

D. 考察

有効成分として不均一性が高く比較的精製度の低い抗原（不活化病原体等）が用いられる非組換えの感染症ワクチンとは異なり、がんワクチンでは有効成分として高度に精製された組み換えタンパク質やペプチドが用いられる。これらの品質管理の上で重要となる規格及び試験方法の設定にあたっては、化学合成されたペプチドを有効成分とする場合には、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドライン Q6A²⁾が参考になる。また、組換えタンパク質やペプチドが有効成分であるがんワクチンの品質管理においては、ICH ガイドライン Q6B³⁾及び、既存のバイオ医薬品の規格及び試験方法を参考にすることができる。原薬の規格として設定すべき項目は概ねバイオ医薬品と同様であると考えられるが、バイオ医薬品とがんワクチンとは、有効成分に求められる生物活性が大きく異なることに注意が必要である。品質管理戦略の構築においては、十分な特性解析により当該医薬品の有効性・安全性を確保するために必要な特性（重要品質特性）を明らかにし、それに基づいた規格及び試験方法を設定することが重要である。バイオ医薬品では有効成分とする組換えタンパク質あるいはペプチドそのものが生理活性物質として薬理作用を発揮することが期待される。このため、薬理作用メカニズムに基づいた適切な生物活性試験（ホルモン類の場合には受容体結合試験、細胞応答性試験など）を構築することにより、有効性に関わる品質特性とその範囲の特定に活用できる。一方、がんワクチンの有効成分である組換えタンパク質やペプチドは、それ自体は薬理作用を発揮せず、抗原提示細胞に提示されることにより、それらのタンパク質を発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導あるいは亢進することを目的とする。がんワクチンの場合、*in vivo* においてはがん抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte ; CTL) の誘導が良い薬力学的マーカーとなると考えられている一方で、CTL の誘導を評価できる頑健な *in*

vitro 試験系の構築は困難である。がんワクチンの有効成分となる組換えタンパク質の重要品質特性の特定にあたっては、樹状細胞等の抗原提示細胞への取り込みや抗原提示能、ペプチドの場合には MHC との結合能などを指標とした特性解析が有用であると考えられる。また、がんワクチンの薬理作用は種特異性が高いため、*in vivo* の薬理作用との相関を明らかにすることは困難であると思われるが、組換えタンパク質のように複雑な高次構造を有する有効成分の品質管理の上では、これらの *in vitro* の評価系を生物活性試験（示性値）として適用することも有用であると考えられる。

不純物管理の考え方は、化学合成されたペプチドを有効成分とする場合には、ICH ガイドライン Q3A⁴⁾（原薬）、Q3B⁵⁾（製剤）及び Q6A²⁾が参考になる。1 日最大投与量が 2 g 以下の場合には、構造決定の必要な不純物の閾値は 0.10%又は 1 日摂取量 1.0 mg のどちらか低い方、安全性確認の必要な閾値は 0.15%又は 1 日摂取量 1.0 mg のどちらか低い方とされている。一方、組換えタンパク質あるいはペプチドを有効成分とする場合には、不純物管理の考え方はケースバイケースである。組換えタンパク質医薬品の不純物としては、宿主細胞由来タンパク質 (HCP) 等の「製造工程由来不純物」、凝集体や切断体等の「目的物質由来不純物」が挙げられる。特に分子量の大きい組換えタンパク質を有効成分とする場合には、酸化体や脱アミド体、糖鎖バリエーションなど様々な分子種が混在し、不均一性を有することに留意が必要である。これらの分子変化体の管理の考え方については、ICH ガイドライン Q6B³⁾が参考になる。目的物質に由来する分子変化体のうち、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持つものは、「目的物質関連物質」として考える。適切な生物活性試験等に基づく特性解析は、それらが「目的物質関連物質」に該当するか、あるいは「目的物質由来不純物」に該当するかを判断する上で有用である。上に述べたように、がんワクチンの有効成分である組換えタンパ

ク質やペプチドの薬理作用を直接的に評価する生物活性試験系の構築は困難であると思われるが、それらの作用機序に基づいた試験（抗原提示細胞への取り込み、MHC との結合能等）の実施は、管理すべき不純物の特定においても有用であると考えられる。

以上を踏まえて、組換えタンパク質・ペプチドを有効成分とするがんワクチン（原薬）の規格及び試験方法の設定の例と留意事項について表2に記載した。なおがんワクチンの場合、投与時にアジュバントと混合して用いられることが一般的である。従来、アジュバントは製剤の添加物として取り扱われるが、がんワクチンの場合には特に有効性に密接に関与する成分であると考えられるため、アジュバントの規格を独立に設定することも考慮する必要があると考えられる。

E. 結論

本研究では、バイオ医薬品の規格及び試験方法をもとに、がんワクチンの有効成分として用いられる組換えタンパク質・ペプチドの品質管理手法について考察した。組換えタンパク質・ペプチドを有効成分とするがんワクチンの品質管理においては、規格及び試験方法について概ね既存のバイオ医薬品と同様の考え方が適用できる一方で、生物活性に関する考え方が異なること、それに基づいた重要品質特性の特定と、規格及び試験方法の設定が重要であることを明らかにした。

