresecable avanzado de alto grado (grado 2-3) según el sistema de clasificación FNCLCC, incluidos los siguientes tipos de tumores: liposarcoma desdiferenciado, liposarcoma mixoide (grado alto), liposarcoma pleomórfico, fibrosarcoma adulto, mixofibrosarcoma (de alto grado), leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma (alveolar, pleomórfico), angiosarcoma, sarcoma sinovial, sarcoma indiferenciado. La positividad de CD13 en histología central (grado 1+; Kessler T *et al*. Translational Oncology 2018) es un requisito previo para ingresar al estudio. Los participantes deben tener al menos una lesión medible unidimensionalmente por tomografía computarizada según lo definido por iRECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; Seymour L, Lancet Oncol. 2017) criterio 1.1. Esta lesión no debería haber sido irradiada durante tratamientos previos. También se requiere que los participantes tengan una expectativa de vida de al menos 3 meses con ECOG 2 y sin contradicciones para Trabectedina. Se inscriben 120 pacientes evaluables y se asignan en paralelo de forma 1:1 a uno de dos brazos diferentes, como se describe a continuación. La aleatorización se estratificará en una puntuación compuesta CD13 1+/2+ frente a CD13 3+.

El estudio se divide en 2 partes que se realizarán en secuencia:

Parte de la fase II:

Antes de la parte aleatorizada de fase III del estudio, hay una cohorte de seguridad de fase II de 6 pacientes que obtienen al menos 3 ciclos cada uno de la combinación descrita en el brazo 2 (ver a continuación, 1.5 mg/m^2 de Trabectedina más 3 mg/m^2 de tTF-NGR) para confirmar la seguridad de esta combinación. En caso de toxicidad limitante de la dosis (DLT) en esta cohorte de fase II, se planea un protocolo de modificación de dosis para tTF-NGR a 2 mg/m^2, y en caso de que surjan más problemas de tolerabilidad, se planean más desescaladas en pasos de 0.5 mg/m^2 de tTF-NGR. La dosis segura se transfiere luego a la fase III aleatoria del estudio. La dosis final de tTF-NGR establecida como segura en esta combinación debe aplicarse a 6 pacientes con 3 ciclos cada uno. La parte aleatoria (fase III) del estudio se abrirá después de que el DSMB juzgue la seguridad en la cohorte de fase II.

Parte de la Fase III:

En la parte de fase III de este estudio, 120 pacientes se aleatorizan 1:1 a dos grupos diferentes. El objetivo principal es la

evaluación de la eficacia de tTF-NGR en combinación con Trabectedina medida como la mediana de supervivencia libre de progresión en el grupo de tratamiento combinado (Brazo 2) frente a la monoterapia con Trabectedina (Brazo 1).

BRAZO 1: los pacientes reciben 1.5 mg/m^2 de Trabectedina como infusión intravenosa central (iv) de 24 horas el día 1, q d 22 x hasta la progresión de la enfermedad o contraindicaciones de aplicación adicional (premedicación de acuerdo con las pautas institucionales: por ejemplo, 20 mg de dexametasona)

BRAZO 2: Los pacientes reciben Trabectedina estándar según el brazo 1 más 3 mg/m^2 de tTF-NGR (infusión de velocidad controlada de 1 hora, acceso venoso central PORT, 100 ml de NaCl) por día durante 4 días consecutivos después de cada ciclo de Trabectedina (< 1 hora de intervalo entre el final de la infusión de Trabectedina y tTF-NGR: es decir: Trabectedina el lunes 8 am al martes 8 am seguido de tTF-NGR el martes 9 am y en los días siguientes (último tTF-NGR el viernes), q d 22 x hasta progresión de la enfermedad o contraindicaciones contra la aplicación posterior.

Dado que la evaluación de los resultados del estudio se basa en la intención de tratar, todos los pacientes después de la aleatorización forman parte de la población de eficacia evaluada por la evaluación central de iRECIST después del final del estudio.

La terapia en ambos brazos se puede administrar de forma ambulatoria. Algunos pacientes pueden requerir hospitalización durante las 24 horas de infusión de Trabectedina. Todos los pacientes reciben la mejor atención de apoyo (BSC) de acuerdo con las pautas institucionales.

