

(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2004-520344

(P2004-520344A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/337	A 6 1 K 31/337	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7064	A 6 1 K 31/7064	
A 6 1 K 31/7068	A 6 1 K 31/7068	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-555839 (P2002-555839)	(71) 出願人	591032596
(86) (22) 出願日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		メルク パテント ゲゼルシャフト ミツト ベシュレンクテル ハフトング
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月8日 (2003.7.8)		Merck Patent Gesellschaft mit beschränkter Haftung
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/015241		ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダルムシュタット フランクフルター シュトラッセ 250
(87) 国際公開番号	W02002/055106		Frankfurter Str. 250, D-64293 Darmstadt, Federal Republic of Germany
(87) 国際公開日	平成14年7月18日 (2002.7.18)		
(31) 優先権主張番号	01100507.1	(74) 代理人	100123788
(32) 優先日	平成13年1月9日 (2001.1.9)		弁理士 宮崎 昭夫
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤および血管新生阻害剤を用いる併用療法

## (57) 【要約】

本発明は、腫瘍および腫瘍転移を治療するための併用療法であって、受容体型チロシンキナーゼアンタゴニスト/阻害剤、特に Erb B 受容体アンタゴニスト、より好ましくは EGF 受容体 (Her 1) アンタゴニストおよび抗血管新生剤、好ましくはインテグリンアンタゴニストを、場合により、アンタゴニスト/阻害剤の前記組合せと一緒に投与した場合に相加または相乗効果を有する化学療法剤および/または放射線療法などの薬剤または療法と一緒に投与することを含む方法に関する。この療法は、腫瘍細胞増殖に対する個々の治療剤の阻害効果に相乗的な潜在的増加をもたらし、個々の成分を単独で投与することにより見いだされるよりも効果的な治療を得ることができる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(i) 少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性および  
(ii) 少なくとも 1 種類の血管新生阻害特異性を有する 1 つまたは複数の薬剤  
と(ここで、前記 1 つまたは複数の薬剤はサイトカイン免疫複合体ではない)、  
場合により薬剤として許容される担体、希釈剤またはレシピエントと一緒に含む薬剤組成物。

## 【請求項 2】

細胞傷害性薬剤をさらに含む請求項 1 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 3】

(i) 受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性を有する少なくとも 1 つの薬剤、および  
(ii) 血管新生阻害特異性を有する少なくとも 1 つの薬剤  
を含む、請求項 1 または 2 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 4】

受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性ならびに血管新生阻害特異性を有する 1 つの薬剤を含む、請求項 1 または 2 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 5】

前記薬剤 (i) が E r b B 受容体遮断特異性を有する、請求項 3 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 6】

前記薬剤の E r b B 受容体特異性が E G F 受容体 ( E r b B 1 / H e r 1 ) または E r b B 2 / H e r 2 受容体と関連する、請求項 5 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 7】

前記薬剤が、E r b B 1 ( H e r 1 ) または E r b 2 ( H e r 2 ) 受容体のエピトープと結合する結合部位を含む抗体または機能的に無傷なその誘導体である、請求項 6 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 8】

前記抗体または機能的に無傷なその誘導体が以下の群：

- ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )
- キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 )
- ヒト化モノクローナル抗体 H e r 2

からなる群から選択される、請求項 7 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 9】

前記血管新生阻害剤が  $\alpha_V$ <sub>3</sub>、 $\alpha_V$ <sub>5</sub> または  $\alpha_V$ <sub>6</sub> インテグリン阻害剤である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の薬剤組成物。

## 【請求項 10】

前記インテグリン阻害剤が R G D 含有直鎖状または環状ペプチドである、請求項 9 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 11】

前記ペプチドがシクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) である、請求項 10 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 12】

前記抗体または機能的に無傷なその誘導体がヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 ) またはキメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 ) であり、前記インテグリン阻害剤がシクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) である、請求項 7 および 9 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 13】

シスプラチン、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、ドセタキセル、パクリタキセル、ブレオマイシンの一群の化合物のいずれかから選択される化学療法剤をさらに含む、請求項 12 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記インテグリン阻害剤が、インテグリン受容体のエピトープと結合する結合部位を含む抗体または機能的に無傷なその誘導体である、請求項 9 に記載の薬剤組成物。

【請求項 15】

前記抗体が L M 6 0 9 または P 1 F 6 である、請求項 14 に記載の薬剤組成物。

【請求項 16】

前記薬剤が、受容体型チロシンキナーゼのエピトープと結合する第 1 の結合部位、および血管新生受容体のエピトープと結合する第 2 の結合部位を含む二重特異性抗体またはヘテロ抗体分子である、請求項 4 に記載の薬剤組成物。

【請求項 17】

前記二重特異性抗体またはヘテロ抗体分子が、E r b B 受容体のエピトープと結合する第 1 の結合部位と、およびインテグリン受容体のエピトープと結合する第 2 の結合部位とを含む、請求項 16 に記載の薬剤組成物。 10

【請求項 18】

E r b B 受容体のエピトープと結合する前記結合部位がモノクローナル抗体 h 4 2 5、c 2 2 5 または H e r 2 から選択され、インテグリン受容体のエピトープと結合する前記結合部位がモノクローナル抗体 L M 6 0 9 または P 1 F 6 から選択される、請求項 17 に記載の薬剤組成物。

【請求項 19】

前記薬剤が、前記特異性の 1 つを有する抗体または抗体フラグメント、およびその抗体または抗体フラグメントに融合した、他の特異性を有する非免疫学的分子からなる免疫複合体である、請求項 4 に記載の薬剤組成物。 20

【請求項 20】

抗体部分またはそのフラグメントが E r b B 受容体のエピトープと結合する結合部位を含み、融合した非免疫学的分子がインテグリン受容体のエピトープと結合する結合部位を含む、請求項 19 に記載の薬剤組成物。

【請求項 21】

E r b B 受容体のエピトープと結合する前記抗体部分がモノクローナル抗体 h 4 2 5、c 2 2 5 または H e r 2 から選択され、インテグリン受容体のエピトープと結合する前記非免疫学的部分がシクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) である、請求項 20 に記載の薬剤組成物。 30

【請求項 22】

( i ) 少なくとも 1 つの E r b B 受容体遮断剤を含む包装、および  
( ii ) 少なくとも 1 つの血管新生阻害剤を含む包装  
を含む薬剤キット。

【請求項 23】

細胞傷害性薬剤を含む包装をさらに含む、請求項 22 に記載の薬剤キット。

【請求項 24】

( i ) 少なくとも 1 つの E r b B 受容体遮断剤および少なくとも 1 つの血管新生阻害剤を含む包装、および  
( ii ) 細胞傷害性薬剤を含む包装  
を含む薬剤キット。 40

【請求項 25】

前記 E r b B 受容体遮断剤が前記受容体のエピトープと結合する結合部位を有する抗体または機能的に無傷なその誘導体である、請求項 22 ~ 24 のいずれかに記載の薬剤キット。

【請求項 26】

抗体または機能的に無傷なその誘導体が、ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )、キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 ) またはヒト化モノクローナル抗体 H e r 2 からなる群から選択される、請求項 25 に記載の薬剤キット。

【請求項 27】

前記血管新生阻害剤が  $a_{V_3}$ 、 $a_{V_5}$  または  $a_{V_6}$  インテグリン阻害剤である、請求項 2 2 から 2 6 のいずれかに記載の薬剤キット。

【請求項 2 8】

前記インテグリン阻害剤が R G D 含有直鎖状または環状ペプチドである、請求項 2 7 に記載の薬剤組成物。

【請求項 2 9】

前記ペプチドがシクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) である、請求項 2 8 に記載の薬剤組成物。

【請求項 3 0】

前記血管新生阻害剤が抗体または機能的に無傷なその誘導体である、請求項 2 2 から 2 6 のいずれかに記載の薬剤キット。 10

【請求項 3 1】

前記抗体が L M 6 0 9 または P 1 F 6 である、請求項 3 0 に記載の薬剤キット。

【請求項 3 2】

( i ) ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )、キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 )、または機能的に無傷なその誘導体を含む包装、および

( ii ) シクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) を含む包装を含む、請求項 2 2 に記載の薬剤キット。

【請求項 3 3】

群：シスプラチン、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、ドセタキセル、パクリタキセル、ブレオマイシンの一群の化合物のいずれかから選択される化学療法剤をさらに含む、請求項 3 2 に記載の薬剤キット。 20

【請求項 3 4】

腫瘍および腫瘍転移を治療するための医薬品を製造するための、請求項 1 から 3 3 のいずれかに記載の薬剤組成物または薬剤キットの使用法。

【請求項 3 5】

患者において腫瘍または腫瘍転移を治療する方法であって、

( i ) 少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性および

( ii ) 少なくとも 1 種類の血管新生阻害特異性

を有する治療上有効な量の 1 つまたは複数の薬剤 ( ここで、前記 1 つまたは複数の薬剤は サイトカイン免疫複合体ではない ) を前記患者に投与することを含む方法。 30

【請求項 3 6】

さらに細胞傷害性薬剤を患者に投与する、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記 1 つまたは複数の薬剤が E r b B 受容体ファミリーと関連する受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性を有する、請求項 3 5 または 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記薬剤の E r b B 受容体特異性が E G F 受容体 ( E r b B 1 / H e r 1 ) または E r b B 2 / H e r 2 受容体と関連する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】 40

前記薬剤が E r b B 1 ( H e r 1 ) または E r b 2 ( H e r 2 ) 受容体のエピトープと結合する結合部位を含む抗体または機能的に無傷なその誘導体である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記抗体またはその誘導体が、ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )、キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 ) またはヒト化モノクローナル抗体 H e r 2 からなる群から選択される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記血管新生阻害剤が、 $a_{V_3}$ 、 $a_{V_5}$  もしくは  $a_{V_6}$  インテグリン阻害剤または V E G F 受容体遮断剤である、請求項 3 5 から 4 0 のいずれかに記載の方法。 50

## 【請求項 4 2】

治療上有効な量の (i) ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 ) またはキメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 )、(ii) シクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l )、および場合により (iii) シスプラチン、ドキソルビシン、ゲムシタピン、ドセタキセル、パクリタキセル、ブレオマイシンを患者に投与することを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、腫瘍および腫瘍転移を治療するための併用療法であって、受容体型チロシンキナーゼアンタゴニスト/阻害剤、特に E r b B 受容体アンタゴニスト、より好ましくは E G F 受容体 ( H e r 1 ) アンタゴニストおよび抗血管新生剤、好ましくはインテグリンアンタゴニストを、場合により、アンタゴニスト/阻害剤の前記組合せと一緒に投与した場合に相加または相乗効果を有する化学療法剤および/または放射線療法などの薬剤または治療形態と一緒に投与することを含む方法に関する。この療法は、腫瘍細胞増殖に対する個々の治療剤の阻害効果に相乗的ポテンシャル増加をもたらすことができ、個々の成分を単独で投与することにより見いだされるよりも効果的な治療が得られる。

## 【背景技術】

## 【0002】

上皮成長因子受容体 ( E G F 受容体または E G F R )、c - e r b B 1 / H e r 1 としても公知である、および n e u 癌遺伝子の産物 ( c - e r b B 2 / H e r 2 としても公知 ) は、E G F 受容体スーパーファミリーのメンバーであり、受容体型チロシンキナーゼの大ファミリーに属している。それらの受容体は、細胞表面上で E G F または T G F アルファなどの特異的成長因子または天然リガンドと相互作用し、受容体型チロシンキナーゼを活性化する。一般に、下流のシグナル伝達タンパク質のカスケードが活性化され、遺伝子発現の変化および成長速度の増加につながる。

## 【0003】

C - e r b B 2 ( H e r 2 ) は、約 1 8 5 , 0 0 0 の分子量を有する膜貫通型チロシンキナーゼであり、E G F 受容体 ( H e r 1 ) とはかなりの相同性を持つが、H e r 2 に特異的なリガンドはこれまでのところ明確には同定されていない。

## 【0004】

E G F 受容体は、1 7 0 , 0 0 0 の分子量を有する膜貫通型糖タンパク質であり、多くの上皮細胞タイプ上に見いだされる。この受容体は、少なくとも 3 種類のリガンド、E G F、T G F - ( トランスフォーミング成長因子アルファ ) およびアンフィレギュリンによって活性化される。上皮成長因子 ( E G F ) と トランスフォーミング成長因子 - アルファ ( T G F - ) は共に、E G F 受容体と結合し、細胞増殖および腫瘍成長をもたらすことが明らかにされている。これらの成長因子は H e r 2 とは結合しない ( U l r i c h および S c h l e s i n g e r、1 9 9 0、C e l l 6 1、2 0 3 )。成長因子のいくつかのファミリーがそれらの二量体的性質によって受容体二量化を引き起こすのとは対照的に (例えば P D G F)、E G F などの単量体成長因子は、それらの受容体に対する 2 個の結合部位を含むため、2 個の隣接する E G F 受容体を架橋することができる ( L e m m o n 他、1 9 9 7、E M B O J . 1 6、2 8 1 )。受容体二量化は、内因性触媒活性の刺激および成長因子受容体の自己リン酸化にとって不可欠である。受容体型タンパク質チロシンキナーゼ ( P T K ) は、ホモ二量化もヘテロ二量化も受けることができることに注意しなければならない。

## 【0005】

臨床試験は、E G F 受容体と c - e r b B 2 が共に、特定タイプの腫瘍、特に乳癌、卵巣癌、膀胱癌、大腸癌、腎臓癌、頭部および頸部癌、ならびに肺の扁平上皮癌において過剰発現されていることを示している。( M e n d e l s o h n、1 9 8 9、C a n c e r C e l l s 7、3 5 9 ; M e n d e l s o h n、1 9 9 0、C a n c e r B i o l o

g y 1、339)。したがって、これらの観察は、癌を治療するための新規な治療的手法としてヒトEGF受容体またはc-erbB2の機能を阻害することを目標とする前臨床研究を促した(例えば、Baselga他、1996、J. Clin. Oncol. 14、737; FanおよびMendelsohn、1998、Curr. Opin. Oncol. 10、67を参照)。例えば、抗EGF受容体抗体および抗Her2抗体がヒトの癌治療に実りの多い結果を示したことが報告されている。それ故に、ヒト化モノクローナル抗体4D5(hMAb4D5、ハーセプチン(登録商標))は、すでに市販されている製品である。

#### 【0006】

抗EGF受容体抗体は、EGFおよびTGF- $\alpha$ が受容体と結合するのを阻止する上に腫瘍細胞増殖を阻害するらしいことが明らかにされている。これらの知見に鑑みて、EGF受容体に対するマウスおよびラットの多くのモノクローナル抗体が開発され、*in vitro*および*in vivo*において腫瘍細胞の成長を阻害する能力について試験されている(ModjtahediおよびDean、1994、J. Oncology 4、277)。ヒト化モノクローナル抗体425(hMAb425)(US5,558,864; EP0531472)とキメラモノクローナル抗体225(cMAb225)(Naramura他、1993、Cancer Immunol. Immunother. 37、343~349、WO96/40210)は共にEGF受容体を対象とし、臨床試験で有効性を示した。C225抗体は、*in vitro*においてはEGF媒介性腫瘍細胞成長を阻害し、ヌードマウスでは*in vivo*においてヒト腫瘍形成を阻害することが明らかとなった。さらに、この抗体は、とりわけある種の化学療法剤(すなわち、ドキソルビシン、アドリアマイシン、タキソール、およびシスプラチン)と相乗して作用し、異種移植片マウスモデルでは*in vivo*においてヒト腫瘍を根絶するように思われた。Ye他(1999、Oncogene 18、731)は、cMAb225とhMAb4D5との組合せでヒト卵巣癌細胞が首尾よく治療できることを報告している。

#### 【0007】

血管新生は新血管新生とも呼ばれ、組織中への新たな血管の成長を含む組織の血管新生化のプロセスである。このプロセスは、内皮細胞および平滑筋細胞の浸潤によって媒介される。このプロセスは、3つの方法、すなわち(1)血管が既存の血管から伸びる;(2)血管の新たな発生が前駆細胞から生じる(血管形成);または(3)既存の小血管の直径が広がるうちいずれか1つにより進行すると考えられている(Blood他、1990、Bioch. Biophys. Acta 1032、89)。血管内皮細胞は、少なくとも5種類のRGD依存性インテグリンを含有することが知られており、ビトロネクチン受容体( $v_3$ または $v_5$ )、IおよびIV型コラーゲン受容体、ラミニン受容体、フィブロネクチン/ラミニン/コラーゲン受容体ならびにフィブロネクチン受容体が含まれる(Davis他、1993、J. Cell. Biochem. 51、206)。平滑筋細胞は、少なくとも6種類のRGD依存性インテグリンを含有することが知られており、 $v_3$   $v_5$ が含まれる。

#### 【0008】

様々なインテグリン または サブユニットに対して免疫特異的なモノクローナル抗体を用いる*in vitro*における細胞接着の阻害は、微小血管内皮細胞を含む様々な細胞タイプの細胞接着におけるビトロネクチン受容体 $v_3$ と結びつけられてきた(Davis他、1993、J. Cell. Biol. 51、206)。

#### 【0009】

インテグリンは、細胞外マトリックスタンパク質と結合することが知られている細胞受容体の一種であり、細胞-細胞外マトリックス相互作用および一般的に細胞接着事象と呼ばれる細胞-細胞相互作用を媒介する。インテグリン受容体は、 および サブユニットから形成された非共有結合性のヘテロ二量体糖タンパク質複合体という共通の構造的特徴を持つタンパク質の1ファミリーを構成する。ビトロネクチン受容体は、ビトロネクチンと優先的に結合するもともとの特徴から名付けられ、現在は  $v_1$ 、  $v_3$  および  $v_5$  で

表される3種類の異なるインテグリンを指すことが知られている。 $\alpha_1$ は、フィブロネクチンおよびビトロネクチンと結合する。 $\alpha_3$ は、フィブリン、フィブリノーゲン、ラミニン、トロンボスポンジン、ビトロネクチンおよびフォンヴィレブランド因子を含む様々なリガンドと結合する。 $\alpha_5$ は、ビトロネクチンと結合する。異なる生物学的機能を有する異なるインテグリンならびに共通の生物学的特異性および機能を有する異なるインテグリンおよびサブユニットが存在することは明らかである。多くのインテグリンにとって重要なリガンド中の認識部位の1つは、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)トリペプチド配列である。RGDは、ビトロネクチン受容体インテグリンについて上記で同定されたすべてのリガンド中に見いだされる。このRGD認識部位は、RGD配列を含む直鎖状または環状(ポリ)ペプチドによって模倣することができる。このようなRGDペプチドは、インテグリン機能のそれぞれ阻害剤すなわちアンタゴニストであることが知られている。しかしながら、RGDペプチドの配列および構造に応じて、特異的インテグリンを標的とするように阻害の特異性を変化させることができることに注目することは重要である。様々なインテグリン特異性の様々なRGDポリペプチドが、例えばCheresh、他、1989、Cell 58、945、Aumailley他、1991、FEBS Letts. 291、50により、および多数の特許出願および特許(例えば、US特許4,517,686、4,578,079、4,589,881、4,614,517、4,661,111、4,792,525;EP0770622)中に記載されている。

10

#### 【0010】

新たな血管の発生、すなわち血管新生は、悪性疾患の成長において重要な役割を果たしており、血管新生を阻害する薬剤の開発に大きな関心を生み出した(例えば、Holmgren他、1995、Nature Medicine 1、149;Folkman、1995、Nature Medicine 1、27;O'Reilly他、1994、Cell 79、315を参照)。血管新生を阻害するための $\alpha_3$ インテグリンアンタゴニストの使用法は、固形腫瘍への血液供給を減少させることにより固形腫瘍の成長を阻害するための方法として知られている(例えば、US5,753,230およびUS5,766,591を参照。 $\alpha_3$ 受容体と結合して血管新生を阻害する合成ポリペプチド、モノクローナル抗体および $\alpha_3$ 模倣体などの $\alpha_3$ アンタゴニストの使用法について記載している)。ビトロネクチン受容体 $\alpha_5$ のアンタゴニストを用いて組織の $\alpha_5$ 媒介性血管新生を阻害する方法および組成物がWO97/45447に開示されている。血管新生の特徴は、内皮細胞の浸潤、遊走および増殖、細胞外マトリックス成分との細胞相互作用に依存するプロセスである。この文脈において、インテグリン細胞-マトリックス受容体は、細胞の伝播および遊走を媒介する。抗血管新生治療戦略において脈管構造特異的標的を提供することにより、インテグリン $\alpha_3$ の内皮接着受容体が中心的存在であることが分かった(Brooks他、1994、Science 264、569;Friedlander他、1995、Science 270)。血管新生における血管インテグリン $\alpha_3$ の必要性は、いくつかのin vivoモデルによって証明されており、移植ヒト腫瘍による新たな血管の発生は、前述のインテグリン $\alpha_3$ および $\alpha_5$ のペプチドアンタゴニストを全身投与することにより、あるいは抗 $\alpha_3$ 抗体LM609(Brooks他、1994、Cell 79、1157;ATCC HB9537)により完全に阻害された。この抗体は $\alpha_3$ インテグリン受容体を遮断し、その天然リガンドによる活性化は増殖性の血管新生血管細胞のアポトーシスを促進し、それによって腫瘍の増殖に不可欠な新たに作成された血管の成熟を中断させる。しかしながら、黒色腫細胞は内皮細胞の非存在下であってもクモの巣状に血管を形成することが最近になって報告され(1999、Science 285、14)、腫瘍は、内皮組織の存在下でのみ有効な抗血管新生薬を回避することができることを意味している。

20

30

40

#### 【0011】

多くの分子は、内皮の増殖、遊走および組立を刺激し、それにはVEGF、Ang1およびbFGFを含み、重要な生存要素である。VEGF(血管内皮増殖因子)は、内皮細胞

50

有糸分裂誘発を刺激することができる選択的血管新生増殖因子として同定されている。特に、VEGFは、原発腫瘍および虚血性眼疾患における血管新生の主要なメディエータであると考えられている。VEGFはホモ二量体(MW: 46,000)であり、内皮細胞特異的血管新生(Ferrara他、1992、Endocrin. Rev., 13, 18)および血管透過性(vasopermeability)因子(Senger他、1986、Cancer Res., 46:5629)であって、チロシンキナーゼ活性を持つ高親和性膜結合性受容体と結合する(Jakeman他、1992、J. Clin. Invest., 89, 244)。ヒト腫瘍生検は、悪性細胞によるVEGF mRNAおよび隣接内皮細胞中のVEGF受容体mRNAの発現の亢進を示す。VEGF発現は、壊死の血管領域に隣接する腫瘍の領域で最大であるように見える。(総説については、Thomas他、1996、J. Biol. Chem. 271(2), 603; Folkman, 1995、Nature Medicine 1, 27を参照)。WO97/45447は、新血管新生における $\alpha_5$ インテグリン、特にVEGF、EGFおよびTGF- $\beta$ により誘発されるインテグリンに関し、 $\alpha_5$ アンタゴニストがVEGF促進性血管新生を阻害できることを開示している。