F. 参考文献

- 1) 原園 景, 橋井則貴, 多田 稔: バイオ医薬品の規格及び試験方法.
Pharm Tech Japan 2012;28:1835-44.
- 2) ICH ガイドライン Q6A
新医薬品の規格及び試験方法の設定
http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6a_01_5_1.pdf
- 3) ICH ガイドライン Q6B
生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）の規格及び試験方法の設定

http://www.pmda.go.jp/ich/q/q6b_01_5_1.pdf

4) ICH ガイドライン Q3A

新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン

http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3ar_02_12_16.pdf

5) ICH ガイドライン Q3B

新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン

http://www.pmda.go.jp/ich/q/q3br_03_6_24.pdf

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|------------|----|
| (1) 特許取得 | なし |
| (2) 実用新案登録 | なし |
| (3) その他 | なし |

項目	内容
名称	一般的名称(JAN)、国際一般的名称(INN)及び販売名。
構造式	アミノ酸配列並びにジスルフィド結合や糖鎖修飾などの翻訳後修飾の情報を記載する。
分子式及び分子量	その分子式及び分子量を記載する。糖鎖など不均一な修飾を含む場合には、タンパク質部分の分子式及び分子量を記載する。
基原	本質(由来、分類、構造、物性、活性など)を記載する。
含量規格	含量、濃度又は比活性を記載する。
性状	物理的状态(例えば、固体、液体)及び色を定性的に規定する。
確認試験	有効成分などをその特性に基づいて確認するための試験。分子構造上の特徴、特異な性質に基づき設定する。 例) 理化学試験: ペプチドマッピング、質量分析; 生物学的試験: 生物活性; 免疫学的試験: ウェスタンブロット法、ELISA
示性値	安定性、有効性及び安全性に関する物理的・化学的性質等を設定する。
不均一性	翻訳後修飾や構造の不均一性の恒常性を評価する。 例) 糖鎖不均一性: 糖鎖分析、グリコフォーム分析、単糖分析
純度と不純物の試験	純度を規定するための試験。混在物の種類及びその存在量を測定する。純度は一般に複数の方法にて評価される。不純物の規格値は、それぞれ個別に及び/または総量で適切に設定する。 例) サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、SDS-PAGE
定量法	成分の含量、力価などを物理的・化学的または生物学的方法によって測定する。 力価: 生物学的性質に基づく生物活性(バイオアッセイ、結合性、細胞応答性) 物質質量: タンパク質含量
標準物質	試験において標準として用いる物質であり、適切な品質であることが必要である。バイオ医薬品では、定量法での使用以外に、確認試験や糖鎖試験で用いられる場合がある。

表1 バイオ医薬品の原薬において設定される規格及び試験方法の項目の例

項目	内容	
名称	一般的名称(JAN)、国際一般的名称(INN)及び販売名。	
構造式	アミノ酸配列並びにジスルフィド結合や糖鎖修飾などの翻訳後修飾の情報を記載する。	
分子式及び分子量	その分子式及び分子量を記載する。糖鎖など不均一な修飾を含む場合には、タンパク質部分の分子式及び分子量を記載する。	
基原	本質(由来、分類、構造、物性、活性など)を記載する。	
含量規格	含量、濃度を記載する。	がんワクチンにおいては比活性を規格とすることは困難であると考えられる。
性状	物理的状态(例えば、固体、液体)及び色を定性的に規定する。	
確認試験	有効成分などをその特性に基づいて確認するための試験。分子構造上の特徴、特有な性質に基づき設定する。	
示性値	安定性、有効性及び安全性に関与する物理的・化学的性質等を設定する。	がんワクチンの場合、管理すべき品質特性の特定において留意が必要。抗原提示細胞への取り込み、抗原提示能等を評価する生物活性試験が有用な場合もある。
不均一性	翻訳後修飾や構造の不均一性の恒常性を評価する。	
純度と不純物の試験	純度を規定するための試験。混在物の種類及びその存在量を測定する。純度は一般に複数の方法にて評価される。不純物の規格値は、それぞれ個別に及び/または総量で適切に設定する。	
定量法	成分の含量を物理的・化学的方法によって測定する。	がんワクチンにおいては生物活性(力価)を定量法とすることは困難であると考えられる。
標準物質	試験において標準として用いる物質であり、適切な品質であることが必要である。	

表2 組換えタンパク質・ペプチドを有効成分とするがんワクチン原薬において設定することが想定される規格及び試験方法の項目の例

がんワクチンの有効性評価手法に関する研究

研究分担者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

がんワクチンの開発が急速に進んでいるが、がんワクチンは従来の細胞障害性の抗がん剤と異なる作用メカニズムで臨床効果を発揮すると考えられ、がんワクチンに特化した評価が必要とされている。

本年度は、がんワクチンの臨床評価や品質に関して次のような点を明らかにした。

1) NIH Clinical Trial に掲載されているがんワクチンプロトコルやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いられることが必要と考えられる。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い、また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがんワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。2) がんワクチンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコルもある。3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、がんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。