La actividad anticancerígena se evalúa clínicamente en la semana 9 y clínicamente y mediante imágenes en la semana 15, y luego cada 9 semanas (ajustada a la duración del ciclo de 3 semanas) hasta la semana 51 y cada 3 meses a partir de entonces. La decisión sobre la aplicación del próximo ciclo en la semana 9 es clínica. A partir de la semana 15 se toman decisiones clínicas y por imágenes. Este procedimiento se describe en detalle a continuación. Mediana de SLP, tasas de SLP (iRECIST) y DCR a los 15, 24, 33, 42 y 51 (es decir, cada 9 semanas o después de 3 ciclos ajustados a la duración del ciclo de 3 semanas), y en intervalos de 3 meses a partir de entonces, se calculan mOS, tasa de OS a los 12 y 18 meses y ORR.

3.2 Evaluación de la seguridad

La evaluación de la seguridad se realiza de forma continua durante la participación en el estudio, incluidas las evaluaciones de laboratorio estándar. La incidencia de AA se resumirá por gravedad en todos los pacientes con al menos una toma del fármaco del estudio.

Los pacientes son tratados en ciclos repetidos hasta que se cumpla uno de los siguientes criterios (en ausencia de cualquier otro criterio de retiro):

1) toxicidad inaceptable que impide la terapia adicional,

2) progresión de la enfermedad (como se describe a continuación),

3) el paciente o el investigador solicita la suspensión del tratamiento.

Los pacientes que interrumpen el tratamiento del estudio en ausencia de progresión de la enfermedad no deben recibir más terapias de línea contra el cáncer antes de que la enfermedad progrese, a menos que existan razones claras para continuar con las terapias alternativas.

La aplicación del siguiente ciclo de terapia puede posponerse hasta 21 días por las siguientes razones:

1) debido a las condiciones clínicas del paciente o

2) por decisión del investigador después de la discusión con el Investigador Principal Prof. Schliemann.

Las visitas de seguimiento detalladas después del inicio de la terapia se realizan en las semanas 9 y 15, seguidas de cada 9 semanas (ajustadas a la duración del ciclo de 3 semanas) hasta la semana 51, y con intervalos de 3 meses a partir de entonces.

3.3 Evaluación de la actividad anticancerígena de la combinación de tTF-NGR y Trabectedina

El estudio usa una modificación de iRECIST para la determinación de la progresión y la SLP de forma análoga a los estudios con inhibidores de puntos de control (Seymour L, Lancet Oncol. 2017). El juicio final de iRECIST y la comparación de la PFS entre ambos brazos se realizan después del final del estudio de manera ciega por un laboratorio central de imágenes independiente en el Departamento de Radiología, LMU, Munich (Prof. M. Wildgruber). El juicio iRECIST ad hoc

para la determinación de un EOT seguro para pacientes individuales lo realizan los investigadores locales en los centros de estudio locales.

La actividad anticancerígena (modificación de iRECIST) se evalúa (clínicamente y por imágenes) en las semanas 9 y 15, seguida cada 9 semanas (ajustada a la duración del ciclo de 3 semanas) hasta la semana 51 y cada 3 meses a partir de entonces.

La respuesta general se evalúa de forma análoga a la versión de criterios RECIST frente a 1.1:

• Respuesta Completa (CR, por sus siglas en inglés): Desaparición de todas las lesiones objetivo. Cualquier ganglio linfático patológico (ya sea objetivo o no objetivo) debe tener una reducción en el eje corto a <10 mm.

• Respuesta parcial (PR, por sus siglas en inglés): al menos una disminución del 30% en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo, usando la suma de los diámetros de referencia como referencia.

• Enfermedad progresiva (PD, por sus siglas en inglés): Al menos un 20% de aumento en la suma de los diámetros de las lesiones objetivo, usando la suma más pequeña del estudio como referencia (esto incluye la suma inicial si es la más pequeña del estudio). Además del aumento relativo del 20%, la suma también debe demostrar un aumento absoluto de al menos 5 mm.

• Enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés): ni contracción suficiente para calificar para PR ni aumento suficiente para calificar para PD, usando la suma de diámetros más pequeña como referencia en el estudio.

