

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/005161

発行日 平成25年9月2日 (2013.9.2)

(43) 国際公開日 平成24年1月12日 (2012.1.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A Z	2 G O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 H O 4 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

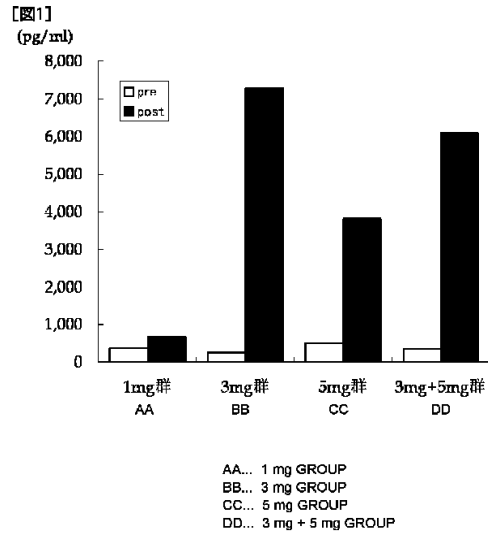
出願番号 特願2012-523834 (P2012-523834)	(71) 出願人 304058240 株式会社グリーンペプタイト 福岡県久留米市百年公園1番1号 福岡バイオインキュベーションセンター402号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/065033	
(22) 国際出願日 平成23年6月30日 (2011.6.30)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-154921 (P2010-154921)	(74) 代理人 100062144 弁理士 青山 稜
(32) 優先日 平成22年7月7日 (2010.7.7)	(74) 代理人 100101454 弁理士 山田 卓二
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100106518 弁理士 松谷 道子
	(74) 代理人 100138911 弁理士 櫻井 陽子
	(72) 発明者 伊東 恭悟 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学医学部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんペプチドワクチン

(57) 【要約】

本発明は、6～13種類の腫瘍抗原由来のペプチドから構成される、がんを治療するための薬剤であって、患者末梢血中の各ペプチドに対する抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択して該患者に投与するよう利用されることを特徴とする薬剤、およびそのペプチド選択方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の a) ~ d) の 6 ~ 13 種類のペプチドから構成される、がんを治療するための薬剤であって、患者末梢血中の各ペプチドに対する抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択して該患者に投与するよう用いられることを特徴とする薬剤：

- a) 配列番号 4、5、および 14 のペプチド、
- b) 配列番号 6、8、11、12、および 13 から選択される 3 ~ 5 種類のペプチド、
- c) 配列番号 7 および 9 から選択される 0 ~ 2 種類のペプチド、および
- d) 配列番号 1、3、および 10 から選択される 0 ~ 3 種類のペプチド。

【請求項 2】

b) のペプチドが配列番号 6、8、11、12、および 13 である、8 ~ 13 種類のペプチドから構成される、請求項 1 の薬剤。

【請求項 3】

b) のペプチドが配列番号 6、8、11、12、および 13 であり、d) のペプチドが 0 種類である、8 ~ 10 種類のペプチドから構成される、請求項 1 の薬剤。

【請求項 4】

b) のペプチドが配列番号 6、8、11、12、および 13 であり c) および d) のペプチドがいずれも 0 種類である、8 種類のペプチドから構成される、請求項 1 の薬剤。

【請求項 5】

b) のペプチドが配列番号 6、8、および 11、並びに 12 または 13 であり、c) および d) のペプチドがいずれも 0 種類である、7 種類のペプチドから構成される、請求項 1 の薬剤。

【請求項 6】

b) のペプチドが配列番号 6、8、および 11 であり、c) および d) のペプチドがいずれも 0 種類である、6 種類のペプチドから構成される、請求項 1 の薬剤。

【請求項 7】

b) のペプチドが配列番号 6、11、12、および 13 であり、c) のペプチドが配列番号 7 であり、d) のペプチドが 0 種類である、8 種類のペプチドから構成される、請求項 1 の薬剤。

【請求項 8】

b) のペプチドが配列番号 6、11、12、および 13 であり、c) および d) のペプチドがいずれも 0 種類である、7 種類のペプチドから構成される、請求項 1 の薬剤。

【請求項 9】

前立腺がんの治療のための、請求項 5 または 6 の薬剤。

【請求項 10】

脳腫瘍の治療のための、請求項 7 または 8 の薬剤。

【請求項 11】

3 または 4 種類のペプチドが投与されるよう用いられる、請求項 1 ~ 10 のいずれかの薬剤。

【請求項 12】

1 種類のペプチドあたり 3 ~ 5 mg のペプチドが投与されるよう用いられる、請求項 1 ~ 11 のいずれかの薬剤。

【請求項 13】

ペプチドが少なくとも 6 回投与されるよう用いられる、請求項 1 ~ 12 のいずれかの薬剤。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

ペプチドが6～12回投与後に再選択されるよう用いられる、請求項1～13のいずれかの薬剤。

【請求項 15】

がんを治療するために投与されるペプチドの選択方法であって、以下のa)～d)の6～13種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含む方法：

- a) 配列番号4、5、および14のペプチド、
- b) 配列番号6、8、11、12、および13から選択される3～5種類のペプチド、
- c) 配列番号7および9から選択される0～2種類のペプチド、および
- d) 配列番号1、3、および10から選択される0～3種類のペプチド。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がんの免疫療法に用いるための腫瘍抗原由来のペプチド群を含む薬剤、具体的にはがんペプチドワクチンに関するものである。

【背景技術】

【0002】

世界では、年間約1,000万人が新たにがんを発症し、うち約600万人が死亡している。日本国内では、年間のがん患者発生数は約60万人であり、毎年約33万人以上ががんのため死亡し、これは全死亡者数の約30%を占める。このようながんに対して従来行なわれている主な治療方法は、手術、放射線療法、化学療法などである。そして、近年では、がん細胞が発現するレセプターなどの分子を標的とした抗体医薬が盛んに開発され、臨床で用いられている。しかしながら、これらの治療方法は、一時的には効果を示すもののがんの進行を止めることができない。よって、新たな作用機序を有する次世代の治療方法として、免疫療法に関する研究並びに開発が行なわれている。

20

【0003】

免疫療法については、世界的には腫瘍抗原提示細胞（樹状細胞）を用いた細胞療法（US, Dendreon社のProvenge等）が先行しており、2009年4月にはpivotal P-III試験成績の速報が発表され、2010年には米国FDAからの承認がなされた。

30

【0004】

また、腫瘍抗原を薬剤として用いるワクチン療法については、ルドウィヒ研究所で発見されたMAGE-A3抗原を用いた非小細胞肺癌の術後再発予防に関する試験や、悪性EGFRvIIIを用いた脳腫瘍（神経膠芽腫）に対するペプチドワクチンの開発がなされている。

【0005】

一方、がんの予防を目的としたワクチンについては、メルク社とGSK社がそれぞれ、子宮頸癌の予防ワクチンについて承認を得ている。

【0006】

しかしながら、現在先行している免疫療法の一つである細胞療法は、患者から採取した細胞を必須とするため、実際には設備が整った施設でしか実施できないという問題点がある。また、現在開発が進められているMAGE-A3やEGFRvIII由来のペプチドワクチンは、全ての患者に同一の抗原を投与する薬剤形態をとっているが、各患者におけるがん細胞のタンパク質の発現パターンは様々であることから（非特許文献52）、患者によってはがん細胞が投与された抗原を発現していないということもあり、その場合は十分な効果が期待できないことが予想される。事実、このような免疫療法の奏効率は十分でないという報告も存在する（非特許文献51）。

40

【0007】

そこで、本発明者らは、各患者のがん細胞がヘテロな集団であり、患者毎にがんに対す

50

る免疫応答を引き起こす抗原が異なることに着目し、腫瘍抗原ペプチドを複数同定し、このペプチド群の各ペプチドに対する免疫応答を患者毎に確認し、免疫応答が得られる最適なペプチドを投与するという、いわゆる「テーラーメイド型がんペプチドワクチン」の研究、開発を試みてきた。

【 0 0 0 8 】

がんの免疫療法では、がん細胞が発現する抗原がヒト白血球抗原（HLA）分子によって細胞表面上に提示され、これを認識する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）ががん細胞を傷害することによってがんの進行を阻止するとされており、本発明者らは、数百の腫瘍抗原ペプチドを同定し、これらのうち約80種類のペプチドを用いて、患者末梢血中に存在するCTLのペプチドに対する反応性を測定し、最適なペプチドを選択して投与する方法について鋭意検討してきた。（特許文献1～3）。

10

【 0 0 0 9 】

しかしながら、医薬品化に当たっては、ペプチドの種類が多ければ多いほど製造や開発にコストがかかり、製品化しにくいという問題がある。さらに、実際の医療現場においても、ペプチドの保管や、ペプチドの取り扱いがないよう管理するための負担が増大してしまうなど、ペプチド選択から投薬までのプロセスが煩雑になるという問題点があった。一方、ペプチドの種類を減らすと患者によっては最適なペプチドが選択できなくなり、薬剤の効果を低くしてしまうという懸念もあった。また、CTLを用いた測定によるペプチドの選択は、時間を要する、十分な再現性を担保した測定が難しい等の問題点もあった。

20

【 0 0 1 0 】

以下の文献は引用により本明細書に含まれる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 特許文献 1 】 WO 2 0 0 5 / 0 4 1 9 8 2

【 特許文献 2 】 WO 2 0 0 5 / 1 2 3 1 2 2

【 特許文献 3 】 WO 0 3 / 0 2 5 5 6 9

【 特許文献 4 】 特開平 1 1 - 3 1 8 4 5 5 号公報

【 特許文献 5 】 WO 0 0 / 1 2 7 0 1

【 特許文献 6 】 WO 0 1 / 0 1 1 0 4 4

【 特許文献 7 】 WO 0 3 / 0 5 0 1 4 0

【 特許文献 8 】 特開 2 0 0 5 - 1 6 2 6 7 9 号公報

【 特許文献 9 】 特開 2 0 0 5 - 1 7 0 7 9 9 号公報

【 特許文献 1 0 】 WO 2 0 0 5 / 0 7 1 0 7 5

【 特許文献 1 1 】 特開 2 0 0 7 - 1 4 5 7 1 5 号公報

【 特許文献 1 2 】 WO 2 0 0 9 / 0 3 8 0 2 6

【 特許文献 1 3 】 特開 2 0 0 3 - 2 7 0 号公報

【 非特許文献 】

【 0 0 1 2 】

【 非特許文献 1 】 Nakao M, Shichijo S, Imaizumi T, Inoue Y, Matsunaga K, Yamada A, Kikuchi M, Tsuda N, Ohta K, Takamori S, Yamana H, Fujita H, and Itoh K. Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J Immunol.* 164:2565-2574, 2000.