協力研究者

佐藤大作 医薬品医療機器総合機構・部長
井口豊崇 医薬品医療機器総合機構・審査役
朝倉 渡 医薬品医療機器総合機構・審査役
野中孝浩 医薬品医療機器総合機構・主任専門員
甘粕晃平 医薬品医療機器総合機構・審査専門員
老邑温子 医薬品医療機器総合機構・審査専門員
秦 利幸 医薬品医療機器総合機構・審査専門員

A. 研究目的

近年患者自身の免疫能を賦活化することにより抗腫瘍効果を発揮させる治療法が開発されつつある。樹上細胞の機能をはじめ、がんに対する基礎的研究の進展やがんによる免疫抑制効果についての解析が進むと共に、強力な腫瘍免疫法が開発されがん免疫療法に期待が持てる成果が得られ始めている。

米国 NIH の臨床研究ウェブページによると既に 1000 を超えるがん免疫療法が登録されており、年々増加の一途に至っており、ペプチドワクチンをはじめ、タンパク質、組換えウイルスなど多様

な製品を複雑に組み合わせた治療もおこなわれている。それぞれの製品の製法や特性解析、品質管理などは各種ガイドラインや指針に従った解析や管理が求められると考えられるが、非臨床試験や臨床試験では、安全性や有効性の評価において様々な課題が存在する。

非臨床試験では免疫応答性の種差もあり、必ずしも適切なモデル動物が存在するわけではないし、ヒト化モデルマウスを用いた検討も行われているが必ずしもヒトに外装できるデータがえられるとは限らない。

また、臨床試験では特に従来の抗がん剤とことなり、MTD や DLT が見られないケースも多い。またがん抗原を発現していない患者に対してはがんワクチンの効果がない可能性があり、そのためがん抗原の発現を評価するためのコンパニオン診断薬の開発も必要と思われる。また、治験初期で行われる多様ながん種の患者に対する試験の必要性についても、がん抗原の発現性の観点から再考する必要がある。

本年度は、種々のがんワクチンを用いたがん免疫

治療に関して臨床試験に関する国際的な登録情報やその臨床試験結果に関する論文等について調査し上で、臨床試験でどのような免疫応答性を評価しているかを明らかにしたうえで、有効性評価との関連についても明らかにした。また、品質、非臨床試験において考慮すべき事項について解析した。これらの成果から、がんワクチンガイドラインに取り込むべき要素について明らかにすると共に、がんワクチンガイドライン作成のための案を提示した。

B. 研究方法

2013年時点で、がんワクチンの臨床開発を目指してNIH Clinical Trialのウェブページに約1300の臨床プロトコルが掲載されている。これらのプロトコルの調査では、パピローマウイルスやがん患者の感染症防御のためのワクチンに関する研究もあり、それらを除いた上で、どのような免疫応答性について臨床試験で明らかにしようとしているかを調査した。ペプチド/タンパク質を用いた開発のみならず、糖脂質を用いた開発、さらには細胞治療、遺伝子治療として分類される臨床開発が行われている。また併用薬としてもアジュバント、核酸医薬、低分子化学医薬品など様々な取り組みが行われている。このような併用薬を含めた治療レジメンとその免疫応答性の評価の関係についても調査した。

さらに治療レジメンに関しても多岐にわたっている。このような現在実施されている臨床プロトコルの解析を行うと共に、FDAのがんワクチンガイドラインや公表文献等も含め調査の対象とした。

また、患者での免疫応答性を評価する国際的な標準化プロジェクトから出されたT細胞のバイオアッセイガイドライン (Minimal Information about T Cell Assays (MIATA) ガイドライン) の有用性についても取り上げた。

C. 研究結果

C-1. がんワクチンの臨床プロトコル

米国NIHのNIH Clinical Trialウェブページには2013年現在で1200を超えるがんワクチンプロトコルが掲載されている。がん抗原ペプチドとして短鎖ペプチド及び長鎖ペプチドの他、がん抗原ペプチドとKLHなどのスーパー抗原との融合タンパク質なども用いられている。がん抗原タンパク質そのもののみならずがん抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入するためのプラスミドやウイルスベクターの他、がん抗原でパルス刺激した樹上細胞による細胞治療も行われている。さらに、

自己や同種がん細胞を放射線照射などにより増殖能を失わせた細胞製品なども用いられている。このような細胞製品にがん抗原をより強く発現させるためにがん抗原の遺伝子を搭載したプラスミドやmRNAを導入して投与したり、さらに免疫応答性を刺激するためにGM-CSFやインターフェロングamma等のサイトカインの遺伝子を導入するなどの改変が行ったうえで、患者に投与することも行われている。