10

#### 【0012】

また、有効な抗腫瘍治療法は、モノクローナル抗体を用いて血管新生を阻害するために標的とするVEGF受容体を利用することができる。(Witte他、1998、Cancer Metastasis Rev. 17(2), 155)。MAb DC-101は、腫瘍細胞の血管新生を阻害することが知られている。

20

#### 【0013】

上記に要約して説明したように、EGF、VEGFならびにインテグリン $\alpha_3$ および $\alpha_5$ 、およびそれらの受容体が、腫瘍の増殖および腫瘍の血管新生と基本的に関与し、EGF受容体および/またはVEGF受容体および/またはインテグリン受容体またはその他のタンパク質チロシンキナーゼ受容体を対象とする有効な阻害剤、特にモノクローナル抗体が主に腫瘍治療法に適した候補であることは明らかである。特に興味深いのは、関連受容体上の抗原エピトープを特異的に認識することができるモノクローナル抗体である。

#### 【0014】

しかしながら、そのような抗体の使用は、in vitroおよび動物モデルにおいて成功したものの、単剤療法としては患者で満足のいく有効性を示したことはない。同様の結果は、抗体以外の抗血管新生剤またはEGF受容体アンタゴニストを臨床試験で使用した場合にも得られた。腫瘍は、ある特異的部位が遮断されると、他の細胞表面分子を用い、前記の当初の遮断を代償することができるようである。したがって、様々な抗血管新生療法または抗増殖療法の間も腫瘍はあまり縮小しない。これらの理由から、細胞傷害性薬剤または化学療法剤と一緒に、または放射線療法と組み合わせるモノクローナル抗体を用い、この問題を回避するために併用療法が提案された。実際、臨床試験は、これらの併用療法が対応する単剤投与よりも効率的であることを示した。すなわち、例えば抗体-サイトカイン融合タンパク質療法は、癌転移などの樹立腫瘍の免疫反応媒介性阻害を促進すると報告されている。例えば、サイトカインのインターロイキン2(IL-2)が、それぞれ、腫瘍関連抗原である上皮細胞接着分子(Ep-CAM、KSA、KS1/4抗原)または

30

40

#### 【0015】

別の臨床的手法は、ハーセプチン(登録商標)と組み合わせたモノクローナル抗体c225の投与に基づいている(Ye他、1999、I. c.)。さらに、抗EGF受容体抗体とシスプラチンまたはドキシソルピシンなどの抗悪性腫瘍薬の組合せがEP0667165(A1)およびUS6,217,866に開示され、同様の組合せ、特にハーセプチン(登録商標)とシスプラチンおよび他の細胞傷害性因子との組合せがGenentechのUS5,770,195に記載された。抗血管新生インテグリン $\alpha_5$ アンタゴニストと

50



前述の抗体 - サイトカイン融合タンパク質との相乗効果が腫瘍転移で観察された (L o d e 他、1999、Proc. Natl. Acad. Sci. 96、1591、W O O O / 47228)。最近、抗悪性腫瘍剤と一緒にインテグリンアンタゴニストを使用する方法がW O O O / 38665の特許請求の範囲に記載された。最近、ゲムシタピンと特異的モノクローナル抗体D C - 101の組合せが血管新生を阻害し、ゲムシタピン単独に比べてマウスの膵臓癌における抗腫瘍効果を増加させることが見いだされた。D E 198 42415は、インテグリン阻害剤としての特異的環状R G Dペプチドと特異的抗血管新生剤との組合せを開示している。その他の手法は、E G F受容体遮断剤、記載された抗体、またはインテグリンアンタゴニストを、それぞれ放射線または放射線療法と組み合わせて投与することを提案している (例えば、W O 99 / 60023、W O O O / 0038715 10)。

#### 【0016】

しかしながら、様々な併用療法が研究中かつ臨床試験中であるにもかかわらず、これらの治療法の結果は十分に実を結んではいない。したがって、有効性の向上と副作用の減少を示すことができるさらなる組合せを開発する必要がある。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0017】

本発明は、受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体、より好ましくはE G F受容体を遮断または阻害する薬剤を治療上有効な量で抗血管新生剤と一緒に患者へ投与するという腫瘍治療における新たな概念に基づく新規薬剤治療について初めて記載する。場合により、本発明による組成物は、治療上活性な化合物、好ましくは細胞傷害性薬剤、化学療法剤および前記薬剤の有効性を増強するか前記薬剤の副作用を減少させることができるその他の薬理的に活性な化合物からなる群から選択される化合物をさらに含むことができる。 20

#### 【0018】

すなわち、本発明は、好ましいE r b B受容体アンタゴニストとして抗E G F R (E r b B 1 / H e r 1)抗体および抗血管新生剤としてa<sub>v</sub><sub>3</sub>、a<sub>v</sub><sub>5</sub>またはa<sub>v</sub><sub>6</sub>インテグリン受容体のいずれかの阻害剤またはアンタゴニスト、好ましくはR G D含有の直鎖状または環状ペプチドを含む薬剤組成物に関する。特に、本発明は、好ましい実施形態として、ヒト化モノクローナル抗体425 (h 425、E M D 72000)、キメラモノクローナル抗体225 (c 225)またはハーセプチン (登録商標)などの抗E G F R抗体または抗H e r 2抗体を、好ましくはR G D含有インテグリン阻害剤、最も好ましくは環状ペプチドであるシクロ - (A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e - V a l)と一緒に、場合により化学療法化合物と一緒に含む特異的併用療法に関する。 30

#### 【0019】

本発明によれば、前記の治療上活性な薬剤は、1つまたは複数の受容体型チロシンキナーゼアンタゴニスト、1つまたは複数の抗血管新生剤、および場合により1つまたは複数の細胞傷害性薬剤 / 化学療法剤を単一包装または別個の容器に含む包装を含む薬剤キットにより提供することもできる。この組合せによる療法には、場合により放射線による治療が含まれる。 40

#### 【0020】

しかしながら、本発明はさらに、抗受容体型チロシンキナーゼ、好ましくは抗E r b B受容体活性および抗血管新生活性を有するただ1つの (融合) 分子を、場合により1つまたは複数の細胞傷害性薬剤 / 化学療法剤と一緒に投与することを含む併用療法に関する。一例は、前述および後述のh 425またはc 225などの抗E G F R抗体であり、これらをF c部分のC末端において、公知の組み換え法または化学的方法により抗ホルモン剤と融合させる。別の例は二重特異性抗体であり、1つの特異性は核ホルモン受容体を対象とし、もう1つの特異性はE G F受容体を対象とする。

#### 【0021】

基本的に、投与には放射線療法が伴うことがあり、放射線治療は、薬物投与と実質的に同時あるいはその前または後に行うことができる。本発明による併用療法の異なる薬剤の投与は、実質的に同時または逐次行うことができる。腫瘍は、それらの細胞表面上に血管の発生に關与する受容体を有しており、本発明の併用療法によって成功裡に治療することができる。

#### 【0022】

腫瘍は、それらの発生および成長のために代替経路を引き出すことが知られている。1つの経路が遮断された場合、他の受容体およびシグナル伝達経路を発現しかつ用いることにより別の経路にスイッチする能力を有していることが多い。したがって、本発明の薬剤の組合せは、そのような可能性のある、腫瘍の発生方策のいくつかを遮断し、その結果様々な利益を提供することができる。本発明による組合せは、腫瘍細胞の表面上に存在する関連ホルモン受容体の活性化により発生しかつ成長する腫瘍、腫瘍様および新形成障害ならびに腫瘍転移を治療するのに有用である。本発明の様々な混合薬剤は、低用量、すなわち臨床状況で従来から用いられていたよりも低い用量で組み合わせ投与することが好ましい。患者に投与される本発明の化合物、組成物、薬剤および療法の用量を下げる利点には、高用量に伴う有害作用の発生率の減少が含まれる。例えば、前述および後述の薬剤の用量を下げることにより、高用量で観察される場合に比べて悪心および嘔吐の回数および重症度の低下が見られるはずである。有害作用の発生率を低下させることにより、癌患者の生活の質改善を企図している。有害作用の発生率を低下させる別の利点には、患者コンプライアンスの改善、有害作用の治療に必要な入院数の減少、および有害作用に伴う疼痛を治療するのに必要な鎮痛剤の投与の減少が含まれる。あるいは、本発明の方法および組合せは、高用量における治療効果を最大限に引き出すこともできる。

10

20

#### 【0023】

本発明による組合せにより、細胞表面上に（過剰発現した）E r b B受容体、好ましくはE r b B 1（H e r 1、E G F R）またはE r b B 2（H e r 2）受容体を有する腫瘍を成功裡に治療することができる。本発明による薬剤治療の範囲に含まれる組合せは、驚くべき相乗効果を示す。薬物の組合せを投与すると、顕著な有害薬物反応が検出されることなく、本当の腫瘍縮小および崩壊が臨床試験の間に観察されるであろう。とりわけ、3薬組合せ（受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断剤プラス抗血管新生剤プラス化学療法剤）は優れた有効性を示す。しかしながら、化学療法薬が相乗的に有効であるか否かは薬物自体、受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体アンタゴニストおよび前記薬剤で治療される腫瘍細胞にかかっており、通常はケースバイケースでチェックしなければならない。

30

#### 【0024】

詳細には、本発明は、

- ・（i）少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ遮断/阻害特異性および
- （ii）少なくとも1種類の血管新生遮断/阻害特異性を有する1つまたは複数の薬剤と（ここで、前記1つまたは複数の薬剤はサイトカイン免疫複合体ではない）、
- 場合により薬剤として許容される担体、希釈剤またはレシピエントとを一緒に含む薬剤組成物；
- ・第1の代替物として、（i）受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性を有する少なくとも1つの薬剤、および
- （ii）血管新生阻害特異性を有する少なくとも1つの薬剤を含む薬剤；
- ・第2の代替物として、受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性ならびに血管新生阻害特異性を有する薬剤を含む薬剤組成物；
- ・少なくとも1つの細胞傷害性薬剤、好ましくは化学療法剤をさらに含む対応する組成物；
- ・より詳細には、前記薬剤（i）がE r b B受容体遮断/阻害特異性を有する薬剤組成物

40

50

；。

【0025】

- ・前記薬剤の E r b B 受容体特異性が E G F 受容体 ( E r b B 1 / H e r 1 ) または E r b B 2 / H e r 2 受容体と関連している、相当する薬剤組成物；
- ・より詳細には、前記薬剤が、 E r b B 1 ( H e r 1 ) または E r b B 2 ( H e r 2 ) 受容体のエピトープと結合する結合部位を含む抗体または機能的に無傷なその誘導体である薬剤組成物；
- ・好ましい実施形態として、前記抗体または機能的に無傷なその誘導体が、群：
  - ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )
  - キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 )
  - ヒト化モノクローナル抗体 H e r 2、記載された対応するヒト化、キメラまたは脱免疫化された ( de-immunized ) 機能的に無傷な誘導体から選択される薬剤組成物；
- ・前記血管新生阻害剤が、 a v <sub>3</sub>、 a v <sub>5</sub> または a v <sub>6</sub> インテグリン阻害剤である対応する薬剤組成物；
- ・前記インテグリン阻害剤が、 R G D 含有直鎖状または環状ペプチド、好ましくはシクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) である対応する薬剤組成物；。

10

【0026】

- ・具体的実施形態として、前記抗体または機能的に無傷なその誘導体が、ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 ) またはキメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 )、記載された脱免疫化体であり、前記インテグリン阻害剤が、シクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) であり、場合により、群：シスプラチン、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、ドセタキセル、パクリタキセル、プレオマイシンの化合物のいずれかより選択される化学療法剤を場合により別個の容器または包装中に含む薬剤組成物；
- ・前記インテグリン阻害剤が、インテグリン受容体のエピトープと結合する結合部位を含み、抗体の群： L M 6 0 9、 P 1 F 6、 1 7 E 6、 1 4 D 9 . F 8、記載されたそのヒト化、キメラおよび脱免疫化バージョンから選択されることが好ましい抗体または機能的に無傷なその誘導体である、対応する薬剤組成物；
- ・前記薬剤の 1 つが、受容体型チロシンキナーゼ、好ましくは E r b B 受容体のエピトープと結合する第 1 の結合部位、および血管新生受容体、好ましくはインテグリン受容体のエピトープと結合する第 2 の結合部位を含む二重特異性抗体またはヘテロ抗体 ( heteroantibody ) 分子である薬剤組成物；
- ・前記モノクローナル抗体が、 h 4 2 5、 c 2 2 5 または H e r 2、並びにモノクローナル抗体 L M 6 0 9、 P 1 F 6、 1 7 E 6 および 1 4 D 9 . F 8 から選択される、特異的な対応する薬剤組成物；
- ・前記薬剤の 1 つが、前記遮断特異性の 1 つを有する抗体または抗体フラグメント、および他の特異性を有する抗体または抗体フラグメントと融合した非免疫学的分子からなる免疫複合体である薬剤組成物；。

20

30

【0027】

- ・抗体部分またはそのフラグメントが、 E r b B 受容体、好ましくは E G F 受容体 ( H e r 1 ) のエピトープと結合する結合部位を含み、融合した非免疫学的分子が、インテグリン受容体のエピトープと結合する結合部位を含む対応する薬剤組成物；
- ・ E r b B 受容体のエピトープと結合する前記抗体部分が、モノクローナル抗体 h 4 2 5、 c 2 2 5 または H e r 2 から選択され、インテグリン受容体のエピトープと結合する非免疫学的部分がシクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) であるその特異的薬剤組成物；
- ・ ( i ) 少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ阻害剤、好ましくは E r b B 受容体遮断剤を含む包装、および
- ( ii ) 少なくとも 1 種類の血管新生阻害剤、好ましくは a v <sub>3</sub>、 a v <sub>5</sub> または a v <sub>6</sub> インテグリン受容体阻害剤、より好ましくは R G D 含有直鎖状または環状ペプチド、特にシク

40

50

口 ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) を含む包装、  
場合により、細胞傷害性薬剤を含む包装をさらに含む薬剤キット；

・前記 E r b B 受容体遮断剤が、前記受容体のエピトープと結合する結合部位を有する抗体または機能的に無傷なその誘導体であり、前記抗体が、抗体の群：ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )、キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 ) またはヒト化モノクローナル抗体 H e r 2 から選択されることが好ましい、対応する薬剤キット；

・前記血管新生阻害剤が、抗体の群：L M 6 0 9、P 1 H 6、1 7 E 6 および 1 4 D 9、F 8 から選択されることが好ましい抗体または活性なその誘導体である、薬剤キット；

・本発明の具体的実施形態として、

( i ) ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )、キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 )、または機能的に無傷なその誘導体を含む包装、および 10

( i i ) シクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) を含み、場合により群：シスプラチン、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、ドセタキセル、パクリタキセル、ブレオマイシンの化合物のいずれかから選択される化学療法剤を含む包装を含む特異的薬剤キット；。

#### 【 0 0 2 8 】

・上記、下記および特許請求の範囲で定義する薬剤組成物または薬剤キットの、腫瘍および腫瘍転移を治療するための医薬品を製造するための使用法；

・患者において腫瘍または腫瘍転移を治療するための薬剤治療または方法であって、

( i ) 少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ遮断特異性、および 20

( i i ) 少なくとも 1 種類の血管新生阻害特異性

を有する治療上有効な量の 1 つまたは複数の薬剤を ( ここで、前記 1 つまたは複数の薬剤は、サイトカイン免疫複合体ではない )、場合により、細胞傷害性薬剤、好ましくは化学療法剤と一緒に前記患者に投与することを含み、前記薬剤 ( i ) は、E r b B 受容体、好ましくは E r b B 1 ( H e r 1 ) または E r b 2 ( H e r 2 ) 受容体のエピトープと結合する結合部位を含む抗体または機能的に無傷なその誘導体であり、前記薬剤 ( i i ) は、 $a_{v_3}$ 、 $a_{v_5}$  または  $a_{v_6}$  インテグリン阻害剤または V E G F 受容体遮断剤であることが好ましい、薬剤治療または方法；最後には、

・ E r b B 受容体を対象とする前記抗体が、群：ヒト化モノクローナル抗体 4 2 5 ( h 4 2 5 )、キメラモノクローナル抗体 2 2 5 ( c 2 2 5 ) またはヒト化モノクローナル抗体 H e r 2 から選択され、抗血管新生剤がシクロ ( A r g - G l y - A s p - D P h e - N M e V a l ) であり、場合により群：シスプラチン、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、ドセタキセル、パクリタキセル、ブレオマイシンから選択される細胞傷害性薬物が一緒である対応する方法を指す。 30

#### 【 0 0 2 9 】

本発明による薬剤組成物およびキットを用いる薬剤治療と同時または連続して放射線療法を行うことができる。

#### 【 0 0 3 0 】

主に、薬剤組成物の 4 種類の組合せを本発明に従って区別することができる。

#### 【 0 0 3 1 】

( i ) 少なくとも 1 種類の抗血管新生活性を備える薬剤と組み合わせられた少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくは E r b B 受容体遮断活性 / 特異性を備える薬剤 ( 2 薬組合せ ) ；

( i i ) 少なくとも 1 種類の抗血管新生活性を備える薬剤と組み合わせられ、かつ少なくとも 1 つの化学療法剤と組み合わせられた少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくは E r b B 受容体遮断活性 / 特異性を備える薬剤 ( 3 薬組合せ ) ；

( i i i ) 1 分子中に組み合わせられた少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくは E r b B 受容体遮断活性 / 特異性および少なくとも 1 種類の抗血管新生活性を備える薬剤 ( 2 薬活性を有する 1 薬組合せ ) ；

( i v ) 1 分子中に組み合わせられた少なくとも 1 種類の受容体型チロシンキナーゼ、好まし 50

くはE r b B受容体遮断活性 / 特異性および少なくとも1種類の抗血管新生活性を備え、少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせられた薬剤(3薬活性を有する2薬組合せ)。

【0032】

薬剤は、前記のいずれの場合においても同時または連続して投与することができる。

【0033】

上記により、本発明の方法は、主に以下の投与の組合せを含む。

【0034】

(i) 少なくとも1種類の抗血管新生活性を備える薬剤と組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性を備える薬剤(2薬投与) ;

10

(ii) 少なくとも1種類の抗血管新生活性を備える薬剤と組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性を備える薬剤(2薬投与) および放射線療法 ;

(iii) 少なくとも1種類の抗血管新生活性を備える薬剤と組み合わせられ、かつ少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性を備える薬剤(3薬投与) ;

(iv) 少なくとも1種類の抗血管新生活性を備える薬剤と組み合わせられ、かつ少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性を備える薬剤(3薬投与) および放射線療法 ;

【0035】

20

(v) 1分子中に組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性および少なくとも1種類の抗血管新生活性を備える薬剤(「2薬活性」を有する1薬投与) ;

(vi) 1分子中に組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性および少なくとも1種類の抗血管新生活性を備える薬剤(「2薬活性」を有する1薬投与) および放射線療法 ;

(vii) 1分子中に組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性および少なくとも1種類の抗血管新生活性を備え、少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせられる薬剤(「3薬活性」を有する2薬投与) 。

30

【0036】

(viii) 1分子中に組み合わせられた少なくとも1種類の受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはE r b B受容体遮断活性 / 特異性および少なくとも1種類の抗血管新生活性を備え、少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせられる薬剤(「3薬活性」を有する2薬投与) および放射線療法。

【発明の効果】

【0037】

本発明による薬剤の組合せおよび方法は、様々な利点を提供する。本発明による組合せは、腫瘍、腫瘍様および新形成障害を治療しかつ予防するのに有用である。本発明の様々な混合薬剤は、低用量、すなわち臨床状況で従来から用いられていたよりも低い用量で組み合わせ投与することが好ましい。哺乳類に投与される本発明の化合物、組成物、薬剤および療法の用量を下げる利点には、高用量に伴う有害作用の発生率の減少が含まれる。例えば、メトトレキセート、ドキソルピシン、ゲムシタピン、ドセタキセル、パクリタキセル、ブレオマイシンまたはシスプラチンなどの化学療法剤の用量を下げることにより、高用量で観察される場合に比べて悪心および嘔吐の回数ならびに重症度の低下が見られるはずである。同様の利点は、本発明のインテグリンアンタゴニストと組み合わせられた化合物、組成物、薬剤および療法にも企図されている。有害作用の発生率を低下させることにより、癌患者の生活の質改善を企図している。有害作用の発生率を低下させる別の利点には、患者コンプライアンスの改善、有害作用の治療に必要な入院数の減少、および有害作用に伴う疼痛を治療するのに必要な鎮痛剤の投与の減少が含まれる。あるいは、本発明の方法

40

50

および組合せは、高用量における治療効果を最大限に引き出すこともできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

特別の指示がない限り、本発明で使用する用語および語句は以下に示す意味および定義を有する。さらに、これらの定義および意味は、本発明をより詳細に、記載された好ましい実施形態を説明している。

【0039】

「受容体」または「受容体分子」は、1つまたは複数のドメインを含む可溶性または膜結合性 (bound) / 結成型 (associated) タンパク質または糖タンパク質であり、これにリガンドが結合して受容体 - リガンド複合体を形成する。アゴニストまたはアンタゴニストであるリガンドが結合することにより、受容体は活性化または不活性化され、シグナル伝達経路を開始または遮断する。

【0040】

「リガンド」または「受容体リガンド」は、受容体分子と結合して受容体 - リガンド複合体を形成する天然または合成化合物を意味する。用語リガンドには、アゴニスト、アンタゴニスト、および部分的アゴニスト / アンタゴニスト作用を持つ化合物が含まれる。

【0041】

「アゴニスト」または「受容体アゴニスト」は、受容体と結合して受容体 - アゴニスト複合体を形成し、それぞれ前記受容体および受容体 - リガンド複合体を活性化することによりシグナル伝達経路とさらに生物学的プロセスを開始させる天然または合成化合物である。

【0042】

「アンタゴニスト」または「受容体アンタゴニスト」は、アゴニストと反対の生物学的作用を有する天然または合成化合物である。アンタゴニストは、受容体と結合し、受容体のアゴニストと競合することによって受容体アゴニストの作用を遮断する。アンタゴニストは、アゴニストの作用を遮断するその能力によって定義される。また、受容体アンタゴニストは、抗体または免疫療法に有効なそのフラグメントであってもよい。本発明による好ましいアンタゴニストを挙げ、以下で論じる。

【0043】

「ErbB受容体」は、ErbB受容体ファミリーに属する受容体型タンパク質チロシンキナーゼであり、EGFR (ErbB1)、ErbB2、ErbB3およびErbB4受容体ならびに今後同定されるこのファミリーの他のメンバーが含まれる。一般に、ErbB受容体は、ErbBリガンドと結合することができる細胞外ドメイン；親油性の膜貫通ドメイン；保存的細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびリン酸化されうるいくつかのチロシン残基を有するカルボキシ末端シグナル伝達ドメインを含む。ErbB受容体は、「天然配列」ErbB受容体、またはその「アミノ酸配列変異体」であってもよい。ErbB受容体は、天然配列ヒトErbB受容体であることが好ましい。ErbB1は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子を指す。EGF受容体 (Her1) が最も好ましい。表現「ErbB1」および「Her1」は、本明細書中で互換的に使用され、ヒトHer1タンパク質を指す。表現「ErbB2」および「Her2」は、本明細書中で互換的に使用され、ヒトHer2タンパク質を指す。本発明によれば、ErbB1受容体 (EGFR) が好ましい。