40

【 非特許文献 2 】 Yang D, Nakao M, Shichijo S, Sasatomi T, Takasu H, Matsumoto H, Mori K, Hayashi A, Yamana H, Shirouzu K, and Itoh K. Identification of a gene coding for a protein possessing shared tumor epitopes capable of inducing HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in cancer patients. *Cancer Res.* 59:4056-4063, 1999.

【 非特許文献 3 】 Harashima N, Tanaka K, Sasatomi T, Shimizu K, Miyagi Y, Yamada A, Tamura M, Yamana H, Itoh K, and Shichijo S. Recognition of the Lck tyrosine k

50

inase as a tumor antigen by cytotoxic T lymphocytes of cancer patients with distant metastases. *Eur J Immunol.* 31:323-332, 2001.

【非特許文献4】Inoue Y, Takaue Y, Takei M, Kato K, Kanai S, Harada Y, Tobisu K, Noguchi M, Kakizoe T, Itoh K, and Wakasugi H. Induction of tumor specific cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer using prostatic acid phosphatase derived HLA-A2402 binding peptide. *J Urol.* 166:1508-1513, 2001.

【非特許文献5】Harada M, Kobayashi K, Matsueda S, Nakagawa M, Noguchi M, and Itoh K. Prostate-specific antigen-derived epitopes capable of inducing cellular and humoral responses in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate.* 57:152-159, 2003.

【非特許文献6】Kobayashi K, Noguchi M, Itoh K, and Harada M. Identification of a prostate-specific membrane antigen-derived peptide capable of eliciting both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Cancer Sci.* 94(7):622-627, 2003.

【非特許文献7】Ogata R, Matsueda S, Yao A, Noguchi M, Itoh K, and Harada M. Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2(EZH2)-derived peptides immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate.* 60:273-281, 2004.

【非特許文献8】Yao A, Harada M, Matsueda S, Ishihara Y, Shomura H, Noguchi M, Matsuo K, Hara I, Kamidono S, and Itoh K. Identification of parathyroid hormone-related protein-derived peptides immunogenic in human histocompatibility leukocyte antigen-A24+ prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 91:287-296, 2004.

【非特許文献9】Shomura H, Shichijo S, Komatsu N, Matsueda S, Mine T, Rikimaru T, Sato Y, and Itoh K. Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognised by both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer.* 40:1776-1786, 2004.

【非特許文献10】Yamada A, Kawano K, Koga M, Matsumoto T, and Itoh K. Multidrug resistance-associated protein 3 is a tumor rejection antigen recognized by HLA-A2402-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 61: 6459-6466, 2001.

【非特許文献11】Miyagi Y, Imai N, Sasatomi T, Yamada A, Mine T, Katagiri K, Nakagawa M, Muto A, Okouchi S, Isomoto H, Shirouzu K, Yamana H, and Itoh K. Induction of cellular immune responses to tumor cells and peptides in colorectal cancer patients by vaccination with SART3 peptides. *Clin Can Res.* 7:3950-3962, 2001.

【非特許文献12】Hida N, Maeda Y, Katagiri K, Takasu H, Harada M, and Itoh K. A simple culture protocol to detect peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the circulation. *Cancer Immunol Immunother.* 51:219-228, 2002.

【非特許文献13】Komatsu N, Shichijo S, Maeda Y, and Itoh K. Measurement of interferon- γ by high-throughput fluorometric microvolume assay technology (FMAT) system. *J Immunol Methods.* 263:169-176, 2002.

【非特許文献14】Noguchi M, Kobayashi K, Suetsugu N, Tomiyasu K, Suekane S, Yamada A, Itoh K, and Noda S. Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate.* 57: 80-92, 2003.

【非特許文献15】Tanaka S, Harada M, Mine T, Noguchi M, Gohara R, Azuma K, Tamura M, Yamada A, Morinaga A, Nishikori M, Katagiri K, Itoh K, Yamana H, and Hashimoto T. Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancer based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors in the periphery. *J Immunother.* 26(4):357-366, 2003.

【非特許文献16】Sato Y, Shomura H, Maeda Y, Mine T, Une Y, Akasaka Y, Kondo M, Takahashi S, Shinohara T, Katagiri K, Sato M, Okada S, Matsui K, Yamada A, Yama

10

20

30

40

50

na H, Itoh K, and Todo S. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci.* 94(9):802-808, 2003.

【非特許文献 1 7】Noguchi M, Itoh K, Suekane S, Yao A, Suetsugu N, Katagiri K, Yamada A, Yamana H, and Noda S. Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2-positive patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci.* 95: 77-84, 2004.

【非特許文献 1 8】Harada M, Gohara R, Matsueda S, Muto A, Oda T, Iwamoto Y, and Itoh K. In vivo evidence that peptide vaccination can induce HLA-DR-restricted CD4+ T cells reactive to a class I tumor peptide. *J Immunol.* 172: 2659-2667, 2004. 10

【非特許文献 1 9】Tsuda N, Mochizuki K, Harada M, Sukehiro A, Kawano K, Yamada A, Ushijima K, Sugiyama T, Nishida T, Yamana H, Itoh K, and Kamura T. Vaccination with pre-designated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. *J Immunother.* 27: 60-72, 2004.

【非特許文献 2 0】Mine T, Sato Y, Noguchi M, Sasatomi T, Gohara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T, Shichijo S, Kamura T, Hashimoto T, Shirouzu K, Yamada A, Todo S, Itoh K, and Yamana H. Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clin Cancer Res.* 10: 929-937, 2004. 20

【非特許文献 2 1】Sato Y, Maeda Y, Shomura H, Sasatomi T, Takahashi M, Une Y, Kondo M, Shinohara T, Hida N, Katagiri K, Sato K, Sato M, Yamada A, Yamana H, Harada M, Itoh K, and Todo S. A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer.* 90: 1334-1342, 2004.

【非特許文献 2 2】Noguchi M, Itoh K, Suekane S, Morinaga A, Sukehiro A, Suetsugu N, Katagiri K, Yamada A, and Noda S. Immunological monitoring during combination of patient-oriented peptide vaccination and estramustine phosphate in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Prostate.* 60: 32-45, 2004. 30

【非特許文献 2 3】Mochizuki K, Sato Y, Tsuda N, Shomura H, Sakamoto M, Matsuura K, Ushijima K, Maeda Y, Katagiri K, Yamada A, Todo S, Kamura T, Harada M, and Itoh K. Immunological evaluation of vaccination with pre-designated peptides frequently selected as vaccine candidates in an individualized peptide vaccination regimen. *Int J Oncol.* 25: 121-131, 2004.

【非特許文献 2 4】Takedatsu H, Okamura T, Yoshimoto K, Harada M, Koga M, Shichijo S, Sata M, and Itoh K. Expression of epithelial cancer-related antigens in hematologic malignancies applicable for peptide-based immunotherapy. *J Immunother.* 27(4): 289-297, 2004. 40

【非特許文献 2 5】Komatsu N, Shichijo S, Nakagawa M, and Itoh K. New multiplexed flow cytometric assay to measure anti-peptide antibody: a novel tool for monitoring immune responses to peptides used for immunization. *Scand J Clin Lab Invest.* 64: 535-545, 2004.

【非特許文献 2 6】Noguchi M, Itoh K, Yao A, Mine T, Yamada A, Obata Y, Furuta M, Harada M, Suekane S, and Matsuoka K. Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with a low dose of estramustine for HLA-A24+ HRPC patients. *Prostate.* 63: 1-12, 2005.

【非特許文献 2 7】Yajima N, Yamanaka R, Mine T, Tsuchiya N, Honma J, Sano M, Kuramoto T, Obata Y, Komatsu N, Arima Y, Yamada A, Shigemori M, Itoh K, and Tanaka 50

- R. Immunologic evaluation of personalized peptide vaccination for patients with advanced malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 11(16) : 5900-5911, 2005
- 【非特許文献 2 8】Rosenberg SA, Yang JC, and Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10(9): 909-915, 2004.
- 【非特許文献 2 9】Jaeckle KA, Hess KR, Yung WK, Greenberg H, Fine H, Schiff D, Pollack IF, and Kuhn J. Phase II evaluation of temozolomide and 13-cis-retinoic acid for the treatment of recurrent and progressive malignant glioma: a North American brain tumor consortium study. *J Clin Oncol.* 21(12): 2305-2311, 2003.
- 【非特許文献 3 0】Prados MD, Yung WK, Fine HA, Greenberg HS, Junck L, Chang SM, Nicholas MK, Robins HI, Mehta MP, Fink KL, Jaeckle KA, Kuhn J, Hess KR, Schold SC Jr., and North American Brain Tumor Consortium study. Phase 2 study of BCNU and temozolomide for recurrent glioblastoma multiforme: North American brain tumor consortium study. *Neuro-oncol.* 6: 33-37, 2004.
- 【非特許文献 3 1】Rich J N, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, McLendon RE, Koa JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Ushlig SE, Herndon JE 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman A H, Bigner DD, and Friedman HS. Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 22: 133-142, 2004.
- 【非特許文献 3 2】Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, and Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10): 1036-1038, 2005.
- 【非特許文献 3 3】Yagoda A, and Petrylak D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer.* 71: 1098-1109, 1993.
- 【非特許文献 3 4】Scher HI, Mazumdar M, and Kelly WK. Clinical trials in relapsed prostate cancer: Defining the target. *J Natl Cancer Inst.* 88(22): 1623-1634, 1996.
- 【非特許文献 3 5】de Voogt HJ, Smith PH, Pavone-Macaluso M, de Pauw M, and Suci S. Cardiovascular side effects of diethylstilbestrol, cyproterone acetate, medroxyprogesterone acetate and estramustine phosphate used for treatment of advanced prostatic cancer. Results from European organization for research on treatment of cancer trials 30761 and 30762. *J Urol.* 135: 303-307, 1986.
- 【非特許文献 3 6】Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, and Eisenberger MA; TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 351: 1502-1512, 2004.
- 【非特許文献 3 7】Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, and Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* 351: 1513-1520, 2004.
- 【非特許文献 3 8】Kojima S, Suzuki H, Akakura K, Shimbo M, Ichikawa T, and Ito H. Alternative antiandrogens to treat prostate cancer relapse after initial hormone therapy. *J Urol.* 171:679-683. 2004.
- 【非特許文献 3 9】Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, and Rosenberg SA. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.* 56:4749-4757, 1996.