このような多様な製品が投与されるばかりでなく、投与レジメンとしてウイルスベクターのよるワクチン投与に引き続いてがん抗原ペプチドによる追加免疫やサイトカインによる刺激を行ったり、さらに数ヶ月から数年にわたる免疫刺激を行うことも試みられている。また、このような投与スケジュールのみならず、投与量、投与ルート、併用薬などについても様々な試みが行われている。このような情報を明らかにした上で、免疫応答性の評価項目、評価スケジュール、有効性の評価項目、評価スケジュールについて整理した(資料1)。

C1.1. 製品群の多様性

図1に、NIH Clinical Protocolのデータベースの収載されているプロトコルで用いられている製品を分類してみた。最も多いのはペプチドであるが、この中には短鎖ペプチドと長鎖ペプチドが含まれる。また、KLHなどのキャリアタンパク質との融合ペプチドも含まれている。次に多いのが自己由来細胞であるが、この中には自己樹状細胞と自己のがん細胞に遺伝子導入などの何らかの処理をした後に抗原として投与される場合も含まれる。樹状細胞を用いたプロトコルが非常に多いが、この中には樹状細胞を刺激するペプチドやタンパク質、mRNA、プラスミドなども含まれている。タンパク質の中には、特定のがん抗原のイディオタイプ抗体なども含まれる。

遺伝子治療の中にはウイルスベクターを用いるケースからプラスミドやプラスミドをリポソームに封入した製品も含まれる。

またペプチドをスーパー抗原と結合させたり、がん抗原タンパク質をリポソームなどに封入することにより免疫応答性を高める製剤の開発も行われている。キャリアタンパク質が用いられるケースでは、キャリアタンパク質に対する免疫応答性を評価し、がんによる免疫抑制からどの程度回復しているのかについての解析も平行して行われることがある。

このほかに統計データとしては含めていないシアルルイスXなどの糖鎖抗原やGD1、GD2などの

糖脂質抗原などをターゲットした試験が実施されている。

C1.2. 併用薬

がんワクチンの併用薬として、免疫賦活化作用を有する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) や IL-2、インターフェロンの他、がんによる免疫抑制に関与する Treg 細胞を抑制すると考えられているシクロフォルファミドやフルダラビン、Treg 細胞の機能を抑制するためのアンチセンス核酸や siRNA などが用いられている。

近年、がんによる免疫抑制解除に抗体医薬品を用いる試みが行われており、大きな成功を収めている。代表的な例として、Treg 細胞の発現する CTLA4 やケモカインレセプター CCR4 をターゲットとした抗体医薬品としてイピリムマブやモガムリズマブ、がん細胞に発現する免疫抑制性のリガンドである PDL-1 や PDL-1 に結合する PD-1 に対する抗体医薬品などが利用されており、イピリムマブや抗 PD-1 抗体では高い有効性が得られたとの報告がある。

併用薬の効果とがんワクチンの効果が同じであれば臨床的な応答性について区別して評価する必要はないが、例えば Treg 細胞の抑制を評価する場合には、Treg 細胞集団のどれほど低下したのか評価する必要があるかもしれない。

また、Treg 細胞のようにいくつかのサブセットが存在する場合には、サブセットを区別して解析することも有用であると考えられる。

C.1.3. 臨床開発初期での安全性

従来の細胞傷害性の抗がん剤と異なり、僅かな例外を除いてがんワクチンで最大耐毒性が同定されたことは無いと考えられる。がんワクチンの臨床試験では、投与可能な最大投与量は毒性というより製品の製造上の限界や投与部位の物理的あるいは解剖学的な観点からの制限を受けることになると考えられる。従って従来の 3+3 用量試験を用いて最大耐毒性 (MTD) や用量制限毒性 (DLT) を明らかにする必要がないと考えられる。

一方で、がんワクチンの臨床試験のデザインにかんする調査では、MTD や DLT を明らかにすることを主用評価項目や副次評価項目に挙げているプロトコールもある。がんワクチンの製品は非常に多用であり、これらの中には細胞製剤やアダプタントを用いたプロトコールが含まれており、そのためにこのような MTD や DLT を明らかにすることを目指しているとも考えられる。

C.1.4. がんワクチンの免疫応答性評価

がんワクチンの有効性を予測可能な PD マーカーのとして、抗原特異的な細胞性免疫の活性測定や液性免疫反応の評価が行われてきている。また非特異的な免疫応答性として標準抗原に対する遅延型アナフィラキシー反応の強度を測定することも行われている。

細胞性免疫の応答性の評価に当たってはがんワクチンの投与スケジュール等を考慮する必要がある。すなわちがんワクチンの投与では、ウイルスベクター等による持続刺激がある場合を除いて 1-2 ヶ月の反復投与から、3-4 年といった長期にわたる反復投与を行うプロトコールも試みられている。また免疫応答性の評価ポイントも投与スケジュールに応じて数ヶ月から数年という長期の評価を行う場合もある。従って長期にわたる細胞を用いた評価を行うのに際して、異なる日時での測定データの比較可能な結果が得られるような標準化が重要となる。

主とした有効性を示唆する細胞免疫応答性の評価項目としては、細胞傷害性 T 細胞やヘルパー T 細胞の増減をテトラマーアッセイや ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生能をフローサイトメトリーで解析する方法など複数の方法で解析されている。

