

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-523517

(P2004-523517A)

(43) 公表日 平成16年8月5日(2004.8.5)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**A61K 31/09**  
**A61K 31/282**  
**A61K 31/337**  
**A61K 31/4745**  
**A61K 31/661**

F 1

A 61 K 31/09  
A 61 K 31/282  
A 61 K 31/337  
A 61 K 31/4745  
A 61 K 31/661

テーマコード(参考)

4 C 084  
4 C 086  
4 C 088  
4 C 206

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-557211 (P2002-557211)  
(86) (22) 出願日 平成13年12月20日 (2001.12.20)  
(85) 翻訳文提出日 平成15年6月20日 (2003.6.20)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/050261  
(87) 国際公開番号 WO2002/056692  
(87) 国際公開日 平成14年7月25日 (2002.7.25)  
(31) 優先権主張番号 60/258,195  
(32) 優先日 平成12年12月22日 (2000.12.22)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 503106926  
プリストルーマイヤーズ スクイブ カン  
パニー  
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O  
8543-4000 ブリンストン ロー<sup>1</sup>  
レンスヴィル-ブリンストン ロード ピ  
ー オー ボックス 4000  
(71) 出願人 503224792  
オキシジーン、 インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ O2  
472, ウォータータウン, アーセナ  
ル ストリート 321  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍増殖および転移を調節するための方法

## (57) 【要約】

腫瘍の増殖または転移を調節するための方法および薬学的組成物を提供する。本発明の方法は、より大きな全体的効力(例えば、相乗作用を達成するかまたは拮抗作用を避ける)などの利点を提供し、そして望ましい場合、使用される1種以上の個々の薬剤の量を減少させ、副作用を同時に減少させ得る。さらに、処置される腫瘍は、所与の抗癌剤に対して最適に応答性ではない場合、本発明の併用療法の使用は、それにもかかわらず、効果的な処置を提供し得る。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

腫瘍の増殖または転移を調節する必要のある動物において、腫瘍の増殖または転移を調節する方法であって、有効量の少なくとも1つの抗癌剤およびコンプレタスタチンA-4化合物を連続投与または同時投与する工程を包含する、方法。

**【請求項 2】**

腫瘍の増殖または転移を調節する必要のある動物において、腫瘍の増殖または転移を調節する方法であって、有効量のコンプレタスタチンA-4化合物および少なくとも1つの抗癌剤を投与する工程を包含し、ここで、該コンプレタスタチンA-4化合物は、時間依存性有効腫瘍濃度の該抗癌剤を提供するように、該腫瘍への血流を調節するのに十分な該抗癌剤の投与と関連した時間に投与される、方法。

**【請求項 3】**

前記少なくとも1つの抗癌剤が、アルキル化剤、二官能性アルキル化剤、非ステロイドアロマターゼインヒビター、免疫療法剤、ニトロソ尿素化合物、代謝拮抗物質、抗腫瘍抗生物質、有糸分裂インヒビター、放射線、トポイソメラーゼIインヒビター、および抗エストロゲンからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記少なくとも1つの抗癌剤が、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、放射線、CPT-11、パクリタキセル、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、エポチロン、ゲムシタビン、UFT、ハーセプチニン、シトキサン、ダカルバキシン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、クロラムブシル、アナストロゾールおよびエキセムスタン、カルムスチン、ロムスチン、メトトレキセート、ゲムシタビン、シタラビン、フルダラビン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ドセタキセル、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、トポテカン、ルプロン、メガス、ロイコボリン、イレッサ、フラボピリドール、免疫療法剤、ZD6474、SUS6668、ならびにバルスボダールからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記抗癌剤が、「ピーク腫瘍濃度剤」であり、前記コンプレタスタチンA-4化合物と同時に投与されるかまたは近い時間に投与される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記ピーク腫瘍濃度剤が、シトキサン、マイトマイシンC、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンからなる群より選択される、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記抗癌剤が、持続性曝露剤であり、前記コンプレタスタチンA-4化合物の投与後に投与される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記持続性曝露剤が、タキサン、エトポシド、リン酸エトポシド、イムノトキシン、およびエポチロンからなる群より選択される、請求項7に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記抗癌剤が、AUC剤であり、該AUC剤が、前記コンプレタスタチンA-4化合物の投与前に投与される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記AUC剤が、アドリアマイシン、CTP-11、およびトポテカンからなる群より選択される、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記コンプレタスタチンA-4化合物が、コンプレタスタチンA-4ニナトリウム塩であり、前記ピーク腫瘍濃度剤がシスプラチンである、請求項6に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記コンプレタスタチンA-4化合物が、コンプレタスタチンA-4ニナトリウム塩であり

10

20

30

40

50

、前記ピーク腫瘍濃度剤がカルボプラチンである、請求項6に記載の方法。

【請求項13】

前記コンプレタスタチンA-4化合物が、コンプレタスタチンA-4リン酸ニナトリウム塩であり、前記AUC剤がCPT-11である、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

前記コンプレタスタチンA-4化合物が、コンプレタスタチンA-4リン酸ニナトリウム塩であり、前記持続性曝露剤がパクリタキセルである、請求項8に記載の方法。

【請求項15】

前記コンプレタスタチンA-4ニナトリウム塩が、パクリタキセルの少なくとも3時間前に投与される、請求項14に記載の方法。

10

【請求項16】

腫瘍の増殖または転移を調節する必要のある動物において、腫瘍の増殖または転移を調節する方法であって、有効量の少なくとも1つの抗癌剤およびコンプレタスタチンA-1化合物を連続投与または同時投与する工程を包含する、方法。

【請求項17】

腫瘍の増殖または転移を調節する必要のある動物において、腫瘍の増殖または転移を調節する方法であって、有効量のコンプレタスタチンA-1化合物および少なくとも1つの抗癌剤を投与する工程を包含し、ここで、該コンプレタスタチンA-1化合物は、時間依存性有効腫瘍濃度の該抗癌剤を提供するように、該腫瘍への血流を調節するのに十分な該抗癌剤の投与と関連した時間に投与される、方法。

20

【請求項18】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、放射線、CPT-11、パクリタキセル、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、エポチロイン、ゲムシタビン、UFT、ハーセプチン、シトキサン、ダカルバキシン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、クロラムブシル、アナストロゾールおよびエキセムスタン、カルムスチン、ロムスチン、メトトレキセート、マイトマイシンC、ゲムシタビン、シタラビン、フルダラビン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ドセタキセル、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、トポテカン、ルブロン、メガス、ロイコボリン、イレッサ、フラボピリドール、免疫療法剤、ZD6474、SU6668、ならびにバルスボダールからなる群より選択される、請求項16に記載の方法。

30

【請求項19】

前記コンプレタスタチンA-1化合物が、コンプレタスタチンA-1ニナトリウム塩であり、前記抗癌剤がカルボプラチンである、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記コンプレタスタチンA-1化合物が、コンプレタスタチンA-1ニナトリウム塩であり、前記抗癌剤がシスプラチンである、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

前記コンプレタスタチンA-1化合物が、コンプレタスタチンA-1ニナトリウム塩であり、前記免疫療法剤が、BR96-sfv-PF40である、請求項17に記載の方法。

40

【請求項22】

腫瘍の増殖または転移を調節する必要のある動物において、腫瘍の増殖または転移を調節するための薬学的組成物であって、薬学的に受容可能なキャリア中に、有効量の少なくとも1つの抗癌剤およびコンプレタスタチンA-4化合物を含有する、薬学的組成物。

【請求項23】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、放射線、CPT-11、パクリタキセル、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、エポチロイン、ゲムシタビン、UFT、ハーセプチン、シトキサン、ダカルバキシン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、クロラムブシル、アナストロゾールおよびエキセムスタン、カルムスチン、ロムスチン、メトトレキセート、ゲムシタビン、シタラビン、マ

50

イトマイシンC、フルダラбин、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ドセタキセル、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、トポテカン、ルプロン、メガス、ロイコボリン、イレッサ、フラボピリドール、免疫療法剤、ZD6474、SUG6668、ならびにバルスボダールからなる群より選択される、請求項22に記載の薬学的組成物。

【請求項24】

前記コンプレタスタチンA-4化合物がコンプレタスタチンA-4ニナトリウム塩である、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項25】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、シトキサン、マイトイシンC、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンからなる群より選択される、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項26】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、シトキサン、マイトイシンC、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンからなる群より選択される、請求項24に記載の薬学的組成物。

【請求項27】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、タキサン、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド、リン酸エトポシド、およびエポチロンからなる群より選択される、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項28】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、タキサン、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド、リン酸エトポシド、およびエポチロンからなる群より選択される、請求項24に記載の薬学的組成物。

【請求項29】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、アドリアマイシン、CTP-11、およびトポテカンからなる群より選択される、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項30】

前記少なくとも1つの抗癌剤が、アドリアマイシン、CTP-11、およびトポテカンからなる群より選択される、請求項24に記載の薬学的組成物。

【請求項31】

前記抗癌剤が、シスプラチンである、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項32】

前記抗癌剤が、シスプラチンである、請求項24に記載の薬学的組成物。

【請求項33】

前記抗癌剤が、カルボプラチンである、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項34】

前記抗癌剤が、カルボプラチンである、請求項24に記載の薬学的組成物。

【請求項35】

前記抗癌剤が、CPT-11である、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項36】

前記抗癌剤が、CPT-11である、請求項24に記載の薬学的組成物。

【請求項37】

前記抗癌剤が、パクリタキセルである、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項38】

前記抗癌剤が、パクリタキセルである、請求項24に記載の薬学的組成物。

【請求項39】

前記免疫療法剤が、BR96-sfv-PE40である、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項40】

10

20

30

40

50

前記免疫療法剤が、B R 9 6 - s f v - P E 4 0 である、請求項 2 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 1】

腫瘍の増殖または転移を調節する必要のある動物において、腫瘍の増殖または転移を調節するための薬学的組成物であって、薬学的に受容可能なキャリア中に、有効量の少なくとも 1 つの抗癌剤およびコンプレタスタチン A - 1 化合物を含有する、薬学的組成物。

【請求項 4 2】

前記少なくとも 1 つの抗癌剤が、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、放射線、C P T - 1 1 、5 - フルオロウラシル、ロイコボリン、エポチロン、ゲムシタビン、U F T 、ハーセプチン、シトキサン、タキサン、ダカルバキシン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、クロラムブシル、アナストロゾールおよびエキセムスタン、カルムスチン、ロムスチン、メトトレキセート、ゲムシタビン、シタラビン、フルダラビン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ドセタキセル、ピンプラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビン、トポテカン、ルプロン、メガス、ロイコボリン、イレッサ、マイトマイシン C 、フラボピリドール、Z D 6 4 7 4 、S U 6 6 6 8 、免疫療法剤、ならびにバルスボダールからなる群より選択される、請求項 4 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 3】

前記コンプレタスタチン A - 1 化合物がコンプレタスタチン A - 1 ニナトリウム塩である、請求項 4 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 4】

前記少なくとも 1 つの抗癌剤が、シトキサン、マイトマイシン C 、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンからなる群より選択される、請求項 4 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 5】

前記少なくとも 1 つの抗癌剤が、シトキサン、マイトマイシン C 、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンからなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 6】

前記少なくとも 1 つの抗癌剤が、タキサン、エトポシド、リン酸エトポシド、およびエポチロンからなる群より選択される、請求項 4 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 7】

前記少なくとも 1 つの抗癌剤が、タキサン、エトポシド、リン酸エトポシド、およびエポチロンからなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 8】

前記少なくとも 1 つの抗癌剤が、アドリアマイシン、C T P - 1 1 、およびトポテカンからなる群より選択される、請求項 4 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 9】

前記少なくとも 1 つの抗癌剤が、アドリアマイシン、C T P - 1 1 、およびトポテカンからなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 0】

前記抗癌剤が、シスプラチンである、請求項 4 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 1】

前記抗癌剤が、シスプラチンである、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 2】

前記抗癌剤が、カルボプラチンである、請求項 4 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 3】

前記抗癌剤が、カルボプラチンである、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5 4】

前記抗癌剤が、C P T - 1 1 である、請求項 4 2 に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

**【請求項 5 5】**

前記抗癌剤が、CPT-11である、請求項43に記載の薬学的組成物。

**【請求項 5 6】**

前記抗癌剤が、パクリタキセルである、請求項42に記載の薬学的組成物。

**【請求項 5 7】**

前記抗癌剤が、パクリタキセルである、請求項43に記載の薬学的組成物。

**【請求項 5 8】**

前記抗癌剤が、BR96-sfv-P E 40である、請求項42に記載の薬学的組成物。

**【請求項 5 9】**

前記抗癌剤が、BR96-sfv-P E 40である、請求項43に記載の薬学的組成物。 10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2000年12月22日に出願され、「Methods For Modulating Tumor Growth and Metastasis」と題された、米国仮出願第60/258,195号に対する優先権を主張する。

**【0002】****(発明の分野)**

本発明は、腫瘍学および改善された化学療法レジメンの分野に関する。

**【背景技術】****【0003】****(発明の背景)**

本明細書中で言及される各文献および公開された特許文書の開示は、その全体が、本明細書中において参考として援用される。

**【0004】**

癌発生の間の細胞形質転換は、細胞増殖調節の正常なパターンにおける複数の変更に関する。発癌のプロセスにおける最初の事象は、いくつかの方法（例えば、増幅、変異、染色体再編成）による癌遺伝子の活性化、ならびに多くの場合、抗癌遺伝子機能の除去を含む。大部分の悪性腫瘍および处置不可能な腫瘍において、細胞増殖に対する正常な拘束は完全に失われる。なぜなら、形質転換された細胞が、それらの原発性部位から逃れ、そして身体の他の部位に転移するからである。いくつかの腫瘍の増強した増殖および浸潤性の特性についての1つの理由は、蓄積的効果を有する、癌遺伝子における変異の数の増加の獲得であり得る（Bearら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7495-7499, (1989)）。

**【0005】**

あるいは、生物の成長および細胞機能に必要とされる正常な細胞シグナル伝達経路を介して癌遺伝子が機能する範囲において（McCormick、Nature 363: 15-16, 1993）において概説される）、たとえ、シグナル伝達経路の変異のみでは癌を引き起こさないかもしれないとしても、癌遺伝子シグナル伝達経路におけるさらなる変化は、悪性腫瘍に寄与し得る（Gilkisら、Mol. Cell. Biol. 13: 1759-1768, (1993)）。

**【0006】**

いくつかの異なるクラスのタンパク質が、形質転換に関する細胞分裂特性および形態学における異なる型の変化をもたらすことに関与することが公知である。これらの変化は、以下のように要約され得る：最初に、連続的な細胞周期の促進（不朽化）；第2に、増殖阻害性シグナルおよび細胞アポトーシスシグナルに対する応答の喪失；および第3に、浸潤性特性を増強する細胞の形態学的再構築。

**【0007】**

National Cancer Instituteは、米国のみにおいて、3人のうち1人が、寿命の間に、癌に襲われると推定している。さらに、癌にかかった約50%~6 50

0 % の人々が、最終的に、その病気で亡くなる。この疾患の広範な発症は、悪性疾患の処置のための改善された抗癌レジメンについての必要性を強調する。

【0008】

現在観測される幅広い種々の癌に起因して、身体内の癌を破壊するために多くの抗ガン剤が開発されている。これらの化合物は、正常な健常な細胞を乱さないままにしながら、悪性細胞を破壊するかまたは悪性細胞の増殖を阻害する目的で癌患者に投与される。抗癌剤は、作用の機構に基づいて分類される。1つの型の化学療法剤は、金属配位錯体と呼ばれる。この型の化学療法剤は、主に、細胞の核内において鎖間DNA架橋を形成し、それによって、細胞複製を妨げると考えられている。結果として、腫瘍増殖は、最初に抑制され、次いで、逆転される。別の型の化学療法剤は、アルキル化剤と呼ばれる。これらの化合物は、分裂する癌細胞のDNA中に外因性の組成物または分子を挿入することによって機能する。これらの外因性部分の結果として、癌細胞の正常な機能が破壊され、増殖が妨げられる。別の型の化学療法剤は、抗新生物剤である。この型の薬剤は、癌細胞の増殖および拡散を妨げるか、死滅させるか、または遮断する。なお他の型の抗癌剤としては、非ステロイド性アロマスターゼ(aromastase)インヒビター、二官能性アルキル化剤などが挙げられる。

【0009】

不運なことに、有害な副作用が、これらの薬剤の各々に付随する。例えば、フルオロウラシル(抗新生物剤として一般的に使用される)は、正常な皮膚の膨張または赤色化、黒色またはタール状の便、尿中の血液、胸痛、錯乱、下痢、息切れ、および嗜眠状態を引き起こす。フルオロウラシルの投与はまた、発熱、悪寒、咳、咽喉炎、腰痛、口のただれ、恶心、嘔吐、疼痛および/または排尿困難に関係している。タキサン投与は、少し挙げると、失神、拍動異常、高血圧および静脈血栓症のような心臓血管事象；骨髄抑制；好中球減少症；貧血；末梢神経障害、関節痛/筋肉痛；恶心/嘔吐および脱毛症に関係している。

【0010】

コンブレタスタチン(combretastatin)は、別のクラスの抗癌剤である。コンブレタスタチンは、アフリカの木のコンブレタムカフラン(combretum caffrum)(Combretaceae)の幹から単離されており、ミクロチューブリンアセンブリの強力なインヒビターである。コンブレタスタチンA-4(CA-4)は、U.S. National Cancer Institute(NCI)のマウスL1210およびP338リンパ性白血病細胞株に対して有意に活性である。さらに、CA-4は、チューブリンに結合するコルヒチンの強力なインヒビターとして、Combretum caffrumから単離された別の化合物である、コンブレタスタチンA-1(CA-1)と競合することが見出された。CA-4はまた、特定の細胞株の増殖を強力に遅らせ( $ED_{50} < 0.01 (g/ml)$ )、強力な抗有糸分裂剤である。米国特許第4,996,237号を参照のこと。さらに、CA-4とCA-1との両方についての作用の「抗脈管」機構が最近発見されている。コンブレタスタチンの可溶性が非常に限定されるので、可溶性を増大させるために、従って、CA-4およびCA-1の効力を増加させるために、コンブレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩およびコンブレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩(本明細書中、以後、それぞれ、「CA4P」および「CA1P」)のようなプロドラッグが開発されている。特に、コンブレタスタチンA-4二ナトリウム塩またはコンブレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩の投与が、腫瘍脈管系への血流の広範囲な閉鎖を引き起こし、二次的な腫瘍細胞死を導くことを、多くの研究が示している。CA-4の毒性の副作用もまた報告されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従って、患者への暴露およびこのようないくつかの薬剤に関連する望ましくない副作用を最小化する優れた効果的な抗癌治療を提供する必要性が、当該分野に存在する。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

30

40

50

## 【0012】

## (発明の要旨)

本発明は、薬剤の組み合わせを使用する、腫瘍の増殖または転移を調節するための効果的な治療方法を提供する。本発明の方法は、より大きな全体的効力（例えば、相乗作用を達成するかまたは拮抗作用を避ける）などの利点を提供し、そして望ましい場合、使用される1種以上の個々の薬剤の量を減少させ、副作用を同時に減少させ得る。さらに、処置される腫瘍は、所与の抗癌剤に対して最適に応答性ではない場合、本発明の併用療法の使用は、それにもかかわらず、効果的な処置を提供し得る。

## 【0013】

特に、本発明は、腫瘍の増殖または転移を調節する必要がある動物（特に、ヒト）において、腫瘍の増殖または転移を調節するための方法を提供し、この方法は、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物および少なくとも1種の他の抗癌剤の、その有効量での連続的投与または同時投与を含む。好ましいこのような薬剤は、さらに以下に記載される。本発明の方法は、上記利点を提供し得る。

## 【0014】

さらに、本発明は、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物および他の抗癌剤を投与する特定の順序が、インビボで、組み合わせの全体的な効力を増強し得ることを見出した。抗脈管剤としてのコンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物は、腫瘍組織に対する血流を調節する。時間依存性有効腫瘍濃度の他の抗癌剤を提供するために、腫瘍への血流を調節するためのコンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物の投与の時間を調節することによって、組み合わせの全体的な効力が増強される。

## 【0015】

任意の作用の分子理論によって束縛されることを望まないが、特定の抗癌剤は、比較的高い腫瘍濃度で最も効果的であるが、腫瘍組織から迅速に取り除かれる。このような薬剤に対して、本発明は、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物および他の抗癌剤の同時投与が、組み合わせの効果を増強することを見出した。同時投与は、他の抗癌剤が腫瘍組織においてピーク濃度まで迅速に蓄積することを可能にしながら、なお、腫瘍組織を取り除く脈管系がコンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物によって破壊されるので、この薬剤を「捕捉」することを可能にする。このような薬剤は、本明細書中において、「ピーク腫瘍濃度薬剤」と呼ばれる。従って、ピーク腫瘍濃度薬剤は、好ましくは、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物と同時に、または密接に時間的に近接して投与される。

## 【0016】

例えば、他の薬剤は、高い濃度で存在する必要はないが、全細胞周期の比較的短い期間の間、効果的である。このような薬剤がタンパク質に結合し、腫瘍組織と接触したままである場合に経時にわたって不活性になり得るので、従って、これらは、薬剤の連続的供給が腫瘍に達する条件下で最も効率的である。これらの場合における併用療法の効力の増強は、抗癌剤およびコンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物を、連続的に、他の薬剤の前に、1つの薬剤の作用を可能にするのに十分な投与間の遅延とともに、投与することによって得られ得る。従って、このような抗癌剤が、最初に投与され、続いて、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物の投与の前の遅延があり、抗癌剤は、化合物の作用を可能にする十分な持続期間にわたって、腫瘍組織に達し、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物の引き続く投与が、腫瘍組織にさらに損傷を与える。

## 【0017】

コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物が最初に投与され、続いて、抗癌剤の投与の前に腫瘍への血流を再開させる遅延がある場合、腫瘍は、最初に、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物によって弱められ、続いて、抗癌剤により腫瘍にさらに損傷が与えられる。この後者の場合、抗癌

10

20

30

40

50

剤の腫瘍濃度の持続時間は、ピーク濃度よりも有意である。コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の最初の投与による腫瘍脈管系への損傷は、必要とされる相対的に低い濃度の抗癌剤が、一旦血流が再開した場合に、腫瘍組織に達することを妨げない。このような薬剤は、本明細書中において、「持続時間暴露薬剤」と呼ばれる。従って、持続時間暴露薬剤およびコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物は、好ましくは、最初のコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の投与、続く抗癌剤の投与、あるいはその逆のいずれかで、連続的に投与される。但し、十分な遅延が、組み合わせを増強するために投与の間で可能にされる。コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の投与の後の抗癌剤の投与が、持続時間暴露薬剤について最も好ましい。

10

## 【0018】

本発明の方法のなおさらなる実施形態において、特定の薬剤は、より長い持続時間にわたって腫瘍組織において比較的高い濃度で存在する場合に最も効果的である（すなわち、濃度対時間のプロットの「曲線下面積（AUC）」を最大にする）。最初にこのような薬剤を投与し、続いて、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の投与の前の遅延があるので、抗癌剤の作用が可能になり、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の引き続く投与が、さらに腫瘍組織を弱める。このような薬剤について、最初の抗癌剤の投与は、腫瘍脈管系の早発な損傷を避け、そして十分な濃度の抗癌剤が腫瘍に到達することを可能にする。このような薬剤は、本明細書中において、「高AUC薬剤」と呼ばれる。従って、高AUC薬剤およびコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物は、好ましくは、連続的に投与され、高AUC薬剤の投与が、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の投与に先立つ。但し、十分な遅延は、組み合わせを増強するために投与間で可能にされる。

20

## 【0019】

従って、本発明は、さらなる実施形態として、腫瘍の増殖または転移の調節が必要な動物（特に、ヒト）において、腫瘍の増殖または転移を調節するための方法を提供し、この方法は、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物および少なくとも1種の抗癌剤を、その有効量で投与することを包含し、ここで、このコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物は、この抗癌剤の時間依存性有効腫瘍濃度を提供するために、この腫瘍に対する血流を調節するのに十分な、抗癌剤の投与に対する時間で投与される。本発明の方法は、使用される組み合わせの全体的な効力の増強を可能にする。