【0044】

「ErbBリガンド」は、ErbB受容体と結合しおよび / または活性化するポリペプチドである。EGFRと結合するErbBリガンドには、EGF、TGF- $\alpha$ 、アンフィレギュリン、ベータセルリン、HB-EGFおよびエピレギュリンが含まれる。

【0045】

用語「チロシンキナーゼアンタゴニスト / 阻害剤」は、チロシンキナーゼを阻害または遮断することができる天然または合成薬剤を指し、記載された受容体型チロシンキナーゼに本発明の具体的関心がある。したがって、この用語には「ErbB受容体アンタゴニスト

10

20

30

40

50

「阻害剤」が含まれ、以下でより詳細に定義する。これらのアンタゴニストは例外として、本発明のチロシンキナーゼアンタゴニストとしてさらに適している抗ErbB受容体抗体は、単剤療法において、例えば乳癌および前立腺癌に有効性を示した化合物であることが好ましい。好適なインドロカルバゾール型チロシンキナーゼ阻害剤は、米国特許5,516,771;米国特許5,654,427;米国特許5,461,146;米国特許5,650,407などの文書に見いだされる情報を用いて入手することができる。US特許5,475,110;US特許5,591,855;US特許5,594,009およびWO96/11933は、ピロロカルバゾール型チロシンキナーゼ阻害剤および前立腺癌を開示している。上記で定義される化学的チロシンキナーゼ阻害剤の用量は、1日につき体重1kg当たり1pgから1gであることが好ましい。チロシンキナーゼ阻害剤の用量は、1日につき体重1kg当たり0.01mgから100mgであることがより好ましい。

10

20

30

40

50

**【0046】**

用語「ErbB受容体アンタゴニスト/阻害剤」は、ErbB受容体と結合して遮断または阻害する天然または合成分子であり、したがって、「(受容体)チロシンキナーゼアンタゴニスト/阻害剤」ファミリーのメンバーである。すなわち、受容体を遮断することにより、アンタゴニストは、ErbBリガンド(アゴニスト)の結合およびアゴニスト/リガンド受容体複合体の活性化を妨げる。ErbBアンタゴニストは、Her1(すなわちEGFR/Her1)またはHer2を対象とすることができる。本発明の好ましいアンタゴニストは、EGF受容体(EGFR、Her1)を対象とする。ErbB受容体アンタゴニストは、抗体もしくは免疫療法に有効なそのフラグメントまたは、ペプチド、ポリペプチドタンパク質などの非免疫学的分子であってもよい。化学分子も含まれるが、抗EGFR抗体および抗Her2抗体が本発明による好ましいアンタゴニストである。

**【0047】**

本発明の好ましい抗体は、抗Her1および抗Her2抗体であり、抗Her1抗体であることがより好ましい。好ましい抗Her1抗体はMAb425、好ましくはヒト化MAb425(hMAb425、US5,558,864;EP0531472)およびキメラMAb225(cMAb225、US4,943,533およびEP0359282)である。軽減された有害作用および副作用と相まって単剤療法において高い有効性を示すモノクローナル抗体h425が最も好ましい。最も好ましい抗Her2抗体は、Genentech/Rocheより市販されているハーセプチン(登録商標)である。

**【0048】**

また、本発明による有効なEGF受容体アンタゴニストは、他の天然または合成化合物であってもよい。この範疇の好ましい分子のいくつかの例には、有機化合物、有機金属化合物、有機および有機金属化合物の塩が含まれる。

**【0049】**

また、本発明による有効なErbB受容体アンタゴニストは、小さな分子であってもよい。本発明の小さな分子は、上記で定義した生物学的分子ではなく、約400を超えない分子量を有する。それらはタンパク質またはペプチド構造を有していないことが好ましく、合成的に製造される化合物であることが最も好ましい。小さな分子のいくつかの例には、有機化合物、有機金属化合物、有機および有機金属化合物の塩が含まれる。

**【0050】**

EGF受容体および/またはHer2受容体を阻害するのに有用であるとして多くの小分子が報告されている。その例は、スチリル置換ヘテロアリール化合物(US5,656,655);ピス単環式および/または二環式アリールヘテロアリール、炭素環式、およびヘテロ炭素環式化合物(US5,646,153);三環式ピリミジン化合物(US5,679,683);受容体型チロシンキナーゼ阻害活性を有するキナゾリン誘導體(US5,616,582);ヘテロアリールエテンジイルまたはヘテロアリールエテンジイルアリール化合物(US5,196,446);EGFR、PDGFR、およびFGFRファミリーの受容体を阻害する、6-(2,6-ジクロロフェニル)-2-(4-(2-ジ

エチル - アミノエトキシ)フェニルアミノ) - 8 - メチル - 8 H - ピリド ( 2 , 3 ) - 5 - ピリミジン - 7 - オンと名付けられた化合物 ( Panek、他、1997、J . P h a r m a c o l . E x p . T h e r a p . 2 8 3、1 4 3 3 ) である。

【 0 0 5 1 】

「抗血管新生剤」は、血管の発生をある程度まで遮断または妨害する天然または合成化合物である。例えば、抗血管新生分子は、血管新生成長因子または成長因子受容体と結合し遮断する生物学的分子であってもよい。本明細書における好ましい抗血管新生分子は、受容体、好ましくはインテグリン受容体または V E G F 受容体と結合する。この用語には、本発明によれば、前記血管新生剤のプロドラッグも含まれる。様々な構造および起源を有し抗血管新生特性をもたらす多くの分子が存在する。本発明に適している最も関連ある種類の血管新生阻害剤または遮断剤は、例えば、以下の通りである。

10

【 0 0 5 2 】

( i ) フルオロウラシル、マイトマイシン - C、タキソールなどの抗有糸分裂剤 ;  
 ( ii ) 2 - メトキシエストラジオールなどのエストロゲン代謝物 ;  
 ( iii ) 亜鉛メタロプロテイナーゼ (メタロプロテアーゼ) を阻害するマトリックスメタロプロテイナーゼ ( MMP ) 阻害剤 (例えばベチマスタット ( betimastat )、B B 1 6、T I M P、ミノサイクリン、G M 6 0 0 1、または「Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Applications」( Golub、Annals of the New York Academy of Science、Vol . 8 7 8 a ; Greenwald、Zucker ( Eds . )、1 9 9 9 ) に記載の阻害剤) ;  
 ( iv ) I F N ( U S 4、5 3 0、9 0 1 ; U S 4、5 0 3、0 3 5 ; 5、2 3 1、1 7 6 ) ; アンジオスタチンおよびプラスミノゲンフラグメント (例えば、クリングル 1 - 4、クリングル 5、クリングル 1 - 3 ( O ' Reilly、M . S . 他、Cell ( Cambridge、Mass . ) 7 9 ( 2 ) : 3 1 5 ~ 3 2 8、1 9 9 4 ; Cao 他、J . Biol . Chem . 2 7 1 : 2 9 4 6 1 ~ 2 9 4 6 7、1 9 9 6 ; Cao 他、J . Biol Chem . 2 7 2 : 2 2 9 2 4 ~ 2 2 9 2 8、1 9 9 7 ) ; エンドスタチン ( O ' Reilly、M . S . 他、Cell 8 8 ( 2 )、2 7 7、1 9 9 7 および W O 9 7 / 1 5 6 6 6 )、トロンボスポンジン ( T S P - 1 ; Frazier、1 9 9 1、Curr Opin Cell Biol 3 ( 5 ) : 7 9 2 ; 血小板因子 4 ( P F 4 ) などの抗血管新生多機能薬剤および因子 ; 。

20

30

【 0 0 5 3 】

( v ) プラスミノゲン活性化因子 / ウロキナーゼ阻害剤 ;  
 ( vi ) ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト ;  
 ( vii ) ヘパリナーゼ ;  
 ( viii ) T N P - 4 7 0 などのフマギリン類縁体 ;  
 ( ix ) S U I 0 1 などのチロシンキナーゼ阻害剤 ( 前述および後述の E r b B 受容体アンタゴニスト ( E G F R / H e r 2 アンタゴニスト ) の多くもチロシンキナーゼ阻害剤であり、それぞれ腫瘍成長の阻害をもたらす抗 E G F 受容体遮断活性ならびに血管および内皮細胞の発生の阻害をもたらす抗血管新生活性を示すことがある ) ;  
 ( x ) スラミンおよびスラミン類縁体 ;  
 ( xi ) 血管形成抑制 ( angiostatic ) ステロイド  
 ( xii ) V E G F および b F G F アンタゴニスト ;  
 ( xiii ) 抗 V E G F 受容体抗体 ( D C - 1 0 1 ) などの V E G F 受容体アンタゴニスト ;  
 ( xiv ) f l k - 1 および f l t - 1 アンタゴニスト ;  
 ( xv ) C O X - I I などのシクロオキシゲナーゼ阻害剤 ;  
 ( xvi ) v アンタゴニストおよび v 受容体アンタゴニスト、例えば、抗 v 受容体抗体および R G D ペプチドなどのインテグリンアンタゴニストおよびインテグリン受容体アンタゴニスト。本発明によれば、インテグリン ( 受容体 ) アンタゴニストが好ましい。

40

【 0 0 5 4 】

50



用語「インテグリンアンタゴニスト/阻害剤」または「インテグリン受容体アンタゴニスト/阻害剤」は、インテグリン受容体を遮断しかつ阻害する天然または合成分子を指す。場合によっては、この用語には、前記インテグリン受容体のリガンド（ $v_3$ の場合には：ビトロネクチン、フィブリン、フィブリノーゲン、フォンヴィレブランド因子、トロンボスポンジン、ラミニン； $v_5$ の場合には：ビトロネクチン； $v_1$ の場合には：フィブロネクチンおよびビトロネクチン； $v_6$ の場合には：フィブロネクチンなど）を対象とするアンタゴニストが含まれる。本発明によれば、インテグリン受容体を対象とするアンタゴニストが好ましい。インテグリン（受容体）アンタゴニストは、天然もしくは合成ペプチド、非ペプチド、ペプチドミメティカ（peptidomimetic）、抗体もしくはその機能性フラグメントなどの免疫グロブリンまたは免疫複合体（融合タンパク質）のいずれであってもよい。本発明の好ましいインテグリン阻害剤は、 $v$ インテグリン（例えば、 $v_3$ 、 $v_5$ 、 $v_6$ およびサブクラス）の受容体を対象とする。好ましいインテグリン阻害剤は、 $v$ アンタゴニスト、特に $v_3$ アンタゴニストである。本発明による好ましい $v$ アンタゴニストは、RGDペプチド、ペプチドミメティック（非ペプチド）アンタゴニストおよび $v$ 受容体を遮断する抗体などの抗インテグリン受容体抗体である。

10

20

30

40

50

#### 【0055】

典型的な非免疫学的 $v_3$ アンタゴニストがUS5,753,230およびUS5,766,591の教示中に記載されている。好ましいアンタゴニストは、直鎖状および環状RGD含有ペプチドである。一般に、環状ペプチドはより安定であり、増強された血清半減期をもたらす。しかしながら、本発明の最も好ましいインテグリンアンタゴニストは、シクロ-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal)(EMD121974、シレンギチド(Cilengitide)(登録商標)、Merck KGaA, Germany; EP0770622)であり、これは、インテグリン受容体 $v_3$ 、 $v_1$ 、 $v_6$ 、 $v_8$ 、 $11b_3$ を遮断するのに有効である。 $v_3/v_5/v_6$ インテグリン受容体の好適なペプチジルおよびペプチドミメティック（非ペプチド）アンタゴニストが科学文献にも特許文献にも記載されている。例えば、HoekstraおよびPoulter、1998、Curr. Med. Chem. 5、195；WO95/32710；WO95/37655；WO97/01540；WO97/37655；WO97/45137；WO97/41844；WO98/08840；WO98/18460；WO98/18461；WO98/25892；WO98/31359；WO98/30542；WO99/15506；WO99/15507；WO99/31061；WO00/06169；EP0853084；EP0854140；EP0854145；US5,780,426；およびUS6,048,861を参照されたい。

#### 【0056】

本発明における使用にも適しているベンゾアゼピンならびに関連ベンゾジアゼピンおよびベンゾシクロヘプテン $v_3$ インテグリン受容体アンタゴニストを開示している特許には、WO96/00574、WO96/00730、WO96/06087、WO96/26190、WO97/24119、WO97/24122、WO97/24124、WO98/15278、WO99/05107、WO99/06049、WO99/15170、WO99/15178、WO97/34865、WO97/01540、WO98/30542、WO99/11626、およびWO99/15508が含まれる。主鎖の立体配置的環束縛を特徴とするその他のインテグリン受容体アンタゴニストは、WO98/08840；WO99/30709；WO99/30713；WO99/31099；WO00/09503；US5,919,792；US5,925,655；US5,981,546；およびUS6,017,926に記載されている。US6,048,861およびWO00/72801には、強力な $v_3$ インテグリン受容体アンタゴニストである一連のノナン酸誘導体が開示された。その他の化学的小分子のインテグリンアンタゴニスト（大部分はビトロネクチンアンタゴニスト）は、WO00/38665に記載されている。その他の $v_3$ 受容体アンタゴニストは、血管新生を阻害するのに有効であることが分かった。例えば、(S)-10,11-ジヒドロ-3-[3-(ピリジン-2-イル

アミノ) - 1 - プロピルオキシ] - 5 H - ジベンゾ[ a , d ]シクロヘプテン - 10 - 酢酸 ( S B - 265123として知られる ) などの合成受容体アンタゴニストが様々な哺乳類モデル系で試験されている。( Keenan他、1998、Bioorg. Med. Chem. Lett. 8 ( 22 )、3171 ; Ward他、1999、Drug Metab. Dispos. 27 ( 11 )、1232 )。

#### 【0057】

アンタゴニストとして使用するのに適したインテグリンアンタゴニストを同定するためのアッセイは、例えば、Smith他、1990、J. Biol. Chem. 265、12267により、および参照する特許文献中に記載されている。また、抗インテグリン受容体抗体もよく知られている。好適な抗インテグリン ( 例えば、 $v_3$ 、 $v_5$ 、 $v_6$  ) モノクローナル抗体を修飾し、F(ab)<sub>2</sub>、Fabおよび組み換えFvまたは単鎖抗体を含むそれらの抗原結合フラグメントを包含することができる。好適かつ使用が好ましいインテグリン受容体  $v_3$  を対象とするモノクローナル抗体の1つがLM609として同定されている ( Brooks他、1994、Cell 79、1157 ; ATCC HB 9537 )。強力な特異的抗  $v_5$  抗体であるP1F6がWO97/45447に開示され、これも本発明によれば好ましい。さらに好適な  $v_6$  選択的抗体は、MAb 14D9.F8 ( WO99/37683、DSM ACC2331、Merck KGaA、Germany ) ならびにMAb 17.E6 ( EP0719859、DSM ACC2160、Merck KGaA ) であり、これらはインテグリン受容体の  $v$  鎖を選択的に対象とする。別の好適な抗インテグリン抗体は、市販されているビトラキシン ( Vitroxin ) ( 登録商標 ) である。

10

20

#### 【0058】

本明細書の用語「抗体」または「免疫グロブリン」は、最も幅広い意味で使用され、具体的には無傷なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷な抗体から生成した多重特異性抗体 ( 例えば、二重特異性抗体 )、および所望の生物活性を示す限りは抗体フラグメントを網羅する。一般に、この用語には、異なる結合特異性の2つ以上の抗体またはそれらのフラグメントからなり、互いに連結しているヘテロ抗体が含まれる。

#### 【0059】

それらの定常領域のアミノ酸配列に応じて、無傷な抗体を様々な「抗体 ( 免疫グロブリン ) クラス」に割り当てることができる。無傷な抗体にはIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの5つの主なクラスがあり、それらのいくつかは「サブクラス」 ( アイソタイプ )、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgA2にさらに分けることができる。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\mu$  と呼ばれる。本発明による抗体に好ましい主なクラスはIgGであり、より詳細にはIgG1およびIgG2である。

30

#### 【0060】

通常、抗体は、約150,000の分子量を有する糖タンパク質であり、2本の同一軽 ( L ) 鎖および2本の同一重 ( H ) 鎖からなる。各軽鎖は1つの共有結合性ジスルフィド結合により重鎖と連結しているが、ジスルフィド結合数は、異なる免疫グロブリン・アイソタイプの重鎖間で異なる。また、各重鎖および軽鎖は、規則正しい間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一方の端に可変ドメイン ( VH ) と、続いて多くの定常ドメインを有する。可変領域は、超可変領域すなわち「CDR」領域を含み、この領域は抗原結合部位を含み抗体の特異性を担っており、「FR」領域は、抗体の親和性 / 結合活性にとって重要である。一般に、超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」 ( 例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基24~34 ( L1 )、50~56 ( L2 ) および89~97 ( L3 )、ならびに重鎖可変ドメイン中の31~35 ( H1 )、50~65 ( H2 ) および95~102 ( H3 ) ; および / または「超可変ループ」 ( 例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26~32 ( L1 )、50~52 ( L2 ) および91~96 ( L3 )、ならびに重鎖可変ドメイン中の残基26~32 ( H1 )、53~55 ( H2 ) および96~1

40

50

01 (H3); Chothia および Lesk. J. Mol. Biol. 196: 901 ~ 917 (1987) からのアミノ酸残基を含む。「FR」残基(フレームワーク領域)は、本明細書で定義する超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。各軽鎖は、一方の端に可変ドメイン(VL)を、他方の端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインと並び、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間の境界面を形成していると考えられている。どの脊椎動物種に由来する抗体の「軽鎖」も、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ( ) およびラムダ( ) と呼ばれる2つの明確に異なるタイプのうちの1つに割り当てることができる。

#### 【0061】

本明細書で用いる用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同種の抗体の母集団から得られる抗体、すなわち母集団を含む個々の抗体が、少量存在する可能性のある天然に存在する突然変異を除いては同一であることを指す。モノクローナル抗体は極めて特異的であり、単一の抗原部位を対象とする。さらに、様々な決定基(エピトープ)を対象とする様々な抗体が含まれるポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基を対象とする。それらの特異性に加え、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成することができるという点で有利である。モノクローナル抗体を製造する方法には、Kohler および Milstein (1975, Nature 256, 495) により、および「Monoclonal Antibody Technology, the Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas」(1985, Burdon 他、編、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 13巻、Elsevier Science Publishers, Amsterdam) 中に記載のハイブリドーマ法が含まれ、公知の組み換えDNA法(例えば、US 4, 816, 567を参照)によって製造することができる。また、「モノクローナル抗体」は、例えば Clackson 他、Nature, 352: 624 ~ 628 (1991) および Marks 他、J. Mol. Biol., 222: 58, 1 ~ 597 (1991) に記載の技法を用い、ファージ抗体ライブラリーから単離することができる。

#### 【0062】

「キメラ抗体」は、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と一致するか相同的であるが、鎖の残部は、別の種に由来する、または別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、ならびに所望の生物活性を示す限りはそのような抗体のフラグメント中の対応する配列と一致するか相同的である抗体を意味する(例えば、: US 4, 816, 567; Morrison 他、Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81: 6851 ~ 6855 (1984))。また、キメラおよびヒト化抗体を作成する方法は当技術分野で知られている。例えば、キメラ抗体を作成する方法には、Boss (Celltech) および Cabilly (Genentech) による特許 (US 4, 816, 397; US 4, 816, 567) に記載の方法が含まれる。

#### 【0063】

「ヒト化抗体」は、ヒト以外の免疫グロブリンに由来する最小配列を含むヒト以外の(例えば、齧歯類)キメラ抗体の形態である。多くの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたはヒト以外の霊長類などのヒト以外の動物種の超可変領域からの残基(ドナー抗体)により置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が、対応するヒト以外の残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中に見いだされない残基を含むことができる。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、通常は2つの可

10

20

30

40

50

変領域の実質的にすべてを含み、すべてまたは実質的にすべての超可変ループはヒト以外の免疫グロブリンの超可変ループに対応し、すべてまたは実質的にすべてのFRは、ヒト免疫グロブリン配列のFRである。また、場合により、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、通常はヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む。ヒト化抗体を作成する方法は、例えばWinter(US5,225,539)およびBos(US4,816,397)により記載されている。

【0064】

「抗体フラグメント」は、無傷な抗体の一部を含み、その抗原結合領域または可変領域を含むことが好ましい。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、FvおよびFcフラグメント、ダイアボディ(diabody)、直鎖状抗体、単鎖抗体分子；  
 および抗体フラグメントから生成した多重特異性抗体が含まれる。「無傷な」抗体は、抗原結合可変領域ならびに軽鎖定常ドメイン(CL)および重鎖定常ドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む抗体である。無傷な抗体は、1つまたは複数のエフェクター機能を有することが好ましい。抗体のパイニン消化は「Fab」フラグメントと呼ばれ、各々が単一の抗原結合部位ならびにCLおよびCH1領域を含む2つの同一抗原結合フラグメント、および容易に結晶化する能力を表す名前である残りの「Fc」フラグメントを生成する。一般に、抗体の「Fc」領域は、IgG1またはIgG2抗体主要クラスのCH2、CH3およびヒンジ領域を含む。ヒンジ領域は、CH1領域をCH2-CH3領域と結びつける約15個のアミノ酸残基のグループである。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原と架橋することができる「F(ab')<sub>2</sub>」フラグメント  
 が得られる。「Fv」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインが堅固であるが非共有結合で会合した二量体からなる。この配置で、各可変ドメインの3個の超可変領域(CDR)が相互作用し、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を規定する。まとめると、6個の超可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(すなわち抗原に特異的な3個の超可変領域のみを含む半分のFv)であっても、全体の結合部位に比べて親和性は低い、抗原を認識し結合する能力を有している。

【0065】

また、Fabフラグメントは、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の最初の定常ドメイン(CH1)を含む。「Fab'」フラグメントはFabフラグメントと異なり、抗体ヒンジ領域からの1つまたは複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加されている。F(ab')<sub>2</sub>抗体フラグメントは当初、間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として製造された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングも知られている(例えば、Hermanson、Bioconjugate Techniques、Academic Press、1996；US4,342,566)。「単鎖Fv」すなわち「scFv」抗体フラグメントは、抗体のV、およびV、ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖として存在する。Fvポリペプチドは、VHとVLドメインの間に、scFvが抗原結合に望ましい構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーを含むことが好ましい。単鎖FV抗体は、例えば、Pluckthun(the Pharmacology of Monoclonal Antibodies、Vol.113、RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag、New York、pp.269~315(1994))、WO93/16185；US5,571,894；US5,587,458；Houston他、(1988、Proc.Natl.Acad.Sci.85,5879)またはSkerraおよびPlueckthun(1988、Science 240,1038)により知られている。