テトラマーアッセイ、ELISPOT アッセイ、サイトカイン産生フローサイトメトリーアッセイについては国際的なタスクフォースで標準化が試みられており、参考になる部分が多い。

(1) クラス I あるいはクラス II の MHC ポリマーを用いた抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) あるいは抗原特異的な CD4+ 細胞の定量

ウイルス感染細胞やがん細胞の除去に免疫学的に重要な役割を担っている細胞傷害性 T 細胞は、抗原提示細胞の MHC クラス I 分子と結合した抗原ペプチドを認識し、標的細胞を特異的に攻撃、排除するとされている。この MHC 主要組織適合遺伝子複合体のクラス I 分子上に抗原ペプチドを提示することが出来る。さらに、CD8+ の細胞傷害性 T 細胞は HLA-I 分子に結合したがん抗原ペプチドを T 細胞受容体 (TCR) が認識し、刺激を受けた抗原を発現している標的細胞を攻撃するようになるとされている。抗原が特定されたがんワクチンの臨床試験評価では、がんワクチンの接種により増加するがん抗原特異的な CTL ががん細胞を攻撃すると想定されており、特異ペプチドを結合した HLA class-I 複合体を用いて、その血中の抗原特異的な

CTL数を測定することがPDマーカーとなると考えられる。

しかし、MHC Class-1/ペプチド複合体は、単量体ではTCRへの結合親和性が低いために、抗原特異的なCTLの検出にHLA class-1/ペプチド複合体を利用するには、HLAの多量体化が必要とされている。すなわち、がん特異的なペプチドとMHC-class1ポリマーを作製し、さらにそのペプチドポリマー複合体を蛍光標識したものをを用いて、フローサイトメーターによりCD8陽性でかつポリマーとの結合能をもつ陽性ゲートのT細胞数を測定することにより、抗原特異的なCTL数を算出する。さらに、蛍光標識されたMHC Class-1/ペプチド複合体は、CTLの特異的なT細胞受容体(TCR)との結合能を有するが、一方でMHCはCD8とも非特異的に結合する性質があるために、特異結合を抑制する必要があるとされている。このために非特異的なHLAの結合部位に変異を導入する方法も考案されている。

(2) MHC-class2/がん特異的なペプチド複合体の4量体を用いたヘルパーT細胞(CD4陽性)の検出

クラス2分子は、HLAのクラスII(HLA-2)領域にコードされる α 鎖と β 鎖から構成されており、HLA-DR、DQ、DPがある。ヘルパーT細胞は、HLA-2分子に結合した抗原ペプチドを、TCR/CD3複合体が認識し、同時に抗原提示細胞の補助刺激分子(インテグリンリガンド;CD86)を補助受容体(CD28)が認識することにより抗原特異的な活性化が起こる。抗原刺激によって活性化された抗原特異的なヘルパーT細胞は、CTLの活性化のみならずがん組織への浸潤にも必要とされていることから、血中における抗原特異的なヘルパーT細胞の濃度を測定することにより、がんワクチンの有効性を予測可能な指標となるとされている。

抗原特異的なヘルパーT細胞の測定では、細胞傷害性T細胞と同様にMHC Class-2とペプチド複合体の4量体やポリマーに蛍光物質で標識し、患者由来血液細胞等と反応させ、同時に蛍光標識したCD4抗体とのダブルラベルを行い、CD4陽性でかつMHC Class-1/ペプチドの反応性の細胞をフローサイトメーターにて定量する。測定ではMHC Class-2/ペプチド複合体ポリマーとの非特異反応性を排除することである。

テトラマーアッセイのフローサイトメトリーを用いた解析において細胞傷害性T細胞の表現系について同時測定が可能である。しかし、長期保存中にテトラマーの立体構造が変化しやすいことが知られており、安定性について十分な評価が必要

である。また検出した細胞傷害性T細胞の機能的な面の評価ができないという欠点がある。また末梢血中で目的とするT細胞の検出感度としては0.01から0.2%であり、これより少ないT細胞の検出が難しい。このためにin vitroで抗原刺激を与え目的とする細胞傷害性T細胞を増幅させることにより感度を増加させる工夫も行われている。

さらに混合リンパ球反応を利用した細胞傷害性T細胞のin vitroでの増幅法も用いられており、単なる抗原刺激よりも増幅能が高いとされている。しかし、in vitro刺激を加えても感度は100倍ほど増加するが、それより少ないT細胞集団を検出することは技術困難とされている。

(3) 特異的な抗原刺激によって活性化されたCD4+またはCD8+T細胞数のELISPOTによる計測、あるいは細胞内サイトカイン染色による解析

がん抗原特異的に反応するCD4陽性やCD8陽性細胞を測定するもので、Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT)では、特異的な抗原刺激によりこれらのT細胞が産生するインターフェロン γ (IFN- γ)の産生を測定するものである。IFN- γ はCD4、CD8、NK細胞などが産生するサイトカインであり、炎症免疫反応の調整に関与すると考えられ、抗原刺激を受けたこれらの細胞の反応性を検出することが可能とされる。産生また、細胞内サイトカインアッセイでは、抗原刺激によりT細胞が活性化され産生するサイトカインを細胞内に蓄積させサイトカイン陽性細胞を定量するものである。