30

## 【0020】

用語「時間依存性有効腫瘍濃度」は、本明細書中において使用される場合、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物および他の抗癌剤の組み合わせの作用を増強する、経時にわたる（すなわち、投与からこの薬剤が身体から取り除かれるまでの）腫瘍組織における他の抗癌剤の濃度を示す。従って、この組み合わせが他の点で拮抗性である場合、「増強」は、拮抗性の結果なしでの組み合わせの使用を示し得る。「増強」はまた、組み合わせの全体的な効力の予期しない改善（例えば、相乗作用）を達成することを示し得る。

40

## 【0021】

コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物および少なくとも1種の抗癌剤の同時投与が企図される場合、本発明はまた、少なくとも1種の抗癌剤およびコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物を含む薬学的組成物を提供する。例えば、1つの局面において、抗癌剤および/またはコンプレタスタチンA-4化合物もしくはコンプレタスタチンA-1化合物は、個々の薬剤について治療用量未満で存在し得、この薬剤は、組み合わせにおいて有効であり、そして効力を維持しながら減少した副作用を提供する。あるいは、各薬剤は、個々の薬剤について、Physician's Desk Referenceに見出される用量のような、より高い

50

用量で提供され得る。

【0022】

コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物および抗癌剤の同時投与または連続的投与が企図される場合、本発明は、さらに、薬学的キットを提供する。本発明の例示的なキットは、少なくとも1種の抗癌剤を含む第1薬学的組成物およびコンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物を含む第2薬学的組成物を、パッケージ中に一緒に含む。抗癌剤および/またはコンブレタスタチンA-4化合物もしくはコンブレタスタチンA-1化合物は、例えば、個々の薬剤について治療用量未満で存在し得、この薬剤は、組み合わせにおいて有効であり、そして効力を維持しながら減少した副作用を提供する。あるいは、各薬剤は、この薬剤について、Physician's Desk Referenceに見出される用量のような、より高い用量で提供され得る。

【0023】

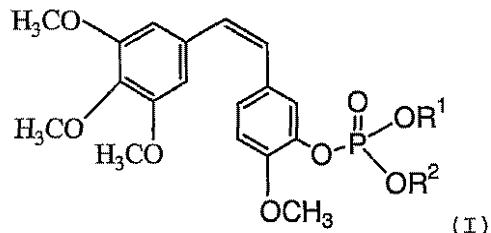
以下の定義は、本発明の理解を容易にするために提供される。

【0024】

本明細書中において使用される場合、用語「コンブレタスタチンA-4化合物」は、コンブレタスタチンA-4、これらのプロドラッグ(好ましくは、リン酸塩プロドラッグ)およびこれらの誘導体、ならびにこれらの化合物の塩のうちの少なくとも1つを示す。このような化合物としては、コンブレタスタチンA-4、およびコンブレタスタチンA-4リン酸塩によって例示されるコンブレタスタチンA-4の種々のプロドラッグおよびこれらの塩(特に、コンブレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法における使用に企図される好ましいコンブレタスタチンA-4化合物は、WO 00/48606; WO 99/35150; 米国特許第5,561,122号; 米国特許第4,996,237号; 米国仮出願番号60/232,568(John J. Venitによって、2000年9月14日に出願され、「Combretastatin A-4 phosphate Mono- and Di-Amino Acid Salt Prodrugs」と題され、この米国仮出願番号60/233,568は、式Iの化合物:

【0025】

【化1】



(ここで、OR<sup>1</sup>およびOR<sup>2</sup>のうちの一方が、-O<sup>-</sup>QH<sup>+</sup>であり、そして他方がヒドロキシルまたは-O<sup>-</sup>QH<sup>+</sup>であり、Qが、少なくとも2つの窒素原子を含むアミノ酸であり、ここで、これらの窒素原子のうち1つが、プロトンとともに、第4級アンモニウムカチオンQH<sup>+</sup>を形成し、好ましくは、ここで、OR<sup>1</sup>およびOR<sup>2</sup>のうちの一方が、ヒドロキシルであり、そして他方が-O<sup>-</sup>QH<sup>+</sup>であり、ここで、Qが、L-ヒスチジンである)を開示する);ならびに米国仮出願番号60/251,921(Mandar V. Dalilaによって、2000年12月7日に出願され、「Combretastatin A-4 Phosphate Prodrug Mono- and Di-Organic Amine Salts」と題され、この米国仮出願番号60/251,921は、上記式Iに示される構造を有する化合物を開示し、ここで、OR<sup>1</sup>およびOR<sup>2</sup>のうちの一方が、-O<sup>-</sup>QH<sup>+</sup>であり、そして他方がヒドロキシルまたは-O<sup>-</sup>QH<sup>+</sup>であり;そしてQが、少なくとも1個の窒素原子を含む有機アミンであり、この窒素原子が

10

20

30

40

50

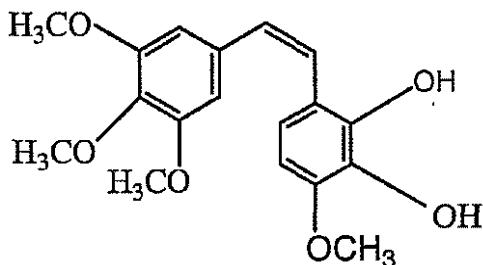
、プロトンとともに、第4級アンモニウムカチオン  $Q H^+$  を形成し、好ましくは、ここで、 $O R^1$  および  $O R^2$  のうちの一方が、ヒドロキシルであり、そして他方が  $-O^- Q H^+$  であり、 $Q$  が、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(「TRIS」)である。上に言及するように、これらの文書のそれぞれは、その全体が、本明細書中において参考として援用される。

## 【0026】

本明細書中で使用される場合、用語コンプレタスタチンA-1化合物は、少なくとも1つのコンプレタスタチンA-1、そのプロドラッグ(好ましくは、ホスフェートプロドラッグ)、および誘導体、ならびにこれらの化合物の塩を示す。コンプレタスタチンA-1は、米国特許第5,409,953号(Pettit)に記載され、以下の一般構造を有する:

## 【0027】

## 【化2】



10

20

本明細書中で使用される場合、用語「調節する」、「調節すること(調節している)」、または「調節」とは、特定のプロセスが、生じる速度を変化させるか、特定のプロセスを阻害するか、特定のプロセスを逆転するか、および/または特定のプロセスの開始を妨げることをいう。従って、その特定のプロセスが、腫瘍増殖または腫瘍転移である場合、用語「調節」としては、腫瘍増殖および/または腫瘍転移が生じる速度を減少させるか；腫瘍増殖および/または腫瘍転移を阻害するか；腫瘍増殖および/または腫瘍転移を逆転する(腫瘍退縮および/または腫瘍根絶を含む)か、ならびに/あるいは腫瘍増殖および/または腫瘍転移を妨げることが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

本明細書中で使用される場合、用語「抗癌剤」は、腫瘍増殖または腫瘍転移を調節し得る化合物または電磁放射線(特に、X線)を示す。このような薬剤をコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物とともに使用することを言及する場合、この用語は、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物以外の薬剤をいう。他に示されない限り、この用語は、1つ、または1つを超えるこのような薬剤を含み得る。従って、用語「抗癌剤」は、本発明の方法および組成物における1以上の化合物および/または電磁放射線の使用を包含する。1種類を超える抗癌剤が使用される場合、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の投与の相対的時間は、所望される場合、1種類または1種類を超える抗癌剤の時間依存性有効腫瘍濃度を提供するように選択され得る。

## 【0028】

上記に説明されるように、多くの型の抗癌剤は、本発明の組成物または方法における適用を有する抗癌剤の例示である。このようなクラスの抗癌剤、およびそれらの好ましい作用機構は、以下に示される。

## 【0029】

1. アルキル化剤：ヌクレオチドにアルキル基を供与する化合物。アルキル化DNAは、それ自体複製できず、細胞増殖が停止する。このような化合物の例としては、ブスルファン、配位金属錯体(例えば、カルボプラチン、オキサリプラチン、およびシスプラチン)

50

、シクロホスファミド（シトキサン（c y t o x a n ））、ダカルバキシン（d a c a r b a x i n e ）、イホスファミド、メクロレタミン（ムスタジエン（m u s t a r g e n ））、およびメルファランが挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

2. 二官能性アルキル化剤：2つの不安定メタンスルホネート基（これらは、4つの炭素アルキル鎖の反対の末端に結合している）を有する化合物。メタンスルホネート基は、癌細胞のD N Aと相互作用して、損傷を引き起こし、それらの複製を妨げる。このような化合物の例としては、クロラムブシルおよびメルファランが挙げられるが、これらに限定されない。

【0032】

3. 非ステロイド系アロマターゼインヒビター：エストロゲン生成に関与する酵素であるアロマターゼを阻害する化合物。従って、アロマターゼのブロックは、エストロゲンの生成の防止を生じる。このような化合物の例としては、アナストロゾールおよびエキセムスタン（e x e m s t a n e ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

4. 免疫療法剤：悪性疾患と関連するタンパク質を生成する癌細胞を標的とする抗体または抗体フラグメント。例示的な免疫療法剤としては、H E R 2またはH E R 2 / n e u（これは、乳癌の約25%～30%に多数存在する）を標的とするH e r c e p t i n；およびB細胞リンパ腫のアポトーシスを誘発する抗C D 2 0が挙げられる。さらなる免疫療法剤としては、免疫毒素が挙げられ、ここでリシン、ジフテリア毒素およびシュードモナス毒素のような毒素分子は、種痘特異的抗原を認識する抗体と結合体化される。結合体化は、生化学的にまたは組換えD N A法により達成され得る。

【0034】

5. ニトロソ尿素化合物：D N A修復に必要な酵素を阻害する。これら薬剤は、脳に移動可能であるので、脳腫瘍、ならびに非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および悪性黒色腫を処置するために使用される。ニトロソ尿素の例としては、カルムスチンおよびロムスチンが挙げられる。

【0035】

6. 代謝拮抗物質：D N Aおよびリボ核酸（R N A）伸長を妨害する薬物のクラス。これら薬剤は、相特異的（S期）であり、慢性白血病、ならびに乳房、卵巣および胃腸管の腫瘍を処置するために使用される。代謝拮抗物質の例としては、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、ゲムシタビン（G E M Z A R ）、シタラビン（A r a - C ）およびフルダラビンが挙げられる。

【0036】

7. 抗腫瘍性抗生物質：抗菌活性および細胞傷害活性を有する化合物。このような化合物はまた、酵素および有糸分裂を化学的に阻害するかまたは細胞膜を改変することにより、D N Aを妨害し得る。例としては、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、およびイダルビシンが挙げられるが、特に限定されない。

【0037】

8. 有糸分裂インヒビター：有糸分裂を阻害し得る化合物（例えば、チューブリン結合化合物）または細胞の再生に必要なタンパク質合成を妨げる酵素を阻害する化合物。有糸分裂インヒビターの例としては、パクリタキセルおよびドセタキセルのようなタキサン、エポチロン、エトポシド、ピンプラスチン、ピンクリスチンおよびビノレルビンが挙げられる。

【0038】

9. 放射線療法：外からの供給源（例えば、光線）または低放射活性供給源の移植のいずれかから送達されるX線またはγ線が挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

10. トポイソメラーゼⅠインヒビター：トポイソメラーゼ活性を妨害し、それによりD

10

20

30

40

50

N A複製を阻害する薬剤。このような薬剤としては、C P T - 1 1 およびトポテカンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0040】

1 1 . ホルモン療法：抗エストロゲン（例えば、タモキシフェン）、G n R Hアゴニスト（例えば、L u p r o n）、およびプロゲスチン薬剤（例えば、メガス（M e g a c e ））が挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

当然のことながら、多種多様の機構を介して機能する他の型の抗癌剤は、本発明の薬学的組成物および方法において適用される。さらなるこのような薬剤としては、例えば、ロイコボリン、キナーゼインヒビター（例えば、I r e s s a およびF l a v o p i r i d o l）、従来の化学療法剤のアナログ（例えば、タキサンアナログおよびエポチロンアナログ）、抗脈管形成剤（例えば、マトリクスマタロプロテイナーゼインヒビター）、および他のV E G Fインヒビター（例えば、Z D 6 4 7 4 およびS U 6 6 6 8 ）が挙げられる。レチノイド（例えば、T a r g r e t i n ）はまた、本発明の薬学的組成物および方法において使用され得る。ファルネシルトランスフェラーゼ活性を妨げるシグナル伝達インヒビターおよび化学療法耐性モジュレーター（例えば、V a l s p o d a r ）もまた、使用され得る。モノクローナル抗体（例えば、C 2 2 5 抗体および抗V E G F r 抗体）もまた、使用され得る。

10

【0042】

本明細書中で使用される場合、句、化合物または薬学的組成物の「有効量」とは、動物（特に、ヒト）における腫瘍増殖または腫瘍転移（腫瘍増殖または腫瘍サイズを減少させることまたは投与前のいずれの腫瘍形成もない動物における腫瘍増殖の形成を防止すること（すなわち、予防投与）が挙げられるが、これらに限定されない）を調節するに十分な量をいう。

20

【0043】

本明細書中で使用される場合、用語「プロドラッグ」とは、インピボで活性薬物が生じるように代謝的に変換される薬物の前駆体形態をいう。従って、例えば、本発明に従って動物に投与されるコンプレタスタチンA - 4 ホスフェートプロドラッグ塩またはコンプレタスタチンA - 1 ホスフェートプロドラッグ塩は、代謝的に活性を受け、例えば、解離および身体中の内因性非特異的ホスファターゼに曝された後に、コンプレタスタチンA - 4 またはコンプレタスタチンA - 1 をインピボで再生する。

30

【0044】

上記で説明されるように、本発明は、例えば、本発明の薬学的組成物を使用して腫瘍増殖または腫瘍転移を調節する方法とともに、本発明の薬学的組成物を使用して、腫瘍（特に固形腫瘍）の増殖または転移を調節する薬学的組成物に関する。

【0045】

本明細書中で使用される場合、用語「腫瘍」、「腫瘍増殖」、または「腫瘍転移」は、交換可能に使用され得、細胞の制御されない進行性の増加から生じ、生理学的機能に役立たない組織の異常な増殖をいう。固形腫瘍は、悪性（例えば、転移する傾向があり、生命を脅かす）または良性であり得る。本発明の方法に従って処置または予防され得る固形腫瘍の例としては、肉腫および癌腫が挙げられ、これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（e n d o t h e l i o s a r c o m a ）、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫（l y m p h a n g i o e n d o t h e l i o s a r c o m a ）、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫、結腸直腸癌、胃癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌腫、乳頭状癌、乳頭状腺癌、囊胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝細胞癌、肝臓転移、胆管癌、絨毛上皮癌、精上皮腫、胎生期癌、甲状腺癌腫（例えば、未分化甲状腺癌（a n a p l a s t i c t h y r o i d c a n c e r ））、ウィルムス腫瘍、頸部の癌、精巣腫瘍、肺癌腫（例えば、小細胞肺癌腫および非小細胞肺癌腫）、膀胱癌腫、上皮細胞癌腫

40

50

、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫。

【0046】

さらに、異常増殖性変化（例えば、化生および形成異常）を含む腫瘍は、上皮組織（例えば、頸部、食道および肺における組織）において、本発明の薬学的組成物または方法を用いて処置または予防され得る。従って、本発明は、新生物または癌への進行に先立って生じることが既知か、または新生物または癌への進行に先立って生じることが疑われる状態の処置を提供する。ここで、特に、過形成、化生、または最も好ましくは、形成異常からなる非新生物細胞増殖が生じる（このような異常増殖状態の総説については、RobbinsおよびAngell, 1976, Basic Pathology, 第2版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68~79を参照のこと）。過形成は、構造または機能の有意な変化なくして、組織または器官中の細胞数が増加することを含む制御された細胞増殖の形態である。例えば、子宮内膜過形成は、しばしば、子宮内膜癌に先立って生じる。化生は、成体細胞または十分に分化した細胞が、別の型の成体細胞に取って代わる、制御された細胞増殖の形態である。化生は、上皮組織細胞または結合組織細胞において生じ得る。異型の化生は、いくらか無秩序に化生の上皮細胞を含む。形成異常は、頻繁に、癌の前兆であり、主に上皮で形成され、個々の細胞の均質性および細胞の構成的配向の喪失を含む、非新生物細胞増殖の最も無秩序な形態である。形成異常細胞は、しばしば、異常に大きく、核が濃く染色され、多態性を示す。形成異常は、特徴的に、慢性刺激または炎症が存在する場所で生じ、しばしば、頸部、呼吸経路、口腔、および胆嚢で見出される。このような障害の総説については、Fishmanら, 1985, Medicine, 第2版, J. B. Lippincott Co., Philadelphiaを参照のこと。

【0047】

良性でありかつ本発明の方法に従って処置または予防され得る腫瘍の他の例としては、動静脈（AV）先天異常（特に、頭蓋内部位および筋細胞膜（myoleoma）における動静脈先天異常）が挙げられる。

【0048】

句「ピーク腫瘍濃度薬剤（Peak Tumor Concentration Agent）」とは、高腫瘍濃度で最も有効であるが、腫瘍組織から迅速に排出される抗癌剤をいう。このような薬剤は、好ましくは、本発明に従って、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物の投与と同時またはこれら化合物の投与の時間的近辺（例えば、臨床的にありそうな、特に1時間以内）に投与される。例示的なピーク腫瘍濃度薬剤としては、アルキル化剤（例えば、シトキサンおよびマイトマイシンC）、および金属配位錯体（例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0049】

本明細書中で使用される場合、句「持続性曝露剤（Duration Exposure Agent）」は、相対的に低腫瘍濃度で有効であり得るが、最も有効であるには、特定の腫瘍組織曝露時間を要する薬剤をいう。このような薬剤は、十分な遅延が投与間で生じて、組み合わせを増強するのであれば、好ましくは、本発明に従って、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物を使用して任意の順番で連続的に投与される。本発明の方法の好ましい実施形態において、持続性曝露剤は、コンブレタスタチンA-4化合物またはコンブレタスタチンA-1化合物の投与後に投与される。例示的な持続性曝露剤としては、パクリタキセルおよびドセタキセルのようなタキサン、エトポシド、リン酸エトポシド、免疫毒素およびエポチロンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0050】

本明細書中で使用される場合、句「高AUC薬剤」とは、腫瘍組織中に長期間高濃度で存在する場合に最も高い有効性を示す薬剤をいう。このような薬剤は、好ましくは、本発明

に従って、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物と連続して投与される。ここで、高AUC薬剤は、十分な遅延が投与間で生じて、組み合わせを増強するのであれば、最初に投与され、続いて、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物が投与される。例示的な高AUC薬剤は、アドリアマイシン、CPT-11(イリノテカン)およびトポテカンが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0051】

1つの好ましい実施形態において、白金ベースの抗癌剤(シスプラチンまたはカルボプラチンが挙げられる)のようなピーク腫瘍濃度薬剤は、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物(例えば、コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩またはコンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩)と本質的に同時に投与される。

#### 【0052】

なお別の好ましい実施形態において、持続性曝露剤(免疫毒素およびタキサン(例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルが挙げられる)は、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の後に投与される。持続性曝露剤の前にコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物を投与すると、腫瘍組織が持続性曝露剤に曝される時間が延びる。

#### 【0053】

さらなる好ましい実施形態において、高AUC薬剤(例えば、CPT-11)は、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物(例えば、コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩またはコンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩)の投与の前に投与される。このような薬剤は、好ましくは、例えば、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の投与の24時間以内(例えば、投与前2~24時間以内、投与前3~24時間以内、投与前6~24時間以内、投与前8~24時間以内、または投与前12~24時間以内)に投与され得る。

#### 【0054】

驚くべきことに、上記のもののような組み合わせは、組み合わせの効力を増強し、上記の利点を提供し得る。例えば、本発明の方法は、臨床医が、コンプレタスタチンA-4化合物もしくはコンプレタスタチンA-1化合物(例えば、これら化合物のリン酸二ナトリウム塩)および/または抗癌剤を、単一薬剤について使用され得る投薬量より有意に低い投薬量にて投与することを可能にする。本発明に従う、抗癌剤およびコンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物の投与に適切な好ましい投薬量は、本明細書中以下に記載される。

#### 【0055】

同時にまたは連続的に投与されるか否かにかかわらず、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物および少なくとも1種類の抗癌剤は、腫瘍増殖または腫瘍転移の調節(特に、本明細書中に記載の癌の処置)に有効な、任意の量にてまたは任意の投与経路により投与され得る。表現「化学療法的に有効な量」とは、本明細書中で使用される場合、所望の抗癌効果を提供するに十分な量の本発明の化合物をいう。必要とされる正確な量は、被験体毎に、化学療法化合物などの投与の様式毎などに変化する。

#### 【0056】

本発明はさらに、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物、および少なくとも1種類の選択された抗癌剤の両方を含む化学療法薬学的組成物、ならびに本発明の方法におけるその使用を提供する。あるいは、本発明の方法は、活性成分として上記の化合物の1つを、薬学的に受容可能なキャリア媒体または補助剤と組み合わせて含む化学療法薬学的組成物を使用して実施され得る。従って、このような実施形態において、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物(例えば、コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩またはコンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩)、および抗癌剤(例えば、シスプラチン)が処方され、別々に投与

10

20

30

40

50

される。

【0057】

(発明の詳細な説明)

本発明に従い、癌の治療に関して改善された化学療法のレジメンが、提供される。この改善された化学療法レジメンは、副作用を低下し得、かつ新生物疾患の処置の効力を増強し得る。

【0058】

South African tree Combretum caffrum由来のコンブレタスタチンA-4 (CA-4) は、チューブリンの重合の強力なインヒビターとして1980年代に最初に同定された。CA-4は、チューブリン上のコルヒチン結合部位またはその近縁の部位に高親和性で結合する。インビトロでの研究は、CA-4が、培養物中の多様な範囲の腫瘍細胞型に対する強力な細胞障害性薬剤であることを明白に実証した。最近、コンブレタスタチンA-4はまた、さらなる「抗脈管」の作用機構を有することが示された。多くの研究は、CA4Pが、腫瘍脈管系への血流の完全な閉鎖を引き起こし、第2の腫瘍細胞死を導くことを示した。いくつかの器官(例えば、脾臓、皮膚、骨格筋、および脳)への血流は、阻害され得るが、正常な組織への血流は、一般的にコンブレタスタチンA-4によって、腫瘍よりも非常に弱く影響される。CA4Pの作用のこの新規の「非細胞障害性」様式を考慮すると、癌の処置のためのCA4Pの新規の抗脈管作用の利用において多大な利益がある。最近、頻繁な用量のレジメンを用いた、CA4Pに関する単一薬剤の効力が、報告された。他の報告は、いくつかの場合において、大きい腫瘍が、小さい腫瘍よりCA4P治療に対してより反応性であり得ることを示唆した。

【0059】

コンブレタスタチンA-1およびそのプロドラッグ(CA1P)もまた、チューブリン重合の強力なインヒビターである。CA1Pもまた、腫瘍脈管への血流の閉鎖を引き起こすことが示された。

【0060】

(薬学的組成物)

上に示すように、例えば、本方法は、コンブレタスタチンA-4化合物もしくはコンブレタスタチンA-1化合物および抗癌剤の両方を含む単一の薬学的組成物を用いて(投与が同時にされる場合)か、またはコンブレタスタチンA-4化合物もしくはコンブレタスタチンA-1化合物および抗癌剤を別々に含む2つ以上の薬学的組成物を用いて(投与が同時に連続的にされる場合)実施され得る。そのような薬学的組成物は、とりわけ、少なくとも1つの抗癌剤および/またはコンブレタスタチンA-4化合物もしくはコンブレタスタチンA-1化合物(例えば、コンブレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩もしくはコンブレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩および薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。句「薬学的に受容可能」とは、ヒトに投与した場合、生理学的に耐性であり、好ましくはアレルギーまたは類似の不適当な反応(例えば、胃の不調、めまいなど)を生じない分子実体および組成物をいう。

