

を立ち合わせた上で行う。

試験開始後も、GCPに基づくモニタリングおよび監査が実施される。

C. 研究結果

1. 臨床試験全体の研究結果については総括報告書に記載

2. 当該分担者による研究結果については以下のとおりであり。

1) 第 I 相臨床試験

IRB 審査：平成 24 年 5 月 16 日

治験計画届出：平成 24 年 7 月 6 日

当該試験期間：平成 24 年 7 月 9 日～平成 25 年 1 月 16 日

目標症例数：3 症例

被験者への同意説明：3 名

同意取得後、本登録に至った症例：3 例

治験薬投与を行った症例：3 名

治験終了症例（中止症例）：3 名（0 名）

2) 早期第 II 相臨床試験

IRB 審査：平成 25 年 7 月 17 日（予定）

治験計画届出：平成 25 年 7 月下旬（予定）

当該試験開始：平成 25 年 8 月（予定）

D. 考察

当初の研究計画では、平成 24 年 3 月より医師主導による第 I 相臨床試験（試験期間 8 ヶ月）を開始して、10 月までに終了し、平成 24 年度後半（平成 25 年 2 月）より本試験での推奨投与量を用いた早期第 II 相臨床試験（試験期間 12 ヶ月）を実施し、試験期間内に中間評価を行う予定であった。しかしながら、PMDA からの非臨床試験実施の助言に伴い、4 週間反復皮下投与毒性試験を実施したことから、第 I 相臨床試験の開始が 6 月下旬となり、試験終了も平成 25 年 1 月となった。そのため、第 I 相臨床試験については当初の計画より約 3 ヶ月の遅れを生じ、それに伴い早期第 II 相臨床試験に関しても計画より数ヶ月の遅れを招いてはいるものの、第 I 相臨床試験は試験期間内に試験を終了することができた。研究計画全体の進捗遅延については、共同研究機関の協力を得ながら、速やかな症例登録ならびに試験実施の促進を図り、研究期間終了までにできる限り解消するよう努力する。

E. 結論

当該研究計画に沿って、概ね順調に経過していると自己評価しており、中間・事後評価委員会からも追加の非臨床試験のため、多少の遅れはあるが着実に進めており、研究が計画通りに進行しているとのコメントを頂いたが、当該研究事業の期

間（3 年）が来年度で終了となるため、早期第 II 相臨床試験ならびに当該研究事業の終了に向け、症例登録等の促進を図り、研究期間終了まで進捗管理を徹底する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kurosaka S, Satoh T, Tabata K, Kimura M, Tsumura H, Matsumoto K, Baba S. EORTC QLQ-BM22 and QLQ-C30 quality-of-life scores in patients with painful bone metastases of prostate cancer treated with strontium-89 radionuclide therapy. Ann Nucl Med. 26(6): 485-491, 2012

2. 学会発表

- 1) 黒坂真二、佐藤威文、Chow E、土橋正人、木村将貴、津村秀康、松本和将、田畑健一、浅野雄二、石山博條、井上優介、早川和重、馬場志郎 ストロンチウム-89 (Sr-89) 治療を受けた有痛性骨転移を有する前立腺癌患者における EORC QLQ-BM22 と EORTC QLQ-C30 を用いた QOL 評価. 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012. 4. 21-24, 横浜
- 2) 山田泰史、佐藤威文、原 敏将、田畑健一、坂本聡子、ウッドハムス玲子、藤田哲夫、松本和将、石山博條、早川和重、井上優介、馬場志郎. 前立腺癌放射線治療後の再発診断における MRI 拡散強調画像の有用性：プレートガイド下 3 次元マッピング生検との比較 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012. 4. 21-24, 横浜
- 3) 佐藤威文、浅野雄二、井上優介、田畑健一、原敏将、佐藤絵里奈、松本和将、藤田哲夫、工藤しとみ、熊谷雄二、早川和重、馬場志郎. 前立腺癌に対する新規 PET 画像診断：synthetic amino acid analogue anti-F18 FACBC の検討. 第 100 回日本泌尿器科学会総会 2012. 4. 21-24, 横浜
- 4) 中村正樹、松本和将、馬嶋正隆、北里英郎. プロスタグランジン遺伝子導入によるマウス前立腺癌 in vivo モデルにおけるアポトーシスの誘導. 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012. 7. 5-6, 福岡.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

去勢抵抗性前立腺がんに対する新規がんペプチドワクチン療法開発のための
第 I 相・第 II 相 (前半) 臨床試験に関する研究

研究分担者 植村 天受 近畿大学 教授

研究要旨

本研究では、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象として、新規ペプチドワクチンの安全性、最小有効免疫反応量を推定する第 I 相臨床試験、ならびに推奨用量と標準治療であるドセタキセル併用における早期第 II 相臨床試験を実施することにより、併用療法の有効性、安全性を確認し、早期の proof of concept (POC) を得る。その後、製薬企業に技術移転し、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

従来のペプチドワクチンは、HLA 型別に異なるワクチンを必要とする上、久留米大学で開発中の患者毎に異なるペプチドを選択投与するテラーメイド型においては、治療薬としての汎用性に欠けるという短所を有していたが、当該ペプチドワクチンはその短所の克服のみならず、ペプチドワクチンの長所 (がんの CTL エピトープのみ) とテラーメイド型の長所 (2 次免疫賦活) および蛋白ワクチンの長所 (HLA 非拘束) を有しており、世界初の研究と言える。

A. 研究目的

本研究の目的は、去勢抵抗性前立腺がんに対する新規ペプチドワクチンの開発および標準治療であるドセタキセルを用いた化学療法との併用療法の確立である。具体的には、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象とした新規ペプチドワクチンの安全性および免疫学的最小免疫反応有効量を推定する第 I 相臨床試験、ならびに推奨投与量のペプチドワクチンとドセタキセルを用いた化学療法との併用における有効性および安全性の探索的検討を行う早期第 II 相臨床試験を実施し、早期の proof of concept (POC) を得た後に、製薬企業へ技術移転して、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

B. 研究方法

本研究では、まずは去勢抵抗性前立腺がん患者 15 症例を対象として、前立腺がん患者用に関与された、HLA-A2、A24、A3 スーパータイプ、A26 拘束性の 20 種類のがんペプチドから構成される 20 種混合ペプチドワクチン (以下、KRM-20 と記載) の投与量を 3 群設定し、無作為割付により各群 (各用量 5 症例) に割り付ける。割付結果に従い、KRM-20 を割付用量に調製し、毎週 1 回、合計 6 回の皮下投与を行い、その安全性、特異的免疫能変化および免疫学的最小免疫反応有効量ならびに血清 PSA 値の変化について探索的検討を行う第 I 相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は安全性 (全有害事象) であり、集積期間は 4 ヶ月、試験期間は 8 ヶ月である。