(3-1) ELISPOTアッセイ

がんワクチンの投与を行った患者末梢血より白血球を分離し、リンパ球層あるいは、CD8やCD4細胞を分離して、一定期間抗原刺激を与えながら培養を行う。その際、培養プレートを抗IFN- γ コーティングしておき、T細胞が産生するIFN- γ をトラップ可能としておく。所定の培養期間を経過した後、T細胞やリンパ球を除去した後、トラップしたIFN- γ 量を酵素免疫反応により検出する。細胞から産生されるIFN- γ は培養プレートにコートされた抗IFN- γ により効率よくトラップされ、IFN- γ 産生細胞が存在した部位のみがプラーク状に染色される。この染色パターンからIFN- γ 産生細胞量の推定が可能となる。培養プレートのスポットとして検出されるために、定量範囲がそれほど広がらないが、機器を用いなくても解析可能な測定法である。

ELISPOTアッセイの感度は0.01%とされている。ELISPOTアッセイでは細胞傷害性T細胞の機能面

の評価も可能であるが、陽性細胞傷害性 T 細胞の回収が出来ないために、その機能や抗原特異性などについて詳細な検討が出来ない。

(3-2) 細胞内サイトカインアッセイ

フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカインアッセイは、ELISPOT と同様にがん抗原特異的な T 細胞の機能情報に着目したアッセイ法である。抗原刺激に应答して、CD4 細胞や CD8 細胞が産生するサイトカイン（インターロイキン 2；IL-2）を産生するが、その IL-2 再生している細胞を特異的に染色する。このために、Monensin や Brefeldin-A などの細胞内タンパク質輸送を阻害する薬剤を用いて抗原刺激を行い、細胞内に蓄積された IFN- γ や IL-2 を膜透過処理を行ったうえで蛍光免疫染色により検出する。同時に、CD4 及び CD8 抗体を用いて蛍光免疫染色し、CD4 陽性/IL-2 陽性、あるいは CD8 陽性/IL-2 陽性の細胞をフローサイトメーターにより解析する。細胞内サイトカインアッセイの特徴は、抗原刺激による機能（サイトカイン産生）を測定できるだけでなく、CD4 と CD8 陽性の細胞を同時に測定することも可能とされている。

細胞内サイトカインアッセイの感度は 0.02% ほどであり、感度の点が課題となっている。

(4) がん抗原の特異性が不明な場合

がん抗原タンパク質やこれをコードするような遺伝子を発現させる製品では、抗原のどの部位に対する免疫応答が惹起されるか不明であり、また MHC-1 と MHC-2 の両方に別々の抗原ペプチドが呈示される可能性がある。さらに、複数の MHC に異なるがん抗原ペプチドが提示される可能性がある。従って、がん抗原タンパク質の中の複数のペプチドに対する免疫応答性を評価することが有用と考えられる。

このために、導入したがん抗原タンパク質をコードするプラスミド等を導入した抗原提示細胞を用いて複数の抗原ペプチドを MHC 上に発現させることも行われている。例えば、複数のがんペプチド発現する抗原提示細胞と患者由来のリンパ球分画を *in vitro* で同時に反応させ、抗原提示細胞からの刺激を受けた特異的な細胞傷害性 T 細胞や CD4 陽性細胞のサイトカイン放出を ELISPOT アッセイにより検出するというものである。

一方で、抗原タンパク質の全体を網羅するようにペプチドライブラリーを合成し、ELISPOT アッセイやサイトカインフローサイトメトリーアッセイを行うものである。

(5) 制御性 T 細胞の測定

以上のがんワクチンの免疫応答性の評価では、がん組織は様々な因子を放出したりすることにより、がんに対する免疫応答を抑制する機構があることが知られている。このがんによる免疫抑制機構の中で重要な役割を果たしているのが制御性 T 細胞（Treg 細胞）といわれている（図 2）。また、がん細胞は肝臓などに発現される PD-L1 を発現することがあり、この PD-L1 は免疫細胞の PD-1 に結合し、免疫細胞を不活化することが知られている。

このために Treg 細胞上に発現する機能タンパク質である CTLA4 やケモカイン受容体である CCR4 に対する抗体や、PD-L1 や PD-1 に対する抗体を用いてがんによる免疫抑制を回避する方策が試みられている（図 2）。

また Treg 細胞の抑制効果があるとされるサイクロヘキシミド(CHX)投与などの投与ががんワクチンの併用薬として用いられている。

このような免疫抑制からの解除を評価することもがんワクチンの効果を評価する上で非常に重要とされる。例えば Treg 細胞の血中濃度やがん組織やリンパ節内での Treg 細胞の量を測定することも有用と考えら得る。また、Treg 細胞の活性化状態に関しては、末梢血中の Treg 細胞数や Treg 細胞のサブタイプの解析、さらには腫瘍内に浸潤している Treg 細胞数やそのサブタイプ解析が行われている。また、特異抗原に対する免疫応答性のみならず、がんには関連しない非特異的な標準抗原に対する免疫応答性とした遅延型アナフィラキシー応答性の評価も行われている。