【0061】

好ましくは、本明細書中に使用される場合、用語「薬学的に受容可能」とは、動物、より好ましくはヒトにおける使用について連邦政府もしくは州政府の監督官庁によって認可されているか、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識される薬局方に列挙されていることを意味する。用語「キャリア」とは、例えば、本発明の活性薬剤と共に投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤、補助薬剤またはビヒクルをいう。そのような薬学的キャリアは、滅菌の液体(例えば、水および石油起源、動物起源、植物起源または合成起源の油(例えば、落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油など)であり得る。水または水性生理食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液は、好ましくは、キャリアとして(特に注射可能な溶液のために)用いられる。適切な薬学的キャリアは、E.W.Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。

## 【0062】

本発明の薬学的組成物は、任意の適切な経路（例えば、注射、経口、肺経由、鼻経由または他の投与形態）によって投与され得る。一般的に、本発明の範囲内にあることが企図される薬学的組成物は、とりわけ、薬学的に受容可能な希釈剤、保存料、可溶化剤、乳化剤、アジュバント、および／またはキャリアを含む。そのような組成物は、種々の内容物（例えば、Triis-HCl、アセテート、ホスフェート）、pHおよびイオン強度の希釈剤；添加物（例えば、界面活性剤および可溶化剤（例えば、Tween 80、Poly sorbate 80）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存料（例えば、Thimerisol、ベンジルアルコール）およびバルキング（bulking）物質（例えば、ラクトース、マンニトール））；高分子化合物（例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸など）の粒子状調製物またはリポソームへのこの物質の組み込みが挙げられ得る。そのような組成物は、本発明の薬学的組成物の物理的状態、安定性、インビボでの放出速度、およびインビボでのクリアランス速度に影響を与え得る。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版（1990、Mack Publishing Co.、Easton、PA 18042）1435～1712頁（これは、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。本発明の薬学的組成物は、例えば、液体形態で調製され得るか、または乾燥粉末剤（例えば、凍結乾燥された形態）であり得る。そのような組成物を投与する特定の方法は、以下に記載される。

10

20

30

40

## 【0063】

## （腫瘍増殖または転移を調節するための方法）

上で説明されるように、本発明は、腫瘍増殖および転移を調節するための方法に関連し、この方法は、とりわけ、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物（例えば、コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩またはコンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩）、および少なくとも1つの抗癌剤を投与する工程を包含する。本発明の薬剤は、別々に投与され得るか（例えば、別々に処方および投与される）、または本発明の薬学的組成物として組み合わせて投与され得る。投与は、任意の適切な経路（例えば、非経口的、経粘膜的（例えば、経口的、鼻経由、または直腸経由）、または経皮的に）によって達成され得る。好ましくは、投与は、非経口的（例えば、静脈内注射）である。投与の代替的手段としてはまた、小動脈内投与、筋肉内投与、皮膚内投与、皮下投与、腹腔内投与、心室内投与および頭蓋内投与、または処置される腫瘍もしくはその腫瘍周辺の組織への注射が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0064】

コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物（例えば、コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩またはコンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩）および抗癌剤は、小胞中（例えば、リポソーム中）[Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treatら、Liposomes in the Therapy of Infections Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler (編)、Liss: New York, pp. 317-327を参照のこと。一般的には、同書を参考のこと]）を含む、上記のような任意の適切な薬学的処方物として用いられ得る。好ましくは、本発明の薬剤を含むリポソームの投与は、非経口的（例えば、静脈内注射を経由する）であるが、その投与としては、非限定的に、小動脈内投与、筋肉内投与、皮膚内投与、皮下投与、腹腔内投与、心室内投与および頭蓋内投与、または処置される腫瘍もしくはその腫瘍周辺の組織への注射が挙げられ得る。

## 【0065】

なお別の実施形態において、本発明の薬学的組成物は、制御放出系（例えば、静脈内注入、移植可能な浸透圧ポンプ、経皮パッチ、リポソーム、または他の投与様式を用いる）で送達され得る。特定の実施形態において、ポンプが、用いられ得る[Langer、前出；Sefton、CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1

50

987) ; Buchwaldら、Surgery 88:507(1980) ; Saudekら、N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと]。別の実施形態において、高分子物質が用いられ得る[Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise(編)、CRC Press: Boca Raton, Florida(1974) ; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall(編)、Wiley: New York(1984) ; RangerおよびPeppas、J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61(1983)を参照のこと; Levyら、Science 228:190(1985) ; Duringら、Ann. Neurol. 25:351(1989) ; Howardら、J. Neurosurg. 71:105(1989) ; も参照のこと]。なお別の実施形態において、制御放出系は、動物の標的組織に隣接して配置され得、従って全身用量の一部のみが必要とされる[例えば、Goodson、Medical Applications of Controlled Release、前出、vol. 2、pp. 115~138(1984)を参照のこと]。特に、制御放出デバイスは、動物の、不適切な免疫活性部位または腫瘍の隣接部に導入され得る。他の制御放出系は、Langer [Science 249:1527~1533(1990)]による概説において議論される。以下の表Iは、本発明の方法における使用のための好ましい化学療法の組み合わせおよび例示的投薬量を示す。「コンブレタスタチンA-4」が示される場合、好ましくは、コンブレタスタチンA-4、コンブレタスタチンA-1またはコンブレタスタチンA-4もしくはコンブレタスタチンA-1のいずれかのリン酸プロドラッグ塩(すなわち、例えば、CA4PまたはCA1P)が用いられる。

【0066】

【表1】

化学療法の組み合わせ	投薬量 mg/m <sup>2</sup> (用量当たり)
コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ シスプラチニ	5-150 mg/m <sup>2</sup>
コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ カルボプラチニ	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ 放射線	200-8000 cGy
コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ CPT-11	5-400 mg/m <sup>2</sup>

10

20

30

40

コンブレタスタチン A-4 + パクリタクセル	1-100 mg/m <sup>2</sup> 40-250 mg/m <sup>2</sup>	
コンブレタスタチン A-4 + パクリタクセル + カルボプラチニ	1-100 mg/m <sup>2</sup> 40-250 mg/m <sup>2</sup> 5-1000 mg/m <sup>2</sup>	
コンブレタスタチン A-4 + 5FU および必要に応じて + ロイコボリン	1-100 mg/m <sup>2</sup> 5-5000 mg/m <sup>2</sup> 5-1000 mg/m <sup>2</sup>	10
コンブレタスタチン A-4 + エポチロン	1-100 mg/m <sup>2</sup> 1-500 mg/m <sup>2</sup>	
コンブレタスタチン A-4 + ゲムシタビン	1-100 mg/m <sup>2</sup> 100-3000 mg/m <sup>2</sup>	
コンブレタスタチン A-4 + UFT および必要に応じて + ロイコボリン	1-100 mg/m <sup>2</sup> 50-800 mg/m <sup>2</sup> 5-1000 mg/m <sup>2</sup>	20
コンブレタスタチン A-4 + ゲムシタビン + シスプラチニ	1-100 mg/m <sup>2</sup> 100-3000 mg/m <sup>2</sup> 5-150 mg/m <sup>2</sup>	
コンブレタスタチン A-4 + UFT + ロイコボリン	1-100 mg/m <sup>2</sup> 50-800 mg/m <sup>2</sup> 5-1000 mg/m <sup>2</sup>	30
コンブレタスタチン A-4 + シスプラチニ + パクリタクセル	1-100 mg/m <sup>2</sup> 5-150 mg/m <sup>2</sup> 40-250 mg/m <sup>2</sup>	
コンブレタスタチン A-4 + シスプラチニ + 5FU	1-100 mg/m <sup>2</sup> 5-150 mg/m <sup>2</sup> 5-5000 mg/m <sup>2</sup>	40

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ オキザリプラチン	5-200 mg/m <sup>2</sup>
+ CPT-11	4-400 mg/m <sup>2</sup>

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ 5FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
+ CPT-11 および必要に応じて	4-400 mg/m <sup>2</sup>
+ ロイコボリン	5-1000 mg/m <sup>2</sup>

10

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ 5FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
+ 放射線	200-8000 cGy

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ 放射線	200-8000 cGy
+ 5FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
+ シスプラチン	5-150 mg/m <sup>2</sup>

20

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ オキザリプラチン	5-200 mg/m <sup>2</sup>
+ 5FU および必要に応じて	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
+ ロイコボリン	5-1000 mg/m <sup>2</sup>

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ パクリタクセル	40-250 mg/m <sup>2</sup>
+ CPT-11	4-400 mg/m <sup>2</sup>

30

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ パクリタクセル	40-250 mg/m <sup>2</sup>
+ 5-FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ UFT	50-800 mg/m <sup>2</sup>
+ CPT-11 および必要に応じて	4-400 mg/m <sup>2</sup>
+ ロイコボリン	5-1000 mg/m <sup>2</sup>

コンブレタスタチン A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ BR96-sFv-PE40	100-750 mg/m <sup>2</sup>

40

上記の表 I において、「5 FU」は、5-フルオロウラシルを示し、「ロイコボリン」は、ロイコボリンカルシウムとして用いられ得、「UFT」は、1:4モル分率のテガフル(t e g a f u r) : ウラシルであり、「エポチロン」とは、好ましくは、WO 99/02514 または WO 00/50423 (これら両方は、その全体が、本明細書中に参考として援用される) に記載される化合物である。

【0067】

表 I は、コンブレタスタチン A-4 化合物もしくはコンブレタスタチン A-1 化合物およ

50

び本発明の特定の抗癌剤の例示的投薬範囲を提供するが、本発明の薬学的組成物を処方する場合、臨床医は、処置される患者の状態によって理由付けらるるような好ましい投薬量を用い得る。例えば、好ましくは、コンプレタスタチンA-4化合物またはコンプレタスタチンA-1化合物は、処置が必要とされる間にわたり、3週間毎に、30mg/m<sup>2</sup>~70mg/m<sup>2</sup>の範囲の投薬量で、投与され得る。シスプラチンについての3週間毎に投与される好ましい投薬量は、75~120mg/m<sup>2</sup>である。カルボプラチンについての好ましい投薬量は、200~600mg/m<sup>2</sup>の範囲または0.5~8mg/m<sup>1</sup>×分のAUCであり、最も好ましくは、4~6mg/m<sup>1</sup>×分のAUCである。用いられる方法が放射線を使用する場合、好ましい投与量は、200~6000cGYの範囲内である。CPT-11についての好ましい投薬量は、週に1回で、100~125mg/m<sup>2</sup>の範囲である。パクリタクセルについての好ましい投薬量は、21日毎に130~225mg/m<sup>2</sup>である。ゲムシタビン(gemcitabine)についての毎週投与される好ましい投薬量は、80~1500mg/m<sup>2</sup>の範囲内である。ロイコボリン投与と組み合わせた場合、好ましくは、UFTは、1日あたり300~400mg/m<sup>2</sup>の範囲内で用いられる。好ましくは、ロイコボリンは、10~600mg/m<sup>2</sup>で毎週投与される。Br96-sFv-PE40イムノトキシンの好ましい用量は、420mg/m<sup>2</sup>である。免疫増強療法においてコンプレタスタチンA-4およびそのプロドラッグと組み合わせたBR96-sFv-PE40イムノトキシンの使用は、米国仮出願番号第60/258,283号(2000年12月26日出願)(この開示全体は、本明細書中に参考として援用される)に記載される。

10

20

30

**【0068】**  
特定の癌は、コンプレタスタチンA-4またはコンプレタスタチンA-1および複数の抗癌剤により効果的に処置され得る。そのような3種または4種の組み合わせは、より強力な効力を提供し得る。そのような3種および4種の組み合わせが用いられる場合、上に示される投薬量が、用いられ得る。従って、上記の表Iのような他の組み合わせとしては、(1)ミトザントロンおよびプレドニゾン、(2)ドキソルビシンおよびタキサン；または(3)ハーセプチニンおよびタキサンと組み合わせた「コンプレタスタチンA-4またはコンプレタスタチンA-1」が挙げられ得る。任意の上記の組み合わせにおいて、5-FUは、UFTと置き換えられ得る。

30

**【0069】**  
本発明の方法または組成物を使用する場合、臨床的設定における腫瘍増殖または転移の調節に用いられる他の薬剤(例えば、制吐剤)もまた、所望されるように投与され得る。

40

**【0070】**

以下の実施例は、本発明の実施形態を例示するために提供される。これらは、いかなる様式においても、本発明を限定することを意図しない。

40

**【0071】**

以下のプロトコールは、実施例Iおよび実施例IIの実施を容易にするために提供される。

40

**【0072】**

(薬物投与)

げっ歯類への投与のために、CA4Pを、通常の生理食塩水(0.9%NaCl)中に溶解した。パクリタキセルを、エタノールおよびCremophor(登録商標)の50/50の混合物に溶解し、そして4℃で保存した；パクリタキセルの最終希釈物を、NaCl 0.9%を用いて薬物投与の直前に得た。沈殿を防ぐために、パクリタキセルの新しい調製物を用いた。CPT-11を、通常の生理食塩水に溶解した。注射した全ての化合物の容量は、0.01ml/マウス1g、および0.005ml/ラット1gであった。

40

(インビボでの抗腫瘍試験)

以下の腫瘍モデルを用いた：A2780ヒト卵巣癌、マウス線維肉腫M5076およびM5076/dddP(シスプラチンおよびカルボプラチンに耐性)。

50

## 【0073】

Balb/c nu/nuヌードマウスにおいて、ヒト腫瘍を維持した。C57BL/6マウスにおいて、M5076およびM5076ddpを維持した。ドナーマウスから得られた腫瘍フラグメントを用いて、皮下移植片として、適切なマウス系統に腫瘍を伝播させた。

## 【0074】

示されるマウスの宿主系統において、以下の腫瘍を継代させた：C57BL/6マウスにおける、マウスM5076線維肉腫（M5076）；ヌードマウスにおける、ヒトA2780卵巣癌。腫瘍継代は、マウス腫瘍については隔週で行い、そしてヒト腫瘍株については、約2～3週間ごとに行つた。有効性試験に関して、M5076腫瘍およびM5076ddp腫瘍を、（C57BL/6×DBA/2）F1ハイブリッドマウスに移植し、そしてヒト腫瘍を、ヌードマウスに移植した。有効性試験のための全ての腫瘍インプラントは、皮下（s.c.）であった。

## 【0075】

有意な応答の検出に必要とされる、必要数の動物を実験開始時にプールし、そして各々に、腫瘍フラグメント（約50mg）の皮下インプラントを、13ゲージ外套針を用いて与えた。初期段階の腫瘍の処置のために、種々の処置群および対照群への分配の前に、これらの動物を再びプールした。進行段階の疾患を有する動物の処置のために、所定サイズの窓（この範囲より外の腫瘍は排除した）に腫瘍を成長させ、そして動物を、種々の処置群および対照群に均等に分配した。各々の動物の処置は、固体の体重に基づいた。処置した動物を、毒性/死亡率に関する処置について毎日検査した。各々の動物群を、処置の開始前に計量し（Wt1）、そして最後の処置投与後に再び計量した（Wt2）。体重の差異（Wt2-Wt1）は、処置関連毒性の尺度を提供する。

## 【0076】

腫瘍が所定の「標的」サイズ（1g m）に達するまで、1週間に2回、カリパスでの腫瘍の測定によって腫瘍応答を決定した。腫瘍重量（mg）を、次式から見積もった：

$$\text{腫瘍重量} = (\text{長さ} \times \text{幅}^2) \div 2$$

最大耐性用量（MTD）（過剰毒性（例えば、1つよりも多くの死）が発生する用量レベルの直下として定義される）において、抗腫瘍活性を評価した。このMTDは頻繁に、ODに等価であった。死が発生した場合、死亡日を記録した。腫瘍が標的サイズに達する前に死亡する処置マウスは、薬物毒性によって死亡したと考慮した。標的サイズよりも小さい腫瘍を生じて死亡した対照マウスはなかった。薬物毒性によって引き起こされた1つよりも多くの死を有する処置群は、過剰に毒性の処置を施されていたと考慮し、そしてこれらのデータは、化合物の抗腫瘍有効性の評価に含まなかった。

## 【0077】

腫瘍成長遅延（T-C値）によって、腫瘍応答終点を表した。腫瘍成長遅延は、処置された腫瘍が所定の標的サイズに達するのに要する時間（日数）（T）の、対照群のそれ（C）と比較した場合の差異として定義される。

## 【0078】

腫瘍細胞の死を見積もるために、腫瘍体積倍増時間を、次式を用いて最初に決定した：  
 $T_{VDT} = \text{対照腫瘍が標的サイズに達するための時間 (日数)} - \text{対照腫瘍が標的サイズの半分に達するための時間 (日数)} \div 3.32 \times T_{VDT}$

Gehanの一般化Wilcoxon試験を用いて、データの統計学的評価を行つた。  
 （実施例I）

コンブレタスタチン（combrestatin）A-4リン酸二ナトリウム塩（二重の作用機構を有する試薬）を、ピーク濃度試薬（シスプラチンおよびカルボプラチン）を用いて、インビボでの抗腫瘍活性について評価した。腫瘍保有マウスに、単一の試薬として10日間、毎日投与した場合、コンブレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩は、シスプラチン耐性M5076DDPマウス線維肉腫に対する有意な抗腫瘍活性を示し、1

10

20

30

40

50

. 110g 細胞死を生じた。図 1 を参照のこと。

【 0079 】

化学療法試行と組み合わせて、シスプラチンおよびカルボプラチンの両方を用いて、治療的相乗効果を観察した。腫瘍灌流研究において、コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩は、マウス (67% 阻害) およびラット (87% 阻害) における A2780 ヒト卵巣腫瘍異種移植片における腫瘍血流を有意に阻害した。

【 0080 】

コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩の治療的可能性的よりよい評価のために、研究を行って CA4P の薬理学の 3 つの側面を評価した： [1] 単一試薬としての抗腫瘍有効性、 [2] シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセルまたは CPT-11 と組み合わせての抗腫瘍有効性、および [3] 腫瘍血流への効果。

( 結果 )

( シスプラチン耐性 s c M5076 DDP 腫瘍モデルに対する単一試薬効力 )

M5076 DDP は、発達したシスプラチンに対する耐性およびカルボプラチンに対する交差耐性を有する、マウス線維肉腫である。病期の M5076 DDP 腫瘍を有するマウスのコンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩での、毎日 10 回 ( 月曜～金曜 ) スケジュールを用いての処置は、中程度であるが、有意な抗腫瘍効果を生じた。適切な用量 ( 150mg / kg / inj ) で、コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩は、 1.110g の細胞死 ( LCK ) を生じた。相対的に、適切なスケジュール ( 4 日間毎に 3 用量 ; Q4D × 3 ) の単一試薬シスプラチン投与は、 7.5mg / kg / inj の MTD で 0.8LCK を生じた ( 図 1 )。

( 化学療法と白金薬物との組み合わせ )

進行段階の ( 300mg ) s c M5076 DDP 腫瘍の処置において、コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩をシスプラチンと組み合わせた場合 ( 同時に投与される ) 、治療共調作用を得た。単一試薬シスプラチンは、その最大耐性用量 ( MTD ) である 7.5mg / kg / inj ( q4d × 3 ) で 0.8LCK を生じた。相対的に、コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩 ( 250mg / kg / inj ) + シスプラチン ( 5mg / kg / inj ) の最大耐性の組み合わせは、 2.0LCK を生じた ( 図 2A )。この組み合わせが、処置後に腫瘍の顕著な減少を生じたが、一方、単一試薬シスプラチンは生じなかつた ( 図 1 ) ことは興味深いことである。この相乗的な組み合わせレジメンの別の注目すべき局面は、コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩が実質的にシスプラチンの別の不活性 ( 低 ) 用量の効果を改善する能力である ( 図 2B )。

【 0081 】

( カルボプラチン ( CPT ) 対 s c M5076 との組み合わせ )

コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩はまた、カルボプラチンと組み合わせて使用した場合、巨大な s c M5076 腫瘍 ( H300mg ) に対し、相乗的な抗腫瘍活性を生じた。この感受性の腫瘍モデルにおいて、カルボプラチンは、その MTD である 90mg / kg / inj ( i.v. q4d × 3 ) で 1.4LCK を生じたが、腫瘍後退を伴わなかつた。相対的に、最前の組み合わせは、顕著な腫瘍減少を伴つた 2.0LCK を生じた ( 図 3A )。コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩 + カルボプラチンの組み合わせレジメンによって誘発された腫瘍応答の 2 つの重要な局面は、 [1] 治療共調作用に必要とされる、最適なコンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩用量 ( < 90mg / kg / inj ) は、その薬剤単独での MTD (> 250mg / kg / inj ) よりも有意に低かつた ( 図 3B ) ； [2] 最適な抗腫瘍効果を生ずるために必要とされる、カルボプラチン用量 ( 単一試薬として投与される場合、 90mg / kg / inj ) は、コンプレタスタチン A - 4 リン酸二ナトリウム塩と組み合わせて使用される場合、大きく減少された ( 図 3B )。

【 0082 】

( 時期調査 ( カルボプラチン + CA4P ) )

図 4 に示されるデータは、カルボプラチン ( 「 C B - p t 」 ) および CA4P が、好まし 50

くは、およそ同時に投与されることを示す。最も好ましくは、カルボプラチニンは、CA4P直前に投与される。このグラフに示される腫瘍モデルは、M5076ddp (M5076マウス纖維肉腫の白金耐性改変体) である。

【0083】

(腫瘍灌流におけるCA4Pの効果)

コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩の腫瘍灌流における効果を、エバンズブルー色素取込アッセイを使用して研究した。sc A2780ヒト卵巣癌を有するマウスまたはラットに、コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩のiv用量を投与した。1時間後、エバンズブルーを、iv注射した。腫瘍中に蓄積されたエバンズブルーの量は、腫瘍を通る血流に比例した。この技術を使用して、CA4Pが、マウスおよびラットの両方において、腫瘍への血流を劇的に阻害し、最適な用量で、それぞれ、67%および87%の腫瘍血流の減少を引き起こすことを示した(図5Aおよび図5B)。

10

【0084】

(化学療法とCPT-11との組み合わせ)

組み合わせ化学療法研究を、CPT-11とコンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩との組み合わせ処置の抗腫瘍活性を評価するために行った。種々の投薬スケジュールを、2つの試薬を実質的に同時に(5分あけて)投与することから、CPT-11をCA4Pの3時間または24時間前に投与することの範囲で、本発明に従って使用した。そのMTDで、CPT-11は、3.3LCKを生じた。2つの試薬の同時投与または3時間離れた投与は、CPT-11単独と同等の結果を生じた。しかし、CPT-11をCA4Pの24時間前に投与した場合、増大した抗腫瘍効果が得られ(図6)、本発明の好ましい実施形態を立証した。

20

【0085】

(カルボプラチニンとの組み合わせにおける、最小の有効用量 - 薬物速度論定量)

コンプレタスタチンA-4は、本明細書中に示されるように、シスプラチニンおよびカルボプラチニンとの強い治療相乗作用を立証した。これらの前記の組み合わせ研究において使用されたコンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩(CA4P)の用量は、一般に、100-250mg/kg(200~750mg/m<sup>2</sup>)の間であった。現在のヒト薬物速度論データは、好ましいCA4P用量が、かなり低い(約50~60mg/m<sup>2</sup>)ことを示す。従って、適度のカルボプラチニン耐性マウス線維肉腫M5076/DDPにおけるカルボプラチニンとの組み合わせ治療に必要とされる最小のCA4P用量を決定するために研究を行った。単一試薬活性を有しないCA4Pの用量および処置レジメン(iv, q4d×3)を使用することにより、12.5~25mg/m<sup>2</sup>の低用量のCA4Pは、一定範囲の用量レベルで投与されたカルボプラチニンの抗腫瘍活性を増大するに十分であることが立証された。図7A、図7Bおよび図7Cを参照のこと。

30

【0086】

(コンプレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム塩(CA4P)とパクリタキセルとの組み合わせについての適切な処置スケジュールの決定)

本発明は、例えば、コンプレタスタチンA-4化合物(例えば、パクリタキセルとCA4P、またはパクリタキセルおよびカルボプラチニンとCA4P)の投与を企図する。適切な処置スケジュール(すなわち、順序(sequence)または順序(order))を決定するために、多数の研究を行い、その中で、2つの試薬(CA4Pおよびパクリタキセル)を投与した。この考慮は、以下の2つの理由で、この組み合わせについて特に重要であると判断された: 1) CA4Pは、チューブリンの解重合剤(depolymerizer)であるが、パクリタキセルは、チューブリンの重合剤(polymerizer)であり、従って、チューブリンレベルでの相互作用に対して潜在的であり得る; および2) CA4Pは、腫瘍および腫瘍状の増殖状態におけるパクリタキセルの局所的な微量の薬物速度論に影響する、腫瘍血流を阻害する。16/c 乳腺癌モデルでの初期研究において、2つの試薬の同時投与は、このモデルにおける組み合わせ(図8)の総合的効力に逆に影響し得ることを示唆したが、一方で、薬物投与中の間隔が、組み合わせの効力を回