Los ganglios linfáticos identificados como lesiones objetivo siempre deben tener registrada la medición real del eje corto (medida en el mismo plano anatómico que el examen de referencia), incluso si los ganglios retroceden por debajo de 10 mm en el estudio. Esto significa que cuando se incluyen los ganglios linfáticos como lesiones objetivo, la "suma" de las lesiones puede no ser cero, incluso si se cumplen los criterios de RC, ya que un ganglio linfático normal se define como aquel que tiene un eje corto de <10 mm. Por lo tanto, los CRF u otros métodos de recopilación de datos pueden diseñarse para que las lesiones de los ganglios objetivo se registren en una sección separada donde, para calificar para RC, cada ganglio debe lograr un eje corto <10 mm. Para PR, SD y PD, la medición real del eje corto de los nodos debe incluirse en la suma de las lesiones objetivo.

3.4 Evaluación de la mediana de supervivencia libre de progresión y las tasas de supervivencia libre de progresión

El tiempo de SLP se evalúa para todos los sujetos aleatorizados. La duración se define desde la aleatorización hasta la progresión o muerte por cualquier causa. Se calcula la mediana de SLP (mPFS). La tasa de SLP según iRECIST se evalúa en la semana 15 (después de 5 ciclos), luego en las semanas 24, 33, 42 y 51 (es decir, cada 9 semanas o después de 3 ciclos ajustados a la duración del ciclo de 3 semanas) y en intervalos de 3 meses a partir de entonces.

3.5 Evaluación de la mediana de supervivencia global (mOS) y las tasas de supervivencia global

El tiempo de OS se evalúa para todos los pacientes aleatorizados. La duración se define desde la aleatorización hasta la muerte por cualquier causa. Se calcula la mediana del tiempo de OS y la tasa de OS a los 12 y 18 meses. A partir de entonces, se controla la supervivencia de los pacientes durante visitas de seguimiento periódicas cada 3 meses.

Referencias:

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, Stalmann 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*: Aminopeptidase N (CD13): expression, prognostic impact, and use as therapeutic target for tissue factor induced tumor vascular infarction in soft tissue sarcoma. Translational Oncol. 1 1 (6): 1271-1282, 2018

Guzman-Rojas *et al.*, Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13)expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment, PNAS Enero 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 Enero 1997: Vol. 275, Issue 5299, pp. 547-550

Pasqualini *et al.*, Aminopeptidase N is a Receptor for Tumor-homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis, CANCER RESEARCH 60, 722—727, Febrero 1, 2000.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende Trabectedina para usarse en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el tratamiento comprende los siguientes pasos:

(a) administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende Trabectedina, y

(b) administrar posteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende una proteína tTF-NGR.

2. Una composición que comprende una proteína tTF-NGR para usarse en el tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el tratamiento comprende los siguientes pasos:

(a) administrar al individuo una cantidad efectiva de una composición que comprende Trabectedina, y

(b) administrar posteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende la proteína tTF-NGR.

3. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el cáncer del individuo es inoperable, metastásico o refractario.

4. La composición para usarse en el tratamiento de sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el cáncer es sarcoma de tejido blando y se selecciona preferentemente de un grupo que consiste en: liposarcoma desdiferenciado, liposarcoma mixoide, liposarcoma pleomórfico, fibrosarcoma del adulto, mixofibrosarcoma, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, angiosarcoma, sarcoma sinovial y sarcoma indiferenciado.

5. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición que comprende Trabectedina y la composición que comprende tTF-NGR se administran al individuo mediante infusión intravenosa.

6. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición que comprende Trabectedina se administra al individuo mediante una infusión intravenosa de 24 horas.

7. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la Trabectedina se administra a una dosis de 1.5 mg/m^2.

8. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la proteína tTF-NGR comprende o tiene la secuencia de SEC ID NO: 2.

9. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la primera administración de la proteína tTF-NGR se inicia entre 1 minuto y 1 hora después de finalizar la administración de Trabectedina.

10. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la proteína tTF-NGR se administra al individuo mediante una infusión intravenosa de 1 hora.

11. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la administración de la proteína tTF-NGR se repite una vez al día durante los siguientes 4 días consecutivos.

12. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la proteína tTF-NGR se administra a una dosis de 3 mg/m^2/día.

13. La composición para usarse en el tratamiento del sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la proteína tTF-NGR se administra en una solución de NaCl al 0.9% en un volumen de infusión total de 100 ml.

14. La composición para usarse en el tratamiento de sarcoma de tejido blando de conformidad con una de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la proteína tTF-NGR se infunde a través de un puerto de acceso venoso central.



Figura 1

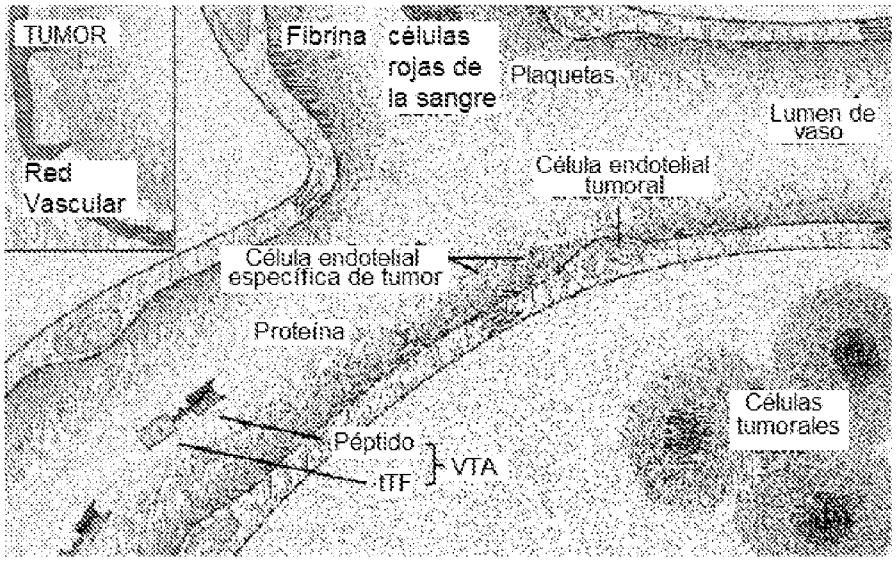


Figura 2A

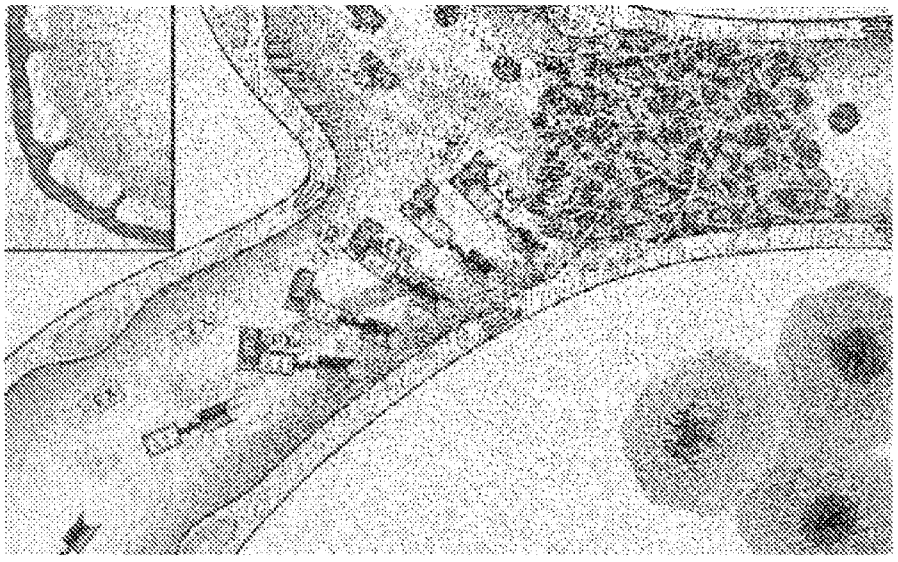
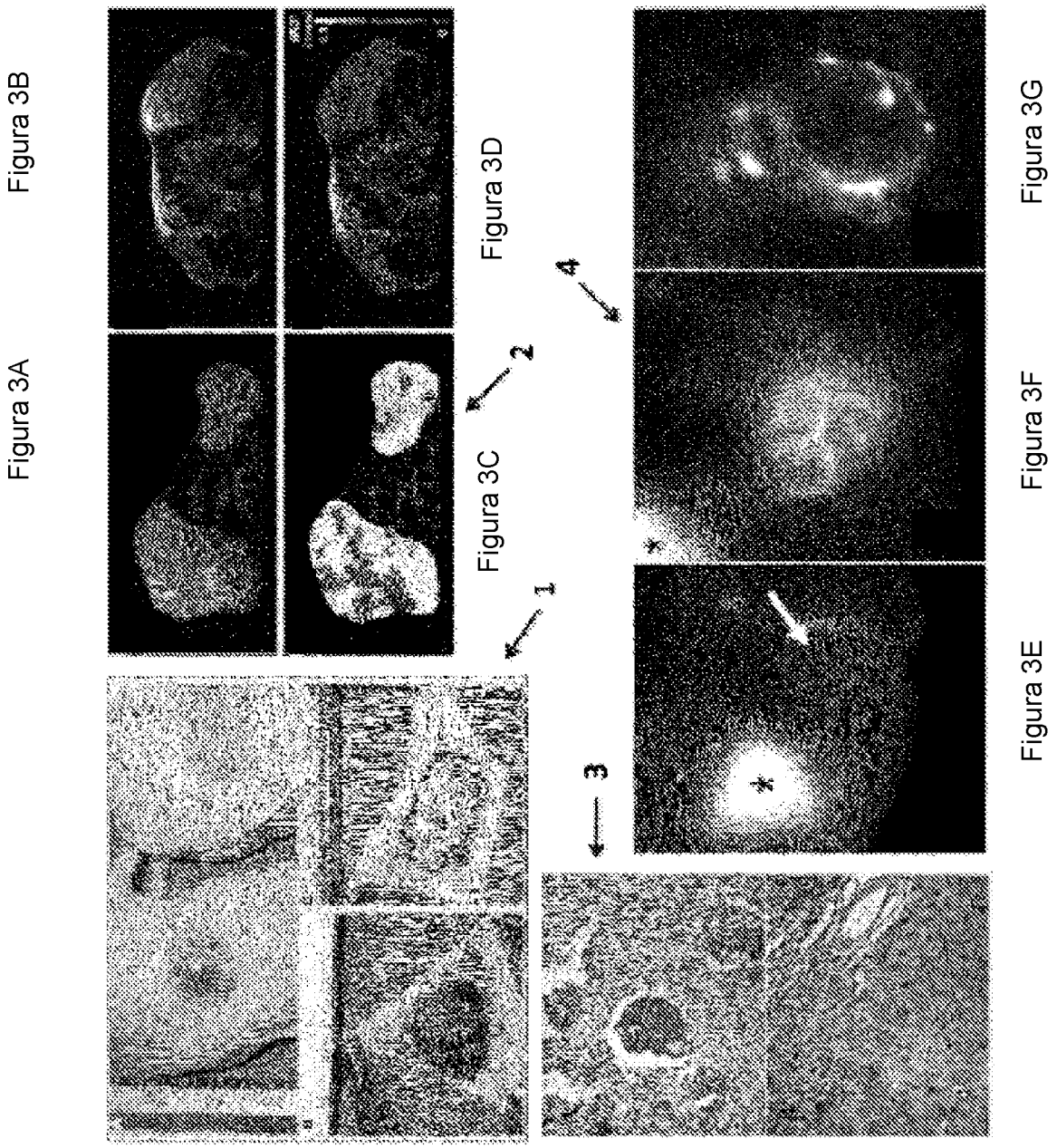
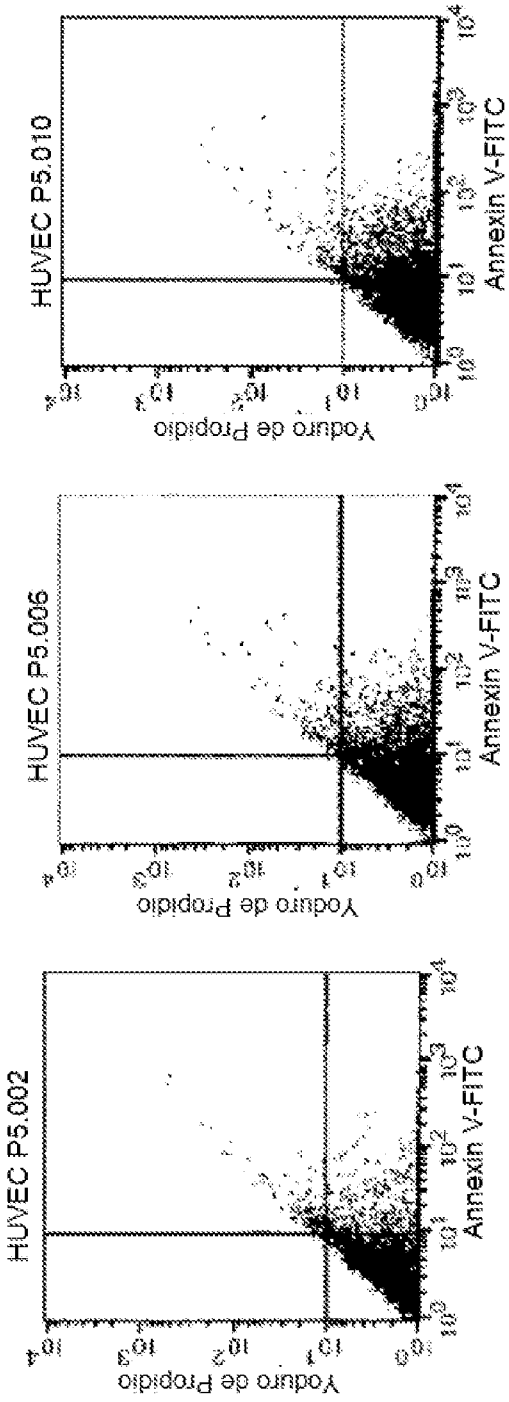