次に、去勢抵抗性前立腺がん患者 46 症例を対象として、背景因子 (年齢および血清 PSA 値) による動的割付により、無作為に 1:1 の割合で KRM-20

群またはプラセボ群に割り付ける。割付結果に従い、第 I 相臨床試験により決定された推奨投与量の KRM-20 (被験薬) またはプラセボ製剤 (対照薬) を 10 回投与、ならびに治験薬 6 回目投与日よりドセタキセルを併用し、ドセタキセル併用における KRM-20 の有効性および安全性の探索的検討を行う早期第 II 相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は血清 PSA 値の 50% 以上低下率であり、集積期間は 6 ヶ月、試験期間は 12 ヶ月である。

[倫理面への配慮]

当該臨床試験は患者を対象とした介入試験であり、「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理的原則を尊重し、治験実施計画書、「医薬品の臨床試験の実施の基準 (GCP) に関する省令」および関連する法規制を遵守して実施する。

治験実施計画書および説明文書・同意文書は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (以下、PMDA と記載) による医薬品戦略相談を実施した上で、各実施医療機関の治験審査委員会 (以下、IRB と記載) においても科学的および倫理的な面からの審査・承認を経た後、治験計画届出後に治験を開始する。さらに公的登録サイト (UMIN、JAPIC) に登録して実施する。

被験者からの同意取得にあたっては、可能な限り平易な言葉で表現した説明文書・同意文書を用いて、試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等について十分に説明する。被験者が説明内容を理解したことを確認した上で、本試験への参加について被験者本人の自由意思による同意を文書により取得する (インフォームドコンセント)。なお、説明文書を読むことができない被験者に対する説明および同意は、公正な立会人

を立ち会わせて上で行う。

試験開始後も、GCPに基づくモニタリングおよび監査が実施される。

C. 研究結果

1. 臨床試験全体の研究結果については総括報告書に記載
2. 当該分担者による研究結果については以下のとおりであり。
 - 1) 早期第Ⅱ相臨床試験
IRB 審査：平成 25 年 7 月 29 日（予定）
治験計画届出：平成 25 年 7 月下旬（予定）
当該試験期間：平成 25 年 8 月（予定）
被験者への同意説明：0 名
同意取得後、本登録に至った症例：0 例
治験薬投与を行った症例：0 名

D. 考察

当初の研究計画では、平成 24 年 3 月より医師主導による第Ⅰ相臨床試験（試験期間 8 ヶ月）を開始して、10 月までに終了し、平成 24 年度後半（平成 25 年 2 月）より本試験での推奨投与量を用いた早期第Ⅱ相臨床試験（試験期間 12 ヶ月）を実施し、試験期間内に中間評価を行う予定であった。しかしながら、PMDA からの非臨床試験実施の助言に伴い、4 週間反復皮下投与毒性試験を実施したことから、第Ⅰ相臨床試験の開始が 6 月下旬となり、試験終了も平成 25 年 1 月となった。そのため、第Ⅰ相臨床試験については当初の計画より約 3 ヶ月の遅れを生じ、それに伴い早期第Ⅱ相臨床試験に関しても計画より数ヶ月の遅れを招いてはいるものの、第Ⅰ相臨床試験は試験期間内に試験を終了することができた。研究計画全体の進捗遅延については、共同研究機関の協力を得ながら、速やかな症例登録ならびに試験実施の促進を図り、研究期間終了までにできる限り解消するよう努力する。

E. 結論

当該研究計画に沿って、概ね順調に経過してい

ると自己評価しており、中間・事後評価委員会からも追加の非臨床試験のため、多少の遅れはあるが着実に進めており、研究が計画通りに進行しているとのコメントを頂いたが、当該研究事業の期間（3 年）が来年度で終了となるため、早期第Ⅱ相臨床試験ならびに当該研究事業の終了に向け、症例登録等の促進を図り、研究期間終了まで進捗管理を徹底する。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Yoshimura K, Minami T, Nozawa M, Uemura H. Phase I clinical trial of human vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide vaccines for patients with metastatic renal cell carcinoma. Br J Cancer. (In press)
 - 2) Yoshimura K, Uemura H. Role of vaccine therapy for renal cell carcinoma in the era of targeted therapy. Int J Urol. (in press)
2. 学会発表
 - 1) Uemura H, Kimura T, Yoshimura K, Minami T, Nozawa M, Nakagawa T, Fujimoto K, Egawa S, Yamada A and Itoh K. Combination therapy of peptide vaccines and dexamethasone for chemotherapy naive castration resistant prostate cancer—a randomized phase-2 study. 28th Annual EAU Congress, Italy, 16 March 2013.
 - 2) Minami T, Shimizu N, Yamamoto Y, Develasco M, Hayashi T, Tsuji H, Nozawa M, Yoshimura K, Ishii T and Uemura H. Clinical role of MHC-class I peptide vaccines for metastatic renal cell carcinoma. 28th EAU Congress, Italy, 18 March 2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

去勢抵抗性前立腺がんに対する新規がんペプチドワクチン療法開発のための
第 I 相・第 II 相(前半) 臨床試験に関する研究

研究分担者 那須 保友 岡山大学 教授

研究要旨

本研究では、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象として、新規ペプチドワクチンの安全性、最小有効免疫反応量を推定する第 I 相臨床試験、ならびに推奨用量と標準治療であるドセタキセル併用における早期第 II 相臨床試験を実施することにより、併用療法の有効性、安全性を確認し、早期の proof of concept (POC) を得る。その後、製薬企業に技術移転し、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

従来のペプチドワクチンは、HLA 型別に異なるワクチンを必要とする上、久留米大学で開発中の患者毎に異なるペプチドを選択投与するテラーメイド型においては、治療薬としての汎用性に欠けるという短所を有していたが、当該ペプチドワクチンはその短所の克服のみならず、ペプチドワクチンの長所(がんの CTL エピトープのみ)とテラーメイド型の長所(2次免疫賦活)および蛋白ワクチンの長所(HLA 非拘束)を有しており、世界初の研究と言える。

A. 研究目的

本研究の目的は、去勢抵抗性前立腺がんに対する新規ペプチドワクチンの開発および標準治療であるドセタキセルを用いた化学療法との併用療法の確立である。具体的には、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象とした新規ペプチドワクチンの安全性および免疫学的最小免疫反応有効量を推定する第 I 相臨床試験、ならびに推奨投与量のペプチドワクチンとドセタキセルを用いた化学療法との併用における有効性および安全性の探索的検討を行う早期第 II 相臨床試験を実施し、早期の proof of concept (POC) を得た後に、製薬企業へ技術移転して、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