(6) 抗原提示細胞によるがん抗原のクロスプレゼンテーション

MHC-1 は基本的に全ての細胞に発現しており、内在性タンパク質がプロテアソームにより分解され生成したペプチドが抗原処理関連トランスポーター（TAP）依存的に小胞体に運ばれ MHC-1 と結合して細胞外へ提示されるようになる。一方で外来性抗原はカテプシン S などの分解を受け、分解されたペプチドは抗原提示細胞特異的に発現される MHC-2 に発現される。

ナイーブな CD8 陽性細胞が外来抗原への応答性を誘導するためには抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）により外来性抗原がその MHC-1 に提示される必要がある（クロスプレゼンテーション：図 3）とされている。いくつかの概念的な仮説も含め、外来性抗原に対する細胞傷害性 T 細胞誘導の機能をになうのがどのような細胞なのか明確にはされていない。本来内在性抗原を提示する

MHC-1 に外来性抗原を提示するクロスプレゼンテーションが惹起されることにより細胞傷害性 T 細胞の強力な誘導が起り、高い抗腫瘍効果が発揮されると考えている研究者も多い。

クロスプレゼンテーションに関わる抗原提示細胞としては、*in vitro* での解析結果から樹状細胞がその主役とされているが、どの樹状細胞サブタイプがその役割を担っているのか明確でない状況で、クロスプレゼンテーションの誘導を評価することを求めるのは時期尚早の感がある。また抗原提示に関わる樹状細胞が局在すると想定される腫瘍内から樹状細胞を収集することも想定されるが、少なくともクロスプレゼンテーションに関わる樹状細胞が特定される必要があったが、近年の解析でその候補となる樹状細胞が特定されつつある。

マウスでの樹状細胞の解析結果から、リンパ節に常在するレジデント樹状細胞 (cDC)、タイプ 1 インターフェロンを産生する形質細胞様樹状細胞 (pDC)、移行性樹状細胞 (mDC) のサブタイプが知られている。さらに、cDC は CD8 α 陽性 (CD8 α +cDC 細胞) の CD8 α 陰性 (CD8 α -cDC 細胞) の 2 種類があり、クロスプレゼンテーションに関与する樹状細胞は CD8 α +cDC 細胞とされている。このマウスの CD8 α +cDC 細胞に相当するヒト細胞について最近の研究で DC antigen-3 (BDCA3) 陽性 (CD141 陽性) 細胞であるとする報告がされつつある。

しかし BDCA3+細胞はリンパ節や骨髄等でも非常に僅かなポピュレーションしかない細胞であり、クロスプレゼンテーションの有無の指標として BDCA3+細胞の抗原提示能を指標とした場合に測定法として成立するのかが問題となる。

マウス DC8 α +cDC やヒト BDCA3+細胞は高い IL-12 やインターフェロン β 産生能をもつと共に トールライク授与体 3 (TLR3) や TLR7 を発現している。

マウス DC8 α +cDC やヒト BDCA3+細胞は MHC-1 上に外来性抗原を提示できるが、TLR3 に 2 本鎖 RNA や polyI:C などが結合すると MHC-1 への抗原提示が活性化され、細胞傷害性 T 細胞の誘導が上昇する。また、産生する IL-12 やインターフェロン β を介してこの細胞傷害性 T 細胞の分化誘導を亢進させる能力を持つとされている (図 3)。

クロスプレゼンテーション能を持つヒト樹状細胞 (BDCA3+細胞) はがん免疫療法のキーとなる細胞と想定されている。樹状細胞を用いた抗腫瘍細胞製剤として FDA が唯一承認している

Sipleucel-T (Provenge) もこのような観点からの承認であると理解される。ただし、Provenge で得られている患者の全生存率の延長は対象に比べて統計的有意さはあるものの僅かであり、様々な改善の余地があるとされている。

例えば投与される樹状細胞の刺激因子、投与する樹状細胞量、投与頻度、投与ルート、投与部などである。このような解析が進展し、BDCA3+樹状細胞が真にがん免疫応答の中心に位置することが明らかになり、さらにその解析手法が確立することが期待される。

従って、樹状細胞に関するこのような解析が進めば、がんワクチンにおけるクロスプレゼンテーションの評価の意義もさらに明確になると考えられる。

C. 1. 5. がんワクチンガイドライン案

以上の調査研究を通じて得られた情報を基に、がんワクチンガイドラインに盛り込むべき要素を検討した。24 年度に実施した特別研究でがんワクチンガイドラインの素案を作成しているが、本年度に明らかにした要素をこの素案に追加した。また、後期臨床評価での全生存期間の延長等の有効性評価はがんワクチン特有の課題ではないことから、特にがんワクチンに特化した記載のみに限定することとした (資料 2)。