【0066】

「二重特異性抗体」は、2つの異なる特異性の抗原結合部位を有する単一の二価抗体(または免疫療法に有効なそのフラグメント)である。例えば、第1の抗原結合部位は、血管

新生受容体（例えば、インテグリンまたはVEGF受容体）を対象とするが、第2の抗原結合部位は、ErbB受容体（例えば、EGFRまたはHer2）を対象とする。二重特異性抗体は、化学的技法（例えば、Kranz他（1981）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807を参照）により、「ポリドーマ」技法（US4, 474, 893を参照）により、またはそれ自体よく知られている組換えDNA技法により製造することができる。他の方法は、WO91/00360、WO92/05793およびWO96/04305に記載されている。また、二重特異性抗体は、単鎖抗体から調製することができる（例えば、Houston他、（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 5879; SkerraおよびPlueckthun（1988）Science 240, 1038を参照）。これらは、単一ポリペプチド鎖として製造された抗体可変領域の類縁体である。二重特異性結合剤を生成するために、単鎖抗体を化学的、または当技術分野で知られている遺伝子組み換え法により一緒にカップリングすることができる。

10

**【0067】**

また、ロイシンジッパー配列を用いて本発明による二重特異性抗体を製造することも可能である。用いる配列は、転写因子FosおよびJunのロイシンジッパー領域に由来する（Landschulz他、1988、Science 240, 1759; 総説としては、ManiatisおよびAbel、1989、Nature 341, 24を参照）。ロイシンジッパーは、通常7番目の残基毎にロイシンが存在する長さが約20~40残基の特異的アミノ酸配列である。このようなジッパー配列は両親媒性のラセンを形成し、ロイシン残基は二量体形成のために疎水性の面上に並ぶ。FosおよびJunタンパク質のロイシンジッパーに対応するペプチドは、ヘテロ二量体を優先的に形成する（O'Shea他、1989、Science 245, 646）。また、二重特異性抗体を含むジッパーおよびそれらを製造する方法は、WO92/10209およびWO93/11162に開示されている。本発明による二重特異性抗体は、単一の特異性を有する抗体に関しては、前述のVEGF受容体およびV3受容体を対象とする抗体であってもよい。

20

**【0068】**

「ヘテロ抗体」は、互いに連結する2つ以上の抗体または抗体結合フラグメントであり、各々は異なる結合特異性を有する。ヘテロ抗体は、2つ以上の抗体または抗体フラグメントを互いに結合させることにより調製することができる。好ましいヘテロ抗体は、架橋Fab/Fab'フラグメントを含む。抗体を結合させるためには様々なカップリング剤または架橋剤を用いることができる。そのような例は、タンパク質A、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート（SATA）およびN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）である（例えば、Karpovskiy他、（1984）J. Exp. Med. 160, 1686; Liu他（1985）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8648を参照）。その他の方法には、Paulus、Behring Inst. Mitt., No. 78, 118（1985）; Brennan他（1985）Science 30m: 81またはGlennie他（1987）J. Immunol. 139, 2367によって記載された方法が含まれる。別の方法は、3個のFab'フラグメントをカップリングするのにo-フェニレンジマレイミド（oPDM）を用いている（WO91/03493）。本発明の文脈中では、多重特異性抗体も適しており、例えば、WO94/13804およびWO98/50431の教示に従って調製することができる。

30

40

**【0069】**

「融合タンパク質」は、異なる特異性を有する1つもしくは複数のタンパク質またはペプチドあるいはそれらのフラグメントからなり、場合によりリンカー分子により互いに融合された天然または合成分子を指す。具体的実施形態として、この用語には、少なくとも1つのタンパク質またはペプチドが、それぞれ免疫グロブリンもしくは抗体またはそれらの部分である、融合構築物（「免疫複合体」）が含まれる。

**【0070】**

50

用語「免疫複合体」は、免疫学的に有効でない分子と共有結合により融合されたそれぞれ抗体または免疫グロブリン、または免疫学的に有効なそれらのフラグメントを指す。この融合パートナーはペプチドまたはタンパク質であることが好ましく、グリコシル化されていてもよい。前記非抗体分子を、抗体の定常重鎖のC末端または可変軽鎖および/または重鎖のN末端に連結することができる。融合パートナーは、リンカー分子を介して連結することができる、この分子は一般にペプチドを含む3～15個のアミノ酸残基である。本発明による免疫複合体は、免疫グロブリンまたは免疫療法で有効なそのフラグメントからなり、受容体型チロシンキナーゼ、好ましくはErbB(ErbB1/ErbB2)受容体、およびインテグリンアンタゴニストペプチド、または血管新生受容体、好ましくはインテグリンまたはVEGF受容体および、本質的にTNFおよびIFNまたは前記免疫グロブリン、好ましくはそのFc部分のC末端にそのN末端で連結する他の好適なサイトカインからなるTNFまたは融合タンパク質を対象とする。また、この用語には、二重特異性または多重特異性免疫グロブリン(抗体)あるいはそれらのフラグメントを含む対応する融合構築物が含まれる。

10

**【0071】**

用語「機能的に無傷な誘導体」は、本発明への理解によれば、当初の化合物、ペプチド、タンパク質、抗体(免疫グロブリン)、免疫複合体などに比べて本質的に同一の生物学的機能および/または治療的機能を有する、化合物、ペプチド、タンパク質、抗体(免疫グロブリン)、免疫複合体などのフラグメントもしくは部分、修飾、変異体、相同体または脱免疫化形態(免疫反応を担うエピトープの修飾は除外する)を意味する。しかしながら、この用語には有効性の低下または増強をもたらすような誘導体も含まれる。

20

**【0072】**

用語「サイトカイン」は、ある細胞母集団によって放出され、細胞間メディエータとして別の細胞に作用するタンパク質の総称である。このようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、および従来のポリペプチド・ホルモンである。サイトカインには、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、および黄体形成ホルモン(LH)などの糖タンパク質ホルモン；肝成長因子；線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞成長因子(VEGF)；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGFなどの神経成長因子；血小板成長因子；TGFおよびTGFなどのトランスフォーミング成長因子(TGF)；エリスロポエチン(EPO)；IFN、IFN、およびIFNなどのインターフェロン；M-CSF、GM-CSFおよびG-CSFなどのコロニー刺激因子；IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12などのインターロイキン；およびTNFまたはTNFなどが含まれる。本発明による好ましいサイトカインは、インターフェロンおよびTNF $\alpha$ である。

30

**【0073】**

本明細書で用いる用語「細胞傷害性薬剤」は、細胞の機能を阻害または妨げおよび/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語には、放射性同位体、化学療法剤、および細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素などの毒素、またはそれらの断片が含まれることを意図している。また、この用語には、サイトカインファミリーのメンバー、好ましくはIFNならびに細胞傷害活性を有する抗新生物薬も含まれる。

40

**【0074】**

用語「化学療法剤」または「抗新生物薬」は、本発明への理解によれば、前述した「細胞傷害性薬剤」のクラスのメンバーとして見なされ、抗新生物効果を発揮する、すなわち新生物細胞の発生、成熟、または伝播を、例えば細胞分裂静止作用または細胞傷害性作用により直接、および生物反応修飾などの機序を介して間接的でなく妨げる化学薬品が含まれる。本発明による好適な化学療法剤は、天然または合成化合物であることが好ましいが、

50

タンパク質、ポリペプチドなどの生物学的分子も排除されない。商業的利用、臨床評価および前臨床開発に利用できる多くの抗新生物薬があり、前述のTNFと抗血管新生剤、場合によりEGF受容体アンタゴニストなどの他の薬剤との併用療法により腫瘍/新形成を治療するため、本発明にそれらを含めることができる。場合により、前記薬物の組合せと一緒に化学療法剤を投与できることを指摘しなければならない。化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン化合物、アルキルスルホネートおよびニトロソ尿素などのアルキル化作用を持つ他の化合物、シスプラチンおよびダカルバジン；代謝拮抗剤、例えば葉酸、プリンまたはピリミジンアンタゴニスト；有糸分裂阻害剤、例えばピンカアルカロイドおよびポドフィロトキシンの誘導體；細胞傷害性抗生物質およびカンプトセシン誘導體が含まれる。

10

## 【0075】

好ましい化学療法剤または化学療法には、アミフォスチン（エチオール（ethyol））、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾトシン、シクロホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、ドキシソルピシンリポ（ドキシル（Doxil））、ゲムシタピン（ジェムザール）、ダウノルピシン、ダウノルピシンリポ（ダウノキソーム（daunoxome））、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキセート、5-フルオロウラシル（5-FU）、ビンブラスチン、ピンクリスチン、プレオマイシン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテル）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クラドリビン（cladribine）、カンプトセシン、CPT-11、10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトセシン（SN38）、ダカルバジン、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシ尿素、イホスファミド、イダルピシン、メスナ、インターフェロンアルファ、インターフェロンベータ、イリノテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、プリカマイシン、ミトタン、ペガスバルガーゼ（pegaspargase）、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ストレプトゾトシン、タモキシフェン、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテバ、ウラシルマスタード、ピノレルピン、クロラムブシルおよびそれらの組合せが含まれる。

20

## 【0076】

本発明による最も好ましい化学療法剤は、シスプラチン、ゲムシタピン、ドキシソルピシン、パクリタキセル（タキソール）およびプレオマイシンである。

30

## 【0077】

用語「癌」および「腫瘍」は、一般的には規制されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理的状态を指すかそれについて記載する。本発明による薬剤組成物により、乳房、心臓、肺、小腸、大腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭部および頸部、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、精巣、子宮頸部、および肝臓の腫瘍などの腫瘍を治療することができる。より具体的には、腫瘍は、腺腫、血管肉腫、星細胞腫、上皮癌、胚細胞腫、グリア芽細胞腫、神経膠腫、過誤腫、血管内皮腫、血管肉腫、血腫、肝芽腫、白血病、リンパ腫、髄芽腫、黒色腫、神経芽細胞腫、骨肉腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫および奇形腫から選択される。詳細には、腫瘍は、末端性黒子性黒色腫、光線性角化症、腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、星状細胞腫瘍、バルトリン腺癌、基底細胞癌、気管支腺癌、毛細血管、カルチノイド、癌、癌肉腫、海綿状、胆管癌、軟骨肉腫、脈絡叢乳頭腫/癌、明細胞癌、嚢胞腺腫、内胚葉洞腫瘍、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質部肉腫、子宮内膜様腺癌、上皮、類上皮、ユーイング肉腫、線維層状（fibrolamellar）、限局性結節性再生、ガストリン産生腫瘍、胚細胞腫瘍、グリア芽細胞腫、グルカゴン産生腫瘍、血管芽細胞腫、血管内皮腫、血管腫、肝細胞腺腫、肝腺腫症、肝細胞癌、膵島細胞腺腫、上皮内異常増殖、上皮間扁平上皮細胞異常増殖、浸潤性扁平上皮細胞癌、大細胞癌、平滑筋肉腫、悪性黒子型黒色腫、悪性黒色腫、悪性中皮腫、髄芽腫、髄様上皮腫、黒色腫、髄膜、中皮、転移性癌、粘液性類表皮癌、神経芽細胞腫、神経上皮腺癌

40

50

結節型黒色腫、燕麦細胞癌、オリゴデンドログリア、骨肉腫、膵臓ポリペプチド、乳頭状漿液性腺癌、松果体細胞、下垂体部腫瘍、プラズマ細胞腫、偽肉腫、肺芽細胞腫、腎細胞癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性癌、小細胞癌、軟部組織癌、ソマトスタチン分泌腫瘍、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、中皮下 (submesothelial)、表在拡大型黒色腫、未分化癌、ブドウ膜黒色腫、疣状癌、ビポーマ、高分化癌、およびウィルムス腫瘍からなる群から選択される。

【0078】

本発明の「薬剤組成物」は、本発明の併用療法に伴う副作用を軽減するか回避する薬剤を含むことができ(「補助療法」)、例えば、抗癌剤の毒作用を軽減する薬剤、例えば骨吸収阻害剤、心保護剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。前記補助剤は、化学療法、放射線療法または手術に伴う悪心および嘔吐の発生を防ぐか減少させ、または骨髄抑制性抗癌剤の投与に伴う感染の発生率を低下させる。補助剤は当技術分野でよく知られている。さらに、本発明による免疫療法剤は、BCGのようなアジュバントおよび免疫系刺激剤と一緒に投与することができる。さらに、組成物には、細胞傷害性の有効な放射線標識同位元素、または細胞傷害性ペプチド(例えばサイトカイン)または細胞傷害性薬物などの他の細胞傷害性薬剤を含む免疫療法剤または化学療法剤が含まれる。

10

【0079】

腫瘍または腫瘍転移を治療するための用語「薬剤キット」は、腫瘍および腫瘍転移を治療するための方法で試薬を用いるための包装、および一般には使用説明書を指す。通常、本発明のキットにおける試薬は、本明細書に記載の治療用組成物として製剤化されており、したがってキットの配布に適した様々な形態のいずれであってもよい。そのような形態には、本発明のアンタゴニストおよび/または融合タンパク質を提供するための液体、粉末、錠剤、懸濁液などが含まれる。本方法によれば、別個に投与するのに適した別個の容器で試薬を提供するか、あるいは包装中の単一容器に組成物を一体化して提供してもよい。この包装は、本明細書に記載の治療方法によれば、1回または複数の試薬の投与に十分な量を含むことができる。また、本発明のキットは、包装中に含まれる材料の「使用説明書」を含む。

20

【0080】

用語「薬剤治療」は、腫瘍における腫瘍細胞および腫瘍転移を治療するための本発明の治療方法を指し、受容体型チロシンキナーゼ遮断剤、好ましくはErbBアンタゴニスト、中でも抗ErbB1(EGFR、Her1)/抗ErbB2(Her2)抗体を用いることによる血管新生阻害(抗血管新生)療法と抗腫瘍免疫療法の併用に基いている。2タイプ以上の血管新生阻害剤を、2タイプ以上の、好ましくは抗ErbB受容体阻害剤と組み合わせる用いることができる。この併用は、同時に、順次に、または治療間に介入の期間をおいて行うことができる。具体的などの治療剤も、治療の過程で2回以上投与することができる。この方法により、各治療剤の腫瘍細胞増殖阻害効果が相乗的に強化され、各成分を単独で投与することにより見いだされるより有効な治療を行うことができる。したがって、一態様では、本発明の方法は、単独で投与した場合には有効な血管新生阻害、または抗腫瘍細胞活性をもたらさないと思われる量の抗血管新生剤および抗ErbB受容体(Her1/Her2)剤を組み合わせる患者に投与することを包含する。本発明の方法は、そのステップに関して本発明を実施するための様々な様式を含んでいる。例えば、本発明による薬剤を同時、順次、または別個に投与することができる。さらに、受容体型チロシンキナーゼ遮断剤および抗血管新生剤を、投与と投与の間に約3週間の時間間隔以内、すなわち実質的に第1の薬剤を投与した直後から第1の薬剤を投与して約3週間後までに別個に投与することができる。外科的処置の後でこの方法を実施することができる。あるいは、第1の活性薬剤の投与と第2の活性薬剤の投与との間に外科的処置を実施することができる。この方法の例は、本方法と外科的腫瘍除去の組合せである。通常、本方法による治療は、1または複数サイクルの投与で治療用組成物を投与することを含む。例えば、同時投与を実施する場合、両薬剤を含む治療用組成物を単一サイクルで約2日から約3週間にわたって投与する。その後、医師の判断により必要に応じて治療サイクルを繰り返

30

40

50



すことができる。同様に、逐次投与を企図する場合には、各治療剤の投与時間を、通常同一時間をカバーするように調整しなければならない。サイクル間の間隔は約0から2カ月まで変えることができる。本発明のモノクローナル抗体、ポリペプチドまたは有機ミネラル/化学療法剤は、注射または長時間の注入により非経口的に投与することができる。通常、治療される組織は全身投与によって体内で評価されるため、ほとんどの場合治療用組成物の静脈内投与によって治療されるが、標的組織が標的分子を含む可能性がある場合にはその他の組織および送達手段も企図されている。すなわち、本発明のモノクローナル抗体、ポリペプチドまたは有機薬剤を、眼内、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内、経皮で、同所注射および注入により投与でき、かつ蠕動手段によっても送達することができる。例えば、本発明のインテグリンアンタゴニストを含有する治療用組成物は、例えば単位投与量の注射として従来のように静脈内投与される。本発明の治療用組成物は、本明細書に記載の関連薬剤と一緒に、生理的に耐容性のある担体を含み、薬剤は活性成分として担体中に溶解または懸濁している。

10

20

30

40

50

#### 【0081】

組成物、担体、希釈剤および試薬に言及する場合に本明細書で使用する用語「薬剤として許容される」およびそれらの文法的変形形態は互換的に用いられ、材料が、悪心、眩暈、胃の不快感などの望ましくない生理的影響を生じることなしに哺乳類に投与することができることを表す。それらの材料に溶解または懸濁した活性成分を含有する薬剤組成物の調製は、当技術分野ではよく理解されており、製剤に基づいて限定する必要はない。通常、このような組成物は、注射用として液体溶液または懸濁液のどちらかとして調製されるが、使用前には液体中の溶液または懸濁液に適した固体を調製することもできる。また、調製物を乳化することもできる。活性成分は、薬剤として許容され活性成分と適合する賦形剤と、本明細書に記載の治療方法で使用するのに適した量で混合することができる。好適な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなどおよびそれらの組合せである。

#### 【0082】

さらに、必要に応じて、組成物は、少量の湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などの活性成分の有効性を増強する補助物質を含有することができる。本発明の治療用組成物には、組成物中の成分の薬剤として許容される塩を含むことができる。薬剤として許容される塩には、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機塩、または酢酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸により生成する酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基により生成）が含まれる。また、遊離カルボキシル基により生成する塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することができる。環状ポリペプチド  $\nu$  アンタゴニストの調製で使用する場合にはHCl塩が特に好ましい。生理学的に耐容性のある担体は、当技術分野でよく知られている。液体担体の例は、活性成分および水の他には材料を一切含有しない、または生理的pH値のリン酸ナトリウムなどの緩衝液、生理的食塩水もしくはリン酸緩衝食塩水などの両者を含有する無菌水溶液である。さらに、水性担体は、2種類以上の緩衝塩、ならびに塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなどの塩、ブドウ糖、ポリエチレングリコールおよび他の溶質を含有することができる。また、液体組成物は、水の他に、および水ではない液相を含有することができる。このような追加の液相の例は、グリセリン、綿実油などの植物油、および水-油エマルジョンである。

#### 【0083】

通常、例えば抗Erbb2受容体抗体もしくは抗体フラグメントもしくは抗体複合体または抗血管新生受容体抗体、フラグメントもしくは複合体の形態である免疫療法剤の治療上有効な量は、生理学的に耐容性のある組成物で投与した場合に、1ミリリットル（ml）当たり約0.01マイクログラム（ $\mu\text{g}$ ）から約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、通常は約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の血漿中濃度を得るのに十分な量である。換言すれば、用量は、1日または数日間に1日1回または複数回の投与において約0.

1 mg / kg から約 300 mg / kg まで、好ましくは約 0.2 mg / kg から約 200 mg / kg まで、最も好ましくは約 0.5 mg / kg から約 20 mg / kg まで変化することができる。免疫療法剤がモノクローナル抗体のフラグメントまたは複合体の形態である場合には、全抗体の質量に対するフラグメント / 複合体の質量に基づき、量を容易に調整することができる。好ましい血漿中濃度のモル濃度は、約 2 マイクロモル (μM) から約 5 ミリモル (mM) まで、好ましくは約 100 μM から 1 mM までの抗体アンタゴニストである。通常、非免疫療法ペプチドもしくはタンパク質ポリペプチド (例えば IFN-アルファ) またはその他の大きさの類似した小分子である本発明による薬剤の治療上有効な量は、生理学的に耐容性のある組成物で投与した場合に、1 ミリリットル (ml) 当たり約 0.1 マイクログラム (μg) から約 200 μg / ml、好ましくは約 1 μg / ml から約 150 μg / ml の血漿中濃度を得るのに十分なポリペプチドの量である。1 モル当たり約 500 グラムの質量を有するポリペプチドに基づくと、好ましい血漿中濃度のモル濃度は、約 2 マイクロモル (μM) から約 5 ミリモル (mM) まで、好ましくは約 100 μM から 1 mM までのポリペプチドアンタゴニストである。本発明による化学的アンタゴニストまたは (化学的) 化学療法剤であることが好ましい (免疫療法剤または非免疫療法ペプチド / タンパク質のどちらでもない) 活性薬剤の典型的用量は、1 日につき体重 1 kg 当たり 10 mg から 1000 mg、好ましくは約 20 から 200 mg、より好ましくは 50 から 100 mg である。

#### 【0084】

用語「治療上有効な」または「治療上有効な量」は、哺乳類において疾患または傷害を治療するのに有効な薬物の量を指す。癌の場合には、治療上有効な量の薬物は、癌細胞の数を減少させ；癌の大きさを縮小し；周辺器官への癌細胞浸潤を阻害し (すなわち、ある程度遅延させる、好ましくは止める)；腫瘍成長をある程度阻害し；および / または癌に伴う 1 つまたは複数の症状をある程度軽減することができる。薬物が成長を妨げおよび / または既存の癌細胞を死滅させる限り、その薬物は細胞増殖抑制性でおよび / または細胞傷害性である。癌治療の場合、例えば、疾患進行までの時間 (TTP) を評価し、および / または反応速度 (RR) を決定することにより有効性を測定することができる。

#### 【実施例】

#### 【0085】

実施例：下記は短い臨床試験報告である：

患者は 45 歳で当初から上顎の進行性扁平上皮細胞癌に苦しんでいた。

#### 【0086】

EMD 72000：モノクローナルヒト抗体 425 (h425)、Merck KgaA、Germany

EMD 121974：シクロ - (Arg - Gly - Asp - DPhe - NMeVal)、シレンギチド (Cilengitide) (登録商標)、Merck KgaA、Germany；

化学療法：各種 (ゲムシタピン、シスプラチンなど)

病歴および例外的使用の治療開始時における臨床所見 / 状況：

1997 年 7 月、患者は初めて Virchow Klinikum、Germany を訪れた。上顎内の疑わしい大きな腫瘍の生検を行った。組織像は、T4 N0 M0 に分類される扁平上皮細胞癌を示した。1997 年 8 月 5 日、上顎の部分切除および局所リンパ節の切除を行った。組織像は、腫瘍が完全に除去されなかったことを示したため、同じ入院中に追加の切除を行った。組織学的分類が芳しくないため、患者は、1997 年 9 月から 10 月までに最高 50.4 グレイまでの術後放射線療法を受けた。

#### 【0087】

1998 年 7 月、疾患の進行が疑われ入院した。今度は組織像が腺扁平上皮癌を示した。放射線治療士に相談後、別の放射線療法を勧められ、1998 年 8 月に開始した。同時に放射線増感剤としてゲムシタピン (100 mg) を用い患者を治療した。6 週間の治療により完全な臨床的緩解に至った。併用放射線 - 化学療法の後、患者は 1000 mg ゲムシタピン (16 回の投与を 5 サークル) による治療を受けた。