B. 研究方法

本研究では、まずは去勢抵抗性前立腺がん患者 15 症例を対象として、前立腺がん患者用に関与された、HLA-A2、A24、A3 スーパータイプ、A26 拘束性の 20 種類のがんペプチドから構成される 20 種混合ペプチドワクチン(以下、KRM-20 と記載)の投与量を 3 群設定し、無作為割付により各群(各用量 5 症例)に割り付ける。割付結果に従い、KRM-20 を割付用量に調製し、毎週 1 回、合計 6 回の皮下投与を行い、その安全性、特異的免疫能変化および免疫学的最小免疫反応有効量ならびに血清 PSA 値の変化について探索的検討を行う第 I 相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は安全性(全有害事象)であり、集積期間は 4 ヶ月、試験期間は 8 ヶ月である。

次に、去勢抵抗性前立腺がん患者 46 症例を対象として、背景因子(年齢および血清 PSA 値)による動的割付により、無作為に 1:1 の割合で KRM-20

群またはプラセボ群に割り付ける。割付結果に従い、第 I 相臨床試験により決定された推奨投与量の KRM-20(被験薬)またはプラセボ製剤(対照薬)を 10 回投与、ならびに治験薬 6 回目投与日よりドセタキセルを併用し、ドセタキセル併用における KRM-20 の有効性および安全性の探索的検討を行う早期第 II 相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は血清 PSA 値の 50%以上低下率であり、集積期間は 6 ヶ月、試験期間は 12 ヶ月である。

[倫理面への配慮]

当該臨床試験は患者を対象とした介入試験であり、「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理的原則を尊重し、治験実施計画書、「医薬品の臨床試験の実施の基準(GCP)に関する省令」および関連する法規制を遵守して実施する。

治験実施計画書および説明文書・同意文書は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(以下、PMDA と記載)による医薬品戦略相談を実施した上で、各実施医療機関の治験審査委員会(以下、IRB と記載)においても科学的および倫理的な面からの審査・承認を経た後、治験計画届出後に治験を開始する。さらに公的登録サイト(UMIN、JAPIC)に登録して実施する。

被験者からの同意取得にあたっては、可能な限り平易な言葉で表現した説明文書・同意文書を用いて、試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等について十分に説明する。被験者が説明内容を理解したことを確認した上で、本試験への参加について被験者本人の自由意思による同意を文書により取得する(インフォームドコンセント)。なお、説明文書を読むことができない被験者に対する説明および同意は、公正な立会人

を立ち会わせて上で行う。

試験開始後も、GCPに基づくモニタリングおよび監査が実施される。

C. 研究結果

1. 臨床試験全体の研究結果については総括報告書に記載
2. 当該分担者による研究結果については以下のとおりであり。

1) 早期第Ⅱ相臨床試験

IRB 審査：平成 25 年 7 月 16 日（予定）

治験計画届出：平成 25 年 7 月下旬（予定）

当該試験期間：平成 25 年 8 月（予定）

被験者への同意説明：0 名

同意取得後、本登録に至った症例：0 例

治験薬投与を行った症例：0 名

D. 考察

当初の研究計画では、平成 24 年 3 月より医師主導による第Ⅰ相臨床試験（試験期間 8 ヶ月）を開始して、10 月までに終了し、平成 24 年度後半（平成 25 年 2 月）より本試験での推奨投与量を用いた早期第Ⅱ相臨床試験（試験期間 12 ヶ月）を実施し、試験期間内に中間評価を行う予定であった。しかしながら、PMDA からの非臨床試験実施の助言に伴い、4 週間反復皮下投与毒性試験を実施したことから、第Ⅰ相臨床試験の開始が 6 月下旬となり、試験終了も平成 25 年 1 月となった。そのため、第Ⅰ相臨床試験については当初の計画より約 3 ヶ月の遅れを生じ、それに伴い早期第Ⅱ

相臨床試験に関しても計画より数ヶ月の遅れを招いてはいるものの、第Ⅰ相臨床試験は試験期間内に試験を終了することができた。研究計画全体の進捗遅延については、共同研究機関の協力を得ながら、速やかな症例登録ならびに試験実施の促進を図り、研究期間終了までにできる限り解消するよう努力する。

E. 結論

当該研究計画に沿って、概ね順調に経過していると自己評価しており、中間・事後評価委員会からも追加の非臨床試験のため、多少の遅れはあるが着実に進めており、研究が計画通りに進行しているとのコメントを頂いたが、当該研究事業の期間（3 年）が来年度で終了となるため、早期第Ⅱ相臨床試験ならびに当該研究事業の終了に向け、症例登録等の促進を図り、研究期間終了まで進捗管理を徹底する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究 (がん関係研究分野) 研究事業)
分担研究報告書

去勢抵抗性前立腺がんに対する新規がんペプチドワクチン療法開発のための
第 I 相・第 II 相 (前半) 臨床試験に関する研究

研究分担者 江藤 正俊 熊本大学 教授

研究要旨

本研究では、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象として、新規ペプチドワクチンの安全性、最小有効免疫反応量を推定する第 I 相臨床試験、ならびに推奨用量と標準治療であるドセタキセル併用における早期第 II 相臨床試験を実施することにより、併用療法の有効性、安全性を確認し、早期の proof of concept (POC) を得る。その後、製薬企業に技術移転し、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

従来のペプチドワクチンは、HLA 型別に異なるワクチンを必要とする上、久留米大学で開発中の患者毎に異なるペプチドを選択投与するテラーメイド型においては、治療薬としての汎用性に欠けるという短所を有していたが、当該ペプチドワクチンはその短所の克服のみならず、ペプチドワクチンの長所 (がんの CTL エピトープのみ) とテラーメイド型の長所 (2 次免疫賦活) および蛋白ワクチンの長所 (HLA 非拘束) を有しており、世界初の研究と言える。

A. 研究目的

本研究の目的は、去勢抵抗性前立腺がんに対する新規ペプチドワクチンの開発および標準治療であるドセタキセルを用いた化学療法との併用療法の確立である。具体的には、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象とした新規ペプチドワクチンの安全性および免疫学的最小免疫反応有効量を推定する第 I 相臨床試験、ならびに推奨投与量のペプチドワクチンとドセタキセルを用いた化学療法との併用における有効性および安全性の探索的検討を行う早期第 II 相臨床試験を実施し、早期の proof of concept (POC) を得た後に、製薬企業へ技術移転して、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

B. 研究方法

本研究では、まずは去勢抵抗性前立腺がん患者 15 症例を対象として、前立腺がん患者用に関与された、HLA-A2、A24、A3 スーパータイプ、A26 拘束性の 20 種類のがんペプチドから構成される 20 種混合ペプチドワクチン (以下、KRM-20 と記載) の投与量を 3 群設定し、無作為割付により各群 (各用量 5 症例) に割り付ける。割付結果に従い、KRM-20 を割付用量に調製し、毎週 1 回、合計 6 回の皮下投与を行い、その安全性、特異的免疫能変化および免疫学的最小免疫反応有効量ならびに血清 PSA 値の変化について探索的検討を行う第 I 相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は安全性 (全有害事象) であり、集積期間は 4 ヶ月、試験期間は 8 ヶ月である。