【非特許文献 4 0】Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola F M, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, and White DE. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 4(3):321-327, 1998.

【非特許文献 4 1】Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, and Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 4(3):328-332, 1998.

【非特許文献 4 2】Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, and Boon T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80:219-230, 1999.

【非特許文献 4 3】Slingsluff CL Jr., Yamshchikov G, Neese P, Galavotti H, Eastham S, Engelhard VH, Kittlesen D, Deacon D, Hibbitts S, Grosh WW, Petroni G, Cohen R, Wiernasz C, Patterson JW, Conway BP, and Ross WG. Phase 1 trial of a melanoma vaccine with gp100280-288 peptide and tetanus helper peptide in adjuvant: Immunologic and clinical outcomes. *Clin Cancer Res.* 7:3012-3024, 2001.

【非特許文献 4 4】Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, Spears L, Jeffery G, Marty V, Groshen S, and Weber J. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res.* 5:2756-2765, 1999.

【非特許文献 4 5】Jager E, Gnjjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, and Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(22):12198-12203, 2000.

【非特許文献 4 6】Tsubawa T, Kuwashima N, Sato H, Fellows-Mayle WK, Dusak JE, Okada K, Papworth GD, Watkins SC, Gambotto A, Yoshida J, Pollack IF, and Okada H. Sequential delivery of interferon-alpha gene and DCs to intracranial gliomas promotes an effective antitumor response. *Gene Ther.* 11:1551-8, 2004.

【非特許文献 4 7】The committee of brain tumor registry of Japan: Report of brain tumor registry of Japan (1969-1993) 10th edition. *Neurol medico-chirurgica* 40 (suppl), 2000.

【非特許文献 4 8】Kitamura T. Necessity of re-evaluation of estramustine phosphate sodium (EMP) as a treatment option for first-line monotherapy in advanced prostate cancer. *Int J Urology.* 8: 33-36, 2001.

【非特許文献 4 9】Noguchi M, Mine T, Yamada A, Obata Y, Yoshida K, Mizoguchi J, Harada M, Suekane S, Itoh K, and Matuoka K. Combination therapy of personalized peptide vaccination and low-dose estramustine phosphate for metastatic hormone refractory prostate cancer patients: an analysis of prognostic factors in the treatment. *Oncol Res.* 16:341-349, 2007.

【非特許文献 5 0】Murayama K, Kobayashi T, Imaizumi T, Matsunaga K, Kuramoto T, Shigemori M, Shichijo S, and Itoh K. Expression of the SART3 tumor-rejection antigen in brain tumors and induction of cytotoxic T lymphocytes by its peptides. *J Immunother.* :23(5) 511-518, 2000.

【非特許文献 5 1】Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP, Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):909-15.

10

20

30

40

50

【非特許文献 5 2】Homma S, Komohara Y, Harada M, Saya H, Todo S, Itoh K, Noguchi M, Differential levels of human leukocyte antigen-class I, multidrug-resistance 1 and androgen receptor expressions in untreated prostate cancer cells: the robustness of prostate cancer. *Oncol Rep.* 2007 Aug;18(2):343-6

【非特許文献 5 3】Noguchi M, Kakuma T, Uemura H, Nasu Y, Kumon H, Hirao Y, Moriya F, Suekane S, Matsuoka K, Komatsu N, Shichijo S, Yamada A, Itoh K, A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine plus low dose estramustine phosphate (EMP) versus standard dose EMP in patients with castration resistant prostate cancer, *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Jul;59(7):1001-9. Epub 2010 Feb 10.

【非特許文献 5 4】Noguchi M, Yao A, Harada M, Nakashima O, Komohara Y, Yamada S, Itoh K, Matsuoka K, Immunological evaluation of neoadjuvant peptide vaccination before radical prostatectomy for patients with localized prostate cancer, *Prostate.* 2007 Jun 15;67(9):933-42.

【非特許文献 5 5】Naito M, Itoh K, Komatsu N, Yamashita Y, Shirakusa T, Yamada A, Moriya F, Ayatuka H, Mohamed ER, Matsuoka K, Noguchi M. Dexamethasone did not suppress immune boosting by personalized peptide vaccination for advanced prostate cancer patients. *Prostate.* 2008 Dec 1;68(16):1753-62.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

よって、本発明の目的は、かかる問題点を克服した、患者毎に最適なペプチドを投与可能なテーラーメイド型がんペプチドワクチンを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、患者末梢血中のペプチドに対する抗体を測定することによってペプチドを選択する方法について検討したところ、高い抗体反応が得られるペプチドを患者毎に選択して投与することによって、臨床的効果が得られることを見出した。また、選択され投与されたペプチドについて検討したところ、テーラーメイド型がんペプチドワクチンとして様々な患者に対応しうる最適なペプチドの組を見出すことができた。

【0015】

すなわち、本発明は、以下の a) ~ d) の 6 ~ 13 種類のペプチドから構成される、がんを治療するための薬剤であって、患者末梢血中の各ペプチドに対する抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択して該患者に投与するよう用いられることを特徴とする薬剤を提供する：

a) 配列番号 4、5、および 14 のペプチド、

b) 配列番号 6、8、11、12、および 13 から選択される 3 ~ 5 種類のペプチド、

c) 配列番号 7 および 9 から選択される 0 ~ 2 種類のペプチド、および

d) 配列番号 1、3、および 10 から選択される 0 ~ 3 種類のペプチド。

【0016】

また、本発明は、がんを治療するために投与されるペプチドの選択方法であって、以下の a) ~ d) の 6 ~ 13 種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含む方法を提供する：

a) 配列番号 4、5、および 14 のペプチド、

b) 配列番号 6、8、11、12、および 13 から選択される 3 ~ 5 種類のペプチド、

c) 配列番号 7 および 9 から選択される 0 ~ 2 種類のペプチド、および

d) 配列番号 1、3、および 10 から選択される 0 ~ 3 種類のペプチド。

【発明の効果】

【0017】

本発明の薬剤は、前立腺がんや脳腫瘍などのがん、特に進行性のがんに対して優れた臨床的効果を発揮する。また、本発明の薬剤は、ペプチド群からなる薬剤であり、使用に際

10

20

30

40

50

して特別な設備を必要としないため従来の医薬と同様に取り扱うことができるという利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】HRPC患者におけるペプチド投与量とIFN-値の関係。

【図2】HRPC患者におけるペプチド投与量とFIUの関係。

【図3】膠芽腫患者におけるペプチド投与量とIFN-値の関係。

【図4】膠芽腫患者におけるペプチド投与量とFIUの関係。

【図5】HRPC患者におけるペプチド投与回数とIFN-値の関係。

【図6】HRPC患者におけるペプチド投与回数とFIUの関係。

10

【図7】膠芽腫患者におけるペプチド投与回数とIFN-値の関係。

【図8】膠芽腫患者におけるペプチド投与回数とFIUの関係。

【図9】HRPC患者における投与回数と初回選択ペプチドおよび再選択ペプチドのIFN-値の関係。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明の薬剤について説明する。なお、以下の記載は本発明を限定するものでなく、当業者は本発明の範囲内で種々の改変を行うことができる。

【0020】

本発明の薬剤は、以下に示す配列番号1および3～14から選択される6～13種類のペプチドにより構成される。これらのペプチドは、がん細胞が発現する腫瘍抗原タンパク質に由来するペプチドであり(特許文献4～13)、HLAクラスIIアレルのA24に拘束性されるCTLに認識され、がん細胞に対する細胞傷害活性を誘導するペプチドである。すなわち、本発明の薬剤は、HLA-A24陽性のがん患者に適応する薬剤である。

20

配列番号	名称	アミノ酸配列	
1	EGF-R-800	Asp-Tyr-Val-Arg-Glu-His-Lys-Asp-Asn-Ile	
2	EZH2-735	Lys-Tyr-Val-Gly-Ile-Glu-Arg-Glu-Met	
3	Lck-208	His-Tyr-Thr-Asn-Ala-Ser-Asp-Gly-Leu	
4	Lck-486	Thr-Phe-Asp-Tyr-Leu-Arg-Ser-Val-Leu	30
5	Lck-488	Asp-Tyr-Leu-Arg-Ser-Val-Leu-Glu-Asp-Phe	
6	MRP3-503	Leu-Tyr-Ala-Trp-Glu-Pro-Ser-Phe-Leu	
7	MRP3-1293	Asn-Tyr-Ser-Val-Arg-Tyr-Arg-Pro-Gly-Leu	
8	PAP-213	Leu-Tyr-Cys-Glu-Ser-Val-His-Asn-Phe	
9	PSA-248	His-Tyr-Arg-Lys-Trp-Ile-Lys-Asp-Thr-Ile	
10	PSMA-624	Thr-Tyr-Ser-Val-Ser-Phe-Asp-Ser-Leu	
11	PTH-rP-102	Arg-Tyr-Leu-Thr-Gln-Glu-Thr-Asn-Lys-Val	
12	SART2-93	Asp-Tyr-Ser-Ala-Arg-Trp-Asn-Glu-Ile	
13	SART2-161	Ala-Tyr-Asp-Phe-Leu-Tyr-Asn-Tyr-Leu	40
14	SART3-109	Val-Tyr-Asp-Tyr-Asn-Cys-His-Val-Asp-Leu	

【0021】

本発明の薬剤におけるペプチドは、常套的な方法で製造することができ、例えば、PeptideSynthesis, Interscience, NewYork, 1966; The Proteins, Vo1.2, Academic Press Inc, NewYork, 1976; ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)1985; 医薬品の開発続第十四巻・ペプチド合成、広川書店、1991(これら文献は引用により本明細書に含まれる)などに記載の方法が挙げられるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。また、ペプチドの精製・回収は、ゲルクロマトグラフィー、イオンカラムクロマトグラフ

50

ィーまたはアフィニティークロマトグラフィー等を組み合わせるか、硫安やアルコール等を用いた溶解度差に基づく分画手段等に例示される公知の方法により行うことができる。ペプチドのアミノ酸配列の情報に基づき、これらに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を作製し、当該抗体を用いて特異的に吸着回収する方法も当然ながら利用可能である。

【0022】

本発明の薬剤において、各ペプチドは水溶液化されて患者に投与される。よって、本発明の薬剤は、粉末化したペプチドにより構成されていてもよいが、投与前に容易に水溶液化できるよう製剤化されたペプチドにより構成されることが好ましい。製剤化の方法としては、各ペプチドを生理食塩水や1～6w/v%のアルカリ金属炭酸水素塩水溶液に溶解した溶液を凍結乾燥する方法が挙げられる。