## 【0088】

1999年3月、癌の進行が再び起こり、追加の放射線療法および腫瘍の緩和切除を行った。1999年8月、再び腫瘍が進行し、シスプラチン(75 mg/m<sup>2</sup>)およびドセタキセル(75 mg/m<sup>2</sup>)による化学療法を開始した。3回の投与後、腫瘍成長に対する効果がないために治療を中止した。

## 【0089】

大きな腫瘍塊からのびまん性出血により、赤血球濃縮物の頻繁な輸血が必要となった。

## 【0090】

抗血管新生剤/化学療法剤による例外的使用治療の経過：

EMD121974(600 mg/m<sup>2</sup>)およびゲムシタピン(ジェムザール)(1000 mg/m<sup>2</sup>)による治療の下で、1999年11月、腫瘍の退縮が診断された。2000年1月中旬から、患者は右耳で再び聞き取れるようになり、1999年12月に比べると30%以上も口を開けられるようになった。腫瘍の表面は肉芽形成および創傷治癒の徴候を示した。出血は止まり、さらに輸血する必要はなかった。

## 【0091】

1999年11月17日から2000年3月30日まで、EMD121974およびジェムザールで患者を治療した。2000年4月6日から2000年4月28日まで、腫瘍の進行が認められたため、EMD121974、ジェムザールならびに5-FU、シスプラチンおよびレスキュボリン(rescuvolin)による化学療法を患者に施した。血液毒性のために化学療法治療を中止し、シレンギチド治療を単独で続けた。2000年4月から6月まで、1週間に2度EMD121974 600 mg/m<sup>2</sup>を患者に投与したが疾患が安定したに過ぎなかった。

## 【0092】

数週間後に患者の状態が悪化し、EMD121974を1200 mg/m<sup>2</sup>に増量して1週間に2回患者を治療した。

## 【0093】

h425 + シレンギチド + 化学療法剤による治療：

2000年11月、デキサメタゾン/マレイン酸ジメチンデン(フェニスティル(Fenistil))およびラニチジン(ザンティック(Zantac))の前投与の後、まずEMD72000を200 mgの用量(30分にわたる注入)で投与した。1週間後、さらにゲムシタピン(1000 mg/m<sup>2</sup>)を患者に投与した。1週間の治療スケジュールは：月曜日：シレンギチド1200 mg/m<sup>2</sup>(1時間の注入)、木曜日EMD72000 200 mg(30分の注入)と、続いてゲムシタピン1000 mg/m<sup>2</sup>(1時間の注入)、金曜日シレンギチド1200 mg/m<sup>2</sup>(1時間の注入)。この治療の下で、腫瘍塊のクレーター様崩壊が観察された。腫瘍塊を外科的に何度か除去した。治療する医師には併用療法の効果が非常に印象的に見えた。EMD121974およびEMD72000に関連した有害薬物反応は一切観察されなかった。今日まで患者の状態は改善されたままであった。

## 【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  
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/055106 A2**

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/395**, 47/48, A61P 35/00, 35/04 // (A61K 39/395, 38:08) (A61K 39/395, 31:00)
- (21) International Application Number: PCT/EP01/15241
- (22) International Filing Date:  
21 December 2001 (21.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
01100507.1 9 January 2001 (09.01.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **GOODMAN, Simon** [GB/DE]; Friedrich-Libert-Straße 102a, 64327 Friesheim (DE); **KREYSCH, Hans-Georg** [DE/DE]; Burgunderweg 16, 55130 Mainz (DE).
- (74) Common Representative: **MERCK PATENT GMBH**; Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (81) Designated States (national): 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, PI, PL, 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, NE, SN, TD, TG).
- Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- 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 02/055106 A2

(54) Title: COMBINATION THERAPY USING RECEPTOR TYROSINE KINASE INHIBITORS AND ANGIOGENESIS INHIBITORS

(57) Abstract: The invention relates to a combination therapy for the treatment of tumors and tumor metastases comprising administration of receptor tyrosine kinase antagonists/inhibitors, especially ErbB receptor antagonists, more preferably EGF receptor (Her 1) antagonists and anti-angiogenic agents, preferably integrin antagonists, optionally together with agents or therapy forms that have additive or synergistic efficacy when administered together with said combination of antagonists/inhibitors, such as chemotherapeutic agents and/or radiation therapy. The therapy can result in a synergistic potential increase of the inhibition effect of each individual therapeutic on tumor cell proliferation, yielding more effective treatment than found by administering an individual component alone.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

**COMBINATION THERAPY USING RECEPTOR TYROSINE KINASE INHIBITORS  
AND ANGIOGENESIS INHIBITORS**

**TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION:**

5 The invention relates to a combination therapy for the treatment of tumors and tumor metastases comprising administration of receptor tyrosine kinase antagonists/  
inhibitors, especially ErbB receptor antagonists, more preferably EGF receptor (Her 1)  
antagonists and anti-angiogenic agents, preferably integrin antagonists, optionally  
together with agents or therapy forms that have additive or synergistic efficacy when  
10 administered together with said combination of antagonists/inhibitors, such as  
chemotherapeutic agents and or radiation therapy. The therapy can result in  
a synergistic potential increase of the inhibition effect of each individual therapeutic on  
tumor cell proliferation, yielding more effective treatment than found by administering  
an individual component alone.

15

**BACKGROUND OF THE INVENTION:**

The epidermal growth factor receptor (EGF receptor or EGFR), also known as *c-erbB1/Her 1*, and the product of the *neu* oncogene (also known as *c-erbB2/Her 2*) are the members of the EFG receptor super family, which belongs to the large family of  
20 receptor tyrosine kinases. They interact at the cell surface with specific growth factors or natural ligands, such as EGF or TGF alpha, thus, activating the receptor tyrosine kinase. A cascade of downstream signaling proteins are activated in general leading to altered gene expression and increased growth rates.

C-erbB2 (Her 2) is a transmembrane tyrosine kinase having a molecular weight of  
25 about 185.000, with considerable homology to the EGF receptor (Her 1), although a specific ligand for Her 2 has not yet been clearly identified so far.

The EGF receptor is a transmembrane glycoprotein which has a molecular weight of 170.000, and is found on many epithelial cell types. It is activated by at least three  
ligands, EGF, TGF- $\alpha$  (transforming growth factor alpha) and amphiregulin. Both  
30 epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor-alpha (TGF-a) have been demonstrated to bind to EGF receptor and to lead to cellular proliferation and tumor growth. These growth factors do not bind to Her 2 (Ulrich and Schlesinger, 1990, Cell 61, 203). In contrast to several families of growth factors, which induce

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 2 -

receptor dimerization by virtue of their dimeric nature (e.g. PDGF) monomeric growth factors, such as EGF, contain two binding sites for their receptors and, therefore, can cross-link two neighboring EGF receptors (Lemmon et al., 1997, EMBO J. 16, 281). Receptor dimerization is essential for stimulating of the intrinsic catalytic activity and  
5 for the autophosphorylation of growth factor receptors. It should be remarked that receptor protein tyrosine kinases (PTKs) are able to undergo both homo- and heterodimerization.

Clinical studies indicate that both EGF receptor and c-erbB2 are overexpressed in certain types of tumors, especially, breast, ovary, bladder, colon, kidney, head and  
10 neck cancers and squamous carcinomas of the lung. (Mendelsohn, 1989, Cancer Cells 7, 359; Mendelsohn, 1990, Cancer Biology 1, 339). Therefore, these observations have stimulated preclinical investigations targeting on inhibiting the function of human EGF receptors or c-erbB2 as novel therapeutic approaches to treat cancer (see e.g. Baselga et al., 1996, J. Clin. Oncol. 14, 737; Fan and  
15 Mendelsohn, 1998, Curr. Opin. Oncol. 10, 67). It has been reported that, for example, anti-EGF receptor antibodies as well as anti-Her 2 antibodies show fruitful results in human cancer therapy. Thus, humanized monoclonal antibody 4D5 (hMAb 4D5, HERCEPTIN<sup>®</sup>) is already a commercialized product.

It has been demonstrated that anti-EGF receptor antibodies while blocking EGF and  
20 TGF- $\alpha$  binding to the receptor appear to inhibit tumor cell proliferation. In view of these findings, a number of murine and rat monoclonal antibodies against EGF receptor have been developed and tested for their ability inhibit the growth of tumor cells in vitro and in vivo (Modjtahedi and Dean, 1994, *J. Oncology* 4, 277). Humanized monoclonal antibody 425 (hMAb 425) (US 5,558,864; EP 0531 472) and chimeric  
25 monoclonal antibody 225 (cMAb 225) (Naramura et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother. 37, 343-349, WO 96/40210), both directed to the EGF receptor, have shown their efficacy in clinical trials. The C225 antibody was demonstrated to inhibit EGF-mediated tumor cell growth in vitro and inhibit human tumor formation in vivo in nude mice. The antibody, moreover, appeared to act, above all, in synergy  
30 with certain chemotherapeutic agents (i.e., doxorubicin, adriamycin, taxol, and cisplatin) to eradicate human tumors in vivo in xenograft mouse models. Ye et al.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 3 -

(1999, Oncogene 18, 731) have reported that human ovarian cancer cells can be treated successfully with a combination of both cMAb 225 and hMAb 4D5.

Angiogenesis, also referred to as neovascularization, is a process of tissue vascularization that involves the growth of new blood vessels into a tissue. The process is mediated by the infiltration of endothelial cells and smooth muscle cells. The process is believed to proceed in any one of three ways: (1) the vessels can sprout from pre-existing vessels; (2) de novo development of vessels can arise from precursor cells (vasculogenesis); or (3) existing small vessels can enlarge in diameter (Blood et al., 1990, Bioch. Biophys. Acta 1032, 89. Vascular endothelial cells are known to contain at least five RGD-dependent integrins, including the vitronectin receptor ( $\alpha_v\beta_3$  or  $\alpha_v\beta_5$ ), the collagen Types I and IV receptor, the laminin receptor, the fibronectin/laminin/collagen receptor and the fibronectin receptor (Davis et al., 1993, J. Cell. Biochem. 51, 206). The smooth muscle cell is known to contain at least six RGD-dependent integrins, including  $\alpha_v\beta_3$   $\alpha_v\beta_5$ .

Inhibition of cell adhesion in vitro using monoclonal antibodies immunospecific for various integrin  $\alpha$  or  $\beta$  subunits have implicated the vitronectin receptor  $\alpha_v\beta_3$  in cell adhesion of a variety of cell types including microvascular endothelial cells (Davis et al., 1993, J. Cell. Biol. 51, 206).

Integrins are a class of cellular receptors known to bind extracellular matrix proteins, and mediate cell-extracellular matrix and cell-cell interactions, referred generally to as cell adhesion events. The integrin receptors constitute a family of proteins with shared structural characteristics of non-covalent heterodimeric glycoprotein complexes formed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. The vitronectin receptor, named for its original characteristic of preferential binding to vitronectin, is now known to refer to three different integrins, designated  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$ .  $\alpha_v\beta_1$  binds fibronectin and vitronectin.  $\alpha_v\beta_3$  binds a large variety of ligands, including fibrin, fibrinogen, laminin, thrombospondin, vitronectin and von Willebrand's factor.  $\alpha_v\beta_5$  binds vitronectin. It is clear that there are different integrins with different biological functions as well as different integrins and subunits having shared biological specificity and function. One important recognition site in a ligand for many integrins is the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) tripeptide sequence. RGD is found in all of the ligands identified

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 4 -

above for the vitronectin receptor integrins. This RGD recognition site can be mimicked by linear and cyclic (poly)peptides that contain the RGD sequence. Such RGD peptides are known to be inhibitors or antagonists, respectively, of integrin function. It is important to note, however, that depending upon the sequence and structure of the RGD peptide, the specificity of the inhibition can be altered to target specific integrins. Various RGD polypeptides of varying integrin specificity have been described, for example, by Cheresh, et al., 1989, Cell 58, 945, Aumailley et al., 1991, FEBS Letts. 291, 50, and in numerous patent applications and patents (e.g. US patents 4,517,686, 4,578,079, 4,589,881, 4,614,517, 4,661,111, 4,792,525; EP 0770 622).

The generation of new blood vessels, or angiogenesis, plays a key role in the growth of malignant disease and has generated much interest in developing agents that inhibit angiogenesis (see, for example, Holmgren et al., 1995, Nature Medicine 1, 149; Folkman, 1995, Nature Medicine 1, 27; O'Reilly et. al., 1994, Cell 79, 315). The use of  $\alpha_v\beta_3$  integrin antagonists to inhibit angiogenesis is known in methods to inhibit solid tumor growth by reduction of the blood supply to the solid tumor (see, for example, US 5,753,230 and US 5,766,591, which describe the use of  $\alpha_v\beta_3$  antagonists such as synthetic polypeptides, monoclonal antibodies and mimetics of  $\alpha_v\beta_3$  that bind to the  $\alpha_v\beta_3$  receptor and inhibit angiogenesis). Methods and compositions for inhibiting  $\alpha_v\beta_3$  mediated angiogenesis of tissues using antagonists of the vitronectin receptor  $\alpha_v\beta_3$  are disclosed in WO 97/45447. Angiogenesis is characterized by invasion, migration and proliferation of endothelial cells, processes that depend on cell interactions with extracellular matrix components. In this context, the integrin cell-matrix receptors mediate cell spreading and migration. The endothelial adhesion receptors of integrin  $\alpha_v\beta_3$  were shown to be key players by providing a vasculature-specific target for anti-angiogenic treatment strategies (Brooks et al., 1994, Science 264, 569; Friedlander et. al., 1995, Science 270). The requirement for vascular integrin  $\alpha_v\beta_3$  in angiogenesis was demonstrated by several in vivo models where the generation of new blood vessels by transplanted human tumors was entirely inhibited either by systemic administration of peptide antagonists of integrin  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$ , as indicated above, or, alternatively, by anti-  $\alpha_v\beta_3$  antibody



WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 5 -

LM609 (Brooks et al., 1994, Cell 79, 1157; ATCC HB 9537). This antibody blocks the  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor the activation of which by its natural ligands promotes apoptosis of the proliferative angiogenic vascular cells and thereby disrupts the maturation of newly forming blood vessels, an event essential for the proliferation of tumors.

- 5 Nevertheless, it was recently reported, that melanoma cells could form web-like patterns of blood vessels even in the absence of endothelial cells (1999, Science 285, 14), implying that tumors might be able to circumvent some anti-angiogenic drugs which are only effective in the presence of endothelial tissue.
- 10 Numerous molecules stimulate endothelial proliferation, migration and assembly, including VEGF, Ang1 and bFGF, and are vital survival factors. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) has been identified as a selective angiogenic growth factor that can stimulate endothelial cell mitogenesis. VEGF, in particular, is thought to be a major mediator of angiogenesis in a primary tumor and in ischemic ocular
- 15 diseases. VEGF is a homodimer (MW : 46.000) that is an endothelial cell-specific angiogenic (Ferrara et al., 1992, Endocrin. Rev., 13, 18) and vasopermeability factor (Senger et al., 1986, Cancer Res., 46:5629) that binds to high-affinity membrane-bound receptors with tyrosine kinase activity (Jakeman et al., 1992, J. Clin. Invest., 89, 244). Human tumor biopsies exhibit enhanced expression of
- 20 VEGF mRNAs by malignant cells and VEGF receptor mRNAs in adjacent endothelial cells. VEGF expression appears to be greatest in regions of tumors adjacent to vascular areas of necrosis. (for review see Thomas et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(2), 603; Folkman, 1995, Nature Medicine 1, 27). WO 97/45447 has implicated the  $\alpha_v\beta_3$  integrin in neovascularization, particularly, that induced by VEGF, EGF and TGF-
- 25  $\alpha$ , and discloses that  $\alpha_v\beta_3$  antagonist can inhibit VEGF promoted angiogenesis. Effective anti-tumor therapies may also utilize targeting VEGF receptor for inhibition of angiogenesis using monoclonal antibodies. (Witte et al., 1998, Cancer Metastasis Rev. 17(2), 155). MAb DC-101 is known to inhibit angiogenesis of tumor cells.
- 30 As summarized above it is evident that EGF, VEGF and integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  and their receptors are basically involved in tumor proliferation and tumor angiogenesis, and that effective inhibitors, especially monoclonal antibodies, directed to EGF

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 6 -

receptor and/or VEGF receptor and/or integrin receptors or any other protein tyrosine kinase receptors are principally suitable candidates for tumor therapy. Monoclonal antibodies which can specifically recognize their antigen epitopes on the relevant receptors, are of special interest.

5 However, the use of such antibodies, which were successful in vitro and in animal models, have not shown satisfying efficacy in patients as mono-drug therapy. Similar results were obtained when other anti-angiogenic or EGF receptor antagonists than antibodies were used in clinical trials. It seems, that tumors, if some specific sites are  
10 blocked, may use other cell surface molecules to compensate for said original blocking. Thus, tumors do not really shrink during various anti-angiogenic or anti-proliferative therapies. For these reasons, combination therapies were proposed to circumvent this problem using monoclonal antibodies together with cytotoxic or chemotherapeutic agents or in combination with radiotherapy. Indeed, clinical trials  
15 have shown that these combination therapies are more efficient than the corresponding mono-administrations. Thus, for example, antibody-cytokine fusion protein therapies have been described which promote immune response-mediated inhibition of established tumors such as carcinoma metastases. For example, the cytokine interleukin 2 (IL-2) has been fused to specific monoclonal antibodies KS1/4  
20 and ch14.18 directed to the tumor associated antigens epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM, KSA, KS1/4 antigen) or the disialoganglioside GD, respectively, to form the fusion proteins ch14.18-IL-2 and KS1/4-IL-2, respectively (US 5,650,150). Another clinical approach is based on the administration of monoclonal antibody c225 in combination with Herceptin® (Ye et al, 1999, I.c.). Furthermore, the combination of  
25 anti-EGF receptor antibodies together with anti-neoplastic agents, such as cisplatin or doxorubicin, was disclosed in EP 0667 165 (A1) and US 6,217,866; a similar combination, especially a combination of Herceptin® with cisplatin and other cytotoxic factors, was described in Genentech's US 5,770,195. Synergy effects between an anti-angiogenic integrin  $\alpha_v$  antagonist and above-mentioned antibody-cytokine fusion  
30 proteins were observed in tumor metastases (Lode et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 1591, WO 00/47228). Methods of using integrin antagonists together with anti-neoplastic agents were recently claimed in WO 00/38665. Recently, it was found that

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 7 -

a combination of gemcitabine with specific monoclonal antibody DC-101, which inhibits angiogenesis, increased the anti-tumor effect in pancreatic cancer of mice compared with gemcitabine alone. DE 198 42415 discloses the combination of a specific cyclic RGD peptide as integrin inhibitor with specific anti-angiogenesis agents. Other approaches suggest the administration of EGF receptor blocking agents, antibodies included, or integrin antagonists combined with radiation or radiotherapy, respectively (e.g. WO 99/60023, WO 00/0038715).

Nevertheless, although various combinations therapies are under investigation and in clinical trials, the outcome of these therapies are not fruitful enough. Therefore, it is a need to develop further combinations which can show increased efficacy and reduced side-effects.

**SUMMARY OF THE INVENTION:**

The present inventions describes for the first time a novel pharmaceutical treatment which is based on the new concept in tumor therapy to administer to an individual in a therapeutically effective amount an agent that blocks or inhibits a receptor tyrosine kinase, preferably an ErbB receptor and more preferably an EGF receptor together with an anti-angiogenic agent. Optionally the composition according to this invention may comprise further therapeutically active compounds, preferably selected from the group consisting of cytotoxic agents, chemotherapeutic agents and other pharmacologically active compounds which may enhance the efficacy of said agents or reduce the side effects of said agents.

Thus, the invention relates to pharmaceutical compositions comprising as preferred ErbB receptor antagonists an anti-EGFR (ErbB1 / Her 1) antibody and as anti-angiogenic agent an inhibitor or antagonist of any of the  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  or  $\alpha_v\beta_6$  integrin receptors, preferably an RGD containing linear or cyclic peptide. Especially, the inventions relates, as a preferred embodiment, to a specific combination therapy comprising anti-EGFR or anti-Her2 antibodies, such as humanized monoclonal antibody 425 (h425, EMD 72000), chimeric monoclonal antibody 225 (c225) or Herceptin<sup>®</sup> together with preferably RGD-containing integrin inhibitors, most

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 8 -

preferably with the cyclic peptide cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMe-Val), optionally together with a chemotherapeutic compound.

According to this invention said therapeutically active agents may also be provided by  
5 means of a pharmaceutical kit comprising a package comprising one or more receptor tyrosine kinase antagonists, one or more anti-angiogenic agents, and optionally, one or more cytotoxic / chemotherapeutic agents in single packages or in separate containers. The therapy with this combinations may include optionally treatment with radiation.

10

However, the invention relates, furthermore, to a combination therapy comprising the administration of only one (fusion) molecule, having anti-receptor tyrosine kinase, preferably anti-ErbB receptor activity and anti-angiogenic activity, optionally together with one or more cytotoxic / chemotherapeutic agents. An example is an anti-EGFR  
15 antibody, such as h425 or c225 as described above and below, which is fused at the C-terminal of its Fc portion to an anti-hormonal agent by known recombinant or chemical methods. A further example is a bispecific antibody, wherein one specificity is directed to an nuclear hormone receptor and the other one is directed to the EGF receptor.

20

Principally, the administration can be accompanied by radiation therapy, wherein radiation treatment can be done substantially concurrently or before or after the drug administration. The administration of the different agents of the combination therapy according to the invention can also be achieved substantially concurrently or  
25 sequentially. Tumors, bearing receptors on their cell surfaces involved in the development of the blood vessels of the tumor, may be successfully treated by the combination therapy of this invention.

It is known that tumors elicit alternative routes for their development and growth. If  
30 one route is blocked they often have the capability to switch to another route by expressing and using other receptors and signaling pathways. Therefore, the pharmaceutical combinations of the present invention may block several of such

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 9 -

possible development strategies of the tumor and provide consequently various benefits. The combinations according to the present invention are useful in treating and preventing tumors, tumor-like and neoplasia disorders and tumor metastases, which develop and grow by activation of their relevant hormone receptors which are present on the surface of the tumor cells. Preferably, the different combined agents of the present invention are administered in combination at a low dose, that is, at a dose lower than has been conventionally used in clinical situations. A benefit of lowering the dose of the compounds, compositions, agents and therapies of the present invention administered to an individual includes a decrease in the incidence of adverse effects associated with higher dosages. For example, by the lowering the dosage of an agent described above and below, a reduction in the frequency and the severity of nausea and vomiting will result when compared to that observed at higher dosages. By lowering the incidence of adverse effects, an improvement in the quality of life of a cancer patient is contemplated. Further benefits of lowering the incidence of adverse effects include an improvement in patient compliance, a reduction in the number of hospitalizations needed for the treatment of adverse effects, and a reduction in the administration of analgesic agents needed to treat pain associated with the adverse effects. Alternatively, the methods and combination of the present invention can also maximize the therapeutic effect at higher doses.