次に、去勢抵抗性前立腺がん患者 46 症例を対象として、背景因子 (年齢および血清 PSA 値) による動的割付により、無作為に 1:1 の割合で KRM-20

群またはプラセボ群に割り付ける。割付結果に従い、第 I 相臨床試験により決定された推奨投与量の KRM-20 (被験薬) またはプラセボ製剤 (対照薬) を 10 回投与、ならびに治験薬 6 回目投与日よりドセタキセルを併用し、ドセタキセル併用における KRM-20 の有効性および安全性の探索的検討を行う早期第 II 相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は血清 PSA 値の 50% 以上低下率であり、集積期間は 6 ヶ月、試験期間は 12 ヶ月である。

[倫理面への配慮]

当該臨床試験は患者を対象とした介入試験であり、「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理的原則を尊重し、治験実施計画書、「医薬品の臨床試験の実施の基準 (GCP) に関する省令」および関連する法規制を遵守して実施する。

治験実施計画書および説明文書・同意文書は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (以下、PMDA と記載) による医薬品戦略相談を実施した上で、各実施医療機関の治験審査委員会 (以下、IRB と記載) においても科学的および倫理的な面からの審査・承認を経た後、治験計画届出後に治験を開始する。さらに公的登録サイト (UMIN、JAPIC) に登録して実施する。

被験者からの同意取得にあたっては、可能な限り平易な言葉で表現した説明文書・同意文書を用いて、試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等について十分に説明する。被験者が説明内容を理解したことを確認した上で、本試験への参加について被験者本人の自由意思による同意を文書により取得する (インフォームドコンセント)。なお、説明文書を読むことができない被験者に対する説明および同意は、公正な立会人

を立ち会わせて上で行う。

試験開始後も、GCPに基づくモニタリングおよび監査が実施される。

C. 研究結果

1. 臨床試験全体の研究結果については総括報告書に記載
2. 当該分担者による研究結果については以下のとおりであり。

1) 早期第Ⅱ相臨床試験

IRB 審査：平成 25 年 7 月 22 日（予定）

治験計画届出：平成 25 年 7 月下旬（予定）

当該試験期間：平成 25 年 8 月（予定）

被験者への同意説明：0 名

同意取得後、本登録に至った症例：0 例

治験薬投与を行った症例：0 名

D. 考察

当初の研究計画では、平成 24 年 3 月より医師主導による第Ⅰ相臨床試験（試験期間 8 ヶ月）を開始して、10 月までに終了し、平成 24 年度後半（平成 25 年 2 月）より本試験での推奨投与量を用いた早期第Ⅱ相臨床試験（試験期間 12 ヶ月）を実施し、試験期間内に中間評価を行う予定であった。しかしながら、PMDA からの非臨床試験実施の助言に伴い、4 週間反復皮下投与毒性試験を実施したことから、第Ⅰ相臨床試験の開始が 6 月下旬となり、試験終了も平成 25 年 1 月となった。そのため、第Ⅰ相臨床試験については当初の計画より約 3 ヶ月の遅れを生じ、それに伴い早期第Ⅱ

相臨床試験に関しても計画より数ヶ月の遅れを招いてはいるものの、第Ⅰ相臨床試験は試験期間内に試験を終了することができた。研究計画全体の進捗遅延については、共同研究機関の協力を得ながら、速やかな症例登録ならびに試験実施の促進を図り、研究期間終了までに行える限り解消するよう努力する。

E. 結論

当該研究計画に沿って、概ね順調に経過していると自己評価しており、中間・事後評価委員会からも追加の非臨床試験のため、多少の遅れはあるが着実に進めており、研究が計画通りに進行しているとのコメントを頂いたが、当該研究事業の期間（3 年）が来年度で終了となるため、早期第Ⅱ相臨床試験ならびに当該研究事業の終了に向け、症例登録等の促進を図り、研究期間終了まで進捗管理を徹底する。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究(がん関係研究分野) 研究事業)
分担研究報告書

去勢抵抗性前立腺がんに対する新規がんペプチドワクチン療法開発のための
第Ⅰ相・第Ⅱ相(前半)臨床試験に関する研究

研究分担者 角間 辰之 久留米大学 教授

研究要旨

本研究では、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象として、新規ペプチドワクチンの安全性、最小有効免疫反応量を推定する第Ⅰ相臨床試験、ならびに推奨用量と標準治療であるドセタキセル併用における早期第Ⅱ相臨床試験を実施することにより、併用療法の有効性、安全性を確認し、早期のproof of concept (POC) を得る。その後、製薬企業に技術移転し、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

従来のペプチドワクチンは、HLA型別に異なるワクチンを必要とする上、久留米大学で開発中の患者毎に異なるペプチドを選択投与するテラーメイド型においては、治療薬としての汎用性に欠けるという短所を有していたが、当該ペプチドワクチンはその短所の克服のみならず、ペプチドワクチンの長所(がんのCTLエピトープのみ)とテラーメイド型の長所(2次免疫賦活)および蛋白ワクチンの長所(HLA非拘束)を有しており、世界初の研究と言える。

A. 研究目的

本研究の目的は、去勢抵抗性前立腺がんに対する新規ペプチドワクチンの開発および標準治療であるドセタキセルを用いた化学療法との併用療法の確立である。具体的には、去勢抵抗性前立腺がん患者を対象とした新規ペプチドワクチンの安全性および免疫学的最小免疫反応有効量を推定する第Ⅰ相臨床試験、ならびに推奨投与量のペプチドワクチンとドセタキセルを用いた化学療法との併用における有効性および安全性の探索的検討を行う早期第Ⅱ相臨床試験を実施し、早期の proof of concept (POC) を得た後に、製薬企業へ技術移転して、併用療法における新規ペプチドワクチンの実用化を目指す。

B. 研究方法

本研究では、まずは去勢抵抗性前立腺がん患者 15 症例を対象として、前立腺がん患者用に関与された、HLA-A2、A24、A3 スーパータイプ、A26 拘束性の 20 種類のがんペプチドから構成される 20 種混合ペプチドワクチン(以下、KRM-20 と記載)の投与量を 3 群設定し、無作為割付により各群(各用量 5 症例)に割り付ける。割付結果に従い、KRM-20 を割付用量に調製し、毎週 1 回、合計 6 回の皮下投与を行い、その安全性、特異的免疫能変化および免疫学的最小免疫反応有効量ならびに血清 PSA 値の変化について探索的検討を行う第Ⅰ相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は安全性(全有害事象)であり、集積期間は 4 ヶ月、試験期間は 8 ヶ月である。

次に、去勢抵抗性前立腺がん患者 46 症例を対象

として、背景因子(年齢および血清 PSA 値)による動的割付により、無作為に 1:1 の割合で KRM-20 群またはプラセボ群に割り付ける。割付結果に従い、第Ⅰ相臨床試験により決定された推奨投与量の KRM-20(被験薬)またはプラセボ製剤(対照薬)を 10 回投与、ならびに治験薬 6 回目投与日よりドセタキセルを併用し、ドセタキセル併用における KRM-20 の有効性および安全性の探索的検討を行う早期第Ⅱ相臨床試験を実施する。本試験の主要評価項目は血清 PSA 値の 50%以上低下率であり、集積期間は 6 ヶ月、試験期間は 12 ヶ月である。