10

【0023】

ペプチドを溶解する溶媒としては、生理食塩水または1～6w/v%のアルカリ金属炭酸水素塩水溶液を用いても、生理食塩水と当該アルカリ金属炭酸水素塩水溶液を混合したものをを用いてもよい。アルカリ金属炭酸水素塩としては、炭酸水素リチウム、炭酸水素ナトリウムおよび炭酸水素カリウムが挙げられるが、特に炭酸水素ナトリウムが好適である。ペプチドを溶解する生理食塩水または炭酸水素塩水溶液の量は、ペプチドを均一に溶解できる量であれば特に制限はないが、得られるペプチド溶液のペプチド濃度が0.4質量%以下、好ましくは0.1～0.4質量%、より好ましくは0.3～0.4質量%となる量とすることが好ましい。

20

【0024】

製剤化は、好ましくは、溶媒に溶解したペプチドをバイアルに分注後、凍結乾燥することにより行う。この場合の溶媒としては生理食塩水が好適であるが、生理食塩水に溶解しにくいペプチドの場合は1～6w/v%のアルカリ金属炭酸水素塩水溶液を用いればよい。

【0025】

本発明の薬剤は、1種類ずつ個別に溶解および凍結乾燥したペプチドにより構成されることが好ましい。しかしながら、2種類以上のペプチドと一緒に溶媒に溶解して凍結乾燥したものや、各ペプチドを溶解および凍結乾燥後に混合したものにより構成されていてもよい。

30

【0026】

このように製剤化したペプチドは、血漿と等張となる量の医薬上許容される純度の水で溶解して投与すればよい。

【0027】

本発明の薬剤は、具体的には

- a) 配列番号4、5、および14のペプチド、
- b) 配列番号6、8、11、12、および13から選択される3～5種類のペプチド、
- c) 配列番号7および9から選択される0～2種類のペプチド、および
- d) 配列番号1、3、および10から選択される0～3種類のペプチド

の6～13種類により構成される。本発明の薬剤を構成するペプチド数は6～13の範囲内であれば特に制限されないが、ペプチド数が多ければ適応可能な患者数およびがんの種類が多くなるという点で好ましい。

40

【0028】

ある態様において、本発明の薬剤は、抗体検査によって選択される頻度が高い配列番号4、5、14、6、8、11、12、および13と、配列番号7および9から選択される0～2種類のペプチド、および配列番号1、3、および10から選択される0～3種類のペプチドの、8～13種類のペプチドから構成される。

【0029】

別の態様において、本発明の薬剤は、配列番号4、5、14、6、8、11、12、および13と、配列番号7および9から選択される0～2種類のペプチドの、8～10種類

50

のペプチドから構成される。

【0030】

さらに別の態様において、本発明の薬剤は、配列番号4、5、14、6、8、11、12、および13の、8種類のペプチドから構成される。

【0031】

本発明の薬剤は、がん種に特異的な抗原以外の抗原、例えばSART-3、SART-2、MRP3等を由来とするペプチドを含むことから、対象となるがんの種類は特に限定されない。例として、前立腺がん、膵臓癌、大腸癌、肺癌、造血器腫、脳腫瘍、子宮癌、子宮頸癌、胃癌、黒色腫、甲状腺癌、肝臓癌、食道癌が挙げられる。好ましくは、本発明の薬剤は、前立腺がんおよび脳腫瘍に用いられる。

10

【0032】

特に、前立腺がんを対象とする場合、本発明の薬剤は、配列番号4、5、14、6、8、11、および12、または配列番号4、5、14、6、8、11、および13の、7種類のペプチドから構成されていてもよい。あるいは、配列番号4、5、14、6、8、および11の6種類のペプチドから構成されていてもよい。

【0033】

また、脳腫瘍を対象とする場合、本発明の薬剤は、配列番号4、5、14、6、11、12、13、7の8種類、あるいは配列番号4、5、14、6、11、12、13の7種類のペプチドから構成されていてもよい。

【0034】

本発明の薬剤は、患者末梢血中に存在する本発明の薬剤を構成する各ペプチドに対する抗体を測定することによって、患者毎に適したペプチドを選択して投与するよう用いられるという点に特徴を有する。

20

【0035】

患者末梢血中の抗体は、ELISAやLUMINEX社が提供するマルチプレックス・フローメトリー技術を用いた測定方法等の、公知の抗原抗体反応を利用した免疫測定法により測定することができる。具体的には、本発明の薬剤を構成するペプチドをそれぞれ抗体に固相化し、この固相化されたペプチドに対して結合する患者末梢血中の抗体を蛍光等によって検出・測定する。この測定値が高いことが当該ペプチドに対する患者の反応性が高いことを示すため、かかるペプチドを投与するペプチドとして選択する。

30

【0036】

患者末梢血中の抗体の反応が測定できたペプチドが複数存在する場合、反応性が高いペプチドから順に複数種を選択すればよい。選択するペプチドは、少なくとも2種以上、好ましくは3~4種、より好ましくは4種である。患者に投与するペプチドの種類は、多ければ多いほど患者のCTLをより多種にわたり誘導でき、ヘテロな集団であるがん細胞をより効率よく排除しうると考えられる。一方、投与にかかる患者の負担は、投与するペプチドの種類が少ない方が軽減される。よって、投与するペプチドは最大4種類とすることが好ましい。

【0037】

したがって、本発明は、がんを治療するために投与されるペプチドの選択方法であって

40

- a) 配列番号4、5、および14のペプチド、
- b) 配列番号6、8、11、12、および13から選択される3~5種類のペプチド、
- c) 配列番号7および9から選択される0~2種類のペプチド、および
- d) 配列番号1、3、および10から選択される0~3種類のペプチド

のa)~d)の6~13種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含む方法に関する。

【0038】

ある態様において、本発明の方法は、配列番号4、5、14、6、8、11、12、および13と、配列番号7および9から選択される0~2種類のペプチド、および配列番号

50

1、3、および10から選択される0～3種類のペプチドの、8～13種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含む。

【0039】

別の態様において、本発明の方法は、配列番号4、5、14、6、8、11、12、および13と、配列番号7および9から選択される0～2種類のペプチドの、8～10種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含む。

【0040】

さらに別の態様において、本発明の方法は、配列番号4、5、14、6、8、11、12、および13の、8種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含む。

10

【0041】

特に、前立腺がんを対象とする場合、本発明の選択方法は、配列番号4、5、14、6、8、11、および12、または配列番号4、5、14、6、8、11、および13の、7種類のペプチド、あるいは、配列番号4、5、14、6、8、および11の6種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含んでいてもよい。

【0042】

また、脳腫瘍を対象とする場合、本発明の選択方法は、配列番号4、5、14、6、11、12、13、7の8種類、あるいは配列番号4、5、14、6、11、12、13の7種類のペプチドに対する患者末梢血中の抗体を測定し、抗体が陽性であったペプチドを選択することを含んでいてもよい。

20

【0043】

なお、本発明のペプチドの選択方法においては、ペプチドに対する抗体の測定によって得られた各ペプチドに対する抗体の測定値が高い順、すなわち抗体の反応性が高い順に3～4種を選択することが好ましい。例えば、蛍光標識を用いた場合の蛍光強度(FIU)や比色定量(OD)等の測定値が挙げられ、標準物質を用いて定量した場合は、その標準物質へ測定値を換算値した値でもよい。

【0044】

このようにして患者毎に選択されたペプチドは、前述のとおり水溶液化され、好ましくはアジュバント等と混合され、投与される。本発明で用いるアジュバントとしては、ペプチドの水溶液をエマルジョン化することでペプチドの投与局所への貯留性を高める不完全フロイントアジュバント(例えばISA-51等、SEPPIC社)やブルランなどの多糖類や、完全フロイントアジュバント、BCG、アラム、GM-CSF、IL-2、CpG等の免疫増強作用を有するものを使用することができる。中でも、不完全フロイントアジュバントが好ましい。

30

【0045】

このように調製されたペプチドは、通常患者の皮下へ投与される。これは、本発明の薬剤を構成するペプチドは、例えば静脈注射等により投与されると速やかに分解されてしまい免疫応答を十分に引き起こすことができないため、および、皮下には抗原を捕獲してHLA分子を介して細胞表面上に提示しCTL等のT細胞やB細胞を活性化する抗原提示細胞が存在することから皮下に投与されたペプチドは細胞傷害活性を示すCTLを効率よく活性化できるためである。

40

【0046】

投与部位は、投与開始時から、可能な限りがんの病変に近いリンパ節付近とすることが好ましく、例えば、前立腺がんであれば大腿部、脳腫瘍であれば背部である。また、当該投与部位に投与の副作用によって炎症等が発生し投与が困難になった場合は、他の部位(腹部や上腕部等)に投与してもよい。

【0047】

50

ペプチドの投与量は、皮下投与が許容される量であれば特に制限はないが、好ましくは1種類のペプチドにつきペプチドの乾燥粉末の質量で1mg以上、より好ましくは1～5mg、さらに好ましくは3～5mgである。5mg以上の量を投与することも可能である。

【0048】

ペプチドの投与頻度は、免疫応答が得られる頻度であればよく、例えば7～28日間に1回、好ましくは7～21日間に1回、より好ましくは7～14日に1回である。投与頻度は投与期間中に変更してもよく、例えば、投与開始から6回目までは7日間に1回の頻度で投与し、7回目以降は患者の状況に応じて14日間に1回の頻度で投与し、十分な免疫応答が得られているのであれば、さらに間隔をあけて21～28日間に1回の投与とするなどが考えられる。なお、「患者の状況」とは、投与部位の炎症、疼痛などの激しい痛み等、投与によって生じる患者の負担を意味する。

10

【0049】

ペプチドの投与回数は、少なくとも6回、好ましくは12回以上、より好ましくは18回以上である。なお、患者が投与に耐えうる限り、投与回数の上限には特に制限はないが、実施例に記載の臨床試験では最大84回まで投与した実績があり、当該回数までの投与は可能である。

【0050】

このようにペプチドを選択して患者に投与することによって、投与されたペプチドに対するCTLが活性化され、がん細胞が排除され、臨床効果を得ることが可能となる。なお、ペプチドを選択して投与しても、当該ペプチドに対する抗体の反応性が上昇しない、または投与したペプチドに対するCTLが活性化しないこともある。そのため、抗体の反応性の上昇を考慮すると、少なくとも6回投与毎、より好ましくは、6～12回投与毎に再度患者より末梢血を採取し、薬剤を構成する各ペプチドに対する抗体の反応性を測定し、反応性の高いペプチドを再選択することが好ましい。このような再選択によって、患者毎に反応性の高い最適なペプチドが選択されるようになり、より優れた免疫応答を得ることができる。