20 Tumors, bearing (over-expressed) ErbB receptors, preferably ErbB1 (Her1, EGFR) or ErbB2 (Her 2) receptors on their cell surfaces, may be successfully treated by the combinations according to the inventions. The combinations within the pharmaceutical treatment according to the inventions show an astonishing synergetic effect. In administering the combination of drugs real tumor shrinking and disintegration could be observed during clinical studies while no significant adverse drug reactions were detectable. Above all, the three-drug combinations (receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking agent plus anti-angiogenic agent plus chemotherapeutic agent) show superior efficacy. However, whether a  
30 chemotherapeutic drug is synergistically effective or not depends on the drug itself, the receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor antagonist and the tumor cell that is treated with said agents, and must be usually checked case by case.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 10 -

In detail the invention refers to:

- a pharmaceutical composition comprising an agent or agents having
  - (i) at least one receptor tyrosine kinase blocking / inhibiting specificity and
  - (ii) at least one angiogenesis blocking / inhibiting specificity,wherein said agent or agents is / are not a cytokine immunoconjugate, optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or recipient;
- as a first alternative, a pharmaceutical comprising
  - (i) at least one agent having a receptor tyrosine kinase blocking specificity, and
  - (ii) at least one agent having an angiogenesis inhibiting specificity;
- as a second alternative, a pharmaceutical composition, comprising an agent having a receptor tyrosine kinase blocking specificity as well as an angiogenesis inhibiting specificity.
- corresponding compositions further comprising at least one cytotoxic, preferably chemotherapeutic agent;
- in more detail, a pharmaceutical composition, wherein said agent (i) has a ErbB receptor blocking / inhibiting specificity;
- a corresponding pharmaceutical composition, wherein the ErbB receptor specificity of said agent is related to the EGF receptor (ErbB1/Her1) or the ErbB2/Her2 receptor;
- in more detail, a pharmaceutical composition, wherein said agent is an antibody or a functionally intact derivative thereof, comprising a binding site which binds to an epitope of the ErbB1 (Her1) or Erb2 (Her2) receptor;
- as preferred embodiment, a pharmaceutical composition, wherein said antibody or functionally intact derivative thereof is selected from the group:
  - humanized monoclonal antibody 425 (h425)
  - chimeric monoclonal antibody 225 (c225)
  - humanized monoclonal antibody Her 2, the corresponding humanized, chimeric or de-immunized functionally intact derivatives included;
- a corresponding pharmaceutical composition, wherein said angiogenesis inhibiting agent is an  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  or an  $\alpha_v\beta_8$  integrin inhibitor;

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 11 -

- a corresponding pharmaceutical composition, wherein said integrin inhibitor is an RGD-containing linear or cyclic peptide, preferably cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal);
- 5 • as a specific embodiment, a pharmaceutical composition, wherein said antibody or functionally intact derivative thereof is humanized monoclonal antibody 425 (h425) or chimeric monoclonal antibody 225 (c225), de-immunized forms included, and said integrin inhibitor is cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), optionally comprising, optionally in separate containers or  
10 packages, a chemotherapeutic agent which is selected from any of the compounds of the group: cisplatin, doxorubicin, gemcitabine, docetaxel, paclitaxel, bleomycin;
- a corresponding pharmaceutical composition, wherein said integrin inhibitor is an antibody or a functionally intact derivative thereof, comprising a binding site which binds to an epitope of an integrin receptor, preferably selected from the  
15 group of antibodies: LM609, P1F6, 17E6, 14D9.F8, humanized, chimeric and de-immunized versions thereof included;
- a pharmaceutical composition, wherein one of said agents is a bispecific antibody or a heteroantibody molecule comprising a first binding site that binds to an epitope of a receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor, and a  
20 second binding site that binds to an epitope of an angiogenesis receptor, preferably an integrin receptor;
- a specific corresponding pharmaceutical composition, wherein said monoclonal antibodies are selected from h425, c225 or Her 2, and from the monoclonal antibodies LM609, P1F6, 17E6 and 14D9.F8;
- 25 • a pharmaceutical composition, wherein one of said agents is an immunoconjugate consisting of an antibody or antibody fragment, bearing one of said blocking specificities, and a non-immunological molecule, fused to the antibody or antibody fragment bearing the other specificity;
- 30 • a corresponding pharmaceutical composition, wherein the antibody portion or fragment thereof comprises a binding site that binds to an epitope of an ErbB receptor, preferably an EGF receptor (Her 1), and the fused non-immunological

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 12 -

molecule comprises a binding site that binds to an epitope of an integrin receptor;

- a specific pharmaceutical composition thereof, wherein said antibody portion which binds to an epitope of an ErbB receptor is selected from monoclonal antibodies h425, c225 or Her 2, and said non-immunological portion which binds to an epitope of an integrin receptor is cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal);
- a pharmaceutical kit comprising
  - (i) a package comprising at least one receptor tyrosine kinase inhibiting, preferably an ErbB receptor blocking agent, and
  - (ii) a package comprising at least one angiogenesis inhibiting agent, preferably an  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  or an  $\alpha_v\beta_6$  integrin receptor inhibiting agent, more preferably an RGD-containing linear or cyclic peptide, especially cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal);optionally further comprising a package comprising a cytotoxic agent;
- a corresponding pharmaceutical kit, wherein said ErbB receptor blocking agent is an antibody or a functionally intact derivative thereof, having a binding site that binds to an epitope of said receptor; said antibody is preferably selected from the group of antibodies: humanized monoclonal antibody 425 (h425), chimeric monoclonal antibody 225 (c225) or humanized monoclonal antibody Her 2;
- a pharmaceutical kit, wherein said angiogenesis inhibiting agent is an antibody or an active derivative thereof, preferably selected from the group of antibodies: LM609, P1H6, 17E6 and 14D9.F8;
- as specific embodiment of the invention, a specific pharmaceutical kit, comprising
  - (i) a package comprising humanized monoclonal antibody 425 (h425), chimeric monoclonal antibody 225 (c225), or a functionally intact derivative thereof, and
  - (ii) a package comprising cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), optionally comprising a chemotherapeutic agent which is selected from any of the compounds of the group: cisplatin, doxorubicin, gemcitabine, docetaxel, paclitaxel, bleomycin;



WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 13 -

- the use of a pharmaceutical composition or a pharmaceutical kit as defined above, below and in the claims, for the manufacture of a medicament to treat tumors and tumor metastases;
- a pharmaceutical treatment or method for treating tumors or tumor metastases in a patient comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of an agent or agents having
  - (i) at least one receptor tyrosine kinase blocking specificity and
  - (ii) at least one angiogenesis inhibiting specificity,wherein said agent or agents is / are not a cytokine immunoconjugate, optionally together with a cytotoxic, preferably chemotherapeutic agent, and wherein, preferably, said agent (i) is an antibody or a functionally intact derivative thereof, comprising a binding site which binds to an epitope of the ErbB receptor, preferably, ErbB1(Her1) or Erb2(Her2) receptor, and said agent (ii) is a  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  or an  $\alpha_v\beta_6$  integrin inhibitor or a VEGF receptor blocking agent; and finally
- a corresponding method, wherein said antibody directed to the ErbB receptor is selected from the group: humanized monoclonal antibody 425 (h425), chimeric monoclonal antibody 225 (c225) or humanized monoclonal antibody Her 2, and anti-angiogenic agent is cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), optionally together with a cytotoxic drug selected from the group: cisplatin, doxorubicin, gemcitabine, docetaxel, paclitaxel, bleomycin.

The pharmaceutical treatment using the pharmaceutical compositions and kits according to the invention may be accompanied, concurrently or sequentially, by a radiation therapy.

Principally, four different combinations of pharmaceutical compositions can be distinguished according to the invention:

- (i) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity combined with an agent comprising at least one anti-angiogenic activity (two-drug combination);

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 14 -

- (ii) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity combined with an agent comprising at least one anti-angiogenic activity and combined with at least one chemotherapeutic agent (three-drug combination);
- 5 (iii) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity as well as at least one anti-angiogenic activity combined in one molecule (one-drug combination having two-drug activity);
- (iv) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity as well as at least one anti-angiogenic activity
- 10 combined in one molecule, combined with at least one chemotherapeutic agent (two-drug combination having three-drug activity);
- The agents can be administered concurrently or sequentially in any of said cases. According to the above-said, the methods of the invention comprise, in principal, the following combinations of administration:
- 15 (i) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity combined with an agent comprising at least one anti-angiogenic activity (two-drug administration);
- (ii) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity combined with an agent comprising at least one
- 20 anti-angiogenic activity (two-drug administration) and radiotherapy;
- (iii) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity combined with an agent comprising at least one anti-angiogenic activity combined with at least one chemotherapeutic agent (three-drug administration);
- 25 (iv) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity combined with an agent comprising at least one anti-angiogenic activity combined with at least one chemotherapeutic agent (three-drug administration) and radiotherapy;
- (v) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB
- 30 receptor blocking activity / specificity as well as at least one anti-angiogenic activity combined in one molecule (one-drug administration having "two-drug activity");

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 15 -

- (vi) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity as well as at least one anti-angiogenic activity combined in one molecule (one-drug administration having "two-drug activity") and radiotherapy;
- 5 (vii) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity as well as at least one anti-angiogenic activity combined in one molecule combined with at least one chemotherapeutic agent (two-drug administration having "three-drug activity");
- 10 (viii) an agent comprising at least one receptor tyrosine kinase, preferably ErbB receptor blocking activity / specificity as well as at least one anti-angiogenic activity combined in one molecule combined with at least one chemotherapeutic agent (two-drug administration having "three-drug activity") and radiotherapy.

The pharmaceutical combinations and methods of the present invention provide  
15 various benefits. The combinations according to the present invention are useful in treating and preventing tumors, tumor-like and neoplasia disorders. Preferably, the different combined agents of the present invention are administered in combination at a low dose, that is, at a dose lower than has been conventionally used in clinical situations. A benefit of lowering the dose of the compounds, compositions, agents  
20 and therapies of the present invention administered to a mammal includes a decrease in the incidence of adverse effects associated with higher dosages. For example, by the lowering the dosage of a chemotherapeutic agent such as methotrexate, doxorubicin, gemcitabine, docetaxel, paclitaxel, bleomycin or cisplatin, a reduction in the frequency and the severity of nausea and vomiting will result when  
25 compared to that observed at higher dosages. Similar benefits are contemplated for the compounds, compositions, agents and therapies in combination with the integrin antagonists of the present invention. By lowering the incidence of adverse effects, an improvement in the quality of life of a cancer patient is contemplated. Further benefits of lowering the incidence of adverse effects include an improvement in  
30 patient compliance, a reduction in the number of hospitalizations needed for the treatment of adverse effects, and a reduction in the administration of analgesic agents needed to treat pain associated with the adverse effects.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 16 -

Alternatively, the methods and combination of the present invention can also maximize the therapeutic effect at higher doses.

## 5 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

If not otherwise pointed out the terms and phrases used in this invention have the meanings and definitions as given below. Moreover, these definitions and meanings describe the invention in more detail, preferred embodiments included.

10

A "**receptor**" or "**receptor molecule**" is a soluble or membrane bound / associated protein or glycoprotein comprising one or more domains to which a ligand binds to form a receptor-ligand complex. By binding the ligand, which may be an agonist or an antagonist the receptor is activated or inactivated and may initiate or block pathway signaling.

15

By "**ligand**" or "**receptor ligand**" is meant a natural or synthetic compound which binds a receptor molecule to form a receptor-ligand complex. The term ligand includes agonists, antagonists, and compounds with partial agonist/antagonist action.

20

An "**agonist**" or "**receptor agonist**" is a natural or synthetic compound which binds the receptor to form a receptor-agonist complex by activating said receptor and receptor-agonist complex, respectively, initiating a pathway signaling and further biological processes.

25

By "**antagonist**" or "**receptor antagonist**" is meant a natural or synthetic compound that has a biological effect opposite to that of an agonist. An antagonist binds the receptor and blocks the action of a receptor agonist by competing with the agonist for receptor. An antagonist is defined by its ability to block the actions of an agonist. A receptor antagonist may be also an antibody or an immunotherapeutically effective fragment thereof. Preferred antagonists according to the present invention are cited and discussed below.

30

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 17 -

An "**ErbB receptor**" is a receptor protein tyrosine kinase which belongs to the ErbB receptor family and includes EGFR(ErbB1), ErbB2, ErbB3 and ErbB4 receptors and other members of this family to be identified in the future. The ErbB receptor will generally comprise an extracellular domain, which may bind an ErbB ligand; a lipophilic transmembrane domain; a conserved intracellular tyrosine kinase domain; and a carboxyl-terminal signaling domain harboring several tyrosine residues which can be phosphorylated. The ErbB receptor may be a "native sequence" ErbB receptor or an "amino acid sequence variant" thereof. Preferably the ErbB receptor is native sequence human ErbB receptor. ErbB1 refers to the gene encoding the EGFR protein product. Mostly preferred is the EGF receptor (Her 1). The expressions "ErbB1" and "Her 1" are used interchangeably herein and refer to human Her 1 protein. The expressions "ErbB2" and "Her 2" are used interchangeably herein and refer to human Her 2 protein. ErbB1 receptors (EGFR) are preferred according to this invention

15 "**ErbB ligand**" is a polypeptide which binds to and/or activates an ErbB receptor. ErbB ligands which bind EGFR include EGF, TGF- $\alpha$ , amphiregulin, betacellulin, HB-EGF and epiregulin.

The term "**tyrosine kinase antagonist/inhibitor**" refers to natural or synthetic agents that are enabled to inhibit or block tyrosine kinases, receptor tyrosine kinases included, which are of specific interest of this invention. Thus, the term includes "*ErbB receptor antagonists / inhibitors*", which are defined below in more detail. With exception of these antagonists, preferably anti-ErbB receptor antibodies additionally suitable tyrosine kinase antagonists of the invention are chemical compounds which have shown efficacy in mono- drug therapy for, e.g., breast and prostate cancer. Suitable indolocarbazole-type tyrosine kinase inhibitors can be obtained using information found in documents such as US patents 5,516,771; 5,654,427; 5,461,146; 5,650,407. US patents 5,475,110; 5,591,855; 5,594,009 and WO 96/11933 disclose pyrrolocarbazole-type tyrosine kinase inhibitors and prostate cancer. Preferably, the dosage of the chemical tyrosine kinase inhibitors as defined above is from 1  $\mu$ g/kg to 1 g/kg of body weight per day. More preferably, the dosage of tyrosine kinase inhibitors is from 0.01 mg/kg to 100 mg/kg of body weight per day.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 18 -

The term "**ErbB receptor antagonist / inhibitor**" refers to a natural or synthetic molecule which binds and blocks or inhibits the ErbB receptor, and is therefore a member of the "*(receptor) tyrosine kinase antagonist/inhibitor*" family. Thus, by blocking the receptor the antagonist prevents binding of the ErbB ligand (agonist) and activation of the agonist/ligand receptor complex. ErbB antagonists may be directed to Her 1 (or EGFR / Her 1) or Her 2. Preferred antagonists of the invention are directed to the EGF receptor (EGFR, Her 1). The ErbB receptor antagonist may be an antibody or an immunotherapeutically effective fragment thereof or non-immunobiological molecules, such as a peptide, polypeptide protein. Chemical molecules are also included, however, anti-EGFR antibodies and anti-Her 2 antibodies are the preferred antagonists according to the invention.

Preferred antibodies of the invention are anti-Her1 and anti-Her2 antibodies, more preferably anti-Her1 antibodies. Preferred anti-Her1 antibodies are MAb 425, preferably humanized MAb 425 (hMAb 425, US 5,558,864; EP 0531 472) and chimeric MAb 225 (cMAb 225, US 4,943,533 and EP 0359 282). Most preferred is monoclonal antibody h425, which has shown in mono-drug therapy high efficacy combined with reduced adverse and side effects. Most preferred anti-Her2 antibody is HERCEPTIN<sup>®</sup> commercialized by Genentech/Roche.

Efficacious EGF receptor antagonists according to the invention may be also other natural or synthetic chemical compounds. Some examples of preferred molecules of this category include organic compounds, organometallic compounds, salts of organic and organometallic compounds.

Efficacious ErbB receptor antagonists according to the invention may be also small molecules. Small molecules of the invention are not biological molecules as defined above having a molecular weight of approximately not greater than 400. Preferably, they have no protein or peptide structure, and are most preferably synthetically produced chemical compounds. Some examples of preferred small molecules include organic compounds, organometallic compounds, salts of organic and organometallic compounds.

Numerous small molecules have been described as being useful to inhibit EGF receptor and / or Her 2 receptor. Examples are: styryl substituted heteroaryl compounds (US 5,656,655); bis mono and/or bicyclic aryl heteroaryl, carbocyclic, and

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 19 -

heterocarbocyclic compounds (US 5,646,153); tricyclic pyrimidine compounds (US 5,679,683); quinazoline derivatives having receptor tyrosine kinase inhibitory activity (US 5,616,582); heteroarylethenediyl or heteroarylethenediylaryl compounds (US 5,196,446); a compound designated as 6-(2,6-dichlorophenyl)-2-(4-(2-diethyl-  
5 aminoethoxy) phenylamino)-8-methyl-8H-pyrido(2,3)-5-pyrimidin-7-one (Panek, et al., 1997, J. Pharmacol. Exp. Therap. 283,1433) inhibiting EGFR, PDGFR, and FGFR families of receptors.

An "anti-angiogenic agent" refers to a natural or synthetic compound which blocks,  
10 or interferes with to some degree, the development of blood vessels. The anti-angiogenic molecule may, for instance, be a biological molecule that binds to and blocks an angiogenic growth factor or growth factor receptor. The preferred anti-angiogenic molecule herein binds to an receptor, preferably to an integrin receptor or to VEGF receptor. The term includes according to the invention also a prodrug of said  
15 angiogenic agent. There are a lot of molecules having different structure and origin which elicit anti-angiogenic properties. Most relevant classes of angiogenesis inhibiting or blocking agents which are suitable in this invention, are, for example:

- (i) anti-mitotics such as flurouracil, mytomycin-C, taxol;
- (ii) estrogen metabolites such as 2-methoxyestradiol;
- 20 (iii) matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors, which inhibit zinc metalloproteinases (metalloproteases) (e.g. betimastat, BB16, TIMPs, minocycline, GM6001, or those described in "Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Applications" (Golub, Annals of the New York Academy of Science, Vol. 878a; Greenwald, Zucker (Eds.), 1999);
- 25 (iv) anti-angiogenic multi-functional agents and factors such as IFN $\alpha$  (US 4,530,901; US 4,503,035; 5,231,176); angiostatin and plasminogen fragments (e.g. kringle 1-4, kringle 5, kringle 1-3 (O'Reilly, M. S. et al., *Cell (Cambridge, Mass.)* 79(2): 315-328, 1994; Cao et al., *J. Biol. Chem.* 271: 29461-29467, 1996; Cao et al., *J. Biol Chem* 272: 22924 -22928, 1997); endostatin (O'Reilly, M. S. et al., *Cell* 88(2),  
30 277, 1997 and WO 97/15666), thrombospondin (TSP-1; Frazier, 1991, *Curr Opin Cell Biol* 3(5): 792); platelet factor 4 (PF4);

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 20 -

- (v) plasminogen activator/urokinase inhibitors;
- (vi) urokinase receptor antagonists;
- (vii) heparinases;
- (viii) fumagillin analogs such as TNP-470;
- 5 (ix) tyrosine kinase inhibitors such as SU1 01 (many of the above and below - mentioned ErbB receptor antagonists (EGFR / Her 2 antagonists) are also tyrosine kinase inhibitors, and may show, therefore anti-EGF receptor blocking activity which results in inhibiting tumor growth, as well as anti-angiogenic activity which results in inhibiting the development of blood vessels and endothelial cells, respectively);
- 10 (x) suramin and suramin analogs;
- (xi) angiostatic steroids;
- (xii) VEGF and bFGF antagonists;
- (xiii) VEGF receptor antagonists, such as anti-VEGF receptor antibodies (DC-101);
- (xiv) flk-1 and flt-1 antagonists;
- 15 (xv) cyclooxygenase-II inhibitors such as COX-II;
- (xvi) integrin antagonists and integrin receptor antagonists such as  $\alpha v$  antagonists and  $\alpha v$  receptor antagonists, for example, anti- $\alpha v$  receptor antibodies and RGD peptides. Integrin (receptor) antagonists are preferred according to this invention.

20

The term "**integrin antagonists / inhibitors**" or "**integrin receptor antagonists / inhibitors**" refers to a natural or synthetic molecule that blocks and inhibit an integrin receptor. In some cases, the term includes antagonists directed to the ligands of said integrin receptors (such as for  $\alpha_v\beta_3$ : vitronectin, fibrin, fibrinogen, von Willebrand's factor, thrombospondin, laminin; for  $\alpha_v\beta_5$ : vitronectin; for  $\alpha_v\beta_1$ : fibronectin and vitronectin; for  $\alpha_v\beta_6$ : fibronectin). Antagonists directed to the integrin receptors are preferred according to the invention. Integrin (receptor) antagonists may be natural or synthetic peptides, non-peptides, peptidomimetics, immunoglobulins, such as antibodies or functional fragments thereof, or immunoconjugates (fusion proteins).

30 Preferred integrin inhibitors of the invention are directed to receptor of  $\alpha_v$  integrins (e.g.  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$  and sub-classes). Preferred integrin inhibitors are  $\alpha_v$  antagonists, and in particular  $\alpha_v\beta_3$  antagonists. Preferred  $\alpha_v$  antagonists according to



WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 21 -

the invention are RGD peptides, peptidomimetic (non-peptide) antagonists and anti-integrin receptor antibodies such as antibodies blocking  $\alpha_v$  receptors.