[倫理面への配慮]

当該臨床試験は患者を対象とした介入試験であり、「ヘルシンキ宣言」に基づく倫理的原則を尊重し、治験実施計画書、「医薬品の臨床試験の実施の基準(GCP)に関する省令」および関連する法規制を遵守して実施する。

治験実施計画書および説明文書・同意文書は、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(以下、PMDA と記載)による医薬品戦略相談を実施した上で、各実施医療機関の治験審査委員会(以下、IRB と記載)においても科学的および倫理的な面からの審査・承認を経た後、治験計画届出後に治験を開始する。さらに公的登録サイト(UMIN、JAPIC)に登録して実施する。

被験者からの同意取得にあたっては、可能な限り平易な言葉で表現した説明文書・同意文書を用いて、試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等について十分に説明する。被験者が説明内容を理解したことを確認した上で、本

試験への参加について被験者本人の自由意思による同意を文書により取得する（インフォームドコンセント）。なお、説明文書を読むことができない被験者に対する説明および同意は、公正な立会人を立ち合わせた上で行う。

試験開始後も、GCPに基づくモニタリングおよび監査が実施される。

C. 研究結果

1. 臨床試験全体の研究結果については総括報告書に記載
2. 当該分担者による研究結果については以下のとおりであり。

統計学的研究成果：

(1) 症例数の設定

第 I 相臨床試験において、最小免疫反応有効量を推定するために投与量を 3 群設定し、無作為割付により各群（各用量 5 症例）への割り付け、および症例追加についての設定を行った。また、早期第 II 相臨床試験では、血清 PSA 値の 50%以上低下率の群間比較を、検出力 80%としたカイ二乗検定を行うことを想定して症例数設定を行った。

(2) 動的割付のプログラミング作成

この研究成果の詳細は治験実施計画書及び統計解析計画書に記述した。

(3) 安全性および有効性の評価

第 I 相臨床試験において、治験薬の投与を一度以上受けた被験者を対象集団とし、安全性については、発現した全ての有害事象および副作用についての一覧表の作成、及び有効性の各評価指標について経時的な変化をグラフや表で示すこととした。この研究成果の詳細は治験実施計画書及び統計解析計画書に記述した。

D. 考察

当初の研究計画では、平成 24 年 3 月より医師主導による第 I 相臨床試験（試験期間 8 ヶ月）を開始して、10 月までに終了し、平成 24 年度後半（平成 25 年 2 月）より本試験での推奨投与量を用いた早期第 II 相臨床試験（試験期間 12 ヶ月）を実施し、試験期間内に中間評価を行う予定であった。しかしながら、PMDA からの非臨床試験実施の助言に伴い、4 週間反復皮下投与毒性試験を実施したことから、第 I 相臨床試験の開始が 6 月下旬となり、試験終了も平成 25 年 1 月となった。そのため、第 I 相臨床試験については当初の計画より約 3 ヶ月の遅れを生じ、それに伴い早期第 II 相臨床試験に関しても計画より数ヶ月の遅れを招いてはいるものの、第 I 相臨床試験は試験期間内に試験を終了することができた。研究計画全体の進捗遅延については、共同研究機関の協力を得

ながら、速やかな症例登録ならびに試験実施の促進を図り、研究期間終了までできる限り解消するよう努力する。

E. 結論

当該研究計画に沿って、概ね順調に経過していると自己評価しており、中間・事後評価委員会からも追加の非臨床試験のため、多少の遅れはあるが着実に進めており、研究が計画通りに進行しているとのコメントを頂いたが、当該研究事業の期間（3 年）が来年度で終了となるため、早期第 II 相臨床試験ならびに当該研究事業の終了に向け、症例登録等の促進を図り、研究期間終了まで進捗管理を徹底する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohchi T, Agagi Y, Kinugasa T, Kakuma T, Kawahara A, Sasatomi T, Gotanda Y, Yamaguchi K, Tanaka N, Ishibashi Y, Miyamoto S, Kage M, Shirouzu K: Amphiregulin Is a Prognostic Factor in Colorectal Cancer. *Anticancer Research* 32: 2315-2322, 2012
- 2) Niizeki T, Sumie S, Torimura T, Kurogi J, Kurumatsu R, Iwamoto H, Aino H, Nakano M, Kawaguchi A, Kakuma T, Sata M. Serum vascular endothelial growth factor as a predictor of response and survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy. *Journal of Gastroenterology*, 47: 686-695, 2012.
- 3) Mitsutake Y, Ueno T, Yokoyama S, Sasaki K, Sugi Y, Toyama Y, Koizumi H, Ohtsuka M, Nakayoshi T, Itaya N, Chbana H, Kakuma T, Imaizumi T. Coronary Endothelial Dysfunction Distal to Stent of First-Generation Drug-Eluting Stents. *JACC: Cardiovascular Interventions*. Vol 5 No 9:966-973, 2012.
- 4) Otsuka M, Uchida Y, Kawaguchi T, Taniguchi E, Kawaguchi A, Kitani S, Itou M, Oriishi T, Kakuma T, Tanaka S, Yagi M, Sata M. Fish to meat intake ratio and cooking oils are associated with hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels. *Hepatology Research*, 2012.
- 5) Satoh K, Tanaka M, Yano A, Jiang Y, Kakuma T. What treatments are given to patients when their prognostic factors do not match

with the St. Gallen' s guidelines:
Profiling of prognostic factors among
HR(+) and HER2(-) breast cancer patients.
World Journal of Surgery, 2012.

- 2. 学会発表
なし

- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Noguchi M, Moriya F, Suekane S, Matsuoka K, Arai G, Matsueda S, Sasada T, Yamada A, Itoh K.	Phase II study of personalized peptide vaccination for castration-resistant prostate cancer patients who failed in docetaxel-based chemotherapy.	Prostate	72(8)	834-845	2012
Yoshiyama K, Terazaki Y, Matsueda S, Shichijo S, Noguchi M, Yamada A, Mine T, Ioji T, Itoh K, Shirouzu K, Sasada T and Takamori S.	Personalized peptide vaccination in patients with refractory non-small cell lung cancer.	Int J Oncol	40	1492-1500	2012
Yoshitomi M, Yutani S, Matsueda S, Ioji T, Komatsu N, Shichijo S, Yamada A, Itoh K, Sasada T, Kinoshita H.	Personalized peptide vaccination for advanced biliary tract cancer: IL-6, nutritional status, and pre-existing antigen-specific immunity as possible biomarkers for patient prognosis.	Exp Ther Med	3	463-469	2012
Terazaki Y, Yoshiyama K, Matsueda S, Watanabe N, Yamada A, Mine T, Terasaki M, Itoh K, Takamori S, Sasada T.	Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in refractory small cell lung cancer.	Cancer Sci	103(4)	638-644	2012