40

50

復させた。続いて、最適な順序 (sequence) および薬物投与中の最適な間隔をさらに定義するために2つの他の研究をヒト卵巣癌モデルA2780において行った。

【0087】

パクリタキセルをCA4Pと同時に、またはCA4Pの前に投与することの効果を評価するために、初期研究を行った。結果は、2つの試薬の同時投与が、このモデルにおける総合的な評価に対して有害であることを示した(図9)。2つの試薬の投与間の3時間の間隔は、組み合わせの全体的な効力を回復しなかったが、全体的な効力は、24時間の間隔で回復した。

【0088】

パクリタキセルの前にCA4Pを投与する効果を評価するために、さらなる研究を行った。この結果は、2つの試薬の処置の間の3時間の間隔を許容することは、ネガティブな相互作用を避けるために十分であることを立証した(図10)。

【0089】

(化学療法の免疫毒素との組み合わせ)

CA4Pの免疫毒素BR96-sFv-PE40との組み合わせ投与の効力を評価する研究をまた行った。免疫毒素の構築は、Siegalら(1994)J.of Immunology 152:2377~2384において記載される。

【0090】

1.5×10<sup>5</sup> 野生型結腸癌細胞(BN7005-H1D2)を、各々5匹のラットの5つの群に0日目に肝臓内接種した。BR96-sFv-PE40は、BR96モノクローナル抗体とシュードモナス毒素PE40との免疫結合体である。BR96は、結腸癌BN7005ラット腫瘍におけるLewis y抗原を認識する。この免疫毒素を、9日目、12日目、14日目、16日目、19日目、21日目、および23日目に、示されるように2つの異なる用量レベル(それぞれ、125μg/kgまたは150μg/kg)で接種した。コンプレタスタチンA4-リン酸プロドラッグを、免疫毒素と同じ日に投与する場合、7日目、8日目、9日目、12日目、13日目、14日目、14日目、16日目、19日目、および20日目に、免疫毒素投与の4~6時間前に腹腔内(ip)投与した。ラット全てを、28日目に開腹し、そして肝腫瘍サイズをキャリパーで測定し、そして腫瘍容量を計測した。

【0091】

図11に示すように、治療群と処置されていないコントロールとの間には有意な差異があった。このスチューデントt試験の結果もまた図に示す。組み合わせ処置と、CA4P単独または免疫毒素単独との間の差異もまた、有意であった(それぞれ、p=0.002およびp=0.006)。28日目で処置を中止した場合、その腫瘍は、全ての群において、その後急速に増殖した。これらのデータは、CA4Pおよび免疫毒素の組み合わせて投与する場合の効力を立証した。

【0092】

(実施例II)

(コンプレタスタチンA-1Pとの組み合わせ化学療法)

コンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩(二重の作用機構を有する試薬)を、ピーク濃度試薬(カルボプラチンおよびシスプラチン)とのインビボでの抗腫瘍活性について評価した。腫瘍を有するマウスに単一試薬として10日間毎日投与した場合、コンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩は、シスプラチン耐性M5076DDPマウス織維肉腫に対して適度な抗腫瘍活性を立証した。

【0093】

化学療法試行と組み合わせて、シスプラチンおよびカルボプラチンの両方による治療共調作用を観察した。腫瘍灌流研究において、コンプレタスタチンA-1リン酸二ナトリウム塩は、マウスにおけるA2780ヒト卵巣腫瘍異種移植片およびN87胃癌腫瘍異種移植片での腫瘍血流を顕著に阻害した。

【0094】

10

20

30

40

50

コンプレタスタチン A - 1 リン酸二ナトリウム塩の治療可能性をより良く評価するために、C A 4 P の薬理学の以下の 3 つの局面を評価するために、研究を行った： [ 1 ] 単一試薬としての抗腫瘍効力、 [ 2 ] シスプラチニンおよびカルボプラチニンの組み合わせにおける抗腫瘍効力、ならびに [ 3 ] 腫瘍血流に対する影響。

【 0 0 9 5 】

( 結果 )

( N 8 7 胃癌異種移植片および A 2 7 8 0 卵巣癌異種移植片に対する単一試薬効力 )

C A 1 P は、ヌードマウス中のヒト腫瘍異種移植片において C A 4 P により観察された灌流血流阻害と同等の灌流血流阻害を立証したが、5 ~ 10 倍以上強力であった。さらに、C A 1 P は、ヒト腫瘍異種移植片モデル ( N 8 7 ヒト胃癌および A 2 7 8 0 卵巣癌を含む ) において、改善された単一試薬活性を立証した。A 2 7 8 0 において、C A 1 P は、1 5 0 m g / k g ( i p ) での C A 4 P についての 1 . 1 L C K と比較して、その M T D である 9 m g / k g ( i p 、 q 1 d × 8 ) で、2 . 1 L C K を達成した。図 1 2 を参照のこと。

【 0 0 9 6 】

( 化学療法のカルボプラチニンおよびシスプラチニンとの組み合わせ )

図 1 3 に示すように、化学療法の組み合わせは、C A 1 P が、C A 4 P について観察されたのと同様の様式で、カルボプラチニンの抗腫瘍活性を増大させることを立証した。相乗的な抗腫瘍活性もまた立証された。有利に、相乗的な増加に必要とされる最小の有効用量は、C A 4 P ( 2 5 ~ 5 0 m g / k g ) と比較した場合、C A 1 P ( 4 - 8 m g / k g ) についてかなり低かった。さらに、C A 1 P をカルボプラチニンと組み合わせて投与した場合、完全な応答 ( 腫瘍の消失 ) を生じる相乗的な抗腫瘍活性が観察された。いずれかの試薬を単独で投与した場合、この応答は観察されなかった。図 1 4 を参照のこと。

【 0 0 9 7 】

さらなる研究において、C A 1 P をシスプラチニンと組み合わせて、C a N T 乳癌モデル I に投与した。図 1 5 において示されるように、シスプラチニンと C A 1 P との組み合わせ投与は、相乗的に作用して、腫瘍サイズを減少させた。

【 0 0 9 8 】

( 結論 )

上記の結果は、抗癌剤とコンプレタスタチン A - 4 化合物またはコンプレタスタチン A - 1 化合物との種々の組み合わせについての相乗作用を迅速に立証した。従って、抗癌剤を有効に使用して、このような薬物に対する耐性をに事前発達させている腫瘍増殖または腫瘍の転移を調節し得る。さらに、本発明は、臨床家が、より低用量の抗癌剤を適切な投与スケジュールで投与し得る、癌の処置のための方法を開発し、これによって、効力を維持しつつ、不必要的副作用を減少させる。

【 0 0 9 9 】

本発明は、本明細書中に記載される特定の実施形態による範囲に限定されない。実際に、本明細書中に記載されるものに加え、本発明の種々の改変は、明細書および前述の添付図から、当業者に明らかになる。このような改変は、添付の請求の範囲内に含まれることが意図される。例えば、他のコンプレタスタチンまたは他の抗血管薬でさえ、コンプレタスタチン A - 4 化合物またはコンプレタスタチン A - 1 化合物の代わりに、本発明において使用され得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 0 】

【 図 1 】 図 1 は、中程度に白金耐性な M 5 0 7 6 D D P マウス線維肉腫中に、単一で投与されたシスプラチニンおよびコンプレタスタチンの A - 4 リン酸水素二ナトリウム塩 ( C A 4 P ) の抗腫瘍活性のグラフである。処置開始時に、腫瘍は、3 0 0 m g の段階にまでなった ( s t a g e ) 。シスプラチニンは、静脈内 ( i v ) に 4 日毎に 3 用量 ( Q 4 D × 3 ) で投与された。C A 4 P は、1 0 日間にわたり毎日 ( 月曜日から金曜日まで ) 、静脈内に与えられた。

10

20

30

40

50

【図2】図2(A)は、M5076DDP腫瘍モデルにおいて、CA4Pおよびピーク腫瘍濃度の薬剤(シスプラチニン)の組み合わせで観察された治療的相乗作用のグラフである。薬物処置は、静脈内で、4日毎に3用量であった。薬物の組み合わせは、同時に投与された。(B)は、CA4Pが、他の場合には非活性な用量のシスプラチニン(3mg/kg/注射)の抗腫瘍活性を十分に増強したことを示すグラフである。

【図3】図3(A)は、M5076マウス線維肉腫モデルにおいて、CA4Pおよびピーク腫瘍濃度の薬剤(カルボプラチニン)の組み合わせで観察された治療的相乗作用のグラフである。薬物処置は、腹腔内(ip)で、4日毎に3用量であった。薬物の組み合わせは、腹腔内に(混合されて)同時に投与された。(B)は、CA4Pが、3つの異なる用量レベルで(90~250mg/kg/注射)で、カルボプラチニンの抗腫瘍活性を十分に改善したことを示すグラフである。

10

【図4】図4は、10g細胞殺傷での抗腫瘍活性を示すグラフであり、このグラフは、CA4Pおよびカルボプラチニンが、実質的に、同時に投与されるべきであることを示す。

【図5】図5は、ヌードマウス(A)またはヌードラット(B)中で増殖したSC-A2780ヒト卵巣癌における、CA4Pによる腫瘍の血流の阻害のグラフである。

【図6】図6は、ヒト卵巣癌細胞(A2780)における、組み合わせた高AUC剤(CPT-11)およびCA4P化学療法の抗腫瘍効果を示すグラフである。CPT-11は、コンプレタスタチン化合物の投与の3~24時間前に投与される。

【図7】図7は、M5076/DDP腫瘍における、低用量のCA4Pによるカルボプラチニンの抗腫瘍効力の増強である。パネルA~Cは、種々の用量のCA4Pと、各々90mg/m<sup>2</sup>、60mg/m<sup>2</sup>、40mg/m<sup>2</sup>のカルボプラチニンとの組み合わせについての結果を示す。

20

【図8】図8は、16/cマウス乳癌に対するCA4Pおよびパクリタキセルの組み合わせ化学療法を示す。

【図9】図9は、A2780ヒト卵巣癌に対するCA4Pおよびパクリタキセルの組み合わせ化学療法を示す。これらの薬剤の同時投与は、このモデルにおいて、拮抗作用をする。

【図10】図10は、A2780ヒト卵巣癌に対するCA4Pおよびパクリタキセルの組み合わせ化学療法を示す。処置の間の3時間の間隔は、負の相互作用を排除する。

30

【図11】図11は、同種異系のBrown-Norwayラット宿主における結腸癌の異種移植片モデルにおいて、イムノトキシンBR96-sFv-PE40とコンプレタスタチンA4Pの組み合わせ投与が、相乗作用的に腫瘍サイズを減少するように作用することを示す棒グラフである。

【図12】図12Aおよび図12Bは、コンプレタスタチンA-1Pが、ヌードマウスにおいてヒト腫瘍異種移植片中の血流を、コンプレタスタチンA-4Pについて観察された様式と同等の様式で阻害することを示す一対のグラフである。図12A:N87胃癌異種移植片モデル、図12B:A2780卵巣癌異種移植片モデル。

【図13】図13A~図13Dは、M5076線維肉腫の異種移植片モデルに対するコンプレタスタチンA-1Pおよびカルボプラチニン単独ならびに組み合わせの投与に応答した、腫瘍サイズ減少の用量応答性の曲線を示す一連のグラフである。コンプレタスタチンA-1Pおよびカルボプラチニンの組み合わせ投与は、相乗作用的に作用して腫瘍サイズを減少させた。

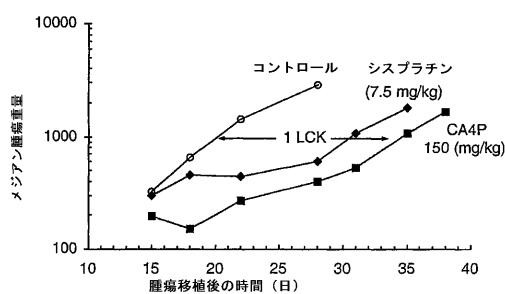
40

【図14】図14は、コンプレタスタチンA-1Pおよびカルボプラチニンの組み合わせ投与が、相乗作用的抗腫瘍効果を生じ、単一薬剤の治療においては観察されない完全な応答(腫瘍の消滅)を生じることを示すグラフである。

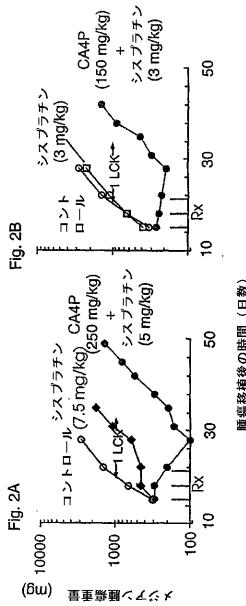
【図15】図15は、CBAマウスにおけるCaNT乳房腫瘍モデルにおいて、シスプラチニンおよびコンプレタスタチンA1Pの組み合わせ投与が、腫瘍サイズを減少させるように相乗作用的に作用することを示すグラフである。

【図1】

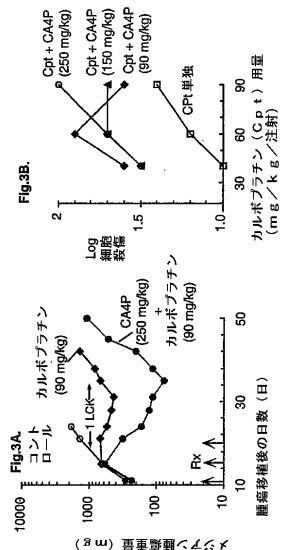
Figure 1



【図2】

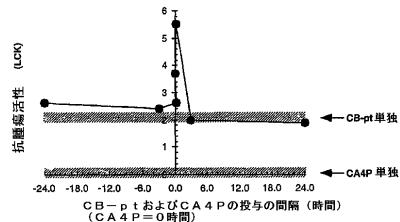


【図3】

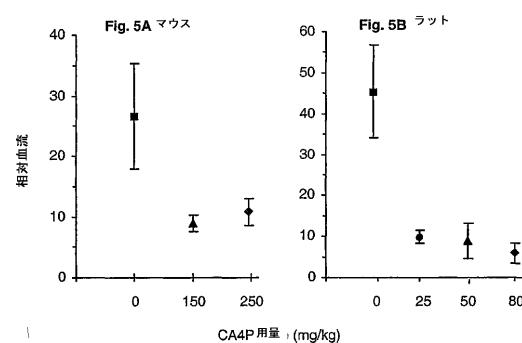


【図4】

Figure 4



【図5】



【 図 8 】

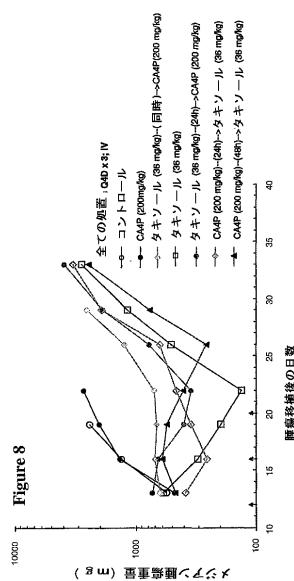
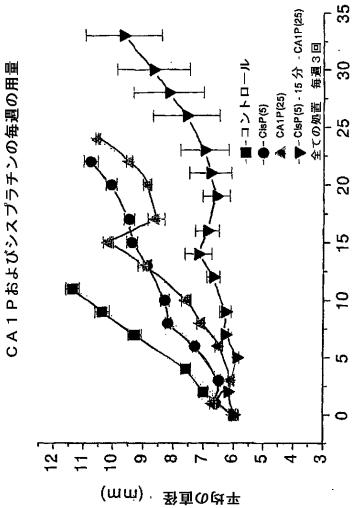


Figure 8

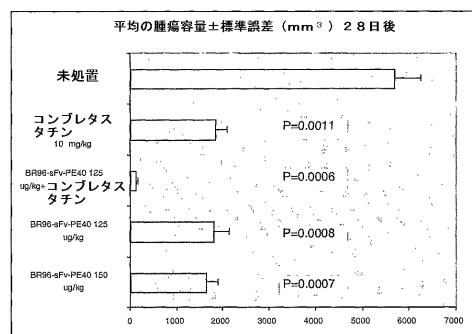
【図 15】



51 *exhibit*

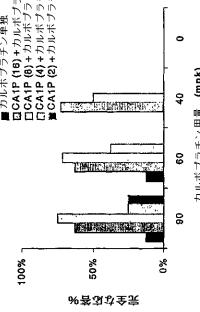
【 図 1 1 】

Figure 11



【 図 1 4 】

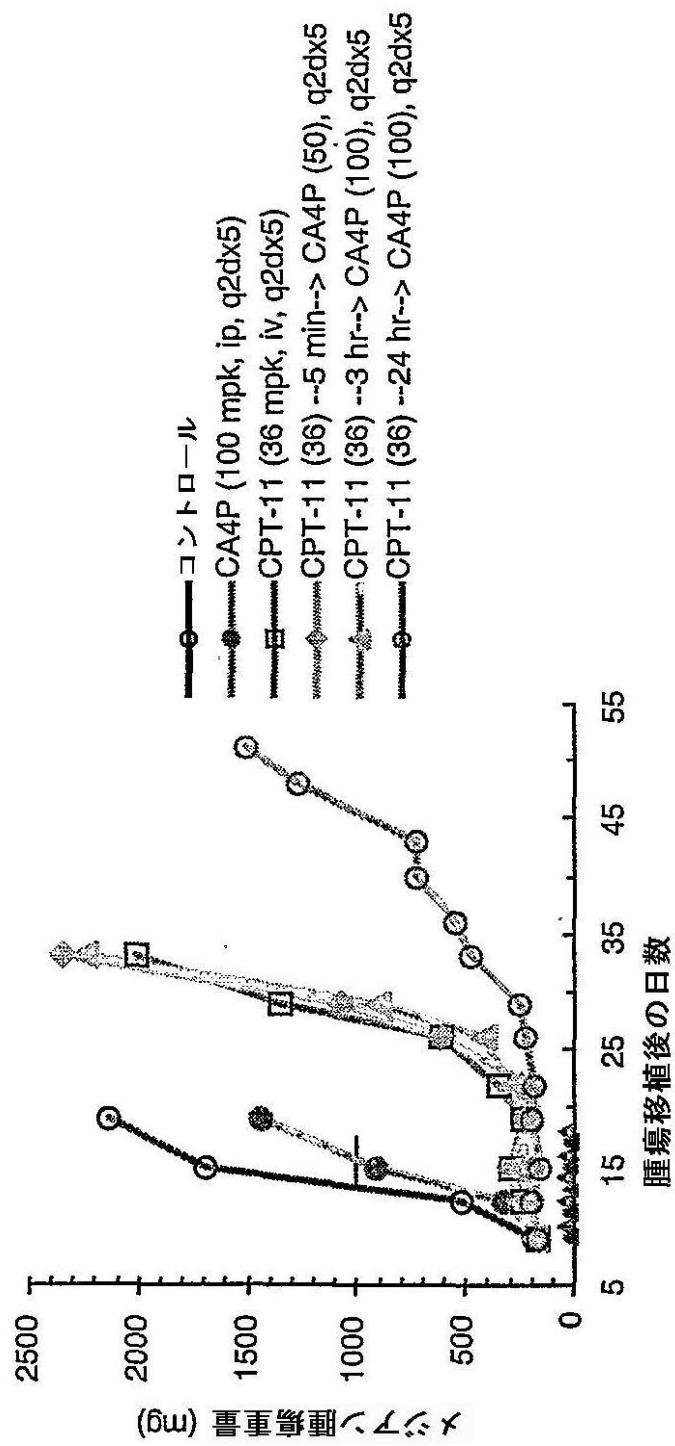
Figure 14



【図6】

Figure 6

## A2780ヒト卵巣癌異種移植片



【図7】

Fig. 7A

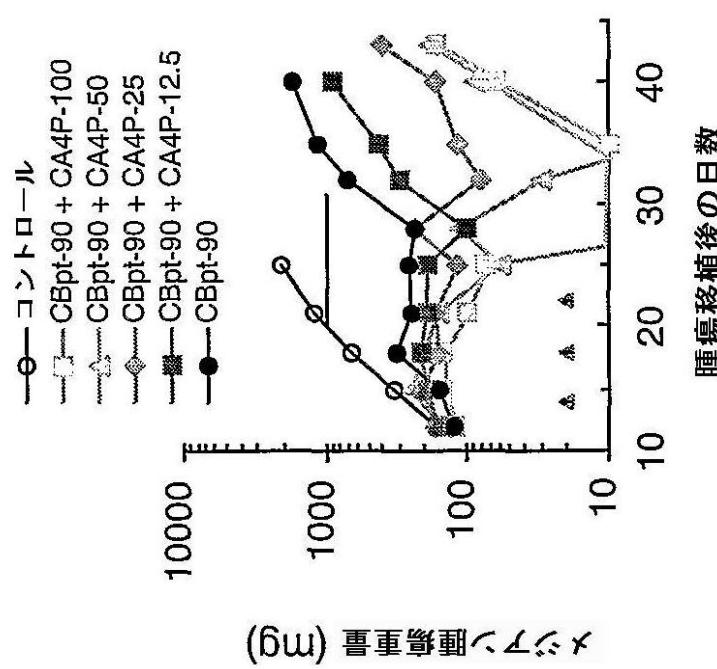


Fig. 7B

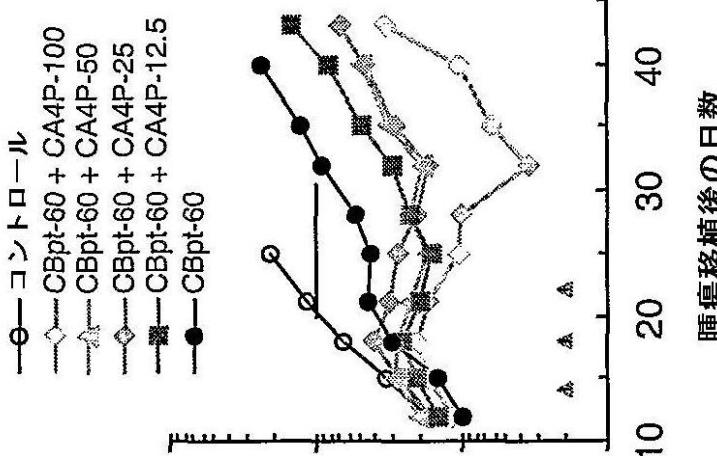
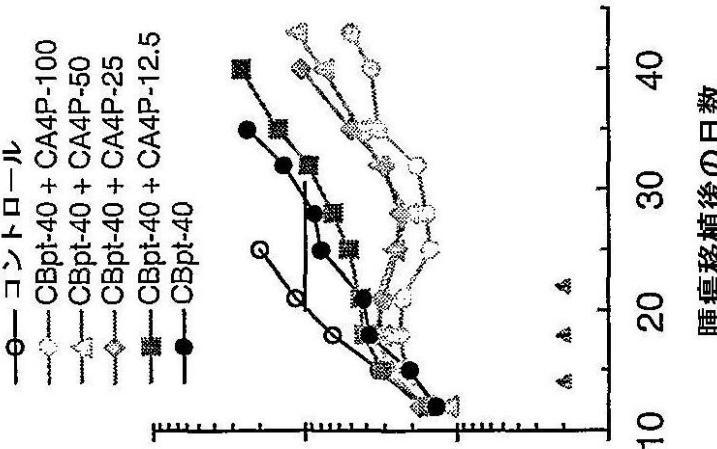