20

【0051】

ペプチドの再選択の回数は特に限定されないが、1回以上、好ましくは2回以上行なうことが好ましい。なお、実施例に記載の臨床試験の結果において、投与開始から24回投与後においては、投与したペプチドに対する抗体の反応が十分得られることにより、投与するペプチドの変更が見られなかったことを考慮すると、6～12回投与毎にペプチドを再選択した場合は1～4回、好ましくは2～4回の再選択でよい。

30

【0052】

本発明の薬剤は、治療対象となるがん種に応じて、他の抗腫瘍薬や治療方法と併用することができる。各患者のがん細胞は、前述のとおりヘテロな集団であり、免疫応答では排除しきれない細胞や、抗腫瘍薬やホルモン療法等に耐性を持つ細胞が存在していることから、本発明の薬剤と他の抗腫瘍薬や治療方法とを併用することによって、がん病変の縮小や生存期間の延長等の臨床効果を高めることが可能となる。他の抗腫瘍薬の例としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害薬、微小管重合阻害薬、分子標的薬等が例示され、具体的には、5-FU、エストラムスチン、ドセタキセル、テモゾロミド、シスプラチン、ジェムザール、リツキシマブ等が挙げられる。また、他の治療方法としては、手術、放射線療法、ホルモン療法（デキサメタゾン、ミトキサントロン、プレゾニゾロン、エストロゲン、プロゲステロン等のステロイドやリュープリン等のアナログ剤）等が挙げられる。

40

【0053】

本発明の薬剤と他の抗腫瘍薬や治療方法とを併用する場合、本発明の薬剤がCTL等の血球系の細胞を活性化して効果を発揮することから、造血系や免疫応答の活性化に影響を及ぼさない範囲で他の抗腫瘍薬や治療方法を使用することが好ましい。例えば、抗腫瘍薬の投与後リンパ球数が（例えば、500個/mL以上、より好ましくは1,000個/mL以上に）回復してから本発明の薬剤を投与する、本発明の薬剤を投与した後に他の抗腫

50

瘍薬や治療方法を用いる、あるいは本発明の薬剤の投与期間中に白血球数やリンパ球数の減少を起こさない範囲で他の抗腫瘍薬や治療方法を用いる、などの方法が考えられる。

【0054】

例えば、本発明の薬剤とエストラムスチンを併用する場合、エストラムスチンが造血系に影響を及ぼすため、本発明の薬剤の投与期間中のエストラムスチンの投与量は180～280mg/日とすることが好ましい。また、本発明の薬剤とデキサメタゾンを併用する場合、デキサメタゾンに免疫応答を抑制する作用があるため、本発明の薬剤の投与期間中のデキサメタゾンの投与量は0.5～1mg/日とすることが好ましい。一方、LH-RHアナログ剤であるリュープリンは造血系および免疫系に対する影響が少ないため、本発明の薬剤の投与期間中にリュープリンを投与する場合でも、通常の投与量で投与することが可能である。このように、薬剤に応じて適宜調整を行なうことで、本発明の薬剤の投与期間中の併用も可能となる。

10

【0055】

以下、本発明を実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明は記載される実施例に制限されるものではない。

【実施例】

【0056】

14種類の腫瘍抗原ペプチド(配列番号1～14)を用いて、前立腺がんおよび脳腫瘍(膠芽種)を適応症とする臨床試験を行なった。

【0057】

20

(患者)

本臨床試験に参加した被験者は、HLA-A24陽性であり、ホルモン療法およびエストラムスチンに対して抵抗性である再燃前立腺がん(HRPC)を有する患者15名、および手術等の初期治療に抵抗性であり再発が見られる進行性の膠芽腫(glioblastoma multiforme)を有する患者12名であった。なお、これらの患者の状態は、前立腺がん患者では、パフォーマンスが0または1、リンパ球数が1,000個/mL以上であり、膠芽腫患者では、パフォーマンスステータスが0から3、リンパ球数が500個/mL以上であった。

【0058】

(薬剤)

30

本臨床試験では、配列番号1～14の各ペプチドの粉末(純度95%以上)をそれぞれ生理食塩水または重曹に溶解し凍結乾燥して得られた製剤と、不完全フロイントアジュバント(ISA-51VG、SEPPIC社)とを用いた。

【0059】

(ペプチド選択検査並びに再選択検査)

配列番号1～14の各ペプチドの粉末を用いて、特許第3960614号(引用により本明細書に含まれる)に記載の方法で、Luminox社が提供するマルチプレックス・フローメトリー技術を用いて、患者末梢血中のペプチドに対する抗体を測定した。より具体的には、ペプチド粉末をそれぞれDMSOに溶解後、マイクロビーズ(Luminox社)の表面にペプチドを固相化した担体を調製した。次いで、患者より採血して得られた血漿(ヘパリン血)と当該固相担体を混合して、血漿に含まれる抗体と担体に固相化されたペプチドとを反応させた。そして、反応後に固相担体を回収し、ビオチン化抗ヒト抗体(Vector社)およびアビジン化した蛍光色素(ストレプトアビジン-PE、Invitrogen社)を用いて、担体上のペプチドに結合した患者末梢血中の抗体を蛍光標識し、この蛍光強度(FIU)を測定した。

40

【0060】

このようにして得られたFIUを基に、FIUの数値が高い順から4種類のペプチドを患者毎に選択した。また、各ペプチドを患者へ1クールあたり6回投与として各クール終了後に採血して得られた血漿を用いてペプチドに対する抗体を再度測定し、得られたFIUの数値の高い順に4種類のペプチドを選択しなおして患者への投与を行なった。

50

【 0 0 6 1 】

(ペプチドの投与)

選択された4種のペプチドへそれぞれ注射用水を添加して水溶液化し、ISA-51VGと混合してエマルジョン化し、患者の皮下へ投与した。ペプチドの原末換算で1ペプチドあたり、1mg投与群(HRPC患者6名、膠芽腫患者6名)、3mg投与群(HRPC患者6名、膠芽腫患者6名)、5mg投与群(HRPC患者3名)に分けて1クールあたり6回投与として投与を行なった。なお、5mg投与群は、投与部位の炎症反応に伴い、3mgへの減薬または最大2回までの休薬を可能として投与を行なった。また、以後の解析においては、1回の休薬を1回の投与分としてカウントし、1クール6回投与として解析している。

10

【 0 0 6 2 】

投与は、投与開始から1クール終了後までは7日間に1回の頻度で行い、7回目の投与以降は、患者の投与部位の炎症の状態によって医師の判断により7日間または14日間に1回の頻度で行なった。

【 0 0 6 3 】

投与部位は、HRPC患者は大腿部、膠芽腫患者は背部とし、選択されたペプチドをそれぞれ個別に皮下へ投与した。

【 0 0 6 4 】

なお、ペプチドの投与は、患者が継続治療を希望し、患者の疾病の進行が見られない間は継続し、疾病の進行が見られると医師が判断したときに終了した。具体的には、前立腺がんにおいては、PSAの上昇や新たな転移が見られた場合等に、医師が疾病の進行を判断した。また、脳腫瘍においては、画像診断(2方向測定法またはRECIST法)による判定で病変部の増大が見られた場合や転移が見られた場合等に、医師が病状の進行を判断した。

20

【 0 0 6 5 】

また、HRPC患者は、ペプチド投与期間中、去勢状態維持のために3.75mg/月のリュープリンまたは3.6mg/月の酢酸ゴセレリンを投与するとともに、エストラムスチンを280mg/日で併用した。

【 0 0 6 6 】

(CTL活性の測定)

投与開始時および各クールの終了時に採血して得た末梢血からPBM Cを分離して凍結保存し、投与終了後、全てのPBM Cを用いて、既知の方法(Hida N, Maeda Y, Katagiri K, Takasu H, Harada M, Itoh K. A simple culture protocol to detect peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in circulation. Cancer Immunol Immunotherapy 2002; 51: 219-228. (引用により本明細書に含まれる))でCTL活性を測定した。まず、各投与ペプチドの存在下でPBM Cを2週間培養後、このPBM Cと、HLA分子を介して投与ペプチドを提示しているHLA-24陽性の標的細胞とを共培養した。そして、PBM C中のCTLが標的細胞と反応することで培養上清中に分泌されるIFN- γ を測定することによって、CTL活性を測定した。なお、共培養は、1ペプチドあたり4つの独立した条件で培養を行い、各採血で得られたPBM C毎に1ペプチドあたり4つの値を得て、この4つの値の合計をIFN- γ 値(pg/mL)として後述の解析に用いた。

30

40

【 0 0 6 7 】

(臨床効果の評価)

臨床効果の評価は以下のようにして行った。

HRPCについては、臨床試験の本登録日からの生存期間を3年間観察し、生存期間の中央値(MST)を算出した。その結果、表1に示すとおり、15例のMSTは23.8ヶ月であった(2010年3月10日現在)。また、3mg以上を投与した被験者は29.4ヶ月、1mg投与では22.8ヶ月であり、3mg以上を投与したほうがMSTは長かった。なお、ホルモン療法抵抗性となった前立腺がんに対して化学療法剤ドセタキセル

50

を用いた報告（非特許文献 36、37）における MST が、ドセタキセルとエストラムスチンの併用で 17.5 ヶ月、ドセタキセルとプレドニゾロンの併用で 18.9 ヶ月であったことを考慮すると、本薬剤は生存期間の延長効果を有することが示唆された。

【表 1】

	全群	1mg群	3mg+5mg群
MST	23.8	22.8	29.4
n	15	6	9

10

【0068】

一方、脳腫瘍については、6 回投与ごとに病変部の MRI 検査を行い、腫瘍形態変化の判定を行なった。2 方向測定法では、測定可能病変の長径とそれに直角に交わる最大径の積によって病変部の増大または縮小を判定し、RECIST 法では、最大で 5 箇所の測定可能病変について各病変の最長径の和によって、病変部の増大または縮小を判定した。結果を表 2 に示す。表中、「PR」は 2 方向測定法または RECIST 法のいずれかで一部奏効（積が 50% 以上減少または和が 30% 以上減少）、すなわち病変部の縮小効果があったことを示し、「NC」は病変部の増大がなかったことを示し、「PD」は病変部の増大等の疾病の進行が見られたことを示している。