Komatsu N, Matsueda S, Tashiro K, Ioji T, Shichijo S, Noguchi M, Yamada A, Doi A, Suekane S, Moriya F, Matsuoka K, Kuhara S, Itoh K, Sasada T.	Gene expression profiles in peripheral blood as a biomarker in cancer patients receiving peptide vaccination.	Cancer	118(12)	3208-3221	2012
Sasada T, Noguchi M, Yamada A, Itoh K.	Personalized peptide vaccination: a novel immunotherapeutic approach for advanced cancer.	Hum Vaccin Immunother.	8(9)	1309-1313	2012
Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K.	Next generation peptide vaccines for advanced cancer.	Cancer Sci	104(1)	15-21	2013
Toyoshima T, Kumamaru W, Hayashida J, Moriyama M, Kitamura R, Tanaka H, Yamada A, Itoh K, Nakamura S.	In vitro induction of specific CD8+ T lymphocytes by tumor-associated antigenic peptides in patients with oral squamous cell carcinoma.	Cancer Lett	322(1)	86-91	2012
Fukui A, Matsueda S, Kawano K, Tsuda N, Komatsu N, Shichijo S, Sasada T, Hattori S, Ushijima K, Itoh K, Kamura T.	Identification of B cell epitopes reactive to human papillomavirus type-16 L1-derived peptides.	Virology	9:199		2012

Miyanaga N, Akaza H, Hinotsu S, Fujioka T, Naito S, Namiki M, Takahashi S, Hirao Y, Horie S, Tsukamoto T, Mori M, Tsuji H.	Prostate cancer chemoprevention study: an investigative randomized control study using purified isoflavones in men with rising prostate-specific antigen.	Cancer Sci	103 (1)	125-130	2012
Kashiwagi E, Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, Inokuchi J, Uchiumi T, Naito S.	Downregulation of phosphodiesterase 4B (PDE4B) activates protein kinase A and contributes to the progression of prostate cancer.	Prostate	72 (7)	741-751	2012
Tsuboi S, Hatakeyama S, Ohyama C, Fukuda M.	Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis.	Trends Mol Med	18 (4)	224-232	2012
Koie T, Ohyama C, Yamamoto H, Hatakeyama S, Yoneyama T, Hashimoto Y, Kamimura N.	Safety and effectiveness of Neoadjuvant luteinizing hormone-releasing hormone agonist plus low-dose estramustine phosphate in high-risk prostate cancer: a prospective single-arm study.	Prostate Cancer Prostatic Dis	15	397-401	2012
Kurosaka S, Sato T, Tabata K, Kimura M, Tsumura H, Matsumoto K, Baba S.	EORTC QLQ-BM22 and QLQ-C30 quality-of-life scores in patients with painful bone metastases of prostate cancer treated with strontium-89 radionuclide therapy.	Ann Nucl Med	26 (6)	485-491	2012

Yoshimura K, Minami T, Nozawa M, Uemura H.	Phase I clinical trial of human vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide vaccines for patients with metastatic renal cell carcinoma.	Br J Cancer	in press		2013
Yoshimura K, Uemura H.	Role of vaccine therapy for renal cell carcinoma in the era of targeted therapy.	Int J Urol	in press		2013
山田 亮	テーラーメイドがんペ プチドワクチン療法	G. I. Research	vol. 20	10-15	2012
山田 亮、 伊東恭悟	がんペプチドワクチン の開発 ～アカデミア からの挑戦	実験医学	Vol. 31	105-110	2013

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Phase II Study of Personalized Peptide Vaccination for Castration-Resistant Prostate Cancer Patients Who Failed in Docetaxel-Based Chemotherapy

Masanori Noguchi,^{1,2*} Fukuko Moriya,² Shigetaka Suekane,² Kei Matsuoka,² Gaku Arai,³ Satoko Matsueda,⁴ Tetsuro Sasada,⁴ Akira Yamada,⁵ and Kyogo Itoh⁴

¹Division of Clinical Research of the Research Center for Innovative Cancer Therapy, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

²Departments of Urology, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

³Department of Urology, Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital, Koshigaya, Japan

⁴Department of Immunology and Immunotherapy, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

⁵Division of Cancer Vaccine of the Research Center for Innovative Cancer Therapy, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

BACKGROUND. Docetaxel-based chemotherapy (DBC) showed limited clinical efficacy for castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients. To explore cancer vaccine as a new treatment modality, we conducted a phase II study of personalized peptide vaccine (PPV) for DBC-resistant CRPC patients.

METHODS. Twenty DBC-resistant CRPC patients and 22 patients with no prior DBC, as a control, were treated with PPV using peptides chosen from 31 peptides in patients, respectively. Cytokines, inflammatory markers, and immune responses were measured as candidate biomarkers. DBC-resistant CRPC patients without PPV was set as a historical control for evaluation of clinical benefit of PPV.

RESULTS. Median overall survival (OS) time from the first vaccination was 14.8 months or not reached in DBC-resistant CRPC patients and patients with no prior DBC (log-rank; $P = 0.07$), respectively. Median OS time from the first day of progression disease was 17.8 and 10.5 months in DBC-resistant CRPC patients receiving PPV and those with no PPV ($P = 0.1656$), respectively. Elevated IL-6 levels before vaccination was an unfavorable factor for OS of DBC-resistant CRPC patients ($P = 0.0161$, hazard ratio (HR): 0.024, 95% CI:0.001–0.499) as well as all 42 patients with PPV ($P = 0.0011$, HR: 0.212, 95% CI:0.068–0.661) by multivariable analysis.

CONCLUSIONS. Further clinical study of PPV is recommended for DBC-resistant CRPC patients, because of the safety and possible prolongation of MST. Control of elevated IL-6 by combined therapy may provide much better clinical outcome. *Prostate* 72:834–845, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: personalized peptide vaccine; prostate cancer; docetaxel; overall survival

INTRODUCTION

Castration-resistant prostate cancer (CRPC) is the second-most common cause of cancer-related death in men in the developed world [1,2]. For patients with metastatic prostate cancer, androgen deprivation therapy improves symptoms, but patients invariably develop progressive disease (PD). In the 1990s, the US

*Correspondence to: Masanori Noguchi, MD, PhD, Department of Urology and Clinical Research Division of the Research Center for Innovative Cancer Therapy, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan.