Figura 2B


Figura 3A
Figura 3B
Figura 3C
Figura 3D
Figura 3E
Figura 3F
Figura 3G
1
2
3
4



Archivo: HUVEC P5.002
Muestra ID: 0nM_8h
ID Paciente: Annexin V-FITC
Fecha de Adquisición: 07-Feb-18
Eventos Totales: 10000

Qued	Eventos	%Cerrado	%Total
UL	12	0.12	0.12
UR	168	1.68	1.68
LL	9099	90.99	90.99
LR	721	7.21	7.21

Archivo: HUVEC P5.006
Muestra ID: 10nM_8h
ID Paciente: Annexin V-FITC
Fecha de Adquisición: 07-Feb-18
Eventos Totales: 10000

Qued	Eventos	%Cerrado	%Total
UL	2	0.02	0.02
UR	188	1.88	1.88
LL	7540	75.40	75.40
LR	2267	22.67	22.67

Archivo: HUVEC P5.010
Muestra ID: 15nM_8h
ID Paciente: Annexin V-FITC
Fecha de Adquisición: 07-Feb-18
Eventos Totales: 10000

Qued	Eventos	%Cerrado	%Total
UL	7	0.07	0.07
UR	168	1.68	1.68
LL	6014	60.14	60.14
LR	2811	28.11	28.11