20

【表 2】

	PR	NC	PD
全群	2	5	5
1mg投与群	1	3	2
3mg投与群	1	2	3

【0069】

本発明の薬剤によって、進行性の膠芽腫において 2 例の PR、5 例の NC が得られたことから、本薬剤は膠芽腫の疾病の進行を抑制し得るものと考えられた。

30

【0070】

なお、HRPC 患者 15 例、膠芽腫患者 12 例における副作用は軽微な副作用のみであり、本薬剤は優れた安全性を有することも確認することができた。

【0071】

（投与量と免疫応答における解析）

HRPC 患者について、1 mg 投与群（レベル I）、3 mg 投与群（レベル II）、5 mg 投与群（レベル III）における IFN- γ 値または FIU の平均を算出して、投与量と免疫応答との関係を解析した。IFN- γ 値についての結果を表 3 および図 1 に、FIU についての結果を表 4 および図 2 に示す。

40

【表 3】

前立腺癌/CTL	1mg群	3mg群	5mg群	3mg+5mg群
pre	368	258	513	343
post	677	7,272 *	3,815 *	6,087 *

* : 投与前 (pre) の値に対して $p < 0.05$

【表 4】

前立腺癌/Ab	1mg群	3mg群	5mg群	3mg+5mg群
pre	387	147	221	171
post	11,172*	14,012*	17,444*	15,125*

*：投与前（pre）の値に対して $p < 0.05$

【0072】

同様に、膠芽腫患者について、1mg投与群（レベルI）、3mg投与群（レベルII）におけるIFN-値またはFIUの平均を算出して、投与量と免疫応答との関係を解析した。IFN-値についての結果を表5および図3に、FIUについての結果を表6および図4に示す。

10

【表 5】

脳腫瘍/CTL	1mg群	3mg群
pre	124	98
post	2,594*	1,845*

*：投与前（pre）の値に対して $p < 0.05$

20

【表 6】

脳腫瘍/Ab	1mg群	3mg群
pre	188	85
post	919*	1,201*

*：投与前（pre）の値に対して $p < 0.05$

【0073】

HRPC患者では、3mg以上の投与（3mg投与群、5mg投与群、または両方）において投与後のIFN-値が投与前に比べ有意に増加した（表3）。また、FIUは、全ての群において投与前に比べ投与後に有意に増加した（表4）。一方、膠芽腫患者においては、1mg投与以上で有意なIFN-値およびFIUの増加が認められた（表5、6）。

30

【0074】

これらの結果から、少なくとも1mgの投与、より好ましくは3mg以上、より好適には3mg～5mgの投与により、CTLの活性化が得られることがわかった。なお、5mgの投与では、投与は可能であるものの投与部位の炎症のために投与間隔をあける必要がある患者が存在したことから、患者への負担とCTLの活性化の双方を考慮すると、ペプチドの投与量は好ましくは最大5mgであり、より好ましくは3～5mgであると考えられた。

40

【0075】

（投与回数と免疫応答における解析）

HRPC患者について、1mg投与群および3mg以上の投与群において、投与前から6クールまでの各クールの終了時に得た血漿又はPBMCより得られたIFN-値およびFIUの平均値を算出し、投与回数と免疫応答との関係について解析を行なった。IFN-値についての結果を表7および図5に、FIUについての結果を表8および図6に示す。なお、表および図の「投与回数」とは各クール終了時の合計投与回数であり、1クールあたりの投与回数は6回である。

【表 7】

投与回数	0	6	12	18	24	30	36
全群	353	1,651*	1,065	3,912*	5,139*	6,097*	4,586*
1mg群	368	908	284	469	1,209	524	640
≥3mg群	343	2,146#	1,846#	6,207*	8,283*	11,670*	8,532*

* : 投与回数「0」の値に対して $p < 0.05$,

: 投与回数「0」の値に対して $p < 0.1$

10

【表 8】

投与回数	0	6	12	18	24	30	36
全群	271	1,542*	10,665*	17,125*	18,760*	18,515*	21,606*
1mg群	387	652	4,349*	9,497*	12,702*	12,358*	16,966*
≥3mg群	171	2,311*	15,297*	22,764*	23,035*	22,992*	24,137*

* : 投与回数「0」の値に対して $p < 0.05$

20

【0076】

同様に、膠芽腫患者について、1mg投与群(レベルI)および3mg以上の投与群(レベルII)において、投与前から2クールまでの各クールの終了時に得た血漿又はPBM Cより得られたIFN-値およびFIUの平均値を算出し、投与回数と免疫応答との関係について解析を行なった。IFN-値についての結果を表9及び図7に、FIUについての結果を表10および図8に示す。なお、表および図の「投与回数」とは各クール終了時の合計投与回数であり、1クールあたりの投与回数は6回である。

【表 9】

	0	6	12
全群	111	1,483*	2,632*
1mg群	124	1,060#	2,679*
≥3mg群	98	1,906*	2,586#

30

* : 投与回数「0」の値に対して $p < 0.05$,

: 投与回数「0」の値に対して $p < 0.1$

【表 10】

	0	6	12
全群	136	181	715*
1mg群	188	247	1,462*
≥3mg群	85	118	181#

40

* : 投与回数「0」の値に対し $p < 0.05$,

: 投与回数「0」の値に対し $p < 0.1$

【0077】

H RPC患者では、CTLについては18回投与後に3mg以上の投与群において有意な増加が認められた(表7)。また、抗体については、全群では6回投与後、1mg投与群では12回投与後に有意な増加が認められた(表8)。このことから、各ペプチドを18回、3mg以上投与することでCTLを活性化できることがわかった。

50

【 0 0 7 8 】

また、膠芽腫患者では、CTLについては6回投与後から有意な上昇が確認でき（表9）、抗体については12回投与後から有意な上昇が確認された（表10）。

【 0 0 7 9 】

以上の結果から、ペプチドの投与回数は少なくとも6回以上、より好ましくは12回以上であり、前立腺がんについては18回以上が最も好ましいことがわかった。なお、投与回数の上限に制限はなく、患者が投与に耐えうる限り投与可能であるが、本試験では前立腺がん患者で最大54回、膠芽腫患者で最大79回の投与がなされていることから、少なくとも79回までは投与可能であるといえる。

【 0 0 8 0 】

さらに、抗体の値は、12回投与後にほぼプラトーに達することがわかった（図3）。よって、投与したペプチドの免疫応答を確認しペプチドを再選択する頻度に関して、6回投与、より好ましくは6～12回投与ごとに各ペプチドに対する抗体を調べることで、各患者に最適なペプチドを選択することができることもわかった。

【 0 0 8 1 】

（抗体とCTLの相関関係解析）

ペプチドの投与量および投与回数に応じてCTL活性または抗体の反応性が増加することがわかったため、CTL活性の増加と抗体の反応性の増加に相関関係があるか否かについて解析を行なった。なお、解析は、投与回数が全体的に多いHRPC患者について行なった。

【 0 0 8 2 】

CTL活性化については、各採血ポイントのPBMCより得られたIFN- γ 値からペプチド投与前のIFN- γ 値を差引いた値を算出し、患者毎にこの値の平均値（ \bar{x} ）を算出した。一方、抗体については、投与開始時のFIUの値が投与後の値に比べ極端に小さいことから、各採血ポイントで得られたFIUの値の平均を患者毎に算出した。次いで、患者毎に得られた \bar{x} とFIUの平均値の間における相関を解析した。得られた相関係数を表11に示す。

【表11】

	全群	1mg	3mg	5mg	3mg&5mg
r	0.65	-0.40	0.96	0.61	0.69
n	15	6	6	3	9
p	0.01	0.43	0.00	0.58	0.04

【 0 0 8 3 】

CTLの増加が有意に認められた3mg投与群、3mg投与群と5mg投与群を合わせた群（3mg以上の投与群）、および全群において、有意な相関関係が得られた。

【 0 0 8 4 】

表7～11の結果から、CTLの反応が有意に得られた3mg投与以上の群で見ると、（1）抗体の反応性は6回投与後から有意な増加が見られること、（2）CTL活性は6回投与後から上昇する傾向が見られ、抗体より遅れて18回投与後から有意な増加が見られること、（3）抗体の反応性とCTL活性の増加は相関すること、がわかる。

【 0 0 8 5 】

すなわち、各ペプチドに対して反応を示す抗体の測定値を基にペプチドを再選択して投与することにより、投与したペプチドに対するCTLを効率よく増加させることができ、かかる選択方法によって各患者に最適なペプチドを選択して投与することが可能であると考えられた。

【 0 0 8 6 】

HRPC患者において、CTLの有意な増加が見られた3mg投与群および5mg投与群のうちペプチドの再選択が行なわれた7症例について、初回の選択で選ばれたペプチド

10

20

30

40

50

によるCTL反応と再選択によって投与されたペプチドによるCTL反応とをIFN- γ 値を用いて解析した。結果を表12および図9に示す。なお、初回のペプチド再選択が1クール目終了時に行なわれていることから、これら表および図には再選択後の測定値（2クール目終了時以降の測定値）の平均を示している。また、表および図の「投与回数」とは各クール終了時の合計投与回数であり、1クールあたりの投与回数は6回である。

【表12】

投与回数	12	18	24	30	36
初回選択ペプチド	1,736	5,163	3,982	5,291	4,604
再選択ペプチド	27	1,044	4,301	6,379	3,928

10

【0087】

表12の結果から、6回投与後の再選択によって投与されたペプチドにとって18回投与後に相当する24回投与以降は、CTL活性化全体に対する再選択したペプチドによるCTL活性化の割合が高かった。このことから、ペプチドの再選択によって選ばれたペプチドに対するCTLの活性化が、各患者の全体のCTLの活性化に大きく寄与していることがわかった。なお、ペプチドを再選択した人数は、6回投与後で7人中6人、12回投与後で6人中3人、18回投与後で5人中2人であり、24回投与後は0人であった。

20

【0088】

（免疫応答と生存期間に関する解析）

さらに、HRPC患者において、患者毎に得られた値およびFIUの平均を算出し、生存期間との相関関係を解析した。得られた相関係数の結果を、値については表13に、FIUについては表14に示す。

【表13】

	全群	1mg	3mg	5mg	3mg&5mg
r	0.29	-0.69	0.92	0.51	0.53
n	15	6	6	3	9
p	0.29	0.13	0.01	0.66	0.14

30

【表14】

	全群	1mg	3mg	5mg	3mg&5mg
r	0.24	-0.32	0.89	0.99	0.61
n	15	6	6	3	9
p	0.39	0.54	0.02	0.07	0.08