E-mail: noguchi@med.kurume-u.ac.jp

Received 1 July 2011; Accepted 22 August 2011

DOI 10.1002/pros.21485

Published online 19 September 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Food and Drug Administration (FDA) approved mitoxantrone and corticosteroids for use in prostate cancer after a demonstrated improvement in palliative benefit over steroids alone [3,4]. In 2004, two large, randomized, phase III trials with docetaxel-based chemotherapy (DBC) showed an improvement in overall survival (OS) as well as patients' reported outcomes [5,6]. These studies changed the goal of treatment in CRPC patients from pure palliation to a survival benefit and represent a milestone in the treatment of the disease. Although DBC represents the most active chemotherapy for first-line treatment of metastatic CRPC, all patients experience disease progression and the median survival benefit with DBC is only 2–3 months. Currently, there is no standard treatment and median OS of second-line approaches after a therapy with DBC are in the range of 12 months [7]. Clearly, the prognosis is very poor, and new treatments that might favorably affect survival for CRPC patients with progression after DBC are obviously needed.

Prostate cancer arises in a relatively unique organ and may express a number of antigens against which an immune response can be generated. Several of these agents have now demonstrated a significant survival benefit in randomized controlled clinical trials for CRPC patients, and Sipuleucel-T (Provenge, Dendreon Corporation, Seattle, WA) which is a fusion protein between the target antigen [prostatic acid phosphatase (PAP)] and granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF), was approved for CRPC patients by the FDA in 2010. However, the survival benefit of this immunotherapy for CRPC patients with progression after DBC has been under investigation.

Personalized peptide vaccine (PPV) is a multiple peptide vaccine regimen planned according to the pre-existing immunity that could prolong OS of patients with advanced cancer. Under PPV treatment, each patient was tested for their immunological reactivity to many different peptides capable of inducing cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) responses. The peptides were derived from a number of targets, including prostate-specific antigen (PSA), PAP, prostate-specific membrane antigen (PSMA), multidrug resistance protein, and a variety of other epithelial tumor antigens. Each patient was immunized with 2–4 peptides on the basis of the reactivity panel, since immune responses to individual peptides are usually quite heterogeneous. The most unique aspect of PPV is the "personalized" selection of antigen peptides ideal for individual patients in consideration of the pre-existing host immunity before vaccination. In view of the heterogeneity and complexity of host immune responses and/or tumors, this approach seems to be

more rational, rather than vaccination with non-personalized "universal" tumor antigens. Based on the current paradigm that the adaptive immune system composes of limited size and composition, in which individual cells constantly compete with each other, "inconvenient" immune responses induced by non-personalized antigens that are either non-specific to tumor cells or ineffective for tumor cell killing may cause suppression of pre-existing beneficial immunity, which may lead to poor prognosis in vaccinated patients. Indeed, in our previous clinical trials with non-personalized vaccine regimens, some advanced cancer patients showed a shorter survival than expected, possibly because of the inhibition of pre-existing host immunity [8,9]. In contrast, our recent randomized trials of PPV in consideration of the pre-existing host immunity in individual patients have clearly demonstrated clinical benefit to the CRPC patients [10]. To preliminarily investigate the efficacy and safety of the PPV in CRPC patients while evaluating progression status with or without prior DBC, we prospectively undertook a non-randomized, open-label phase II trial.

PATIENTS AND METHODS

Eligibility

Patients were eligible for inclusion in the study, if they had a histological diagnosis of prostate adenocarcinoma and PD by clinical, radiological, or PSA-based criteria, despite adequate medical or surgical castration therapy with or without prior DBC, and showed positive humoral responses to at least two of the 31 different, candidate peptides, determined by both human leukocyte antigen (HLA)-class IA types and the titers of IgG against each peptide. Any number of previous hormonal therapies was allowed. Patients were required to wait at least 4 weeks for entry into the study after the completion of prior chemotherapy, radiation therapy, or a change in hormonal therapy. Anti-androgen therapy was discontinued for at least 4 weeks before enrollment for patients receiving flutamide, and 6 weeks for those receiving bicalutamide. Additional inclusion criteria included age ≥ 20 years; Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status 0 or 1; positive status for HLA-A2, -A24, -A3 super type (-A3, -A11, -A31, and -A33) or -A26; life expectancy of at least 12 weeks; negative status for hepatitis virus B and C; adequate hematologic, hepatic, and renal function. Exclusion criteria included pulmonary, cardiac, or other systemic diseases; an acute infection; a history of severe allergic reactions; other inappropriate conditions for enrollment judged by clinicians.

The protocol was approved by the Kurume University Ethical Committee, and was registered in UMIN-CTR (UMIN000003028). After full explanation of the protocol, written informed consent was obtained from all patients before enrollment.

Study Design and Treatment

This study was a non-randomized, open-label, phase II study and the primary and secondary endpoints were OS, and to evaluate immunological activity and safety in CRPC patients under treatment with PPV, respectively. OS was calculated from date of start of vaccination to any causes of death.

Thirty one peptide candidates were prepared under conditions of Good Manufacturing Practice using a Multiple Peptide System (San Diego, CA) and American Peptide Company (Vista, CA). The candidate peptides consisted of the following 31: SART3₃₀₂₋₃₁₀, SART3₃₀₉₋₃₁₇, Lck₂₄₆₋₂₅₄, WHSC2₁₄₁₋₁₄₉, UBE2V₄₃₋₅₁, UBE2V₈₅₋₉₃, and HNRPL₁₄₀₋₁₄₈ for patients with HLA-A2; SART2₉₃₋₁₀₁, SART2₁₆₁₋₁₆₉, Lck₂₀₈₋₂₁₆, Lck₄₈₆₋₄₉₄, Lck₄₈₈₋₄₉₇, MRP3₅₀₃₋₅₁₁, MRP3₁₂₉₃₋₁₃₀₂, PAP₂₁₃₋₂₂₁, PSA₂₄₈₋₂₅₇, PSMA₆₂₄₋₆₂₄, EZH2₇₃₅₋₇₄₃, EGF-R₈₀₀₋₈₀₉, and PTH-rP₁₀₂₋₁₁₁ for patients with HLA-A24; SART3₅₁₁₋₅₁₉, SART3₇₃₄₋₇₄₂, Lck₉₀₋₉₉, Lck₄₄₉₋₄₅₈, and PAP₂₄₈₋₂₅₇ for patients with HLA-A3 super type; SART3₁₀₉₋₁₁₈ for patients with HLA-A24, -A3 super type or -A26; WHSC2₁₀₃₋₁₁₁ for HLA-A2, -A3 super type or -A26; ppMAPkkk₄₃₂₋₄₄₀ for patients with HLA-A2 or -A26; HNRPL₅₀₁₋₅₁₀ for patients with HLA-A2 or -A26; CypB₁₂₉₋₁₃₈ for patients with HLA-A2 or -A3 super type; Lck₄₂₂₋₄₃₀ for patients with HLA-A2 or -A3 super type. Original proteins of the employed peptides, except for Lck and MRP3, are ubiquitously expressed on various tissues and organs with preferential expression in malignant cells [11,12]. The Lck is expressed on metastatic cancer cells [13], although originally identified as a T cell-specific tyrosine-kinase. The MRP3 is an ATP-binding cassette transporter related to multi-drug resistance of cancer cells [14].