Fig. 7C



【図9】

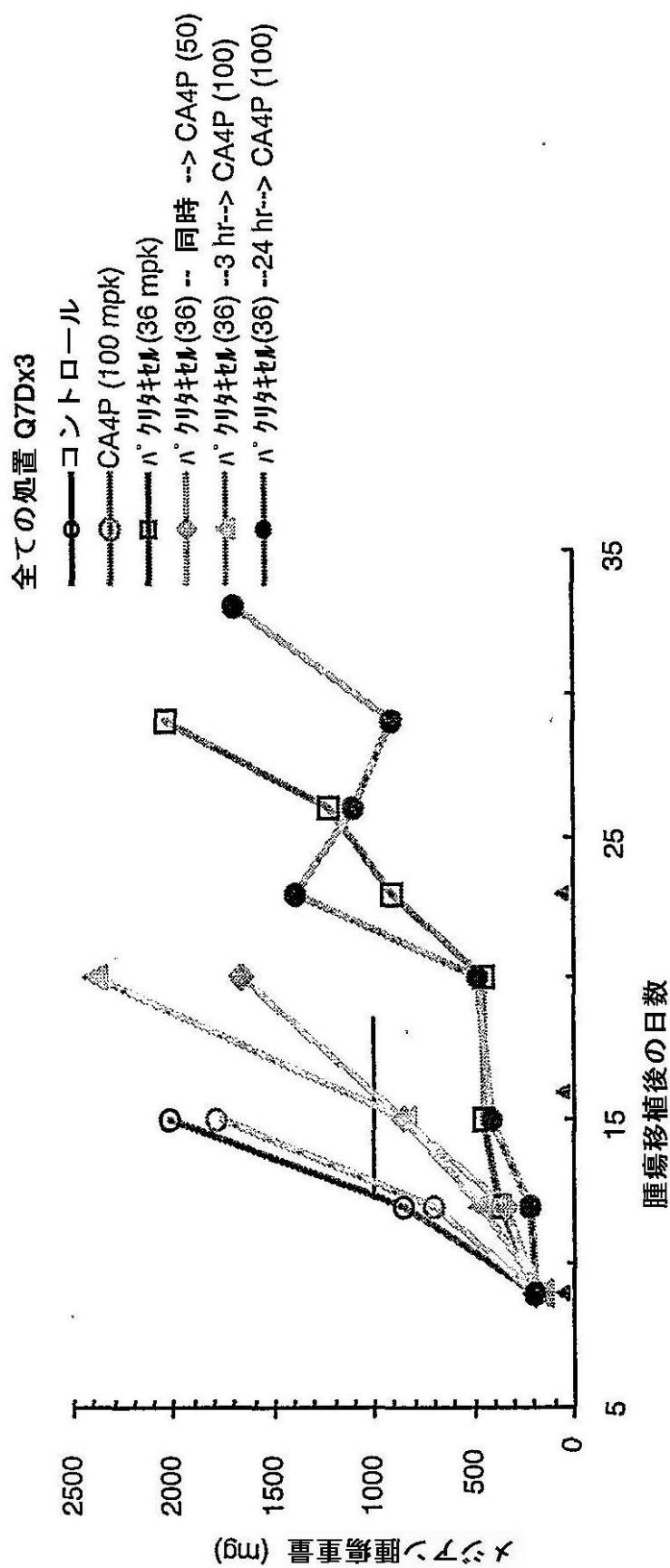
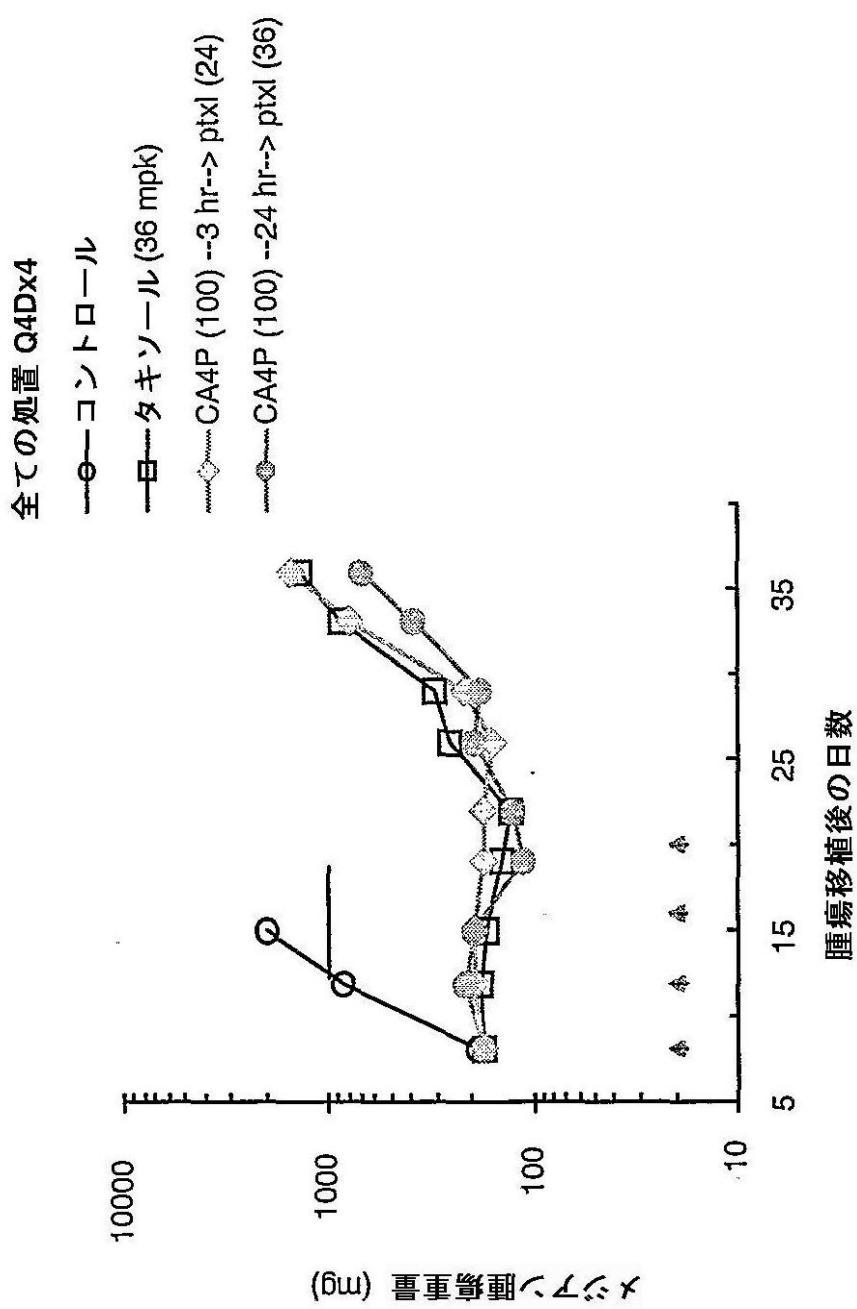


Figure 9

【図10】

Figure 10



【図 12】

CA1P  
単一薬剤の効力

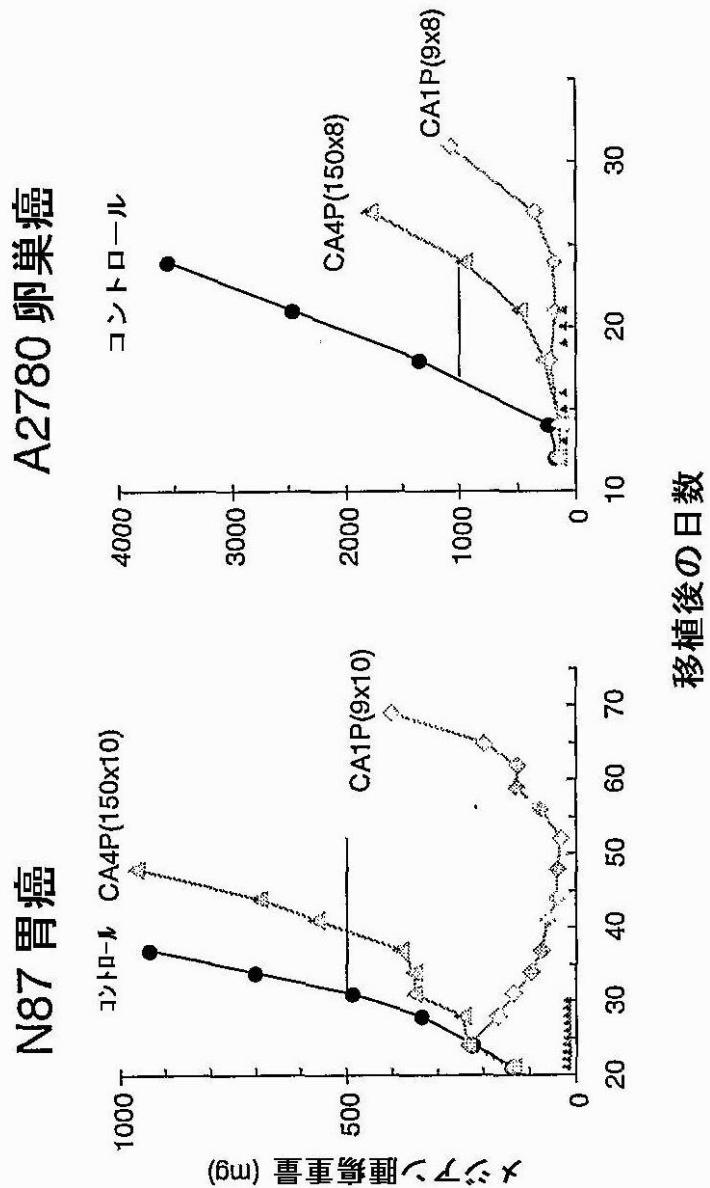


Figure 12A

Figure 12B

【図 13】

CAIP

カルボプラチソを用いる組み合わせ化学療法

## M5076 線維肉腫

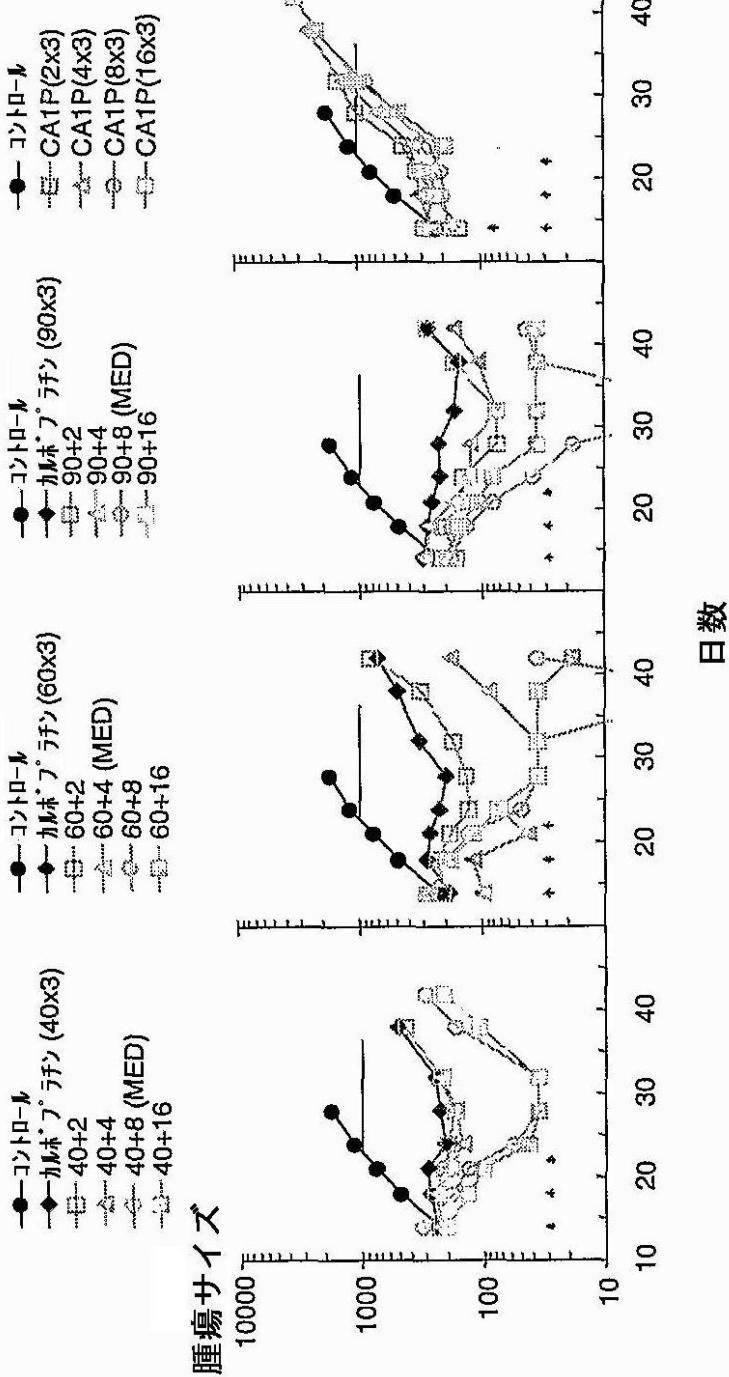


Fig. 13A

Fig. 13B

Fig. 13C

Fig. 13D

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/056692 A1

(51) International Patent Classification: A01N 57/00. (74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky, and Popeo, P., C., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/50261

(22) International Filing Date:  
20 December 2001 (20.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/258,195 22 December 2000 (22.12.2000) US(71) Applicants (for all designated States except US):  
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; Lawrenceville-Princeton Road, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543 (US). OXIGENE, INC. [US/US]; 321 Arsenal Street, Watertown, MA 02472 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NL, SN, TD, TG).

## (72) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LEE, Francis, V. [US/CN]; 363 Lang Court, Yantley, PA 19067 (US). PECK, Ronald [US/US]; 29 Applewood Drive, Cheshire, CT 06410 (US). CHAPLIN, David [GB/GB]; 14 Plotwden Park, Aston Rowant, Watlington, Oxfordshire OX9 5SX (GB). PERO, Ronald [US/US]; RU №1, Box 2773, Arlington, Vermont 05250 (US). EDWARDSEN, Klaus [DK/SE]; Stora Gräbrodersgatan 13, S-222 22 Lund (SE).

Published:  
with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/056692 A1

(54) Title: METHODS FOR MODULATING TUMOR GROWTH AND METASTASIS

(57) Abstract: Methods and pharmaceutical compositions for modulating tumor growth or metastasis are provided.

**METHODS FOR MODULATING TUMOR GROWTH AND METASTASIS**

This application claims priority to US Provisional Application 60/258,195, filed December 22, 2000, entitled "Methods For Modulating Tumor Growth and Metastasis".

**FIELD OF THE INVENTION**

10 This invention relates to the fields of oncology and improved chemotherapy regimens.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

15 The disclosure of each literature article and published patent document referred to herein is incorporated by reference herein in its entirety. Cellular transformation during the development of cancer involves multiple alterations in the normal pattern of cell growth regulation. Primary events in 20 the process of carcinogenesis involve the activation of oncogene function by some means (e.g., amplification, mutation, chromosomal rearrangement), and in many cases, the removal of anti-oncogene function. In the most malignant and untreatable tumors, normal restraints on 25 cell growth are completely lost as transformed cells escape from their primary sites and metastasize to other locations in the body. One reason for the enhanced growth and invasive properties of some tumors may be the acquisition of increasing numbers of mutations in 30 oncogenes, with cumulative effect (Bear et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7495-7499, (1989)).

35 Alternatively, insofar as oncogenes function through the normal cellular signaling pathways required for organismal growth and cellular function (reviewed in McCormick, Nature 363:15-16, (1993)), additional alterations in the oncogenic signaling pathways may also contribute to tumor malignancy (Gilks et al., Mol. Cell

WO 02/056692

PCT/US01/50261

2

Biol. 13:1759-1768, (1993)), even though mutations in the signaling pathways alone may not cause cancer.

Several discrete classes of proteins are known to be involved in bringing about the different types of 5 changes in cell division properties and morphology associated with transformation. These changes can be summarized as, first, the promotion of continuous cell cycling (immortalization); second, the loss of 10 responsiveness to growth inhibitory signals and cell apoptotic signals; and third, the morphological restructuring of cells to enhance invasive properties.

The National Cancer Institute has estimated that in 15 the United States alone, 1 in 3 people will be struck with cancer during their lifetime. Moreover approximately 50% to 60% of people contracting cancer will eventually succumb to the disease. The widespread occurrence of this disease underscores the need for improved anticancer regimens for the treatment of malignancy.

20 Due to the wide variety of cancers presently observed, numerous anticancer agents have been developed to destroy cancer within the body. These compounds are administered to cancer patients with the objective of destroying or otherwise inhibiting the growth of 25 malignant cells while leaving normal, healthy cells undisturbed. Anticancer agents have been classified based upon their mechanism of action. One type of chemotherapeutic is referred to as a metal coordination complex. It is believed this type of chemotherapeutic 30 forms predominantly inter-strand DNA cross links in the nuclei of cells, thereby preventing cellular replication. As a result, tumor growth is initially repressed, and then reversed. Another type of chemotherapeutic is referred to as an alkylating agent. 35 These compounds function by inserting foreign compositions or molecules into the DNA of dividing cancer cells. As a result of these foreign moieties, the

normal functions of cancer cells are disrupted and proliferation is prevented. Another type of chemotherapeutic is an antineoplastic agent. This type of agent prevents, kills, or blocks the growth and 5 spread of cancer cells. Still other types of anticancer agents include nonsteroidal aromatase inhibitors, bifunctional alkylating agents, etc.

Unfortunately, deleterious side effects are associated with each of these agents. For example, 10 fluorouracil, a commonly used antineoplastic agent causes swelling or redness of normal skin, black or tarry stools, blood in the urine, chest pain, confusion, diarrhea, shortness of breath, and drowsiness. Administration of fluorouracil has also been associated 15 with fever, chills, cough, sore throat, lower back pain, mouth sores, nausea, vomiting, pain and/or difficulty passing urine. Taxane administration has been associated with cardiovascular events such as syncope, rhythm abnormalities, hypertension and venous 20 thrombosis; bone marrow suppression; neutropenia; anemia; peripheral neuropathy arthralgia/myalgia; nausea/vomiting and alopecia, to name only a few.

Combretastatins are another class of anticancer agents. Combretastatins have been isolated from stem 25 wood of the African tree *Combretum caffrum* (Combretaceae), and are potent inhibitors of microtubulin assembly. Combretastatin A-4 (CA-4) is significantly active against the US National Cancer Institute's (NCI) murine L1210 and P338 lymphocytic 30 leukemia cell lines. In addition, CA-4 was found to compete with combretastatin A-1 (CA-1), another compound isolated from *Combretum caffrum*, as a potent inhibitor of colchicine binding to tubulin. CA-4 also strongly retards the growth of certain cell lines (ED<sub>50</sub> <0.01 35 (g/ml), and is a powerful anti-mitotic agent. See US Patent 4,996,237. Furthermore, an "anti-vascular" mechanism of action for both CA-4 and CA-1 has recently

WO 02/056692

PCT/US01/50261

4

been discovered. Since the solubility of the combretastatins is very limited, prodrugs have been developed, such as combretastatin A-4 phosphate disodium salt and combretastatin A-1 phosphate disodium salt(hereinafter "CA4P" and "CA1P" respectively), to increase the solubility, and thus the efficacy of CA-4 and CA-1. In particular, a number of studies have shown that administration of combretastatin A-4 disodium salt or combretastatin A-1 phosphate disodium salt causes an extensive shut-down of blood flow to the tumor vasculature, leading to secondary tumor cell death.

Toxic side effects of CA-4 have also been reported.

There is thus a need in the art to provide superior effective anticancer therapies which minimize patient exposure and the unwanted side effects associated with such agents.

20

**SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention provides effective therapeutic methods for modulating tumor growth or metastasis wherein a combination of agents is employed. The methods of the present invention provide advantages such as greater overall efficacy, for example, in achieving synergy or avoiding antagonism, and allow, where desired, a reduction in the amount of one or more of the individual agents employed with a concomitant reduction in side effects. Further, where the tumor to be treated is not optimally responsive to a given anticancer agent, use of the present combination therapy methods can nonetheless provide effective treatment.

In particular, the present invention provides a method for modulating tumor growth or metastasis in an animal, especially a human, in need thereof, comprising sequential or simultaneous administration of a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1

WO 02/056692

PCT/US01/50261

compound and at least one other anticancer agent, in amounts effective therefor. Preferred such agents are described further below. The method of the present invention can provide the aforementioned advantages.

5 Further, the present inventors have found that certain sequences of administering the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound and the other anticancer agent can, *in vivo*, potentiate the overall efficacy of the combination. Combretastatin A-4  
10 compounds or combretastatin A-1 compounds, as antivascular agents, modulate blood flow to tumor tissue. By timing the administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound to modulate the flow of blood to the tumor to  
15 provide a time-dependent effective tumor concentration of the other anticancer agent, the overall efficacy of the combination is potentiated.

Without wishing to be bound by any molecular theory of action, certain anticancer agents are most  
20 efficacious at relatively high tumor concentrations, but are rapidly cleared from tumor tissue. For such agents, the present inventors have found that simultaneous administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound and the other anticancer  
25 agent potentiates the effect of the combination. Simultaneous administration allows the other anticancer agent to rapidly accumulate to a peak concentration in tumor tissue, yet "traps" the agent as the vasculature clearing tumor tissue is disrupted by the combretastatin  
30 A-4 compound or combretastatin A-1 compound. Such agents are termed herein "Peak Tumor Concentration Agents". Peak Tumor Concentration Agents are thus preferably administered simultaneously with, or within close temporal proximity to, the combretastatin A-4  
35 compound or combretastatin A-1 compound.

Other agents, for example, need not be present at high concentrations, but are effective during a

WO 02/056692

PCT/US01/50261

6

relatively short period of the overall cell cycle. As such agents can become protein-bound and inactive over time when remaining in contact with tumor tissue, they are therefore most efficacious under conditions where a continuing supply of the agent reaches the tumor. Potentiation of the efficacy of combination therapy in these cases can be obtained by administering the anticancer agent and combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound sequentially, with sufficient delay between administrations to allow the action of one of the agents before the other. Thus, when such anticancer agent is administered first, followed by a delay before administering the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, the anticancer agent reaches the tumor tissue over a sufficient duration to allow action of the compound, with subsequent administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound further damaging tumor tissue.

When the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound is administered first, followed by a delay to allow blood flow to the tumor to resume before administering the anticancer agent, the tumor is initially weakened by the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, followed by further damage to the tumor by the anticancer agent. In this latter case, duration of anticancer agent tumor concentration is more significant than peak concentration. The damage to tumor vasculature by the initial administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound does not prevent the relatively low concentration of anticancer agent needed from reaching the tumor tissue once blood flow resumes. Such agents are termed herein "Duration Exposure Agents". Duration Exposure Agents and the combretastatin

A-4 compound or combretastatin A-1 compound are thus preferably administered sequentially, with either administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound first, followed by the 5 anticancer agent, or vice versa, provided that a sufficient delay is allowed between administrations to potentiate the combination. Administration of the anticancer agent after the administration of combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 10 compound is most preferred for Duration Exposure Agents.

In yet an additional embodiment of the methods of the invention, certain agents are most efficacious when present at relatively high concentrations in tumor tissue over a longer duration (i.e., maximizing the 15 "area under the curve" (AUC) of a plot of concentration over time). Administering such agents first, followed by a delay before administering the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, allows action of the anticancer agent, with subsequent administration 20 of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound further weakening the tumor tissue. For such agents, administration of the anticancer agent first avoids premature damage to tumor vasculature and allows sufficient concentrations of anticancer agent to reach 25 the tumor. Such agents are termed herein "High AUC Agents". High AUC Agents and the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound are thus preferably administered sequentially, with administration of the High AUC Agent preceding 30 administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, provided that a sufficient delay is allowed between administrations to potentiate the combination.

The present invention therefore provides as a 35 further embodiment, a method for modulating tumor growth or metastasis in an animal in need thereof, especially a human, comprising administration of a combretastatin A-4

compound or combretastatin A-1 compound and at least one anticancer agent, in amounts effective therefor, wherein said combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound is administered at a time 5 relative to administration of said anticancer agent sufficient to modulate blood flow to said tumor to provide a time-dependent effective tumor concentration of said anticancer agent. The method of the present invention allows potentiation of the overall efficacy of 10 the combination employed.