Figura 4A

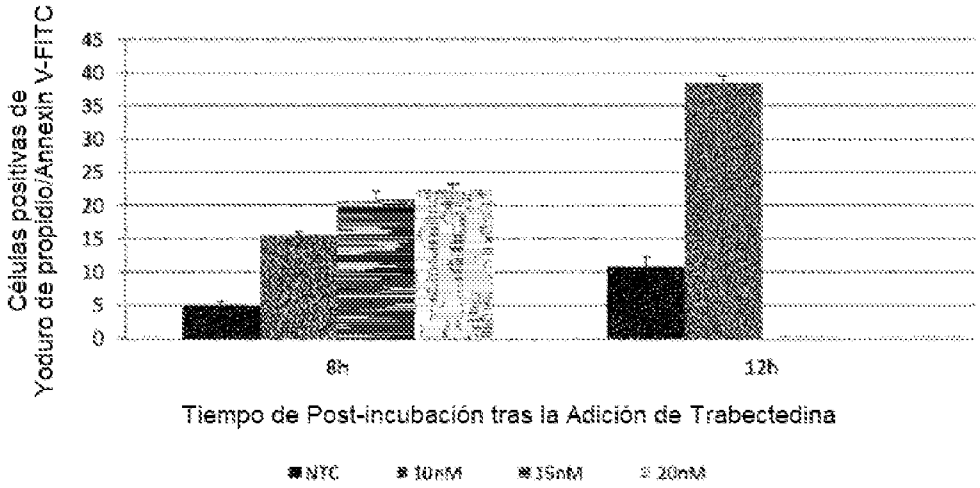


Figura 4B

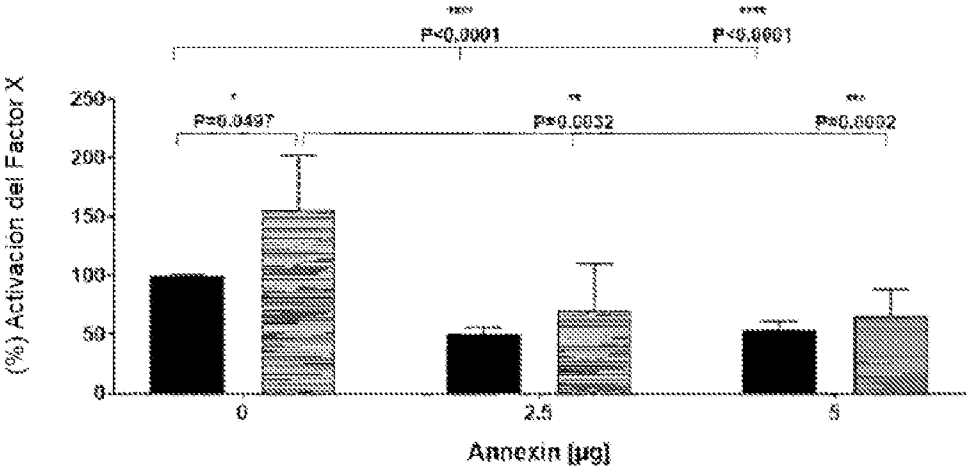


Figura 4C

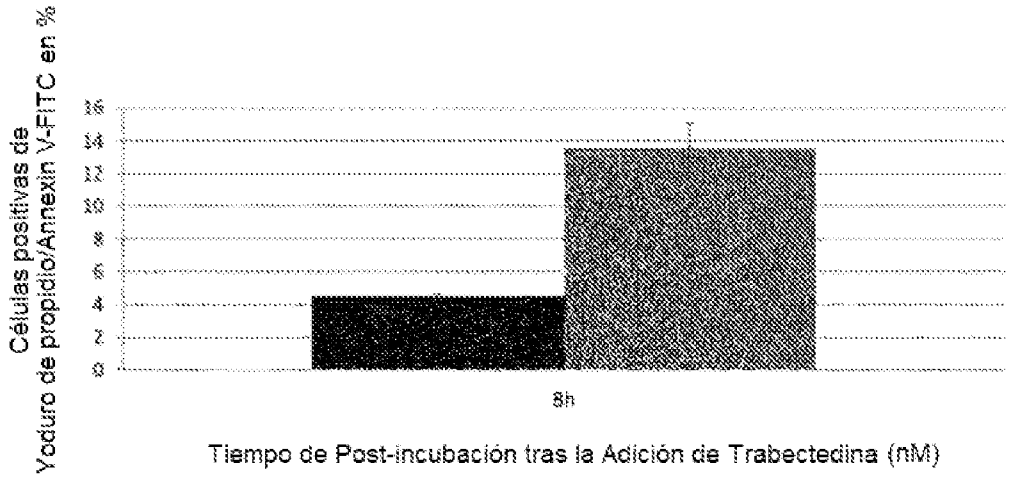


Figura 5A