The safety and immunological effects of these 31 peptides had been confirmed in conducted clinical trials [10,15-22].

The selection of the right peptides for vaccination to individual patients were based on the results of HLA typing and peptide-specific IgG titers to each of the 31 different vaccine candidates as reported previously [10,15-22]. Selected peptides were mixed with incomplete Freund's adjuvant (Montanide ISA-51VG; Seppic, Paris, France), and a maximum of four peptides of 1.5 ml emulsion each at a dose level of 3 mg/peptide were injected subcutaneously into the thigh or armpit area once a week for six times. The

Montanide ISA51VG was used as an adjuvant in the current study, since it is the most popular in clinical use to induce cellular immunity and has been employed in the majority of peptide vaccine trials in the world [23].

After the first cycle of six vaccinations of up to four antigen peptides, the antigen peptides were re-selected according to the titers of peptide-specific IgG at every cycle of six vaccinations and administered at 2, 3, or 4 week intervals until unacceptable toxicity or withdrawal of consent.

Assessment of Clinical Activity

A complete survey of medical history, physical examination, routine laboratory studies, and serum PSA test were performed prior to treatment, and tests were repeated at every six vaccinations. To investigate biomarkers for OS, C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA), and interleukin (IL)-6 in plasma at base line were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the kits from R&D systems (Minneapolis, MN), Invitrogen, and eBioscience (San Diego, CA), respectively. Multiplexed bead-based Luminex assays were used to measure IL-6. Frozen plasma samples were thawed, diluted, and assayed in duplicate in accordance with the manufacturer's instructions. All patients underwent relevant radiologic studies and bone scans every 6 months. Outcomes were assessed by post-therapy changes in serum PSA and by computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) of measurable disease symptoms if present at the baseline. Post-therapy decreases in PSA level of $\geq 50\%$ were defined as partial responses (PR) and confirmed by two separate measurements ≥ 4 weeks apart. Post-therapy decreases of less than 50% or increases of less than 25% from the baseline were interpreted as stable disease (SD) [24]. For measurable disease symptoms, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors was used [25]. PD was defined as radiological progression, or if defined using PSA level alone, three consecutive increases in PSA level and 125% of the baseline PSA value. Toxicity was graded according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0 (NCI-CTC Ver4).

Measurement of Humoral and T-Cell Responses Specific to the Vaccinated Peptides

The humoral responses specific to the vaccinated peptides were determined by peptide-specific IgG levels using a Luminex system (Luminex, Austin, TX), as reported previously [26]. If the titers of peptide-specific IgG in the post-vaccination plasma were

more than twofold higher than those in the pre-vaccination plasma, the changes were considered to be significant. If a significant increase was observed in at least one vaccinated peptide, the specific humoral response was considered to be augmented.

Although T-cell subsets using flowcytometry was not analyzed in this study, T-cell responses specific to the vaccinated peptides were evaluated by INF- γ ELISPOT using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which were separated from peripheral blood (30 ml) by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Uppsala, Sweden) and stored frozen until analysis. After thawing, PBMCs (2.5×10^4 cells/well) were incubated in 384-well microculture plates (IWAKI, Tokyo, Japan) with 25 μ l of medium (OpTmizer™ T Cell Expansion SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10% FBC (MP Biologicals, Solon, OH), IL-2 (20 IU/ml; Serotec, Oxford, UK), and each peptide (10 μ M). Half of the medium was removed and replaced with new medium containing a corresponding peptide (20 μ M) after culturing for 3 days. After incubating for the following 6 days, the cells were harvested and tested for their ability to produce interferon (IFN)- γ in response to either the corresponding peptides or a negative control peptide human immunodeficiency virus (sequences: SLYNTYATL for HLA-A2; RYLRQQLGI for HLA-A24; RLRDLLIVTR for HLA-A3 supertype; EVIPMFSAL for HLA-A26). Antigen-specific IFN- γ secretion after an 18 hr incubation was determined by ELISPOT, according to the manufacturer's instructions (MBL, Nagoya, Japan). All assays were carried out in triplicate and analyzed with an ELISPOT reader (CTL-ImmunoSpot S5 Series; Cellular Technology Ltd, Shaker Heights, OH). Antigen-specific T-cell responses were evaluated by the difference between the spot numbers in response to the corresponding peptide and those to the control peptide; differences of threefold were considered significant. If the spot numbers in response to the corresponding peptide in the post-vaccination PBMCs were more than threefold higher than those in the pre-vaccination PBMCs, the changes were considered to be significant. If a significant increase was observed in at least one vaccinated peptide, the specific T-cell response was considered to be augmented.

Statistical Analysis

Demographics were compared between groups using χ^2 test or Fisher's exact test for categorical variables and the Student's *t*-test for continuous variables. Probabilities of progression free survival (PFS) and OS in patients with PPV were estimated from the first date of peptide vaccination to PD or death using

Kaplan–Meier methods. In comparison of OS between the patients with PPV with prior DBC and PD patients as the matched control cohort, OS were estimated from the date of PD after DBC to death in order to assess uniformly. All analyses are by intent to treat. Surviving patients were censored at October 7, 2010, with follow-up of 97% complete. Patients lost to follow-up are censored at the date last known to be alive. Cox proportional hazard regression analysis was used to develop the univariate and multivariate models describing the association of the independent variables with OS. Independent variables analyzed included age, ECOG performance status, lymphocyte counts, PSA, CRP, SAA, IL-6, prior DBC status, IgG responses, and T-cell responses. All baseline parameters in the models were analyzed as dichotomous variables using cut-off values. Data were analyzed using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) and the StatView® program (SAS Institute Inc., Cary, NC). A two-sided significance level of 5% was considered statistically significant.

RESULTS

Patients' Characteristics

Between November 2008 and April 2010, 42 patients with CRPC (20 with prior DBC and 22 without prior DBC) were enrolled into this study. All patients with DBC received 60–75 mg/m² docetaxel and repeated every 3–4 weeks in combination with oral prednisone (10 mg/day) or dexamethasone (2 mg/day). Median cycle of docetaxel was 6.5 and failed in treatment. Baseline patient characteristics were well balanced between two study cohorts. No statistically significant differences existed between the groups excluding prior DBC. There was no correlation between Gleason score and pre-vaccine PSA doubling times. Before the enrollment all patients received androgen deprivation therapy using luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) analogue (or had previously undergone castration) or anti-androgen as an initial or secondary hormonal therapy. All patients were eligible and assessable. The control group at the Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital represented 17 patients initiating DBC between September 2007 and August 2010. Table I shows patients' characteristics of the study and control group at the Dokkyo Medical University Koshigaya Hospital. The study cohort with prior DBC and control group were well matched regarding median age, ECOG performance status, and median cycle of DBC (6.5 cycles vs. 7 cycles). The study cohort had a higher level of median PSA levels and higher metastatic sites than the control group.