The term "time-dependent effective tumor concentration," as used herein, denotes a concentration of the other anticancer agent in the tumor tissue over time (i.e., from administration until the agent is 15 cleared from the body) which potentiates the action of the combination of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound and other anticancer agent. Thus, where the combination is otherwise antagonistic, "potentiation" can denote use of a combination without 20 antagonistic results. "Potentiation" can also denote achieving an unexpected improvement in the overall efficacy of the combination, such as synergy.

Where simultaneous administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 25 compound and at least one anticancer agent is contemplated, the present invention also provides pharmaceutical compositions comprising at least one anticancer agent and a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound. For example, in one aspect, 30 the anticancer agent and/or combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound can be present in a subtherapeutic dose for the individual agent, the agents being effective in combination, providing reduced side effects while maintaining efficacy. Alternatively, each 35 agent can be provided at higher doses for the individual agent, such as those found in the Physician's Desk Reference.

Where simultaneous or sequential administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound and anticancer agent is contemplated, the present invention further provides pharmaceutical kits.

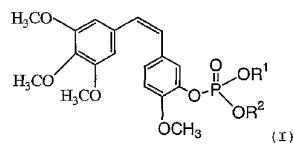
5 Exemplary kits of the invention comprise a first pharmaceutical composition comprising at least one anticancer agent and a second pharmaceutical composition comprising a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound together in a package. The 10 anticancer agent and/or combretastatin A4 compound or combretastatin A-1 compound can be present, for example, in a subtherapeutic dose for the individual agent, the agents being effective in combination and providing reduced side effects while maintaining efficacy.

15 Alternatively, each agent can be provided at a higher dose, such as those found for the agent in the Physician's Desk Reference.

The following definitions are provided to 20 facilitate an understanding of the present invention.

As used herein, the term "combretastatin A-4 compound" denotes at least one of combretastatin A-4, prodrugs (preferably phosphate prodrugs) and derivatives 25 thereof, and salts of these compounds. Such compounds include without limitation, combretastatin A-4, and various prodrugs of combretastatin A-4 exemplified by combretastatin A-4 phosphate and salts thereof, especially combretastatin A-4 phosphate disodium salt.

30 Preferred combretastatin A-4 compounds contemplated for use in the methods of the invention are described in WO 00/48606; WO 99/35150; US patent number 5,561,122; US Patent number 4,996,237; US Provisional Application Serial No. 60/232,568, filed September 14, 2000 by John 35 J. Venit, entitled "Combretastatin A-4 phosphate Mono- and Di-Amino Acid Salt Prodrugs" disclosing compounds of the formula I:

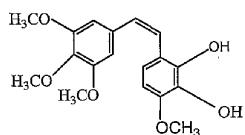


5

wherein one of  $OR^1$  and  $OR^2$  is  $-O^-QH^+$ , and the other is  
10 hydroxyl or  $-O^-QH^+$ , and Q is an amino acid containing at  
least two nitrogen atoms where one of the nitrogen  
atoms, together with a proton, forms a quaternary  
ammonium cation  $QH^+$ , preferably, where one of  $OR^1$  and  $OR^2$   
is hydroxyl, and the other is  $-O^-QH^+$  where Q is L-  
15 histidine; and US Provisional Application Serial No.  
60/251,921, filed December 7, 2000 by Mandar V. Dali et  
al., entitled "Combretastatin A-4 Phosphate Prodrug  
Mono- and Di-Organic Amine Salts" disclosing compounds  
having the structure shown in formula I above, wherein  
20 one of  $OR^1$  and  $OR^2$  is  $-O^-QH^+$ , and the other is hydroxyl  
or  $-O^-QH^+$ ; and Q is an organic amine containing at least  
one nitrogen atom which, together with a proton, forms a  
quaternary ammonium cation,  $QH^+$ , preferably, where one  
of  $OR^1$  and  $OR^2$  is hydroxyl and the other is  $-O^-QH^+$  and Q  
25 is tris(hydroxymethyl)amino methane ("TRIS"). As  
mentioned above, each of these documents is incorporated  
herein by reference in its entirety.

As used herein, the term combretastatin A-1  
30 compound denotes at least one of combretastatin A-1,  
prodrugs (preferably phosphate prodrugs) and derivatives  
thereof, and salts of these compounds. Combretastatin

A-1 is described in US Patent 5,409,953 to Pettit et al. and has the following general structure:



5

As used herein, the terms "modulate", "modulating" or "modulation" refer to changing the rate at which a 10 particular process occurs, inhibiting a particular process, reversing a particular process, and/or preventing the initiation of a particular process. Accordingly, if the particular process is tumor growth or metastasis, the term "modulation" includes, without 15 limitation, decreasing the rate at which tumor growth and/or metastasis occurs; inhibiting tumor growth and/or metastasis; reversing tumor growth and/or metastasis (including tumor shrinkage and/or eradication) and/or preventing tumor growth and/or metastasis.

20

The term "anticancer agent" as used herein denotes a chemical compound or electromagnetic radiation (especially, X-rays) which is capable of modulating tumor growth or metastasis. When referring to use of 25 such an agent with a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, the term refers to an agent other than a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound. Unless otherwise indicated, this term can include one, or more than one, such 30 agents. Thus, the term "anticancer agent" encompasses the use of one or more chemical compounds and/or electromagnetic radiation in the present methods and

WO 02/056692

PCT/US01/50261

12

compositions. Where more than one anticancer agent is employed, the relative time for administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound can, as desired, be selected to provide a time-dependent effective tumor concentration of one, or more than one, of the anticancer agents.

As explained above, numerous types of anticancer agents are exemplary of those having applications in a composition or method of the present invention. Such classes of anticancer agents, and their preferred mechanisms of action, are described below:

1. Alkylating agent: a compound that donates an alkyl group to nucleotides. Alkylated DNA is unable to replicate itself and cell proliferation is stopped. Examples of such compounds include, but are not limited to, busulfan, coordination metal complexes (such as carboplatin, oxaliplatin, and cisplatin), cyclophosphamide (cytoxan), dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine (mustargen), and melphalan;

2. Bifunctional alkylating agent: a compound having two labile methanesulfonate groups that are attached to opposite ends of a four carbon alkyl chain. The methanesulfonate groups interact with, and cause damage to DNA in cancer cells, preventing their replication. Examples of such compounds include, without limitation, chlorambucil and melphalan;

3. Non-steroidal aromatase inhibitor: a compound that inhibits the enzyme aromatase, which is involved in estrogen production. Thus, blockage of aromatase results in the prevention of the production of estrogen. Examples of such compounds include anastrozole and exemstane;

4. Immunotherapeutic agent: an antibody or antibody fragment which targets cancer cells that produce proteins associated with malignancy. Exemplary immunotherapeutic agents include Herceptin which targets 5 HER2 or HER2/neu, which occurs in high numbers in about 25 percent to 30 percent of breast cancers; and anti-CD20 which triggers apoptosis in B cell lymphomas. Additional immunotherapeutic agents include immunotoxins, wherein toxin molecules such as ricin, 10 diphtheria toxin and pseudomonas toxins are conjugated to antibodies which recognize tumor specific antigens. Conjugation can be achieved biochemically or via recombinant DNA methods.

15 5. Nitrosurea compound: inhibits enzymes that are needed for DNA repair. These agents are able to travel to the brain so they are used to treat brain tumors, as well as non-Hodgkin's lymphomas, multiple myeloma, and malignant melanoma. Examples of nitrosureas include 20 carmustine and lomustine;

6. Antimetabolite: a class of drugs that interfere with DNA and ribonucleic acid (RNA) elongation. These agents are phase specific (S phase) 25 and are used to treat chronic leukemias as well as tumors of breast, ovary and the gastrointestinal tract. Examples of antimetabolites include 5-fluorouracil, methotrexate, gemcitabine (GEMZAR), cytarabine (Ara-C), and fludarabine.

30 7. Antitumor antibiotic: a compound having antimicrobial and cytotoxic activity. Such compounds also may interfere with DNA by chemically inhibiting enzymes and mitosis or altering cellular membranes. 35 Examples include, but certainly are not limited to bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin (Adriamycin), and idarubicin;

8. Mitotic inhibitor: a compound that can inhibit mitosis (e.g., tubulin binding compounds) or inhibit enzymes that prevent protein synthesis needed for 5 reproduction of the cell. Examples of mitotic inhibitors include taxanes such as paclitaxel and docetaxel, epothilones, etoposide, vinblastine, vincristine, and vinorelbine;

10 9. Radiation therapy: includes but is not limited to X-rays or gamma rays which are delivered from either an externally supplied source such as a beam or by implantation of small radioactive sources.

15 10. Topoisomerase I inhibitors: agents which interfere with topoisomerase activity thereby inhibiting DNA replication. Such agents include, without limitation, CPT-11 and topotecan.

20 11. Hormonal therapy: includes, but is not limited to anti-estrogens, such as Tamoxifen, GnRH agonists, such as Lupron, and Progestin agents, such as Megace.

25 Naturally, other types of anticancer agents that function via a large variety of mechanisms have application in the pharmaceutical compositions and methods of the present invention. Additional such 30 agents include for example, leuocovorin, kinase inhibitors, such as Iressa and Flavopiridol, analogues of conventional chemotherapeutic agents such as taxane analogs and epothilone analogues, antiangiogenics such as matrix metalloproteinase inhibitors, and other VEGF 35 inhibitors, such as ZD6474 and SU6668. Retinoids such as Targretin can also be employed in the pharmaceutical compositions and methods of the invention. Signal

WO 02/056692

PCT/US01/50261

15

transduction inhibitors which interfere with farnesyl transferase activity and chemotherapy resistance modulators, e.g., Valspodar can also be employed. Monoclonal antibodies such as C225 and anti-VEGFR 5 antibodies can also be employed.

As used herein, the phrase "effective amount" of a compound or pharmaceutical composition refers to an amount sufficient to modulate tumor growth or metastasis 10 in an animal, especially a human, including without limitation decreasing tumor growth or size or preventing formation of tumor growth in an animal lacking any tumor formation prior to administration, i.e., prophylactic administration.

15

As used herein, the term "prodrug" refers to a precursor form of the drug which is metabolically converted *in vivo* to produce the active drug. Thus, for example, combretastatin A-4 phosphate prodrug salts or 20 combretastatin A-1 phosphate prodrug salts administered to an animal in accordance with the present invention undergo metabolic activation and regenerate combretastatin A-4 or combretastatin A-1 *in vivo*, e.g., following dissociation and exposure to endogenous non- 25 specific phosphatases in the body.

As explained above, the present invention is directed towards a pharmaceutical composition that modulates growth or metastasis of tumors, particularly 30 solid tumors, using a pharmaceutical composition of the present invention, along with methods of modulating tumor growth or metastasis, for example, with a pharmaceutical composition of the present invention.

35 As used herein, the terms "tumor", "tumor growth" or "tumor tissue" can be used interchangeably, and refer to an abnormal growth of tissue resulting from

uncontrolled progressive multiplication of cells and serving no physiological function. A solid tumor can be malignant, e.g. tending to metastasize and being life threatening, or benign. Examples of solid tumors that 5 can be treated or prevented according to a method of the present invention include sarcomas and carcinomas such as, but not limited to: fibrosarcoma, myxosarcoma, liposarcoma, chondrosarcoma, osteogenic sarcoma, chordoma, angiosarcoma, endotheliosarcoma, 10 lymphangiosarcoma, lymphangioendotheliosarcoma, synovioma, mesothelioma, Ewing's tumor, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, colon carcinoma, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, breast cancer, ovarian cancer, prostate cancer, squamous cell carcinoma, basal 15 cell carcinoma, adenocarcinoma, sweat gland carcinoma, sebaceous gland carcinoma, papillary carcinoma, papillary adenocarcinomas, cystadenocarcinoma, medullary carcinoma, bronchogenic carcinoma, renal cell carcinoma, hepatoma, liver metastases, bile duct carcinoma, 20 choriocarcinoma, seminoma, embryonal carcinoma, thyroid carcinoma such as anaplastic thyroid cancer, Wilms' tumor, cervical cancer, testicular tumor, lung carcinoma such as small cell lung carcinoma and non-small cell lung carcinoma, bladder carcinoma, epithelial carcinoma, 25 glioma, astrocytoma, medulloblastoma, craniopharyngioma, ependymoma, pinealoma, hemangioblastoma, acoustic neuroma, oligodendrogloma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, and retinoblastoma.

30 Moreover, tumors comprising dysproliferative changes (such as metaplasias and dysplasias) can be treated or prevented with a pharmaceutical composition or method of the present invention in epithelial tissues such as those in the cervix, esophagus, and lung. Thus, 35 the present invention provides for treatment of conditions known or suspected of preceding progression to neoplasia or cancer, in particular, where non-

WO 02/056692

PCT/US01/50261

17.

neoplastic cell growth consisting of hyperplasia, metaplasia, or most particularly, dysplasia has occurred (for review of such abnormal growth conditions, see Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. 5 Saunders Co., Philadelphia, pp. 68 to 79). Hyperplasia is a form of controlled cell proliferation involving an increase in cell number in a tissue or organ, without significant alteration in structure or function. For example, endometrial hyperplasia often precedes 10 endometrial cancer. Metaplasia is a form of controlled cell growth in which one type of adult or fully differentiated cell substitutes for another type of adult cell. Metaplasia can occur in epithelial or connective tissue cells. Atypical metaplasia involves a 15 somewhat disorderly metaplastic epithelium. Dysplasia is frequently a forerunner of cancer, and is found mainly in the epithelia; it is the most disorderly form of non-neoplastic cell growth, involving a loss in individual cell uniformity and in the architectural 20 orientation of cells. Dysplastic cells often have abnormally large, deeply stained nuclei, and exhibit pleomorphism. Dysplasia characteristically occurs where there exists chronic irritation or inflammation, and is often found in the cervix, respiratory passages, oral 25 cavity, and gall bladder. For a review of such disorders, see Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia.

Other examples of tumors that are benign and can be 30 treated or prevented in accordance with a method of the present invention include arteriovenous (AV) malformations, particularly in intracranial sites and myoleomas.

35 The phrase "Peak Tumor Concentration Agents" refers to anticancer agents which are most efficacious at high tumor concentrations yet are rapidly cleared from the

tumor tissue. Such agents are preferably administered simultaneously with or in close temporal proximity to (e.g., as is clinically feasible, especially within one hour of) the administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound in accordance with the invention. Exemplary Peak tumor Concentration Agents include, without limitation, alkylating agents such as cytoxan and mitomycin C and metal coordination complexes such as cisplatin, oxaliplatin and 10 carboplatin.

The phrase "Duration Exposure Agents" as used herein refers to agents which can be effective at relatively low tumor concentrations yet which require 15 certain tumor tissue exposure times to be most effective. Such agents are preferably administered sequentially in any order with a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound in accordance with the invention, provided that sufficient delay is 20 allowed between administrations to potentiate the combination. In a preferred embodiment of the method of the invention, the Duration Exposure Agent is administered after the administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 25 compound. Exemplary Duration Exposure Agents include, without limitation, taxanes such as paclitaxel and docetaxel, etoposide, etoposide phosphate, immunotoxins, and epothilones.

30 The phrase "High AUC Agents" as used herein refers to those agents which show greatest efficacy when present at high concentrations in tumor tissue for extended time periods. Such agents are preferably administered sequentially with a combretastatin A-4 35 compound or combretastatin A-1 compound in accordance with the invention, wherein the High AUC Agent is administered first, followed by the combretastatin A-4

compound or combretastatin A-1 compound, provided that a sufficient delay is allowed between administrations to potentiate the combination. Exemplary High AUC Agents include, without limitation, adriamycin, CPT-11 5 (irinotecan), and topotecan.

In one preferred embodiment, Peak Tumor Concentration Agents, such as platinum based anticancer agents, including cisplatin or carboplatin are administered essentially simultaneously with a 10 combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, such as combretastatin A-4 phosphate disodium salt or combretastatin A-1 phosphate disodium salt.

In yet another preferred embodiment, Duration 15 Exposure Agents, including immunotoxins, and taxanes, such as paclitaxel and docetaxel are administered after the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound. Administration of a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound prior to the 20 Duration Exposure Agent extends the exposure time of the tumor tissue to the Duration Exposure Agent.

In an additional preferred embodiment, High AUC Agents such as CPT-11, are administered prior to the 25 administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound (e.g., combretastatin A-4 phosphate disodium salt or combretastatin A-1 phosphate disodium salt). Such agents can preferably be administered, for example, within 24 hours of the 30 administration of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, such as within 2-24 hours prior, 3-24 hours prior, 6-24 hours prior, 8-24 hours prior, or 12 to 24 hours prior to administration.

Surprisingly, combinations such as those described 35 above potentiate the efficacy of the combination and can provide the advantages described above. For example, the present methods permit the clinician to administer a

WO 02/056692

PCT/US01/50261

20

combreastatin A-4 compound or combreastatin A-1 compound, such as the phosphate disodium salts of these compounds, and/or anticancer agent, at dosages which are significantly lower than those employed for the single agent. Preferred dosages suitable for administration of the anticancer and combreastatin A-4 compounds or combreastatin A-1 compounds in accordance with the invention are set forth hereinbelow.

Whether administered simultaneously or sequentially, the combreastatin A-4 compound or combreastatin A-1 compound and the at least one anticancer agent can be administered in any amount or by any route of administration effective for the modulation of tumor growth or metastasis, especially treatment of cancer as described herein. The expression "chemotherapeutically effective amount", as used herein, refers to a sufficient amount of the compounds of the invention to provide the desired anticancer effect. The exact amount required will vary from subject to subject, the mode of administration of the chemotherapeutic compounds and the like.

The present invention further provides chemotherapeutic pharmaceutical compositions comprising both a combreastatin A-4 compound or combreastatin A-1 compound, and at least one selected anticancer agent and the use thereof in the present methods. Alternatively, the method of the present invention can be carried out using chemotherapeutic pharmaceutical compositions which comprise one of the above-described compounds as the active ingredient, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier medium or an auxiliary agent. Thus, in such an embodiment, the combreastatin A-4 compound or combreastatin A-1 compound, such as combreastatin A-4 phosphate disodium salt or combreastatin A-1 phosphate disodium salt, and

WO 02/056692

PCT/US01/50261

21

the anticancer agent, such as cisplatin are formulated and administered separately.

5                   **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

FIG. 1: Graph of the antitumor activity of cisplatin and combretastain A-4 phosphate disodium salt (CA4P) administered singly in the moderately platinum-resistant M5076DDP murine fibrosarcoma. Tumor was staged to 300 mg 10 at treatment initiation. Cisplatin was administered intravenously (iv), every 4 days for 3 doses (Q4D x 3). CA4P was given iv, every day for 10 days (Monday through Friday).

15                   FIG. 2: (A) Graph of therapeutic synergy observed with the combination of CA4P and the Peak Tumor Concentration Agent, cisplatin in the M5076DDP tumor model. Drug treatment was iv, Q4D x3. Drug combinations were administered simultaneously. (B) Graph showing CA4P 20 significantly enhanced the antitumor activity of an otherwise inactive dose of cisplatin (3 mg/kg/inj).

25                   FIG. 3: (A) Graph of therapeutic synergy observed with the combination of CA4P and the peak tumor concentration agent, carboplatin in the M5076 murine fibrosarcoma model. Drug treatment was intraperitoneal (ip), Q4D x3. Drug combinations were administered simultaneously ip (admixed). (B) Graph showing that 30 CA4P, at three different dose levels (90-250 mg/kg/inj), significantly improved the antitumor activity of carboplatin.

35                   Fig. 4: A graph showing antitumor activity in log cell kill indicating that the CA4P and carboplatin should essentially be administered simultaneously.

WO 02/056692

PCT/US01/50261

22

FIG. 5: Graph of inhibition of tumor blood flow by CA4P in the sc A2780 human ovarian carcinoma grown in nude mice (A) or nude rats (B).

5 Fig. 6: Graph showing the antitumor effects of combined High AUC Agent, CPT-11, and CA4P chemotherapy in human ovarian carcinoma cells (A2780). CPT-11 is administered 3-24 hours prior to the administration of the combretastatin compound.

10 Fig. 7: Enhancement of the antitumor efficacy of carboplatin by low dose CA4P in the M5076/DDP tumors. Panels A-C depict results for the combination of various doses of CA4P with 90, 60 and 40 mg/m<sup>2</sup> of carboplatin, 15 respectively.

Fig. 8: Combination chemotherapy with CA4P and paclitaxel versus the 16/c murine mammary carcinoma.

20 Fig. 9: Combination chemotherapy with CA4P and paclitaxel versus A2780 human ovarian carcinoma. Simultaneous administration of the agents is antagonistic in this model.

25 Fig. 10: Combination chemotherapy with CA4P and paclitaxel versus A2780 human ovarian carcinoma. An interval of 3 hours between treatments abrogates negative interaction.

30 Fig. 11: A bar graph showing that combined administration of an immunotoxin BR96-sFv-PE40 with combretastatin A4P acts synergistically to reduce tumor size in a colon cancer xenograft model in an allogeneic Brown-Norway rat host.

35

WO 02/056692

PCT/US01/50261

23

Figs. 12A and 12B: A pair of graphs showing that combretastatin A-1P inhibits blood flow in human tumor xenografts in nude mice in a manner comparable to that observed for combretastatin A-4P. Fig. 12A: N87  
5 gastric cancer xenograft model; Fig. 12B: A2780 ovarian cancer xenograft model.

Figs. 13A-13D are a series of graphs showing dose response curves of tumor size reduction in response to 10 administration of combretastatin A-1P and carboplatin alone and in combination against an M5076 fibrosarcoma xenograft model. Combined administration of combretastatin A-1P and carboplatin acted synergistically to reduce tumor size.

15

Fig. 14: Graph showing that combined administration of combretastatin A-1P and carboplatin produces a synergistic antitumor effect, producing a complete response (disappearance of tumors) not observed 20 in single agent therapy.

Fig. 15: A graph showing that combined administration of cisplatin and combretastatin A1P act synergistically to reduce tumor size in a CaNT breast 25 tumor model in CBA mice.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, improved 30 chemotherapeutic regimens are provided for the treatment of cancer. The improved chemotherapeutic regimens can lower side effects and enhance efficacy for the treatment of neoplastic disease.

Derived from the South African tree *Combretum caffrum*, combretastatin A-4 (CA-4) was initially

identified in the 1980's as a potent inhibitor of tubulin polymerization. CA-4 binds a site at or near the colchicine binding site on tubulin with high affinity. *In vitro* studies clearly demonstrated that CA-4 is a potent cytotoxic agent against a diverse spectrum of tumor cell types in culture. Combretastatin A-4 has also recently been shown to have an additional "anti-vascular" mechanism of action. A number of studies have shown that CA4P causes extensive shut-down of blood flow to the tumor vasculature, leading to secondary tumor cell death. Blood flow to normal tissues is generally far less affected by combretastatin A-4 than tumors, although blood flow to some organs, such as spleen, skin, skeletal muscle and brain, can be inhibited. In light of this new "non-cytotoxic" mode of action of CA4P, there is considerable interest in exploiting the novel anti-vascular action of CA4P for cancer treatment. Recently, single agent efficacy was reported for CA4P using a frequent dosing regimen. Another report suggested that large tumors can, in some cases, be more responsive to CA4P therapy than small tumors.

Combretastatin A-1 and prodrugs thereof (CA1P) are also potent inhibitors of tubulin polymerization. CA1P has also been shown to cause shut down of blood flow to the tumor vasculature.

#### **Pharmaceutical Compositions**

As explained above, the present methods can, for example, be carried out using a single pharmaceutical composition comprising both combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound and anticancer agent(s) (when administration is to be simultaneous) or using two or more pharmaceutical compositions separately comprising combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound and anticancer agent(s) (when administration is to be simultaneous or sequential). Such pharmaceutical compositions can comprise, inter

alia, at least one anticancer agent and/or a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, such as combretastatin A-4 phosphate disodium salt or combretastatin A-1 phosphate disodium salt and a 5 pharmaceutically acceptable carrier. The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and preferably do not produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, 10 dizziness and the like, when administered to a human.

Preferably, as used herein, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally 15 recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers, for example to a diluent, adjuvant, excipient, auxilliary agent or vehicle with which an active agent of the present invention is administered. Such pharmaceutical 20 carriers can be sterile liquids, such as water and oils including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water or aqueou saline solutions and aqueous dextrose and glycerol 25 solutions are preferably employed as carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin.