40

【0089】

値およびFIUのいずれにおいても、3mg以上を投与した群においてCTLの活性化または抗体の上昇と生存期間との間において相関する傾向が見られ、特に3mg投与群では強い相関関係が得られた。この結果から、少なくとも3mg以上、好ましくは3~5mgのペプチドを投与することにより、抗体の反応性またはCTL活性の増加が生存期間の延長に寄与するものと考えられた。

【0090】

（投与ペプチドに関する解析）

HRPC患者15例（合計402回投与）と膠芽腫患者12例（合計198回投与）に

50

おける各ペプチドの使用頻度、投与者数、ペプチド投与後の抗体の測定値（F I U）およびCTLのIFN - 値の各平均値、平均投与回数を算出した。結果を表15に示す。

【表15】

ペプチド	前立腺癌						脳腫瘍							
	使用頻度		Ab Post 平均	CTL(IFN)		平均 投与 回数	IFN投与後平均/ 平均投与回数	使用頻度		Ab Post 平均	CTL(IFN)		平均 投与 回数	IFN投与後平均/ 平均投与回数
	治療 使用率	投与 者数		治療 使用率	投与 者数			治療 使用率	投与 者数					
			治療 使用率			投与 者数	治療 使用率			投与 者数				
GP-101	4%	1	16,491	129	18.0	7	0%	0	-	-	-	-	-	
GP-102	0%	0	-	-	-	-	0%	0	-	-	-	-	-	
GP-103	3%	1	22	100	12.0	8	0%	0	-	-	-	-	-	
GP-104	96%	15	11,538	3,629	25.2	144	97%	12	920	2,986	16.0	187		
GP-105	70%	12	13,096	5,274	23.0	229	55%	8	3,969	2,706	15.0	180		
GP-106	13%	2	20,080	22,699	27.0	841	24%	3	297	3,134	18.0	174		
GP-107	40%	12	2,888	370	13.5	27	73%	8	302	151	18.0	8		
GP-108	72%	9	19,039	2,209	30.7	72	0%	0	-	-	-	-		
GP-109	30%	5	11,672	494	22.8	22	0%	0	-	-	-	-		
GP-110	3%	2	310	2,190	6.0	365	0%	0	-	-	-	-		
GP-111	21%	4	11,125	5,576	27.0	207	15%	4	241	3,001	7.5	400		
GP-112	6%	4	53	459	6.0	76	55%	8	1,338	1,308	14.3	92		
GP-113	10%	4	207	600	9.0	67	36%	5	67	5,139	14.4	357		
GP-114	31%	11	10,557	4,592	8.4	547	45%	9	297	821	10.0	82		

10

20

30

40

【0091】

配列番号1~14のうち、配列番号2は、ペプチド選択において選択されておらず、配列番号1および3~14の13種類のペプチド群からペプチドを選択すればよいことがわかった。特に、配列番号4、5、14は、前立腺がんおよび脳腫瘍のいずれにおいても使

50

用頻度、投与者数、抗体およびCTLの値が良好であり、配列番号6、8、11、12、13は、前立腺がんまたは脳腫瘍のいずれかにおいて使用頻度、投与者数、抗体またはCTLの値が良好であることがわかった。

【0092】

一方、配列番号1、3および10は前立腺がんおよび脳腫瘍のいずれにおいても使用頻度が低く、このうち配列番号3は1名のHRPC患者において12回の投与がなされたが、抗体およびCTLの反応性が増加せず、その後のペプチド再選択検査によって他のペプチドに変更されていた。一方、配列番号1は1名のHRPC患者で使用されたが、CTLの反応性が他のペプチドに比べ低かった。さらに、配列番号10はCTLの値が高くなっているが、2例中1例で高い値が測定されたものの継続的に投与されていなかった。

10

【0093】

特に、配列番号3は、同程度の投与頻度である配列番号1および10と比べると抗体とCTLの増加が見られないことから、ペプチドを抗体で選択して投与する方法においては、配列番号2および3を除く12種類のペプチド群からペプチドを選択しても十分な臨床効果が得られるものと考えられた。また、配列番号3を除くことで、よりCTLの活性化や抗体の増加が期待できる他のペプチドを選択して投与し得るため、より優れた臨床効果を期待し得るものと考えられた。

【0094】

すなわち、ペプチドの継続投与によってCTLが活性化され、延命効果が発揮されることを考慮すると、配列番号1および3～14の13種類から配列番号3を除く12種類、さらに配列番号1または10を除く11種類、あるいは当該13種類から配列番号1、3、10を除く10種類で、十分な延命効果を期待しうるものと考えられた。さらには、これらのペプチドが除かれることによって、よりCTLの活性化や抗体の増加が期待できるペプチドが投与されることになるため、CTLの活性化や抗体の増加が延命効果と関連することを考慮すると、よりCTLの活性化や抗体の増加が見込まれる他のペプチドを投与することでより優れた臨床効果が期待できることとなる。

20

【0095】

また、配列番号4～9および11～14の10種類について、表14の1クールあたり6回投与とした場合の平均投与回数およびINF-値から1投与あたりのINF-値を算出すると、配列番号7および9は他のペプチドよりもCTL活性の増加が低く、CTLの活性化による延命効果が弱いものと考えられた。よって、当該10種類から配列番号7または9のいずれか一方を除く9種類、または両方を除く8種類でも、延命効果が得られるものと考えられた。さらに、配列番号7は12名、配列番号9は5名の被験者に投与されており、全ての患者において、各クールで投与された4種のペプチドのうち1種は配列番号7または9であった。従って、これらのペプチドに対するCTL活性の増加が十分でなかったことを考慮すると、投与するペプチドは最低3種類でもよいことが考えられた。

30

【0096】

さらに、配列番号4～6、8、および11～14の8種類のうち、配列番号12および13は、HRPC患者では他のペプチドに比べCTL活性化の値が低く、また平均投与回数が少ないことから、前記と同様の理由により除外可能と考えられた。すなわち、前立腺がんを対象とした場合は、配列番号4～6、8、11、および14の6種類で十分に延命効果が期待できると考えられた。同様に、配列番号8は膠芽腫患者に対して使用されていないことから、脳腫瘍を対象とした場合は、配列番号4～6、および11～14の7種類で延命効果が期待できると考えられた。

40

【0097】

これらを検証するため、HRPC患者を対象として、表16に示す6～13種類のペプチドの組により得られたCTLの測定値と生存期間との相関関係を解析した。解析によって得られた相関係数(R)を表16に示す。表中の「3種合致割合」とは、投与されたペプチドのうちいずれか3種類が全てのクールで継続して投与されていた患者の15人中の

50

割合を示し、「抗体陽性率」とは、抗体検査において3種類以上のペプチドに対する抗体が陽性であった患者の15人中の割合を示す。

【表16】

No.	種類	ペプチドNo.		全群 (n=15)	3mg (n=6)	3mg & 5mg (n=9)	3種合致 割合(%)	抗体 陽性率(%)	MST
1	6種	4,5,14	6,8,11	0.29	0.90	0.56	60%	100%	22.08
2	7種	4,5,14	6,8,11,12	0.29	0.92	0.56	67%	100%	22.92
3	7種	4,5,14	6,8,11,13	0.29	0.90	0.57	73%	100%	23.75
4	8種	4,5,14	6,8,11,12,13	0.30	0.92	0.57	80%	100%	26.60
5	9種	4,5,14	6,7,8,11,12,13	0.31	0.94	0.56	87%	100%	23.75
6	9種	4,5,14	6,8,9,11,12,13	0.32	0.91	0.57	87%	100%	23.75
7	10種	4,5,14	6,7,8,9,11,12,13	0.32	0.93	0.57	100%	100%	23.75
8	11種	4,5,14	1,6,7,8,9,11,12,13	0.33	0.93	0.57	100%	100%	23.75
9	11種	4,5,14	6,7,8,9,10,11,12,13	0.32	0.93	0.56	100%	100%	23.75
10	12種	4,5,14	1,6,7,8,9,10,11,12,13	0.32	0.93	0.56	100%	100%	23.75
11	13種	4,5,14	1,3,6,7,8,9,10,11,12,13	0.32	0.93	0.57	100%	100%	23.75

10

【0098】

表16に示されるように、6種類のペプチドの組でも、CTLの値と生存期間との相関係数は大きな影響を受けないことがわかった。また、10～13種類では100%（15例中15例）、8種類で80%（15例中12例）であり、6種類でも約6割の患者に3種類以上のペプチドを全てのクールで継続して投与できることがわかった。また、被験者のMSTは、No.3～11のペプチドの組では同等以上の値であったが、No.1および2の組は若干低くなる傾向を示した。この結果から、好ましくは7種類以上のペプチドの組とすることで、ほとんどの被験者において同等の効果をえられるものと考えられた。

20

【0099】

同様に、12例の膠芽腫患者における3種合致割合と抗体陽性率について解析を行った。結果を表17に示す。

30

【表17】

No.	種類	ペプチドNo.		3種合致 割合(%)	抗体 陽性率(%)
1	7種	4,5,14	6,11,12,13	100%	100%
2	8種	4,5,14	6,7,11,12,13	100%	100%
3	8種	4,5,14	6,8,11,12,13	100%	100%
4	9種	4,5,14	6,7,8,11,12,13	100%	100%
5	9種	4,5,14	6,8,9,11,12,13	100%	100%
6	10種	4,5,14	6,7,8,9,11,12,13	100%	100%
7	11種	4,5,14	1,6,7,8,9,11,12,13	100%	100%
8	11種	4,5,14	6,7,8,9,10,11,12,13	100%	100%
9	12種	4,5,14	1,6,7,8,9,10,11,12,13	100%	100%
10	13種	4,5,14	1,3,6,7,8,9,10,11,12,13	100%	100%

40

【0100】

表17に示されるように、膠芽腫患者では7種類のペプチドでも3種合致割合が100%（12人中12人）であった。

50

【 0 1 0 1 】

さらに、投与回数および投与量の相違が臨床効果に影響するかについて、H P R C 患者 15 名を群分けして解析した。解析は、1) 3 m g 以上および 1 2 回以上投与した患者とそれ以外の患者の 2 群に分けて M S T を算出する、2) 3 m g 以上および 1 8 回以上投与した患者とそれ以外の患者の 2 群に分けて M S T を算出する、の 2 種類の解析を行った。結果を表 1 8、表 1 9 に示す。

【表 1 8】

	全群	1mg投与または 12回未満投与	3mg以上 および 12回以上投与
MST	23.8	22.9	32.6
n	15	8	7

10

【表 1 9】

	全群	1mg投与または 18回未満投与	3mg以上 および 18回以上投与
MST	23.8	21.9	32.8
n	15	9	6

20

表 1 8 および 1 9 より、C T L や抗体の上昇が確認できる 1 2 回投与または 1 8 回投与した患者の群は、それ以外の群に比べ M S T が長い傾向があることがわかった。