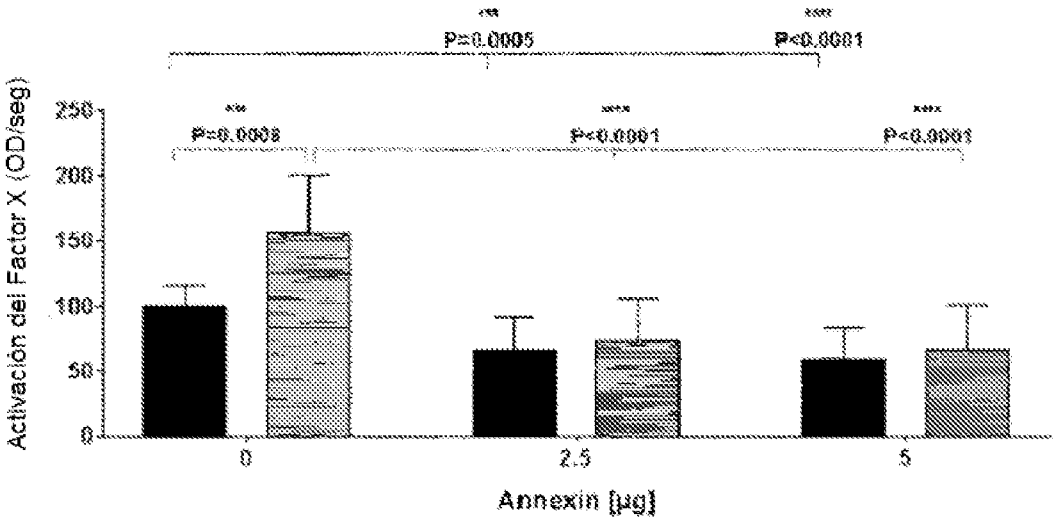


Figura 5B

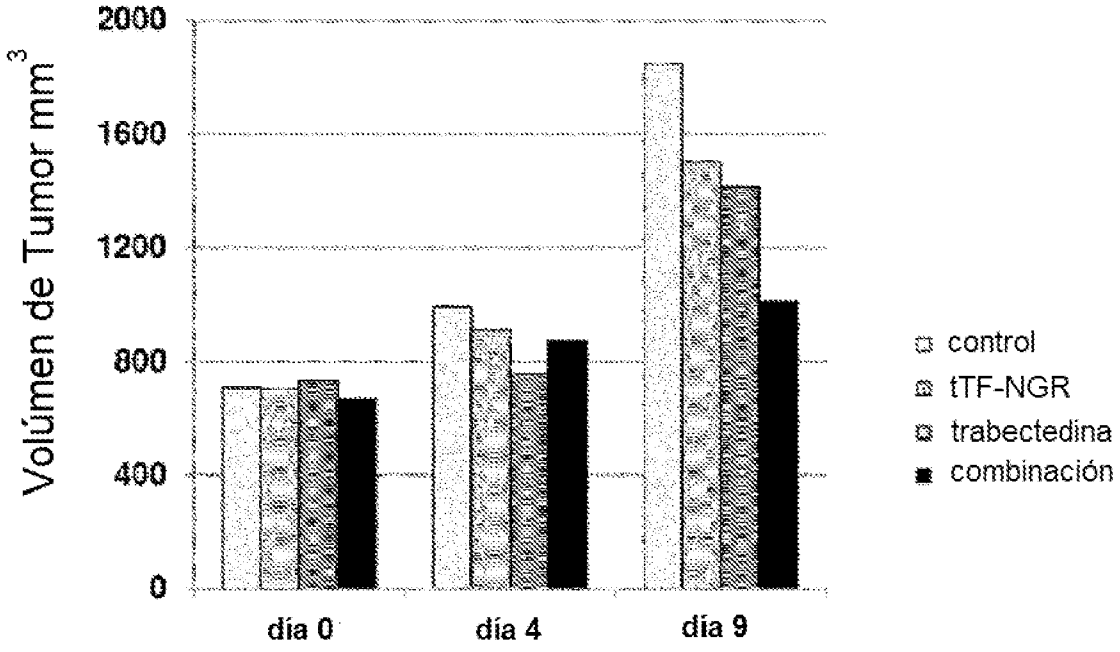

Volúmen de Tumor mm3
2000
1600
1200
800
400
0
día 0
día 4
día 9
control
tTF-NGR
trabectedina
combinación

Figura 6