A pharmaceutical composition of the present 30 invention can be administered by any suitable route, example, by injection, by oral, pulmonary, nasal or other forms of administration. In general, pharmaceutical compositions contemplated to be within the scope of the invention, comprise, *inter alia*, 35 pharmaceutically acceptable diluents, preservatives, solubilizers, emulsifiers, adjuvants and/or carriers. Such compositions can include diluents of various b

content (e.g., Tris-HCl, acetate, phosphate), pH and ionic strength; additives such as detergents and solubilizing agents (e.g., Tween 80, Polysorbate 80), anti-oxidants (e.g., ascorbic acid, sodium 5 metabisulfite), preservatives (e.g., Thimersol, benzyl alcohol) and bulking substances (e.g., lactose, mannitol); incorporation of the material into particulate preparations of polymeric compounds such as polylactic acid, polyglycolic acid, etc., or into 10 liposomes. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of components of a pharmaceutical composition of the present invention. See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, 15 Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) pages 1435-1712 which are herein incorporated by reference. A pharmaceutical composition of the present invention can be prepared, for example, in liquid form, or can be in dried powder, such as lyophilized form. Particular 20 methods of administering such compositions are described *infra*.

**Methods for Modulating Tumor Growth or Metastasis**

As explained above, the present invention is 25 directed towards methods for modulating tumor growth and metastasis comprising, *inter alia*, the administration of a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, such as combretastatin A-4 phosphate disodium salt or combretastatin A-1 phosphate disodium salt, and 30 at least one anticancer agent. The agents of the invention can be administered separately (e.g., formulated and administered separately), or in combination as a pharmaceutical composition of the present invention. Administration can be achieved by any 35 suitable route, such as parenterally, transmucosally, e.g., orally, nasally, or rectally, or transdermally. Preferably, administration is parenteral, e.g., via

intravenous injection. Alternative means of administration also include, but are not limited to, intra-arteriole, intramuscular, intradermal, subcutaneous, intraperitoneal, intraventricular, and 5 intracranial administration, or by injection into the tumor(s) being treated or into tissues surrounding the tumor(s).

The combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound, such as combretastatin A-4 phosphate 10 disodium salt or combretastatin A-1 phosphate disodium salt and anticancer agent may be employed in any suitable pharmaceutical formulation, as described above, including in a vesicle, such as a liposome [see Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes 15 in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss: New York, pp. 317-327, see generally, ibid]. Preferably, administration of liposomes containing the agents of the invention is parenteral, e.g., via intravenous injection, but also 20 may include, without limitation, intra-arteriole, intramuscular, intradermal, subcutaneous, intraperitoneal, intraventricular, and intracranial administration, or by injection into the tumor(s) being treated or into tissues surrounding the tumor(s).

25 In yet another embodiment, a pharmaceutical composition of the present invention can be delivered in a controlled release system, such as using an intravenous infusion, an implantable osmotic pump, a transdermal patch, liposomes, or other modes of 30 administration. In a particular embodiment, a pump may be used [see Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)]. In another embodiment, polymeric materials can 35 be used [see Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product

Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); see also Levy et al., *Science* 228:190 (1985); During et al., *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)]. In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the target tissues of the animal, thus requiring only a fraction of the systemic dose [see, e.g., Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)]. In particular, a controlled release device can be introduced into an animal in proximity of the site of inappropriate immune activation or a tumor. Other controlled release systems are discussed in the review by Langer [*Science* 249:1527-1533 (1990)].

The following Table I sets forth preferred chemotherapeutic combinations and exemplary dosages for use in the methods of the present invention. Where "Combratstatin A-4" appears, combratstatin A-4, 20 combratstatin A-1 or phosphate prodrug salt of either combratstatin A-4 or combratstatin A-1 or, such as CA4P or CA1P, is preferably employed.

	<b>CHEMOTHERAPEUTIC COMBINATION</b>	<b>DOSAGE</b>
		<b>mg/m<sup>2</sup> (per dose)</b>
25	Combratstatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ Cisplatin	5-150 mg/m <sup>2</sup>
	Combratstatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
30	+ Carboplatin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
	Combratstatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ Radiation	200-8000 cGy
35	Combratstatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ CPT-11	5-400 mg/m <sup>2</sup>

WO 02/056692

PCT/US01/50261

29

Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ Paclitaxel	40-250 mg/m <sup>2</sup>
Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
5 + Paclitaxel	40-250 mg/m <sup>2</sup>
+ Carboplatin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+5FU and optionally	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
10 + Leucovorin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ Epothilone	1-500 mg/m <sup>2</sup>
15 Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ Gemcitabine	100-3000 mg/m <sup>2</sup>
Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ UFT and optionally	50-800 mg/m <sup>2</sup>
20 + leucovorin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ Gemcitabine	100-3000 mg/m <sup>2</sup>
+ Cisplatin	5-150 mg/m <sup>2</sup>
25 Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+UFT	50-800 mg/m <sup>2</sup>
+Leucovorin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
30 Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
+ Cisplatin	5-150 mg/m <sup>2</sup>
+ paclitaxel	40-250 mg/m <sup>2</sup>
Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
35 + Cisplatin	5-150 mg/m <sup>2</sup>
+ 5FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>

WO 02/056692

PCT/US01/50261

30

	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ Oxaliplatin	5-200 mg/m <sup>2</sup>
	+ CPT-11	4-400 mg/m <sup>2</sup>
5	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ 5FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
	+ CPT-11 and optionally	4-400 mg/m <sup>2</sup>
	+ leucovorin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
10	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ 5FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
	+ radiation	200-8000 cGy
	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
15	+ radiation	200-8000 cGy
	+ 5FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
	+ Cisplatin	5-150 mg/m <sup>2</sup>
20	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ Oxaliplatin	5-200 mg/m <sup>2</sup>
	+ 5FU and optionally	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
	+ Leucovorin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
25	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ paclitaxel	40-250 mg/m <sup>2</sup>
	+ CPT-11	4-400 mg/m <sup>2</sup>
	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
30	+ paclitaxel	40-250 mg/m <sup>2</sup>
	+ 5-FU	5-5000 mg/m <sup>2</sup>
	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>
	+ UFT	50-800 mg/m <sup>2</sup>
	+ CPT-11 and optionally	4-400 mg/m <sup>2</sup>
35	+ leucovorin	5-1000 mg/m <sup>2</sup>
	Combreastatin A-4	1-100 mg/m <sup>2</sup>

WO 02/056692

PCT/US01/50261

31

+ BR96-sFv-PE40 100-750 mg/m<sup>2</sup>

In the above Table I, "5FU" denotes 5-fluorouracil, "Leucovorin" can be employed as leucovorin calcium, "UFT" is a 1:4 molar ratio of tegafur:uracil, and "Epothilone" is preferably a compound described in WO 99/02514 or WO 00/50423, both incorporated by reference herein in their entirety.

While Table I provides exemplary dosage ranges of the combretastatin A-4 compounds or combretastatin A-1 compounds and certain anticancer agents of the invention, when formulating the pharmaceutical compositions of the invention the clinician may utilize preferred dosages as warranted by the condition of the patient being treated. For example, combretastatin A-4 compounds or combretastatin A-1 compounds may preferably be administered at a dosage ranging from 30-70 mg/m<sup>2</sup> every three weeks for as long as treatment is required. Preferred dosages for cisplatin are 75-120 mg/m<sup>2</sup> administered every three weeks. Preferred dosages for carboplatin are within the range of 200-600 mg/m<sup>2</sup> or an AUC of 0.5-8 mg/ml x min; most preferred is an AUC of 4-6 mg/ml x min. When the method employed utilizes radiation, preferred dosages are within the range of 200-6000 cGY. Preferred dosages for CPT-11 are within 100-125 mg/m<sup>2</sup>, once a week. Preferred dosages for paclitaxel are 130-225 mg/m<sup>2</sup> every 21 days. Preferred dosages for gemcitabine are within the range of 80-1500 mg/m<sup>2</sup> administered weekly. Preferably UFT is used within a range of 300-400 mg/m<sup>2</sup> per day when combined with leucovorin administration. Preferred dosages for leucovorin are 10-600 mg/m<sup>2</sup> administered weekly. A preferred dose of the BR96-sFv-PE40 immunotoxin is 420 mg/m<sup>2</sup>. The use of the BR96-sFv-PE40 immunotoxin in combination with combretastatin A4 and its prodrugs in immune enhancing therapy is described in US Provisional Application 60/258,283, filed December 26, 2000, the

WO 02/056692

PCT/US01/50261

32

entire disclosure of which is incorporated by reference herein.

Certain cancers can be treated effectively with combretastatin A-4 or combretastatin A-1 and a plurality 5 of anticancer agents. Such triple and quadruple combinations can provide greater efficacy. When used in such triple and quadruple combinations the dosages set forth above can be utilized. Other such combinations in the above Table I can therefore include "combreastatin 10 A-4 or combretastatin A-1" in combination with (1) mitoxantrone + prednisone; (2) doxorubicin + taxane; or (3) herceptin + taxane. 5-FU can be replaced by UFT in any of the above combinations.

When employing the methods or compositions of the 15 present invention, other agents used in the modulation of tumor growth or metastasis in a clinical setting, such as antiemetics, can also be administered as desired.

20 The following examples are provided to illustrate embodiments of the invention. They are not intended to limit the invention in any way.

The following protocols are provided to facilitate the practice of Examples I and II.

25 Drug administration: For administration to rodents, CA4P was dissolved in normal saline (0.9% NaCl). Paclitaxel was dissolved in a 50/50 mixture of ethanol and Cremophor® and stored at 4°C; final dilution of 30 paclitaxel was obtained immediately before drug administration with NaCl 0.9%. Fresh preparation of paclitaxel was employed to avoid precipitation. CPT-11 was dissolved in normal saline. The volume of all compounds injected was 0.01 ml/g of 35 mice, and 0.005 ml/g of rats.

In Vivo Antitumor Testing: The following tumor models

WO 02/056692

PCT/US01/50261

33

were used: A2780 human ovarian carcinoma, the murine fibrosarcoma M5076 and M5076/ddp (resistant to cisplatin and carboplatin).

The human tumors were maintained in Balb/c nu/nu 5 nude mice. M5076 and M5076ddp was maintained in C57BL/6 mice. Tumors were propagated as subcutaneous transplants in the appropriate mouse strain using tumor fragments obtained from donor mice.

The following tumors were passaged in the indicated 10 host strain of mouse: murine M5076 fibrosarcoma (M5076) in C57BL/6 mice; human A2780 ovarian carcinomas in nude mice. Tumor passage occurred biweekly for murine tumors and approximately every two to three weeks for the human tumor line. With regard to efficacy testing, M5076 and 15 M5076ddp tumors were implanted in (C57BL/6 x DBA/2)F1 hybrid mice, and human tumors were implanted in nude mice. All tumor implants for efficacy testing were subcutaneous (sc).

The required number of animals needed to detect a 20 meaningful response were pooled at the start of the experiment and each was given a subcutaneous implant of a tumor fragment ( $\approx$  50 mg) with a 13-gauge trocar. For treatment of early-stage tumors, the animals were again pooled before distribution to the various treatment and 25 control groups. For treatment of animals with advanced-stage disease, tumors were allowed to grow to the pre-determined size window (tumors outside the range were excluded) and animals were evenly distributed to various treatment and control groups. Treatment of each animal 30 was based on individual body weight. Treated animals were checked daily for treatment related toxicity/mortality. Each group of animals was weighed before the initiation of treatment (Wt1) and then again following the last treatment dose (Wt2). The difference 35 in body weight (Wt2-Wt1) provides a measure of treatment-related toxicity.

Tumor response was determined by measurement of

WO 02/056692

PCT/US01/50261

34

tumors with a caliper twice a week, until the tumors reach a predetermined "target" size of 1 gm. Tumor weights (mg) were estimated from the formula:

5            Tumor weight = (length x width<sup>2</sup>) ÷ 2  
Antitumor activity was evaluated at the maximum tolerated dose (MTD) which is defined as the dose level immediately below which excessive toxicity (i.e. more than one death) occurred. The MTD was frequently  
10 equivalent to OD. When death occurs, the day of death was recorded. Treated mice dying prior to having their tumors reach target size were considered to have died from drug toxicity. No control mice died bearing tumors less than target size. Treatment groups with more than  
15 one death caused by drug toxicity were considered to have had excessively toxic treatments and their data were not included in the evaluation of a compound's antitumor efficacy.

20            Tumor response end-point was expressed in terms of tumor growth delay (T-C value), defined as the difference in time (days) required for the treated tumors (T) to reach a predetermined target size compared to those of the control group (C).

25            To estimate tumor cell kill, the tumor volume doubling time was first calculated with the formula:

30             $TVDT = \text{Median time (days) for control tumors to reach target size} - \text{Median time (days) for control tumors to reach half the target size}$  and,  $\text{Log cell kill} = T-C + (3.32 \times TVDT)$

35            Statistical evaluations of data were performed using Gehan's generalized Wilcoxon test.

**EXAMPLE I**

35            Combretastatin A-4 phosphate disodium salt, an agent with a dual mechanism of action, was evaluated for in vivo antitumor activity with the Peak Concentration

Agents, cisplatin and carboplatin. When administered daily as a single agent for ten days to tumor bearing mice, combretastatin A-4 phosphate disodium salt demonstrated significant antitumor activity against the 5 cisplatin-resistant M5076DDP murine fibrosarcoma, producing 1.1 log cell kill. See Figure 1.

In a combination chemotherapy trial, therapeutic synergy was observed with both cisplatin and carboplatin. In tumor perfusion studies, combretastatin 10 A-4 phosphate disodium salt significantly inhibited tumor blood flow in the A2780 human ovarian tumor xenografts in mice (67% inhibition) and in rats (87% inhibition).

In order to better assess the therapeutic potential 15 of combretastatin A-4 phosphate disodium salt, studies were conducted to evaluate three aspects of CA4P's pharmacology: [1] antitumor efficacy as a single agent, [2] antitumor efficacy in combination with cisplatin, carboplatin, paclitaxel, or CPT-11 and [3] effects on 20 tumor blood flow.

#### RESULTS

##### Single agent efficacy against the cisplatin-resistant sc

###### M5076DDP tumor model

M5076DDP is a murine fibrosarcoma that has 25 developed resistance to cisplatin and cross-resistance to carboplatin. Combretastatin A-4 phosphate disodium salt treatment of mice bearing staged M5076DDP tumors using an everyday x 10 (Monday thru Friday) schedule produced moderate but significant antitumor effects. At 30 its optimal dose (150 mg/kg/inj), combretastatin A-4 phosphate disodium salt yielded 1.1 log cell kill (LCK). In comparison, single agent cisplatin administered at its optimal schedule (every four days for three doses; Q4D x 3) yielded 0.8 LCK at its MTD of 7.5 mg/kg/inj 35 (Figure 1).

**Combination Chemotherapy with Platinum Drugs**

Therapeutic synergy was achieved when combretastatin A-4 phosphate disodium salt was combined with cisplatin (administered simultaneously) in the treatment of advanced staged (300 mg) sc M5076DDP tumors. Single agent cisplatin produced 0.8 LCK at its maximum tolerated dose (MTD) of 7.5 mg/kg/inj, q4dx3. In comparison, the maximally tolerated combination of combretastatin A-4 phosphate disodium salt (250 mg/kg/inj) + Cisplatin (5 mg/kg/inj) yielded 2.0 LCK (Fig. 2A). It is of interest that the combination produced significant shrinkage of tumors following treatment, whereas single agent cisplatin did not (Fig 1). Another noteworthy aspect of this synergistic 15 combination regimen is the ability of combretastatin A-4 phosphate disodium salt to substantially improve the efficacy of an otherwise inactive (lower) dose of cisplatin (Fig. 2B).

20 **Combination with carboplatin (CPt) versus sc M5076**  
Combretastatin A-4 phosphate disodium salt also produced synergistic antitumor activity when used in combination with carboplatin against large sc M5076 tumors (H300 mg). In this sensitive tumor model, 25 carboplatin produced 1.4 LCK, but with no tumor regression, at its MTD of 90 mg/kg/inj, iv, q4dx3. In comparison the best combination yielded 2.0 LCK which was accompanied by significant tumor shrinkage (Fig 3A). Two important aspects of the tumor response elicited by 30 the combretastatin A-4 phosphate disodium salt + carboplatin combination regimen are [1] the optimal combretastatin A-4 phosphate disodium salt dose required for therapeutic synergy (< 90 mg/kg/inj) was significantly lower than its MTD as a single agent (> 35 250 mg/kg/inj) (Fig 3B); [2] the carboplatin dose (90 mg/kg/inj when administered as single agent) required to produce optimal antitumor effects, is greatly reduced

when used in combination with combretastatin A-4 phosphate disodium salt (Fig. 3B).

**Timing studies (Carboplatin+CA4P)**

5 The data presented in Fig. 4 indicate that Carboplatin ("CB-pt") and CA4P are preferably administered more or less simultaneously. Most preferably carboplatin is administered immediately before CA4P. The tumor model shown in this graph is  
10 M5076ddp (a platinum resistant variant of M5076 murine fibrosarcoma).

**Effects of CA4P on Tumor Perfusion**

15 The effects of combretastatin A-4 phosphate disodium salt on tumor perfusion were studied using the Evans blue dye uptake assay. Mice or rats bearing sc A2780 human ovarian carcinoma were administered an iv dose of combretastatin A-4 phosphate disodium salt. An hour later, Evans blue was injected iv. The amount of  
20 Evans blue accumulated in the tumor is proportional to the blood flow through the tumor. Using this technique, it was shown that CA4P dramatically inhibited blood flow to the tumors, both in mice and rats, causing at optimal dose a 67% and 87 % reduction of tumor blood flow,  
25 respectively (Fig. 5A and 5B).

**Combination chemotherapy with CPT-11**

30 A combination chemotherapy study was conducted to evaluate the antitumor activity of combined CPT-11 and combretastatin A-4 phosphate disodium salt treatment. Various dosing schedules were used in accordance with the invention ranging from administering the two agents virtually simultaneously (5 min apart) to CPT-11 preceding CA4P by 3 or 24 hrs. At its MTD, CPT-11  
35 produced 3.3 LCK. Administering the two agents simultaneously or 3 hr apart gave equivalent results to CPT-11 alone. However, when CPT-11 preceded CA4P by 24

hr, an enhanced antitumor effect was observed (Fig. 6) demonstrating a preferred embodiment of the invention.

**Minimum efficacious dose-pharmacokinetics determination  
5 in combination with carboplatin**

Combretastatin A-4 has demonstrated robust therapeutic synergism with cisplatin and carboplatin as shown herein. The doses of combretastatin A-4 phosphate disodium salt (CA4P) used in these previous combination 10 studies has in general been between 100-250 mg/kg (200-750 mg/m<sup>2</sup>). Current human pharmacokinetics data indicate that preferred CA4P dosing is considerably lower (~50-60 mg/m<sup>2</sup>). A study was therefore conducted to determine the minimum CA4P dose needed for combination 15 therapy with carboplatin in the modestly carboplatin resistant murine fibrosarcoma M5076/DDP. Using doses and treatment regimen (iv, q4dx3) of CA4P that have no single agent activity, it was demonstrated that CA4P at doses as low as 12.5-25 mg/m<sup>2</sup> were sufficient to enhance 20 the antitumor activity of carboplatin administered at a range of dose levels. See Figures 7A, 7B and 7C.

**Determination of the optimal treatment schedule for the  
25 combination of Combretastain A-4 phosphate disodium salt  
(CA4P) with paclitaxel**

The present invention contemplates, for example, the administration of a combretastatin A-4 compound, such as CA4P with paclitaxel or with paclitaxel and carboplatin. A number of studies were conducted to 30 determine an optimal treatment schedule, i.e., the sequence or the order, in which the two agents, CA4P and paclitaxel are administered. This consideration is deemed particularly important for this combination for two reasons: 1) CA4P is a tubulin depolymerizer while 35 paclitaxel is a tubulin polymerizer, thus there may be potential for interaction at the tubulin level; and 2)

WO 02/056692

PCT/US01/50261

39

CA4P inhibits tumor blood flow which may affect the regional micro-pharmacokinetics of paclitaxel in the tumors as well as the tumoral proliferative state. In an initial study in the 16/c mammary carcinoma model, 5 there was a suggestion that administering the two agents simultaneously might adversely affect the overall efficacy of the combination (Fig. 8) in this model, while allowing an interval between drug administration restored the efficacy of the combination. Subsequently 10 two other studies were conducted in the human ovarian carcinoma model A2780 to further define an optimal sequence and interval between drug administrations.

An initial study was conducted to assess the effects of administering paclitaxel simultaneously with 15 CA4P or prior to CA4P. Results indicate that administration of the two agents simultaneously was deleterious to the overall efficacy of the combination in this model (Fig. 9). Allowing an interval of 3 hr between the administration of the two agents did not 20 restore the overall efficacy of the combination, but overall efficacy was restored at an interval of 24 hours.

An additional study was conducted to evaluate the effects of administering CA4P prior to paclitaxel. The 25 results demonstrated that allowing an interval of 3 hr between treatments with the two agents was sufficient to avoid negative interaction (Fig. 10).

**Combination chemotherapy with immunotoxin**

30 Studies assessing the efficacy of combined administration of CA4P with the immunotoxin BR96-sFv-PE40 were also conducted. The construction of the immunotoxin is described in Siegall et al. (1994) J. of Immunology 152:2377-2384.

WO 02/056692

PCT/US01/50261

40

Five groups of 5 rats each were inoculated intrahepatically with  $1.5 \times 10^5$  wild type colon cancer cells (BN7005-H1D2) on day 0. BR96-sFv-PE40 is an immunoconjugate of BR96 monoclonal antibody and 5 Pseudomonas toxin PE40. BR96 recognizes Lewis y antigen on the colon carcinoma BN7005 rat tumor. The immunotoxin was inoculated at 2 different dose levels as indicated (125  $\mu\text{g}/\text{kg}$  or 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively), on days 9, 12, 14, 16, 19, 21 and 23. Combratstatin A4- 10 phosphate prodrug was administered ip 4-6 hours prior to the administration of the immunotoxin when administered on the same day as the immunotoxin on days 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 19 and 20. All rats were laparotomized on day 28 and liver tumor sizes measured by a caliper 15 and tumor volume calculated.

As shown in Fig. 11, there was a significant difference between the treatment group and the untreated controls. The results of the Student's t test are also shown in the figure. The differences between the 20 combined treatment and CA4P or immunotoxin alone were also significant,  $p=0.002$  and  $p=0.006$ , respectively. When treatment was stopped on day 28, the tumor subsequently grew rapidly in all groups. These data demonstrate the efficacy of CA4P and immunotoxin when 25 administered in combination.

#### EXAMPLE II

##### Combination chemotherapy with Combratstatin A-1P

Combratstatin A-1 phosphate disodium salt, an 30 agent with a dual mechanism of action, was evaluated for in vivo antitumor activity with the Peak Concentration Agents, carboplatin, and cisplatin. When administered daily as a single agent for ten days to tumor bearing mice, combratstatin A-1 phosphate disodium salt 35 demonstrated modest antitumor activity against the cisplatin-resistant M5076DDF murine fibrosarcoma.

WO 02/056692

PCT/US01/50261

41

In a combination chemotherapy trial, therapeutic synergy was observed with both cisplatin and carboplatin. In tumor perfusion studies, combretastatin A-1 phosphate disodium salt significantly inhibited tumor blood flow in both A2780 human ovarian tumor xenografts in mice and N87 gastric cancer tumor xenografts.

In order to better assess the therapeutic potential of combretastatin A-1 phosphate disodium salt, studies were conducted to evaluate three aspects of CA4P's pharmacology: [1] antitumor efficacy as a single agent, [2] antitumor efficacy in combination with cisplatin and carboplatin, and [3] effects on tumor blood flow.

15

**RESULTS****Single agent efficacy against N87 Gastric Cancer and A2780 Ovarian cancer xenografts**

CA1P demonstrated equivalent blood flow inhibition to that observed with CA4P in human tumor xenografts in nude mice but was 5-10 times more potent. Additionally, CA1P has demonstrated improved single agent activity in human tumor xenograft models, including N87 human gastric carcinoma, and the A2780 ovarian carcinoma. In A2780, CA1P achieved 2.1 LCK at its MTD of 9 mg/kg, ip, q1dx8, compared to 1.1 LCK for CA4P at 150 mg/kg, ip. See Figure 12.