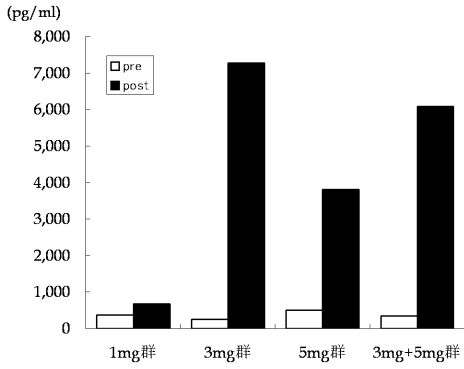
【産業上の利用可能性】

【 0 1 0 2 】

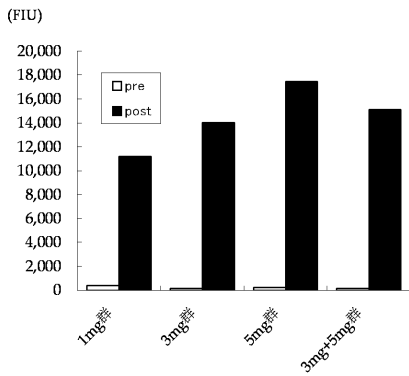
本発明の薬剤は、腫瘍抗原由来のペプチド群からなる薬剤であり、手術、化学療法、放射線療法に次ぐ第四の治療方法として期待される免疫療法に用いるための薬剤である。本薬剤は、患者毎に適したペプチドを選択して投与することができるものであり、前立腺がんや脳腫瘍といった治療が困難ながんの進行を抑制する臨床的効果を有するため有用である。また、本薬剤は、他の治療方法との併用も可能である。

30

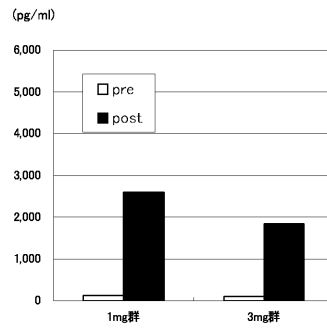
【 図 1 】



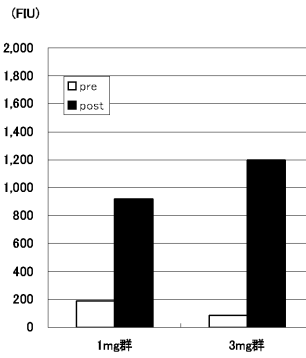
【 図 2 】



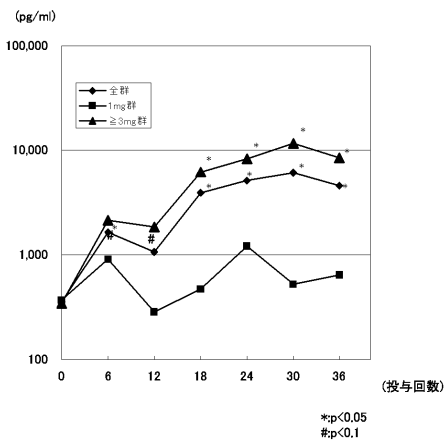
【 図 3 】



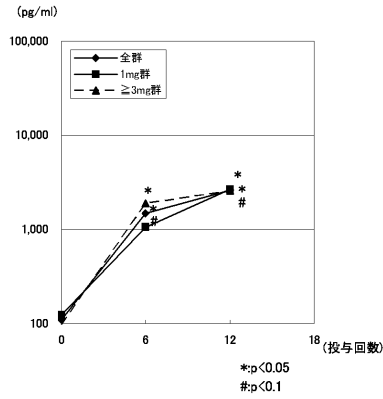
【 図 4 】



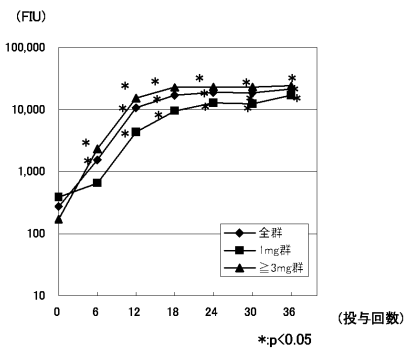
【 図 5 】



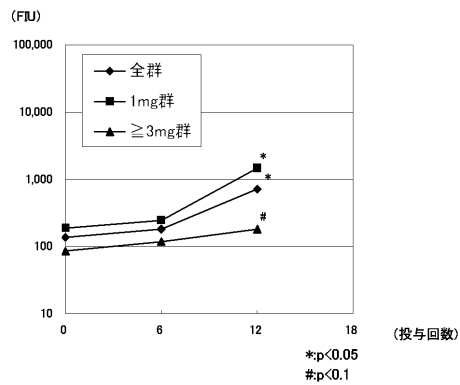
【 図 7 】



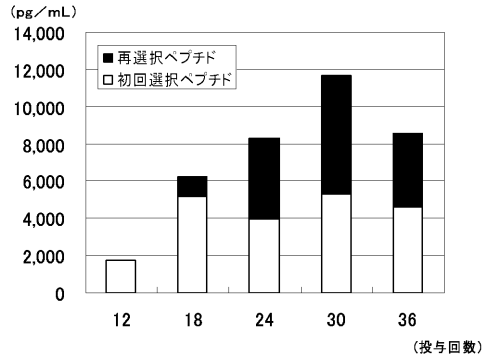
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2012005161000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/065033
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-99001 A (Kyogo ITO), 14 April 2005 (14.04.2005), entire text (Family: none)	1-14
Y	WO 2010/050181 A1 (Green Peptide Co., Ltd.), 06 May 2010 (06.05.2010), entire text (Family: none)	1-14
Y	WO 2009/038026 A1 (Kurume University), 26 March 2009 (26.03.2009), entire text & US 2010/0278851 A & EP 2196209 A1 & CN 101854945 A & KR 10-2010-0047894 A	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than 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 "Y" 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 July, 2011 (22.07.11)		Date of mailing of the international search report 02 August, 2011 (02.08.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/065033

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-170799 A (Kurume University), 30 June 2005 (30.06.2005), entire text & US 2005/0287160 A1	1-14
Y	JP 2007-145715 A (Green Peptide Co., Ltd.), 14 June 2007 (14.06.2007), entire text & US 2008/0014186 A1 & EP 1767541 A1 & WO 2005/116056 A1	1-14
Y	WO 2007/083763 A1 (Green Peptide Co., Ltd.), 26 July 2007 (26.07.2007), entire text; particularly, example 1 (Family: none)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/065033

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention set forth in claim 15 involves a method for treatment or diagnosis of human being.
2. 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. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. 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. 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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/065033

Although it is defined in claim 11 of the present international application that three or four kinds of peptides are administrated, it is defined in claims 1-10 to which claim 11 refers that at least six kinds of peptides are administrated, and therefore, the statement in claim 11 cannot match with the statements in claims 1-10.

Consequently, the invention in claim 11 of the present international application cannot be clearly understood, and therefore, the search with respect to said claim 11 has been carried out on the basis of the embodiments specifically set forth in the description of the present international application.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/065033									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	JP 2005-99001 A (伊藤 恭悟) 2005.04.14, 全文 (ファミリーなし)	1-14									
Y	WO 2010/050181 A1 (株式会社グリーンペプタイド) 2010.05.06, 全文 (ファミリーなし)	1-14									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの									
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの									
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 22.07.2011		国際調査報告の発送日 02.08.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 川寄 洋祐	4C 4765								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3452								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 5 0 3 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2009/038026 A1 (学校法人 久留米大学) 2009.03.26, 全文 & US 2010/0278851 A & EP 2196209 A1 & CN 101854945 A & KR 10-2010-0047894 A	1-14
Y	JP 2005-170799 A (学校法人 久留米大学) 2005.06.30, 全文 & US 2005/0287160 A1	1-14
Y	JP 2007-145715 A (株式会社グリーンペプタイド) 2007.06.14, 全文 & US 2008/0014186 A1 & EP 1767541 A1 & WO 2005/116056 A1	1-14
Y	WO 2007/083763 A1 (株式会社グリーンペプタイド) 2007.07.26, 全文、特に実施例1 (ファミリーなし)	1-14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 6 5 0 3 3

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 15 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項15に係る発明は、ヒトを治療または診断する方法を含むものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/065033

本国際出願の請求項11は、3または4種類のペプチドが投与されることを特定しているが、同請求項の引用する請求項1～10には、少なくとも6種類以上のペプチドを投与することが特定されており、請求項11の記載は、請求項1～10の記載と整合していない。

したがって、本国際出願の請求項11に係る発明を明確に把握することができず、同請求項の調査にあたっては、本国際出願の明細書に具体的に記載された態様に基づいて調査を行った。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/50		Z
C 0 7 K 16/30	(2006.01)	G 0 1 N 33/53		N
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	C 0 7 K 16/30		
		C 0 7 K 7/06		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 山田 亮

福岡県久留米市旭町 6 7 番地 久留米大学医学部内

F ターム(参考) 2G045 DA37 FB03

4C085 AA03 BB01 CC03 DD62 EE03

4H045 BA15 CA41 DA86 EA31

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	癌症肽疫苗		
公开(公告)号	JPWO2012005161A1	公开(公告)日	2013-09-02
申请号	JP2012523834	申请日	2011-06-30
申请(专利权)人(译)	有限公司GreenPeptide		
[标]发明人	伊東恭悟 山田亮		
发明人	伊東 恭悟 山田 亮		
IPC分类号	A61K39/00 A61P35/00 A61P37/04 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K16/30 C07K7/06		
CPC分类号	A61K39/0011 A61K2039/545 A61K2039/55505 A61K2039/55566 A61P13/08 A61P25/00 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/4748 G01N33/6854		
FI分类号	A61K39/00.ZNA.Z A61P35/00 A61P37/04 A61K39/00.H G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N C07K16/30 C07K7/06		
F-TERM分类号	2G045/DA37 2G045/FB03 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/DD62 4C085/EE03 4H045/BA15 4H045/CA41 4H045/DA86 4H045/EA31		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
优先权	2010154921 2010-07-07 JP		
其他公开文献	JP5706895B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种治疗癌症的药剂，其由6至13种肿瘤抗原衍生肽组成，其中测量针对患者外周血中每种肽的抗体，并且抗体是阳性的。其中肽用于向患者选择和施用肽，及其肽选择方法。