Exemplary, non-immunological  $\alpha_v\beta_3$  antagonists are described in the teachings of US 5,753,230 and US 5,766,591. Preferred antagonists are linear and cyclic RGD-  
5 containing peptides. Cyclic peptides are, as a rule, more stable and elicit an enhanced serum half-life. The most preferred integrin antagonist of the invention is, however, cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) (EMD 121974, Cilengitide<sup>®</sup>, Merck KgaA, Germany; EP 0770 622) which is efficacious in blocking the integrin receptors  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$ ,  $\alpha_{4b}\beta_3$ . Suitable peptidyl as well as peptidomimetic (non-  
10 peptide) antagonists of the  $\alpha_v\beta_3$  /  $\alpha_v\beta_5$  /  $\alpha_v\beta_8$  integrin receptor have been described both in the scientific and patent literature. For example, reference is made to Hoekstra and Poulter, 1998, Curr. Med. Chem. 5, 195; WO 95/32710; WO 95/37655; WO 97/01540; WO 97/37655; WO 97/45137; WO 97/41844; WO 98/08840; WO 98/18460; WO 98/18461; WO 98/25892; WO 98/31359; WO 98/30542; WO  
15 99/15506; WO 99/15507; WO 99/31061; WO 00/06169; EP 0853 084; EP 0854 140; EP 0854 145; US 5,780,426; and US 6,048,861. Patents that disclose benzazepine, as well as related benzodiazepine and benzocycloheptene  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor antagonists, which are also suitable for the use in this invention, include WO 96/00574, WO 96/00730, WO 96/06087, WO 96/26190, WO 97/24119, WO  
20 97/24122, WO 97/24124, WO 98/15278, WO 99/05107, WO 99/06049, WO 99/15170, WO 99/15178, WO 97/34865, WO 97/01540, WO 98/30542, WO 99/11626, and WO 99/15508. Other integrin receptor antagonists featuring backbone conformational ring constraints have been described in WO 98/08840; WO 99/30709; WO 99/30713; WO 99/31099; WO 00/09503; US 5,919,792; US 5,925,655; US  
25 5,981,546; and US 6,017,926. In US 6,048,861 and WO 00/72801 a series of nonanoic acid derivatives which are potent  $\alpha_v\beta_3$  integrin receptor antagonists were disclosed. Other chemical small molecule integrin antagonists (mostly vitronectin antagonists) are described in WO 00/38665. Other  $\alpha_v\beta_3$  receptor antagonists have been shown to be effective in inhibiting angiogenesis. For example, synthetic receptor  
30 antagonists such as (S)-10,11-Dihydro-3-[3-(pyridin-2-ylamino)-1-propyloxy]-5H-dibenz[ a,d]cycloheptene-10-acetic acid (known as SB-265123) have been tested in a variety of mammalian model systems. (Keenan et al., 1998, Bioorg. Med. Chem.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 22 -

Let. 8(22), 3171; Ward et al., 1999, Drug Metab. Dispos. 27(11),1232). Assays for the identification of integrin antagonists suitable for use as an antagonist are described, e.g. by Smith et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 12267, and in the referenced patent literature. Anti-integrin receptor antibodies are also well known. Suitable anti-integrin (e.g.  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ) monoclonal antibodies can be modified to encompass antigen binding fragments thereof, including F(ab)<sub>2</sub>, Fab, and engineered Fv or single-chain antibody. One suitable and preferably used monoclonal antibody directed against integrin receptor  $\alpha_v\beta_3$  is identified as LM609 (Brooks et al., 1994, Cell 79, 1157; ATCC HB 9537). A potent specific anti- $\alpha_v\beta_5$  antibody, P1F6, is disclosed in WO 97/45447, which is also preferred according to this invention. A further suitable  $\alpha_v\beta_5$  selective antibody is MAb 14D9.F8 (WO 99/37683, DSM ACC2331, Merck KGaA, Germany) as well as MAb 17.E6 (EP 0719 859, DSM ACC2160, Merck KGaA) which is selectively directed to the  $\alpha_v$ - chain of integrin receptors. Another suitable anti-integrin antibody is the commercialized Vitroxin®.

The term "antibody" or "immunoglobulin" herein is used in the broadest sense and specifically covers intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g. bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity. The term generally includes heteroantibodies which are composed of two or more antibodies or fragments thereof of different binding specificity which are linked together. Depending on the amino acid sequence of their constant regions, intact antibodies can be assigned to different "antibody (immunoglobulin) classes". There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into "subclasses" (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  and  $\mu$  respectively. Preferred major class for antibodies according to the invention is IgG, in more detail IgG1 and IgG2. Antibodies are usually glycoproteins having a molecular weight of about 150,000, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 23 -

isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intra-chain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (VH) followed by a number of constant domains. The variable regions comprise hypervariable regions or "CDR" regions, which contain the antigen binding site and are responsible for the specificity of the antibody, and the "FR" regions, which are important with respect to the affinity / avidity of the antibody. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (e.g. residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain; and/or those residues from a "hypervariable loop" (e.g. residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). The "FR" residues (frame work region) are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined. Each light chain has a variable domain at one end (VL) and a constant domain at its other end. The constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains. The "light chains" of antibodies from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa ( $\kappa$ ) and lambda ( $\lambda$ ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

The term "**monoclonal antibody**" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations which include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 24 -

other antibodies. Methods for making monoclonal antibodies include the hybridoma method described by Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256, 495) and in "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" (1985, Burdon et al., Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam), or may be

made by well known recombinant DNA methods (see, e.g., US 4,816,567). Monoclonal antibodies may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991), for example.

The term "**chimeric antibody**" means antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (e.g.: US 4,816,567; Morrison *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Methods for making chimeric and humanized antibodies are also known in the art. For example, methods for making chimeric antibodies include those described in patents by Boss (Celltech) and by Cabilly (Genentech) (US 4,816,397; US 4,816,567).

"**Humanized antibodies**" are forms of non-human (e.g., rodent) chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region (CDRs) of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 25 -

antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The

5 humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Methods for making humanized antibodies are described, for example, by Winter (US 5,225,539) and Boss (Celltech, US 4,816,397).

10 **"Antibody fragments"** comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen-binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv and Fc fragments, diabodies, linear antibodies, single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragment(s). An "intact" antibody is one which comprises an antigen-binding

15 variable region as well as a light chain constant domain (CL) and heavy chain constant domains, CH1, CH2 and CH3. Preferably, the intact antibody has one or more effector functions. Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called **"Fab"** fragments, each comprising a single antigen-binding site and a CL and a CH1 region, and a residual **"Fc"** fragment, whose name

20 reflects its ability to crystallize readily. The **"Fc"** region of the antibodies comprises, as a rule, a CH2, CH3 and the hinge region of an IgG1 or IgG2 antibody major class. The hinge region is a group of about 15 amino acid residues which combine the CH1 region with the CH2-CH3 region. Pepsin treatment yields an **"F(ab')<sub>2</sub>"** fragment that has two antigen-binding sites and is still capable of cross-linking antigen. **"Fv"** is the

25 minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and antigen-binding site. This region consists of a dimer of one heavy chain and one light chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three hypervariable regions (CDRs) of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the VH - VL dimer. Collectively, the six

30 hypervariable regions confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three hypervariable regions specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 26 -

at a lower affinity than the entire binding site. The **Fab** fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. "**Fab'**" fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more

5 cysteines from the antibody hinge region. F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known (see e.g. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996; . US 4,342,566). "**Single-chain Fv**" or "**scFv**" antibody fragments comprise the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains of antibody,

10 wherein these domains are present in a Single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. Single-chain Fv antibodies are known, for example, from Plückerthun (*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New

15 York, pp. 269-315 (1994)), WO93/16185; US 5,571,894; US 5,587,458; Huston et al. (1988, Proc.Natl. Acad. Sci. 85, 5879) or Skerra and Plueckthun (1988, Science 240, 1038).

"**Bispecific antibodies**" are single, divalent antibodies (or immunotherapeutically

20 effective fragments thereof) which have two differently specific antigen binding sites. For example the first antigen binding site is directed to an angiogenesis receptor (e.g. integrin or VEGF receptor), whereas the second antigen binding site is directed to an ErbB receptor (e.g. EGFR or Her 2). Bispecific antibodies can be produced by chemical techniques (see e.g., Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,

25 5807), by "polydoma" techniques (See US 4,474,893) or by recombinant DNA techniques, which all are known per se. Further methods are described in WO 91/00360, WO 92/05793 and WO 96/04305. Bispecific antibodies can also be prepared from single chain antibodies (see e.g., Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 5879; Skerra and Plueckthun (1988) Science 240, 1038). These are

30 analogues of antibody variable regions produced as a single polypeptide chain. To form the bispecific binding agent, the single chain antibodies may be coupled together chemically or by genetic engineering methods known in the art. It is also possible to

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 27 -

produce bispecific antibodies according to this invention by using leucine zipper sequences. The sequences employed are derived from the leucine zipper regions of the transcription factors Fos and Jun (Landschulz et al., 1988, Science 240,1759; for review, see Maniatis and Abel, 1989, Nature 341, 24). Leucine zippers are specific amino acid sequences about 20-40 residues long with leucine typically occurring at every seventh residue. Such zipper sequences form amphipathic  $\alpha$ -helices, with the leucine residues lined up on the hydrophobic side for dimer formation. Peptides corresponding to the leucine zippers of the Fos and Jun proteins form heterodimers preferentially (O'Shea et al., 1989, Science 245, 646). Zipper containing bispecific antibodies and methods for making them are also disclosed in WO 92/10209 and WO 93/11162. A bispecific antibody according the invention may be an antibody, directed to VEGF receptor and  $\alpha$ V $\beta$ 3 receptor as discussed above with respect to the antibodies having single specificity.

15 **"Heteroantibodies"** are two or more antibodies or antibody-binding fragments which are linked together, each of them having a different binding specificity. Heteroantibodies can be prepared by conjugating together two or more antibodies or antibody fragments. Preferred heteroantibodies are comprised of cross-linked Fab/Fab' fragments. A variety of coupling or crosslinking agents can be used to conjugate the antibodies. Examples are protein A, carboiimide, N-succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA) and N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (see e.g., Karpovsky et al. (1984) J. EXP. Med. 160,1686; Liu et a. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8648). Other methods include those described by Paulus, Behring Inst. Mitt., No. 78, 118 (1985); Brennan et a. (1985) Science 30 m:81 or Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139, 2367. Another method uses o-phenylenedimaleimide (oPDM) for coupling three Fab' fragments (WO 91/03493). Multispecific antibodies are in context of this invention also suitable and can be prepared, for example according to the teaching of WO 94/13804 and WO 98/50431.

30 The term **"fusion protein"** refers to a natural or synthetic molecule consisting of one ore more proteins or peptides or fragments thereof having different specificity which are fused together optionally by a linker molecule. As specific embodiment the term

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 28 -

includes fusion constructs, wherein at least one protein or peptide is an immunoglobulin or antibody, respectively or parts thereof ("immunconjugates").

The term "**immunconjugate**" refers to an antibody or immunoglobulin respectively, or a immunologically effective fragment thereof, which is fused by covalent linkage to a non-immunologically effective molecule. Preferably this fusion partner is a peptide or a protein, which may be glycosylated. Said non-antibody molecule can be linked to the C-terminal of the constant heavy chains of the antibody or to the N-terminals of the variable light and/or heavy chains. The fusion partners can be linked via a linker molecule, which is, as a rule, a 3 – 15 amino acid residues containing peptide. Immunconjugates according to the invention consist of an immunoglobulin or immunotherapeutically effective fragment thereof, directed to a receptor tyrosine kinase, preferably an ErbB (ErbB1/ErbB2) receptor and an integrin antagonistic peptide, or an angiogenic receptor, preferably an integrin or VEGF receptor and TNF $\alpha$  or a fusion protein consisting essentially of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  or another suitable cytokine, which is linked with its N-terminal to the C-terminal of said immunoglobulin, preferably the Fc portion thereof. The term includes also corresponding fusion constructs comprising bi- or multi-specific immunoglobulins (antibodies) or fragments thereof.

The term "**functionally intact derivative**" means according to the understanding of this invention a fragment or portion, modification, variant, homologue or a de-immunized form (a modification, wherein epitopes, which are responsible for immune responses, are removed) of a compound, peptide, protein, antibody (immunoglobulin), immunconjugate, etc., that has principally the same biological and / or therapeutic function as compared with the original compound, peptide, protein, antibody (immunoglobulin), immunconjugate, etc. However, the term includes also such derivatives, which elicit a reduced or enhanced efficacy.

The term "**cytokine**" is a generic term for proteins released by one cell population which act on another cell as intercellular mediators. Examples of such cytokines are lymphokines, monokines, and traditional polypeptide hormones. Included among the



WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 29 -

cytokines are growth hormone such as human growth hormone, N-methionyl human growth hormone, and bovine growth hormone; parathyroid hormone; thyroxine; insulin; proinsulin; relaxin; prorelaxin; glycoprotein hormones such as follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH); hepatic growth factor; fibroblast growth factor; prolactin; placental lactogen; mouse gonadotropin-associated peptide; inhibin; activin; vascular endothelial growth factor (VEGF); integrin; thrombopoietin (TPO); nerve growth factors such as NGF $\beta$ ; platelet-growth factor; transforming growth factors (TGFs) such as TGF $\alpha$  and TGF $\beta$ ; erythropoietin (EPO); interferons such as IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , and IFN $\gamma$ ; colony stimulating factors such as M-CSF, GM-CSF and G-CSF; interleukins such as IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; and TNF $\alpha$  or TNF $\beta$ . Preferred cytokines according to the invention are interferons and TNF $\alpha$ .

15 The term "**cytotoxic agent**" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes, chemotherapeutic agents, and toxins such as enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, or fragments thereof. The term may include also members of the cytokine family, preferably IFN $\gamma$  as well as anti-neoplastic agents having also cytotoxic activity.

The term "**chemotherapeutic agent**" or "**anti-neoplastic agent**" is regarded according to the understanding of this invention as a member of the class of "cytotoxic agents", as specified above, and includes chemical agents that exert anti-neoplastic effects, i.e., prevent the development, maturation, or spread of neoplastic cells, directly on the tumor cell, e.g., by cytostatic or cytotoxic effects, and not indirectly through mechanisms such as biological response modification. Suitable chemotherapeutic agents according to the invention are preferably natural or synthetic chemical compounds, but biological molecules, such as proteins, polypeptides etc. are not expressively excluded. There are large numbers of anti-neoplastic agents available in commercial use, in clinical evaluation and in pre-clinical development, which could be included in the present invention for treatment of

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 30 -

tumors / neoplasia by combination therapy with TNF $\alpha$  and the anti-angiogenic agents as cited above, optionally with other agents such as EGF receptor antagonists. It should be pointed out that the chemotherapeutic agents can be administered optionally together with above-said drug combination. Examples of chemotherapeutic or agents include alkylating agents, for example, nitrogen mustards, ethyleneimine compounds, alkyl sulphonates and other compounds with an alkylating action such as nitrosoureas, cisplatin and dacarbazine; antimetabolites, for example, folic acid, purine or pyrimidine antagonists; mitotic inhibitors, for example, vinca alkaloids and derivatives of podophyllotoxin; cytotoxic antibiotics and camptothecin derivatives. Preferred chemotherapeutic agents or chemotherapy include 5  
amifostine (ethyol), cisplatin, dacarbazine (DTIC), dactinomycin, mechlorethamine (nitrogen mustard), streptozocin, cyclophosphamide, carmustine (BCNU), lomustine (CCNU), doxorubicin (adriamycin), doxorubicin lipo (doxil), gemcitabine (gemzar), daunorubicin, daunorubicin lipo (daunoxome), procarbazine, mitomycin, 10  
cytarabine, etoposide, methotrexate, 5-fluorouracil (5-FU), vinblastine, vincristine, bleomycin, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukin, asparaginase, busulfan, carboplatin, cladribine, camptothecin, CPT-11, 10-hydroxy-7-ethyl-camptothecin (SNS8), dacarbazine, floxuridine, fludarabine, hydroxyurea, ifosfamide, idarubicin, mesna, interferon alpha, interferon beta, irinotecan, mitoxantrone, 20  
topotecan, leuprolide, megestrol, melphalan, mercaptopurine, plicamycin, mitotane, pegaspargase, pentostatin, pipobroman, plicamycin, streptozocin, tamoxifen, teniposide, testolactone, thioguanine, thiotepa, uracil mustard, vinorelbine, chlorambucil and combinations thereof.  
Most preferred chemotherapeutic agents according to the invention are cisplatin, 25  
gemcitabine, doxorubicin, paclitaxel (taxol) and bleomycin.

The terms "cancer" and "tumor" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. By means of the pharmaceutical compositions according of the present invention tumors can be 30  
treated such as tumors of the breast, heart, lung, small intestine, colon, spleen, kidney, bladder, head and neck, ovary, prostate, brain, pancreas, skin, bone, bone marrow, blood, thymus, uterus, testicles, cervix, and liver. More specifically the tumor

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 31 -

is selected from the group consisting of adenoma, angio-sarcoma, astrocytoma, epithelial carcinoma, germinoma, glioblastoma, glioma, hamartoma, hemangioendothelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leukemia, lymphoma, medulloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma and teratoma. In detail, the tumor is selected from the group consisting of acral lentiginous melanoma, actinic keratoses, adenocarcinoma, adenoid cystic carcinoma, adenomas, adenosarcoma, adenosquamous carcinoma, astrocytic tumors, Bartholin gland carcinoma, basal cell carcinoma, bronchial gland carcinomas, capillary, carcinoids, carcinoma, carcinosarcoma, cavernous, cholangio-carcinoma, chondrosarcoma, choroid plexus papilloma/carcinoma, clear cell carcinoma, cystadenoma, endodermal sinus tumor, endometrial hyperplasia, endometrial stromal sarcoma, endometrioid adenocarcinoma, ependymal, epitheloid, Ewing's sarcoma, fibrolamellar, focal nodular hyperplasia, gastrinoma, germ cell tumors, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastomas, hemangioendothelioma, hemangiomas, hepatic adenoma, hepatic adenomatosis, hepatocellular carcinoma, insulinoma, intraepithelial neoplasia, interepithelial squamous cell neoplasia, invasive squamous cell carcinoma, large cell carcinoma, leiomyosarcoma, lentigo maligna melanomas, malignant melanoma, malignant mesothelial tumors, medulloblastoma, medulloepithelioma, melanoma, meningeal, mesothelial, metastatic carcinoma, mucoepidermoid carcinoma, neuroblastoma, neuroepithelial adenocarcinoma nodular melanoma, oat cell carcinoma, oligodendroglial, osteosarcoma, pancreatic polypeptide, papillary serous adeno-carcinoma, pineal cell, pituitary tumors, plasmacytoma, pseudo-sarcoma, pulmonary blastoma, renal cell carcinoma, retinoblastoma, rhabdomyo-sarcoma, sarcoma, serous carcinoma, small cell carcinoma, soft tissue carcinomas, somatostatin-secreting tumor, squamous carcinoma, squamous cell carcinoma, submesothelial, superficial spreading melanoma, undifferentiated carcinoma, uveal melanoma, verrucous carcinoma, vipoma, well differentiated carcinoma, and Wilm's tumor.

The "pharmaceutical compositions" of the invention can comprise agents that reduce or avoid side effects associated with the combination therapy of the present

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 32 -

invention ("adjunctive therapy"), including, but not limited to, those agents, for example, that reduce the toxic effect of anticancer drugs, e.g., bone resorption inhibitors, cardioprotective agents. Said adjunctive agents prevent or reduce the incidence of nausea and vomiting associated with chemotherapy, radiotherapy or operation, or reduce the incidence of infection associated with the administration of myelosuppressive anticancer drugs. Adjunctive agents are well known in the art. The immunotherapeutic agents according to the invention can additionally administered with adjuvants like BCG and immune system stimulators. Furthermore, the compositions may include immunotherapeutic agents or chemotherapeutic agents which contain cytotoxic effective radio labeled isotopes, or other cytotoxic agents, such as a cytotoxic peptides (e.g. cytokines) or cytotoxic drugs and the like.

The term "**pharmaceutical kit**" for treating tumors or tumor metastases refers to a package and, as a rule, instructions for using the reagents in methods to treat tumors and tumor metastases. A reagent in a kit of this invention is typically formulated as a therapeutic composition as described herein, and therefore can be in any of a variety of forms suitable for distribution in a kit. Such forms can include a liquid, powder, tablet, suspension and the like formulation for providing the antagonist and/or the fusion protein of the present invention. The reagents may be provided in separate containers suitable for administration separately according to the present methods, or alternatively may be provided combined in a composition in a single container in the package. The package may contain an amount sufficient for one or more dosages of reagents according to the treatment methods described herein. A kit of this invention also contains "instruction for use" of the materials contained in the package.

The term "**pharmaceutical treatment**" refers to therapeutic methods of the present invention for treating tumor cells in tumors and tumor metastases are based on the combined use of angiogenesis inhibiting (anti-angiogenesis) therapy and anti-tumor immunotherapy by using receptor tyrosine kinase blocking agents, preferably ErbB antagonists, above all anti-ErbB1 (EGFR, Her1) /anti-ErbB2 (Her2) antibodies. More than one type of angiogenesis inhibiting agent can be used in combination with more than one type of preferably anti-ErbB receptor inhibiting agent. The combined

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 33 -

use can occur simultaneously, sequentially, or with the intervention of a period of time between the treatments. Any of the specific therapeutics may be administered more than once during a course of treatment. The method can result in a synergistic potentiation of the tumor cell proliferation inhibition effect of each individual therapeutic, yielding more effective treatment than found by administering an individual component alone. Thus, in one aspect, the method of the invention encompasses administering to a patient, in combination, an amount of an anti-angiogenic agent and an anti-ErbB receptor (Her1/Her2) agent, that may not result in effective angiogenesis inhibition, or anti-tumor cell activity if given in that amount alone. The method of the invention comprises a variety of modalities for practicing the invention in terms of the steps. For example, the agents according to the invention can be administered simultaneously, sequentially, or separately. Furthermore, the receptor tyrosine kinase blocking agent and the anti-angiogenic agent can be separately administered within a time interval of about 3 weeks between administrations, i.e., from substantially immediately after the first active agent is administered to up to about 3 weeks after the first agent is administered. The method can be practiced following a surgical procedure. Alternatively, the surgical procedure can be practiced during the interval between administration of the first active agent and the second active agent. Exemplary of this method is the combination of the present method with surgical tumor removal. Treatment according to the method will typically comprise administration of the therapeutic compositions in one or more cycles of administration. For example, where a simultaneous administration is practiced, a therapeutic composition comprising both agents is administered over a time period of from about 2 days to about 3 weeks in a single cycle. Thereafter, the treatment cycle can be repeated as needed according to the judgment of the practicing physician. Similarly, where a sequential application is contemplated, the administration time for each individual therapeutic will be adjusted to typically cover the same time period. The interval between cycles can vary from about zero to 2 months. The monoclonal antibodies, polypeptides or organic mimetics / chemotherapeutics of this invention can be administered parenterally by injection or by gradual infusion over time. Although the tissue to be treated can typically be accessed in the body by systemic administration and therefore most often treated by

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 34 -

intravenous administration of therapeutic compositions, other tissues and delivery means are contemplated where there is a likelihood that the tissue targeted contains the target molecule. Thus, monoclonal antibodies, polypeptides or organic agents of this invention can be administered intraocularly, intravenously, intraperitoneally, 5 intramuscularly, subcutaneously, intracavity, transdermally, by orthotopic injection and infusion, and can also be delivered by peristaltic means. The therapeutic compositions containing, for example, an integrin antagonist of this invention are conventionally administered intravenously, as by injection of a unit dose, for example. Therapeutic compositions of the present invention contain a physiologically 10 tolerable carrier together with the relevant agent as described herein, dissolved or dispersed therein as an active ingredient.