**Combination chemotherapy with carboplatin and cisplatin**

As shown in Figure 13, combination chemotherapy demonstrated that CA1P enhanced the antitumor activity of carboplatin in a manner similar to what had been observed for CA4P. Synergistic antitumor activity was also demonstrated. Advantageously, the minimum effective dose required for synergistic enhancement was

WO 02/056692

PCT/US01/50261

42

considerably lower for CA1P (4-8 mg/kg) as compared to CA4P (25-50 mg/kg). Additionally, when CA1P is administered in combination with carboplatin, synergistic antitumor activity producing complete 5 response (disappearance of tumors) was observed. When either agent was administered alone, this response was not observed. See Figure 14.

In additional studies, CA1P was administered in combination with cisplatin in a CaNT breasts tumor model 10 I. As can be seen in Figure 15, combined administration of cisplatin and CA1P acted synergistically to reduce tumor size.

#### **Conclusion**

The above described results readily demonstrate 15 potentiation for a variety of combinations of anticancer agents with a combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound. Thus anticancer agents can be effectively used to modulate tumor growth or metastasis of tumors that previously had developed a 20 resistance to such drugs. Additionally, the present inventors have developed methods for the treatment of cancer which permit the clinician to administer lowered dosages of anticancer agents with appropriate administration schedules thereby reducing unwanted side 25 effects while maintaining efficacy.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments describe herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those 30 skilled in the art from the foregoing description and the accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims. For example, other combretastatins or even other antivascular agents can be employed in the present 35 invention in place of the combretastatin A-4 compound or combretastatin A-1 compound.

What is claimed is:

1. A method for modulating tumor growth or  
5 metastasis in an animal in need thereof, comprising  
sequential or simultaneous administration of at least  
one anticancer agent, and a combretastatin A-4 compound  
in amounts effective therefore.

10 2. A method for modulating tumor growth or  
metastasis in an animal in need thereof, comprising  
administration of a combretastatin A-4 compound and at  
least one anticancer agent, in amounts effective  
therefor, wherein said combretastatin A-4 compound is  
15 administered at a time relative to administration of  
said anticancer agent sufficient to modulate blood flow  
to said tumor to provide a time-dependent effective  
tumor concentration of said anticancer agent.

20 3. The method as claimed in claim 1, wherein said  
at least one anti-cancer agent is selected from the  
group consisting of alkylating agents, bifunctional  
alkylating agents, non-steroidal aromatase inhibitors,  
immunotherapeutic agents, nitrosurea compounds,  
25 antimetabolites, antitumor antibiotics, mitotic  
inhibitors, radiation, topoisomerase I inhibitors, and  
anti-estrogens.

4. The method as claimed in claim 1, wherein said  
30 at least one anticancer agent is selected from the group  
consisting of cisplatin, carboplatin, oxaliplatin,  
radiation, CPT-11, paclitaxel, 5-flourouracil,  
leucovorin, epothilone, gemcitabine, UFT, herceptin,  
cytoxan, dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine,

WO 02/056692

PCT/US01/50261

44

melphalan, chlorambucil, anastrozole and exemstane, carmustine, lomustine, methotrexate, gemcitabine, cytarabine, fludarabine, bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, docetaxel, 5 vinblastine, vincristin, vinorelbine, topotecan, lupron, megace, leucovorin, Iressa, flavopiridol, immunotherapeutic agents, ZD6474, SU6668, and valsodar.

10 5. The method as claimed in claim 2, wherein said anti-cancer agent is a "peak tumor concentration agent" and is administered simultaneously or close temporal proximity to said combretastatin A4 compound.

15 6. The method as claimed in claim 5, wherein said peak tumor concentration agent is selected from the group consisting of cytoxan, mitomycin C, cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin.

20 7. The method as claimed in claim 2 wherein said anticancer agent is a duration exposure agent and is administered after the administration of the combretastatin A4 compound.

25 8. The method as claimed in claim 7, wherein said duration exposure agent is selected from the group consisting of taxanes, etoposide, etoposide phosphate, immunotoxins and epothilones.

30 9. The method as claimed in claim 2, wherein said anti-cancer agent is an AUC agent and said AUC agent is administered prior to the administration of said combretastatin A4 compound.

WO 02/056692

PCT/US01/50261

45

10. The method as claimed in claim 9, wherein said AUC agent is selected from the group consisting of adriamycin, CTP-11 and topotecan.

5

11. The method as claimed in claim 6, wherein said combretastatin A4 compound is combretastatin A-4 phosphate disodium salt and said peak tumor concentration agent is cisplatin.

10

12. The method as claimed in claim 6, wherein said combretastatin A4 compound is combretastatin A-4 phosphate disodium salt and said peak tumor concentration agent is carboplatin.

15

13. The method as claimed in claim 10, wherein said combretastatin A4 compound is combretastatin A-4 disodium salt and said AUC agent is CPT-11.

20

14. The method as claimed in claim 8, wherein said combretastatin A4 compound is combretastain A-4 disodium salt and said duration exposure agent is paclitaxel.

25

15. The method as claimed in claim 14, wherein said combretastatin A4 disodium salt is administered at least 3 hours prior to paclitaxel.

30

16. A method for modulating tumor growth or metastasis in an animal in need thereof, comprising sequential or simultaneous administration of at least one anticancer agent, and a combretastatin A-1 compound in amounts effective therefore.

17. A method for modulating tumor growth or metastasis in an animal in need thereof, comprising administration of a combretastatin A-1 compound and at least one anticancer agent, in amounts effective therefor, wherein said combretastatin A-1 compound is administered at a time relative to administration of said anticancer agent sufficient to modulate blood flow to said tumor to provide a time-dependent effective tumor concentration of said anticancer agent.

10

18. The method as claimed in claim 16, wherein said at least one anticancer agent is selected from the group consisting of cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, radiation, CPT-11, paclitaxel, 5-flourouracil, 15 leucovorin, epothilone, gemcitabine, UFT, herceptin, cytoxan, dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine, melphalan, chlorambucil, anastrozole, exemstane, carmustine, lomustine, methotrexate, mitomycin C, gemcitabine, cytarabine, fludarabine, bleomycin, 20 dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, docetaxel, vinblastine, vincristine, vinorelbine, topotecan, lupron, megace, leucovorin, Iressa, flavopiridol, an immunotherapeutic agent, ZD6474, SU6668, and valsphodar.

25

19. The method as claimed in claim 17, wherein said combretastatin A-1 compound is combretastatin A-1 disodium salt and said anti-cancer agent is carboplatin.

30

20. The method as claimed in claim 17, wherein said combretastatin A-1 compound is combretastatin A-1 disodium salt and said anti-cancer agent is cisplatin.

WO 02/056692

PCT/US01/50261

47

21. The method as claimed in claim 17, wherein said combretastatin A-1 compound is combretastatin A-1 disodium salt and said immunotherapeutic agent is BR96-sfv-PE40.

5

22. A pharmaceutical composition for modulating tumor growth or metastasis in an animal in need thereof, comprising at least one anticancer agent, and a combretastatin A-4 compound, in amounts effective 10 therefore in a pharmaceutically acceptable carrier.

23. The pharmaceutical composition as claimed in claim 22, wherein said at least one anticancer agent is selected from the group consisting of cisplatin, 15 carboplatin, oxaliplatin, radiation, CPT-11, paclitaxel, 5-flourouracil, leucovorin, epothilone, gemcitabine, UFT, herceptin, cytoxan, dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine, melphalan, chlorambucil, anastrozole and exemstane, carmustine, lomustine, 20 methotrexate, gemcitabine, cytarabine, mitomycin C, fludarabine, bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, docetaxel, vinblastine, vincristine, vinorelbine, topotecan, lupron, megace, leucovorin, Iressa, flavopiridol, an immunotherapeutic 25 agent, ZD6474, SU6668, and valspar.

24. The pharmaceutical composition of claim 23, wherein said combretastatin A-4 compound is combretastatin A-4 disodium salt.

30

25. The pharmaceutical composition as claimed in claim 23, wherein said at least one anti-cancer agent is selected from the group consisting of cytoxan, mitomycin

C, cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin.

26. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 24, wherein said at least one anti-cancer agent is  
5 selected from the group consisting of cytoxin, mitomycin  
C, cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin.

27. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 23, wherein said at least one anticancer agent is  
10 selected from the group consisting of taxanes,  
paclitaxel, docetaxel, etoposide, etoposide phosphate,  
and epothilones.

28. The pharmaceutical composition as claimed in  
15 claim 24, wherein said at least one anticancer agent is  
selected from the group consisting of taxanes,  
paclitaxel, docetaxel, etoposide, etoposide phosphate,  
and epothilones.

20 29. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 23, wherein said at least one anti-cancer agent is  
selected from the group consisting of adriamycin, CTP-11  
and topotecan.

25 30. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 24, wherein said at least one anti-cancer agent is  
selected from the group consisting of adriamycin, CTP-11  
and topotecan.

30 31. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 23, wherein said anti-cancer agent is cisplatin.

32. The pharmaceutical composition as claimed in

WO 02/056692

PCT/US01/50261

49

claim 24, wherein said anti-cancer agent is cisplatin.

33. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 23, wherein said anti-cancer agent is carboplatin.

5

34. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 24, wherein said anti-cancer agent is carboplatin.

35. The pharmaceutical composition as claimed in  
10 claim 23, wherein said anti-cancer agent is CPT-11.

36. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 24, wherein said anti-cancer agent is CPT-11.

15 37. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 23, wherein said anti-cancer agent is paclitaxel.

39. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 24, wherein said anti-cancer agent is paclitaxel.

20

40. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 23, wherein said immunotherapeutic agent is BR96-  
sfv-PE40.

25 41. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 24, wherein said immunotherapeutic agent is BR96-  
sfv-PE40.

42. A pharmaceutical composition for modulating  
30 tumor growth or metastasis in an animal in need thereof,  
comprising at least one anticancer agent, and a  
combratastatin A-1 compound, in amounts effective  
therefore in a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/056692

PCT/US01/50261

50

43. The pharmaceutical composition as claimed in claim 42, wherein said at least one anticancer agent is selected from the group consisting of cisplatin, 5 carboplatin, oxaliplatin, radiation, CPT-11, 5-fluorouracil, leucovorin, epothilone, gemcitabine, UFT, herceptin, cytoxan, taxanes, dacarbazine, ifosfamide, mechlorethamine, melphalan, chlorambucil, anastrozole and exemestane, carmustine, lomustine, methotrexate, 10 gemcitabine, cytarabine, fludarabine, bleomycin, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, idarubicin, docetaxel, vinblastine, vincristine, vinorelbine, topotecan, lupron, megace, leucovorin, Iressa, mitomycin C, flavopiridol, ZD6474, SU6668, an immunotherapeutic 15 agent and valspodar.

44. The pharmaceutical composition of claim 43, wherein said combretastatin A-1 compound is combretastatin A-1 disodium salt.

20

45. The pharmaceutical composition as claimed in claim 43, wherein said at least one anti-cancer agent is selected from the group consisting of cytoxan, mitomycin C, cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin.

25

46. The pharmaceutical composition as claimed in claim 44, wherein said at least one anti-cancer agent is selected from the group consisting of cytoxan, mitomycin C, cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin.

30

47. The pharmaceutical composition as claimed in claim 43, wherein said at least one anticancer agent is selected from the group consisting of taxanes,

WO 02/056692

PCT/US01/50261

51

etoposide, etoposide phosphate, and epothilones.

48. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 44, wherein said at least one anticancer agent is  
5 selected from the group consisting of taxanes,  
etoposide, etoposide phosphate, and epothilones.

49. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 43, wherein said at least one anti-cancer agent is  
10 selected from the group consisting of adriamycin, CTP-11  
and topotecan.

50. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 44, wherein said at least one anti-cancer agent is  
15 selected from the group consisting of adriamycin, CTP-11  
and topotecan.

51. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 43, wherein said anti-cancer agent is cisplatin.

20 52. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 44, wherein said anti-cancer agent is cisplatin.

53. The pharmaceutical composition as claimed in  
25 claim 43, wherein said anti-cancer agent is carboplatin.

54. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 44, wherein said anti-cancer agent is carboplatin.

30 55. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 43, wherein said anti-cancer agent is CPT-11.

56. The pharmaceutical composition as claimed in

WO 02/056692

PCT/US01/50261

52

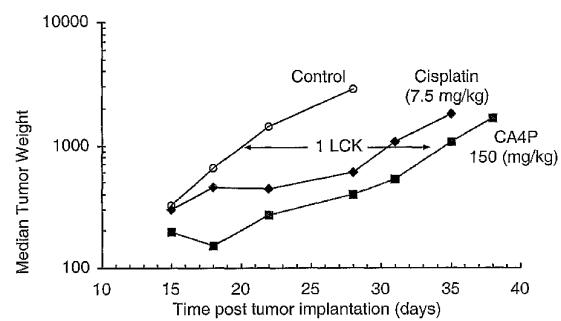
claim 44, wherein said anti-cancer agent is CPT-11.

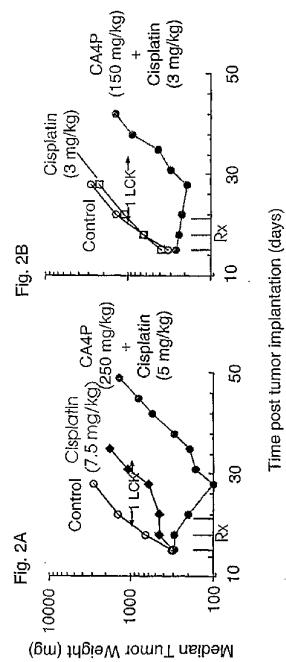
57. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 43, wherein said anti-cancer agent is paclitaxel.

58. The pharmaceutical composition as claimed in  
claim 44, wherein said anti-cancer agent is paclitaxel.

59. The pharmaceutical composition as claimed in  
10 claim 43, wherein said anti-cancer agent is BR96-sfv-  
PE40.

60. The pharmaceutical composition as claimed in  
15 claim 44, wherein said anti-cancer agent is BR96-sfv-  
PE40.

**Figure 1**



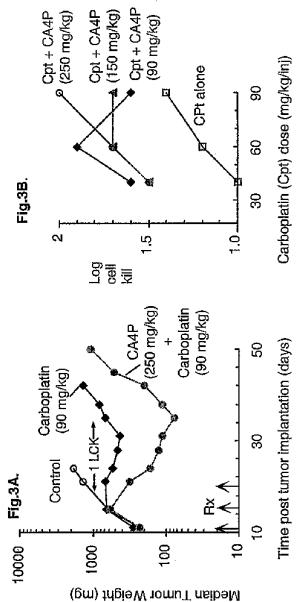
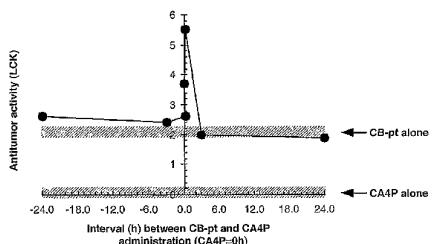
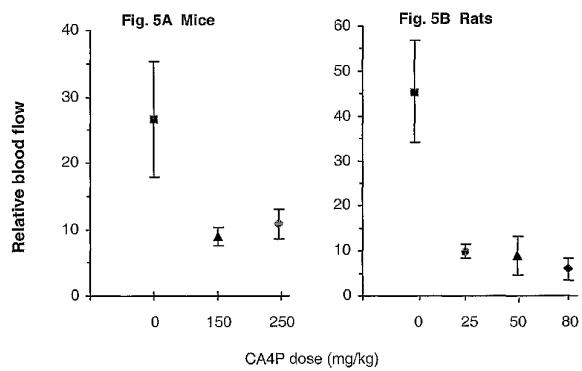


Figure 4





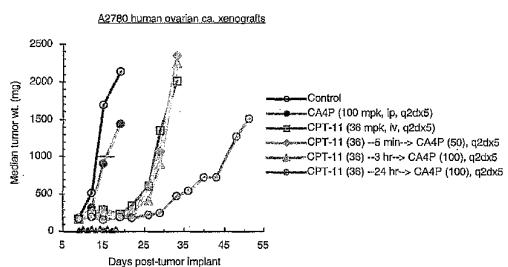
**Figure 6**

Fig. 7A

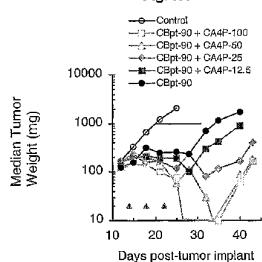


Fig. 7B

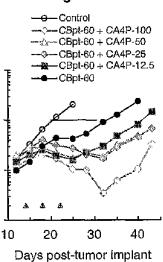
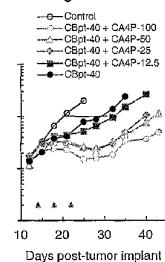
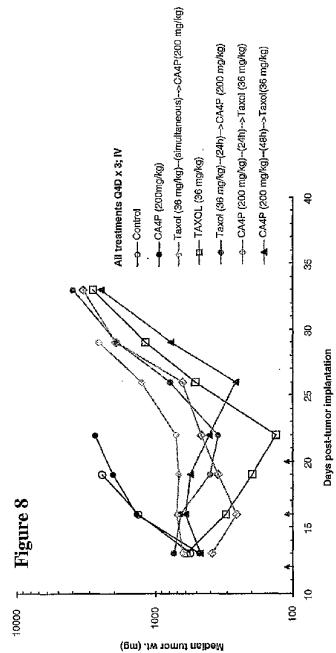
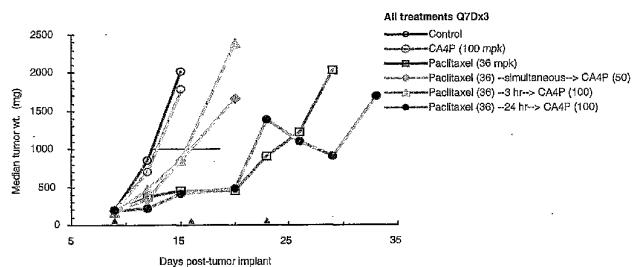


Fig. 7C





**Figure 9**

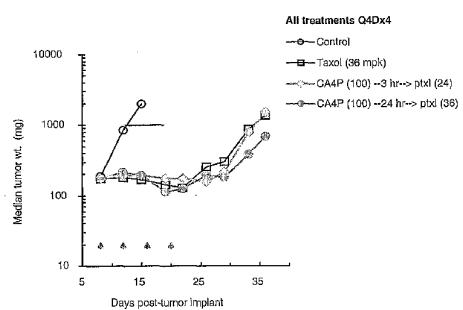
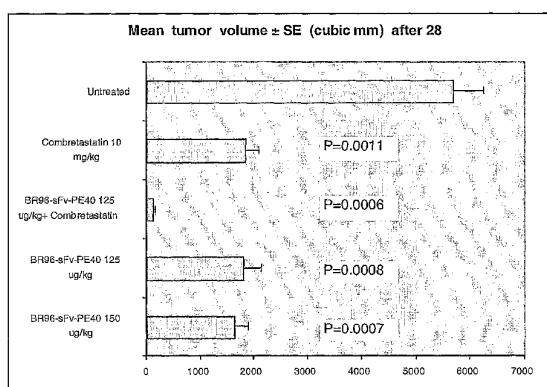
**Figure 10**

Figure 11



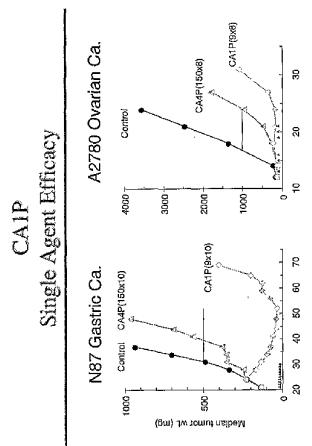


Figure 12A      Figure 12B

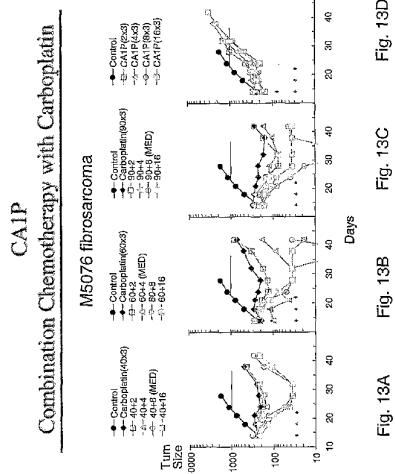
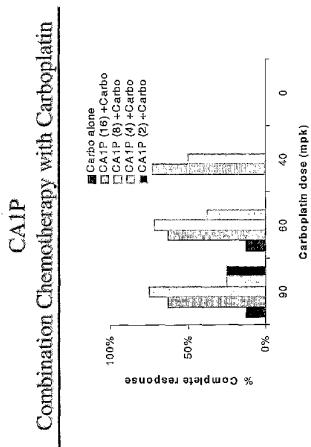


Figure 14



WO 02/056692

PCT/US01/50261

15/15

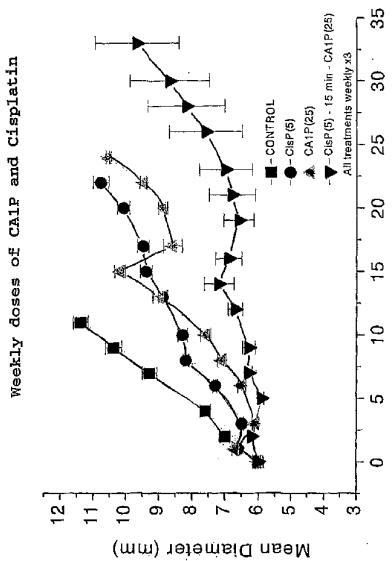
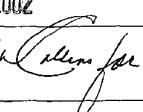


Figure 15

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/50281
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) A01N 87/00; A01K 55/00 US CL : 514/180, 12; 558/210 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/180, 12; 558/210		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST search terms: combretastatin A-4, cancer, tumor, tumour		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,561,122 A (PETTIT) 01 OCTOBER 1996 (01/10/96), see abstract.	1-60
Y	US 4,996,237 A (PETTIT ET AL) 26 February 1991 (26/02/91), see abstract.	1-60
Y	WO 00/48606 A1 (OXIGENE, INC.) 24 AUGUST 2000 (24/08/00), see page 2, lines 3-30.	1-60
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date which contains a step or steps which double on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, exhibition or other means "D" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 MAY 2002		Date of mailing of the international search report 24 JUN 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3250		Authorized officer SHEELA J. HUFF  Telephone No. (703) 305-0196

Form PCT/ISA/910 (second sheet) (July 1998)\*

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 33/24	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/78	C
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P,L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 リー, フランシス ウイ.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19067, ヤードリー, ラング コート 363

(72)発明者 ペック, ロナルド

アメリカ合衆国 コネチカット 06410, チェシャー, アップルウッド ドライブ 29

(72)発明者 チャップリン, デイビッド

イギリス国 オーエックス9 5エスエックス オックスフォードシャー, ワトリントン, アストン ロワント, プラウデン パーク 14

(72)発明者 ペロ, ロナルド

アメリカ合衆国 バーモント 05250, アーリントン, ボックス 2773, アールビー ナンバー1

(72)発明者 エバードセン, クラウス

スイス国 エス-222 22 ルンド, ストラ グラブロダースガタン 13

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA19 BA44 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA43

MA52 MA56 MA59 MA66 NA05 NA06 ZA362 ZB262 ZC412

4C086 AA01 AA02 BA02 CB22 DA34 HA12 HA28 MA02 MA04 MA13

MA17 MA22 MA23 MA43 MA52 MA56 MA59 MA66 NA05 NA06

ZA36 ZB26 ZC41

4C088 AB12 AC06 BA31 CA03 MA02 MA04 MA13 MA17 MA22 MA23

MA43 MA52 MA56 MA59 MA66 NA05 NA06 ZA36 ZB26 ZC41

4C206 CA34 JB16 MA02 MA04 MA13 MA17 MA24 MA30 MA33 MA37

MA42 MA43 MA72 MA76 MA79 MA86 NA05 NA06 ZA36 ZB26

ZC41