As used herein, the terms "**pharmaceutically acceptable**" and grammatical variations thereof, as they refer to compositions, carriers, diluents and reagents, are used interchangeably and represent that the materials are capable of 15 administration to or upon a mammal without the production of undesirable physiological effects such as nausea, dizziness, gastric upset and the like. The preparation of a pharmacological composition that contains active ingredients dissolved or dispersed therein is well understood in the art and need not be limited based on formulation. Typically, such compositions are prepared as injectables either 20 as liquid solutions or suspensions, however, solid forms suitable for solution, or suspensions, in liquid prior to use can also be prepared. The preparation can also be emulsified. The active ingredient can be mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient and in amounts suitable for use in the therapeutic methods described herein. Suitable 25 excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol or the like and combinations thereof. In addition, if desired, the composition can contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents and the like which enhance the effectiveness of the active ingredient. The therapeutic composition of the present invention can include pharmaceutically 30 acceptable salts of the components therein. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the polypeptide) that are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 35 -

acids, or such organic acids as acetic, tartaric, mandelic and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine and the like. Particularly preferred is the HCl salt when used in the preparation of cyclic polypeptide  $\alpha$ v antagonists. Physiologically tolerable carriers are well known in the art. Exemplary of liquid carriers are sterile aqueous solutions that contain no materials in addition to the active ingredients and water, or contain a buffer such as sodium phosphate at physiological pH value, physiological saline or both, such as phosphate-buffered saline. Still further, aqueous carriers can contain more than one buffer salt, as well as salts such as sodium and potassium chlorides, dextrose, polyethylene glycol and other solutes. Liquid compositions can also contain liquid phases in addition to and to the exclusion of water. Exemplary of such additional liquid phases are glycerin, vegetable oils such as cottonseed oil, and water-oil emulsions.

Typically, a therapeutically effective amount of an immunotherapeutic agent in the form of a, for example, anti-ErbB receptor antibody or antibody fragment or antibody conjugate or an anti-angiogenic receptor antibody, fragment or conjugate is an amount such that when administered in physiologically tolerable composition is sufficient to achieve a plasma concentration of from about 0.01 microgram ( $\mu$ g) per milliliter (ml) to about 100  $\mu$ g/ml, preferably from about 1  $\mu$ g/ml to about 5  $\mu$ g/ml and usually about 5  $\mu$ g/ml. Stated differently, the dosage can vary from about 0.1 mg/kg to about 300 mg/kg, preferably from about 0.2 mg/kg to about 200 mg/kg, most preferably from about 0.5 mg/kg to about 20 mg/kg, in one or more dose administrations daily for one or several days. Where the immunotherapeutic agent is in the form of a fragment of a monoclonal antibody or a conjugate, the amount can readily be adjusted based on the mass of the fragment / conjugate relative to the mass of the whole antibody. A preferred plasma concentration in molarity is from about 2 micromolar ( $\mu$ M) to about 5 millimolar (mM) and preferably, about 100  $\mu$ M to 1 mM antibody antagonist. A therapeutically effective amount of an agent according of this invention which is a non-immunotherapeutic peptide or a protein polypeptide (e.g.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 36 -

IFN-alpha), or other similarly-sized small molecule, is typically an amount of polypeptide such that when administered in a physiologically tolerable composition is sufficient to achieve a plasma concentration of from about 0.1 microgram ( $\mu\text{g}$ ) per milliliter (ml) to about 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , preferably from about 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to about 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

5 Based on a polypeptide having a mass of about 500 grams per mole, the preferred plasma concentration in molarity is from about 2 micromolar ( $\mu\text{M}$ ) to about 5 millimolar (mM) and preferably about 100  $\mu\text{M}$  to 1 mM polypeptide antagonist. The typical dosage of an active agent, which is a preferably a chemical antagonist or a (chemical) chemotherapeutic agent according to the invention (neither an  
10 immunotherapeutic agent nor a non-immunotherapeutic peptide/protein) is 10 mg to 1000 mg, preferably about 20 to 200 mg, and more preferably 50 to 100 mg per kilogram body weight per day.

The term "therapeutically effective" or "therapeutically effective amount" refers to  
15 an amount of a drug effective to treat a disease or disorder in a mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug may reduce the number of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit (i.e., slow to some extent and preferably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (i.e., slow to some extent and preferably stop) tumor metastasis; inhibit, to some extent, tumor growth; and/or  
20 relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer. To the extent the drug may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. For cancer therapy, efficacy can, for example, be measured by assessing the time to disease progression (TTP) and/or determining the response rate (RR).

25

**Example:** The following is a short clinical trial report:

A patient, 45 years old, was originally suffering from progressive *squamous cell carcinoma* of the superior maxilla.

30 EMD 72000: Monoclonal human antibody 425 (h425), Merck KGaA, Germany  
EMD 121974: Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), Cilengitide<sup>®</sup>, Merck KGaA, Germany;



WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 37 -

Chemotherapeutics: various (gemcitabine, cisplatin, etc.)

Case history and clinical findings/status at the start of the compassionate use

treatment: In July 1997 the patient first presented at the Virchow Klinikum, Germany.

A biopsy of the suspected large tumor in the upper maxilla was performed. Histology  
5 revealed a squamous cell carcinoma classified as T4 N0 M0. On August 5, 1997  
partial resection of the superior maxilla and resection of regional lymph nodes was  
done. Histology revealed that no clean margin had been achieved, so an additional  
resection was performed during the same hospital stay. Due to the unfavourable  
histologic classification the patient received a post-operative radiation therapy up to  
10 50.4 Gray from September to October 1997.

In July 1998 progression of disease was suspected which led to hospitalization.  
Histology now showed an *adenosquamous carcinoma*. After consultation of  
radiotherapists another radiotherapy was recommended which started in August  
1998. The patient was treated simultaneously with gemcitabine (100 mg) as a  
15 radiosensitizer. The 6 week-therapy led to complete clinical remission. Following the  
combined radio-chemotherapy the patient received a therapy with 1000 mg  
gemcitabine (5 circles of 16 administrations).

In March 1999 again progression of the carcinoma occurred which led to additional  
radiation therapy and palliative resection of the tumor. In August 1999 again tumor  
20 progression and chemotherapy with cisplatin (75 mg/m<sup>2</sup>) and docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup>)  
was started. After three administrations the therapy was stopped due to lack of effect  
on tumor growth.

Diffuse bleedings out of the large tumor mass required frequent transfusions of  
erythrocyte concentrates.

25

Course of compassionate use treatment with anti-angiogenic agent /

chemotherapeutic agents: Under treatment with EMD 121974 (600 mg/m<sup>2</sup>) and  
gemcitabine (Gemzar) (1000mg /m<sup>2</sup>) in November 1999 a regression of the tumor  
was diagnosed. Since mid of January 2000 the patient had been able to hear again  
30 on his right ear and he had been able to open his mouth 30% more than in December  
1999. The surface of the tumor showed signs of granulation and wound healing.  
Bleeding stopped and there was no need for further transfusions.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 38 -

The patient was treated with EMD 121974 and Gemzar from 17.11.1999 until 30.03.2000. From 06.04.2000 until 28.04.2000 EMD 121974, Gemzar and a chemotherapy with 5-FU, cisplatin and rescuvolin was given to the patient because a progression of the tumor was detected. Chemotherapy-treatment was stopped

5 because of haematotoxicity and Cilengitide treatment was continued alone. From April to June 2000 the patient received 600 mg/m<sup>2</sup> EMD 121974 twice a week only resulting in stable disease.

The patient's condition worsened after several weeks and the patient was treated with an increased dose of 1200 mg/m<sup>2</sup> EMD 121974 twice weekly.

10 Treatment with h425 + Cilengitide + chemotherapeutics: EMD 72000 was first given in November 2000 in a dosage of 200 mg (infusion over half an hour) after premedication with dexamethasone / dimetindenmaleate ( Fenistil) and ranitidin (Zantic). One week later the patient received additionally gemcitabine (1000mg/m<sup>2</sup>). The weekly treatment schedule was : Monday:1200mg/m<sup>2</sup> Cilengitide (one hour

15 infusion),Thursday 200 mg EMD 72 000 (half an hour infusion) followed by 1000mg/m<sup>2</sup> gemcitabine (one hour infusion), Friday 1200 mg/m<sup>2</sup> Cilengitide (one hour infusion). Under this treatment a crater-like disintegration of the tumor mass was observed. The tumor masses were surgically removed at several occasions. The effect of the combined treatment was considered exceptionally impressive by the

20 treating physicians. No therapy related adverse drug reactions in relation to EMD 121974 and EMD 72000 were observed. Up to now the patient's condition remained improved.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 39 -

**Patent Claims**

1. A pharmaceutical composition comprising an agent or agents having  
(i) at least one receptor tyrosine kinase blocking specificity and  
5 (ii) at least one angiogenesis inhibiting specificity,  
wherein said agent or agents is / are not a cytokine immunoconjugate,  
optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or recipient.
2. A pharmaceutical composition of claim 1, further comprising a cytotoxic agent.
- 10 3. A pharmaceutical composition of claim 1 or 2, comprising  
(i) at least one agent having a receptor tyrosine kinase blocking specificity, and  
(ii) at least one agent having an angiogenesis inhibiting specificity.
- 15 4. A pharmaceutical composition of claim 1 or 2, comprising an agent having a  
receptor tyrosine kinase blocking specificity as well as an angiogenesis inhibiting  
specificity.
5. A pharmaceutical composition of claim 3, wherein said agent (i) has a ErbB  
20 receptor blocking specificity.
6. A pharmaceutical composition of claim 5, wherein the ErbB receptor specificity of  
said agent is related to the EGF receptor (ErbB1/Her1) or the ErbB2/Her2  
receptor.
- 25 7. A pharmaceutical composition according to claim 6, wherein said agent is an  
antibody or a functionally intact derivative thereof, comprising a binding site which  
binds to an epitope of the ErbB1(Her1) or Erb2(Her2) receptor.
- 30 8. A pharmaceutical composition according to claim 7, wherein said antibody or  
functionally intact derivative thereof is selected from the group:  
- humanized monoclonal antibody 425 (h425)

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 40 -

- chimeric monoclonal antibody 225 (c225)
  - humanized monoclonal antibody Her 2.
9. A pharmaceutical composition according to any of the claims 1 – 8, wherein said  
5 angiogenesis inhibiting agent is an  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  or an  $\alpha_v\beta_6$  integrin inhibitor.
10. A pharmaceutical composition according to claim 9, wherein said integrin inhibitor  
is an RGD-containing linear or cyclic peptide.
- 10 11. A pharmaceutical composition according to claim 10, wherein said peptide is  
cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).
12. A pharmaceutical composition according to claim 7 and 9, wherein said antibody  
or functionally intact derivative thereof is humanized monoclonal antibody 425  
15 (h425) or chimeric monoclonal antibody 225 (c225) and said integrin inhibitor is  
cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).
13. A pharmaceutical composition according to claim 12, further comprising a  
chemotherapeutic agent which is selected from any of the compounds of the  
20 group: cisplatin, doxorubicin, gemcitabine, docetaxel, paclitaxel, bleomycin.
14. A pharmaceutical composition according to claims 9, wherein said integrin inhibitor  
is an antibody or a functionally intact derivative thereof, comprising a binding site  
which binds to an epitope of an integrin receptor.
- 25 15. A pharmaceutical composition according to claim 14, wherein said antibody is  
LM609 or P1F6.
16. A pharmaceutical composition according to claim 4, wherein said agent is a  
30 bispecific antibody or a heteroantibody molecule comprising a first binding site that  
binds to an epitope of a receptor tyrosine kinase and a second binding site that  
binds to an epitope of an angiogenesis receptor.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 41 -

17. A pharmaceutical composition according to claim 16, wherein said bispecific antibody or heteroantibody molecule comprises a first binding site that binds to an epitope of an ErbB receptor and a second binding site that binds to an epitope of an integrin receptor.
- 5
18. A pharmaceutical composition according to claim 17, wherein said binding sites, which bind to an epitope of an ErbB receptor, are selected from monoclonal antibodies h425, c225 or Her 2, and said binding sites, which bind to an epitope of an integrin receptor, are selected from the monoclonal antibodies LM609 or P1F6.
- 10
19. A pharmaceutical composition according to claim 4, wherein said agent is an immunoconjugate consisting of an antibody or antibody fragment, bearing one of said specificities, and a non-immunological molecule, fused to the antibody or antibody fragment bearing the other specificity.
- 15
20. A pharmaceutical composition according to claim 19, wherein the antibody portion or fragment thereof comprises a binding site that binds to an epitope of an ErbB receptor, and the fused non-immunological molecule comprises a binding site that binds to an epitope of an integrin receptor.
- 20
21. A pharmaceutical composition according to claim 20, wherein said antibody portion which binds to an epitope of an ErbB receptor is selected from monoclonal antibodies h425, c225 or Her 2, and said non-immunological portion which binds to an epitope of an integrin receptor is cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).
- 25
22. A pharmaceutical kit comprising
- (i) a package comprising at least one ErbB receptor blocking agent, and
  - (ii) a package comprising at least one angiogenesis inhibiting agent.
- 30
23. A pharmaceutical kit of claim 22, further comprising a package comprising a cytotoxic agent.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 42 -

24. A pharmaceutical kit comprising  
(i) a package comprising at least one ErbB receptor blocking agent and at least one angiogenesis inhibiting agent, and  
(ii) a package comprising a cytotoxic agent.
- 5
25. The pharmaceutical kit of any of the claims 22 – 24, wherein said ErbB receptor blocking agent is an antibody or a functionally intact derivative thereof, having a binding site that binds to an epitope of said receptor.
- 10
26. A pharmaceutical kit of claim 25, wherein said antibody or functionally intact derivative thereof is selected from the group: humanized monoclonal antibody 425 (h425), chimeric monoclonal antibody 225 (c225) or humanized monoclonal antibody Her 2.
- 15
27. A pharmaceutical kit of any of the claims 22 – 26, wherein said angiogenesis inhibiting agent is an  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  or an  $\alpha_v\beta_6$  integrin inhibitor.
28. A pharmaceutical kit of claim 27, wherein said integrin inhibitor is an RGD-containing linear or cyclic peptide.
- 20
29. A pharmaceutical kit of claim 28, wherein said peptide is cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).
30. A pharmaceutical kit of any of the claims 22 – 26, wherein said angiogenesis  
25 inhibiting agent is an antibody or a functionally intact derivative thereof.
31. A pharmaceutical kit of claim 30, wherein said antibody is LM609 or P1F6.
32. A pharmaceutical kit of claim 22, comprising  
30 (i) a package comprising humanized monoclonal antibody 425 (h425), chimeric monoclonal antibody 225 (c225), or a functionally intact derivative thereof, and  
(ii) a package comprising cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal).

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 43 -

33. A pharmaceutical kit of claim 32, further comprising a chemotherapeutic agent which is selected from any of the compounds of the group: cisplatin, doxorubicin, gemcitabine, docetaxel, paclitaxel, bleomycin
- 5 34. Use of a pharmaceutical composition or a pharmaceutical kit as defined in any of the claims 1 – 33, for the manufacture of a medicament to treat tumors and tumor metastases.
35. A method for treating tumors or tumor metastases in a patient comprising  
10 administering to said patient a therapeutically effective amount of an agent or agents having  
(i) at least one receptor tyrosine kinase blocking specificity and  
(ii) at least one angiogenesis inhibiting specificity,  
wherein said agent or agents is / are not a cytokine immunoconjugate.
- 15 36. A method of claim 35, wherein additionally a cytotoxic agent is administered to the patient.
37. A method of claim 35 or 36, wherein said agent or agents have a receptor tyrosine  
20 kinase blocking specificity which is related to the ErbB receptor family.
38. A method of claim 37, wherein the ErbB receptor specificity of said agent is related to the EGF receptor (ErbB1/Her1) or the ErbB2/Her2 receptor.
- 25 39. A method of claim 38, wherein said agent is an antibody or a functionally intact derivative thereof, comprising a binding site which binds to an epitope of the ErbB1(Her1) or Erb2(Her2) receptor.
40. A method of claim 39, wherein said antibody or derivative thereof is selected from  
30 the group: humanized monoclonal antibody 425 (h425), chimeric monoclonal antibody 225 (c225) or humanized monoclonal antibody Her 2.

WO 02/055106

PCT/EP01/15241

- 44 -

41. A method of any of the claims 35 – 40, wherein said angiogenesis inhibiting agent is an  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  or an  $\alpha_v\beta_6$  integrin inhibitor or a VEGF receptor blocking agent.

42. A method of claim 41, comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of (i) humanized monoclonal antibody 425 (h425) or chimeric monoclonal antibody 225 (c225), (ii) cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal), and optionally (iii) cisplatin, doxorubicin, gemcitabine, docetaxel, paclitaxel, bleomycin.



## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/055106 A3

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/395**, 47/48, A61P 35/00, 35/04 // (A61K 39/395, 38/08) (A61K 39/395, 31/00)
- (21) International Application Number: **PCT/EP01/15241**
- (22) International Filing Date:  
21 December 2001 (21.12.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
01100507-1 9 January 2001 (09.01.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **GOODMAN, Simon** [GB/DE]; Friedrich-Ebert-Straße 102a, 64327 Griesheim (DE); **KREYSCH, Hans-Georg** [DE/DE]; Burgunderweg 16, 55130 Mainz (DE).
- (74) Common Representative: **MERCK PATENT GMBH**; Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (81) Designated States (national): AU, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, 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 (GH, GM, KR, 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, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:  
6 March 2003
- 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 02/055106 A3

(54) Title: COMBINATION THERAPY USING RECEPTOR TYROSINE KINASE INHIBITORS AND ANGIOGENESIS INHIBITORS

(57) Abstract: The invention relates to a combination therapy for the treatment of tumors and tumor metastases comprising administration of receptor tyrosine kinase antagonists/inhibitors, especially ErbB receptor antagonists, more preferably EGFR receptor (Her 1) antagonists and anti-angiogenic agents, preferably integrin antagonists, optionally together with agents or therapy forms that have additive or synergistic efficacy when administered together with said combination of antagonists/inhibitors, such as chemotherapeutic agents and/or radiation therapy. The therapy can result in a synergistic potential increase of the inhibition effect of each individual therapeutic on tumor cell proliferation, yielding more effective treatment than found by administering an individual component alone.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/15241
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K39/395 A61K47/48 A61P35/00 A61P35/04 //(A61K39/395,38:08),(A61K39/395,31:00)		
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) IPC 7 A61K		
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 practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. INOUE ET AL.: "Paclitaxel enhances the effects of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ImClone C225 in mice with metastatic human bladder transitional cell carcinoma." CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 6, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 4874-4884, XP00219206 abstract --- -/--	1,2,4-8, 34-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: ** document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but after the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	1 November 2002	Date of mailing of the international search report
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5819 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nooij, F	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 01/15241

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	C. BRUNS ET AL.: "Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms." CLINICAL CANCER RESEARCH, (2000 MAY) 6 (5) 1936-48. vol. 6, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 1936-1948, XP002951102 abstract	1,4-8, 34-40
X	WO 00 27379 A (VEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.-ET AL.) 18 May 2000 (2000-05-18) claims 23-26,28	1,4-6, 34-38
X	US 5 679 683 A (BRIDGES ET AL.) 21 October 1997 (1997-10-21) abstract	1,4-6, 34-38
A	DE 198 42 415 A (MERCK PATENT GMBH) 23 March 2000 (2000-03-23) cited in the application the whole document	9-11,21, 27-29, 32-34,42
P,X	J. GRILL ET AL.: "Combined targeting of adenoviruses to integrins and epidermal growth factor receptors increases gene transfer into primary glioma cells and spheroids." CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 7, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 641-650, XP002219207 abstract	1-10,16, 22, 25-28, 34-41

Form PCT/ISA/210 (continuation of record 04046) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/15241
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
		Although claims 35-42 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.:	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
<b>Remark on Protest</b>		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 01/15241

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0027379	A	18-05-2000	AU 1174700 A 29-05-2000 WO 0027379 A2 18-05-2000
US 5679683	A	21-10-1997	AU 686339 B2 05-02-1998 AU 1833495 A 08-08-1995 BG 63432 B1 31-01-2002 BG 100615 A 28-02-1997 CA 2177392 A1 27-07-1995 CZ 9601971 A3 16-07-1997 EP 0741711 A1 18-11-1996 FI 962855 A 13-09-1996 HR 950033 A1 31-10-1997 HU 74590 A2 28-01-1997 HU 74589 A2 28-01-1997 JP 9508126 T 19-08-1997 MD 960211 A 30-04-1998 NO 963093 A 24-07-1996 NZ 281404 A 28-05-1999 PL 315632 A1 25-11-1996 RU 2158127 C2 27-10-2000 SK 89596 A3 06-08-1997 WO 9519970 A1 27-07-1995 AU 686334 B2 05-02-1998 AU 1731495 A 08-08-1995 BG 63245 B1 31-07-2001 BG 100614 A 31-03-1997 CA 2177372 A1 27-07-1995 CN 1139383 A 01-01-1997 CN 1139430 A 01-01-1997 CZ 9601970 A3 17-09-1997 EP 0742717 A1 20-11-1996 FI 962856 A 25-09-1996 HR 950034 A1 31-10-1997 JP 9508127 T 19-08-1997 MD 960217 A 30-04-1998 NO 963094 A 24-07-1996 NZ 281011 A 01-02-2002 PL 315633 A1 25-11-1996 RO 117257 B1 28-12-2001 RU 2174980 C2 20-10-2001 SK 89496 A3 08-10-1997 WO 9519774 A1 27-07-1995 US 6265410 B1 24-07-2001 US 5654307 A 05-08-1997 US 6084095 A 04-07-2000 US 2001027197 A1 04-10-2001 ZA 9500441 A 10-10-1995 ZA 9500440 A 10-10-1995
DE 19842415	A	23-03-2000	DE 19842415 A1 23-03-2000 AU 5975899 A 03-04-2000 BR 9913737 A 05-06-2001 CA 2344151 A1 23-03-2000 CN 1329499 T 02-01-2002 CZ 20010932 A3 12-09-2001 WO 0015244 A2 23-03-2000 EP 1113809 A2 11-07-2001 HU 0103521 A2 28-02-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 01/15241

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19842415	A	JP 2002524526 T	06-08-2002
		NO 20011308 A	15-03-2001
		PL 348026 A1	06-05-2002
		SK 3372001 A3	06-11-2001
		TR 200100765 T2	21-08-2001

## 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 38/00	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 39/395	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 43/00	A 6 1 K 37/02	

(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, PL, 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 100088328

弁理士 金田 暢之

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 ゴートマン、ズィーモン

ドイツ連邦共和国 6 4 3 4 7 グリースハイム フリードリヒ - エベルト - シュトラッセ 1 0  
2 アー

(72) 発明者 クレイシュ、ハンス - ゲオルク

ドイツ連邦共和国 5 5 1 3 0 マインツ ブルグンダーヴェーク 1 6

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA19 AA20 BA01 BA08 BA16 BA23 CA62 MA02 NA05

ZB261 ZB262 ZC751 ZC752

4C085 AA14 AA16 EE03

4C086 AA02 BA02 EA01 EA10 EA17 HA12 MA02 MA03 MA04 NA05

ZB26 ZC75