D. 考察

本年度は、NIH Clinical Trial プロトコルや公表文献、MIATA プロジェクトガイドライン等を中心に調査を行った。これらの成果に基づいて、昨年作成したがんワクチンガイドライン素案に追記すべき内容として次のような要素が考えられた。

1. ガイドライン作成に当たっての方向性

がんワクチンの対象として、ペプチドを長鎖ペプチドと単鎖ペプチドに分類して書き分けること。また単鎖ペプチドの役割は内在性のメモリー T 細胞の増幅能を期待している点、長鎖ペプチドやがん抗原免疫タンパク質を投与する場合には抗原提示細胞でのプロセッシングが期待されること。

2. ガイダンス案作成のポイント

(非臨床)

・有効性を示唆するデータをモデル動物で実施することの困難さと局所認容性などの点。その中で、薬理試験については、HLA の構造は動物種差が大きく、薬理的活性発現メカニズムの観点から、適切な実験動物種は存在しないこと等に留意が必要。

・ 毒性試験については、合成ペプチドの場合には化学合成由来の不純物や意図しない化合物の混在による安全性リスクが懸念されることから、これを確認する上で動物試験も有用性への言及。

(臨床)

・ 投与方法

皮下、皮内、腫瘍内、リンパ節内など様々な投与方法が試みられている→投与部位/投与方法の説明(非臨床試験から)とその妥当性

・ 至適用量等

MTD や DLT についてはがんワクチンではこれまで殆ど報告されてこなかったことから、必ずしも MTD や DLT を明らかにすることは求めないこと。また、用量増加方法について従来の 3 + 3 用量を踏襲する必要がない点。

・ 投与スケジュール

長期にわたるワクチン投与(追加免疫の実施)も想定される。投与スケジュールの妥当性の説明。追加免疫では、異なるがんワクチンが投与されることもありうる。

・ 併用薬の記載

後述する免疫活性化薬、免疫抑制解除のための抗体/低分子薬; GM-CSF やインターロイキン 2 などの免疫活性化剤。抗 CTLA4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗腫瘍抗原抗体などの抗体医薬品の併用。シクロホスファミドや他の Treg 抑制抗がん剤。TGF-β 等に対するアンチセンスや siRNA などの核酸医薬。

・ 免疫応答性の評価

抗原特異的免疫応答性 (MIATA-P; テトラマーアッセイ、エリスポットアッセイ、フローサイトメトリー) の評価のポイントと抗原ペプチドが特製されない場合の対応について。

・ 免疫抑制状態の評価

評価方法: 標準抗原を用いた遅延型アナフィラキシー応答性、末梢血 Treg 細胞数、腫瘍内 Treg 細胞数、Treg 細胞のサブタイプの評価。

・ HLA

適合する HLA 型を有する被験者を対象とするのが一般的であるが、がん抗原タンパク質では HLA 型の特定が出来ないことが想定される。

同じ標的抗原であっても、被験者の HLA 型により選択すべきペプチドが異なる。治験を実施す

る際は、ペプチド 1 つ 1 つではなく血清 HLA グループ型毎 (例 A19 (A29、A30、A31、A32、A33、A74)) で計画するなど工夫が必要。

E. 結論

1) NIH Clinical Trial に記載されているがんワクチンプロトコールやがんワクチンの臨床試験報告から、がんワクチンによって惹起される抗腫瘍免疫反応を評価するために複数の免疫評価指標が用いることが必要と考えられる。免疫応答性の評価では、がん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞やがん抗原特異的なヘルパー T 細胞数の解析、機能解析に加えて液性免疫応答性も評価されることが多い、また、がんによる免疫抑制反応からの解除を目指して抗体医薬や特定の抗がん剤が用いられており、患者の免疫抑制に関わる Treg 細胞数や免疫応答性の強さを評価する目的として遅延型アナフィラキシー応答性などが評価されている。またがワクチンの投与方法や投与スケジュール、投与量の設定がこれまでの抗がん剤の臨床試験とは異なっていることが明らかになった。2) がんワクチンでは従来の最大耐性投与量や毒性制限投与量の設定は不要な場合が多いと想定されるが、いくつかの臨床試験では MTD や DLT を主用評価項目や副次評価項目としているプロトコールもある。3) これらの成果に基づいて昨年作成したがんワクチンの評価ガイダンスの素案の再検討を行った。ガイダンスでは臨床初期に絞った記載とし、特に免疫応答に対する評価や投与量の設定などを中心に書き、臨床後期での有効性の評価については、他のがん治療と大きな差異はないと考えられるために簡略な記載とし、がんワクチン特有の留意点のみを記載することとした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Sakai-Kato, K. Nanjo, T. Yamaguchi, H. Okuda, and T. Kawanishi, High-performance liquid chromatography separation of monoclonal IgG2 isoforms on a column packed with nonporous particles. *Analytical Methods* 5, 5899-5902 (2013)
- 2) Itoh, S., Hiruta, Y., Ashii, N., Fujita, N., Natsuga, T., Hattori, T., Bandoc, A., Sekimoto, Y., Miyata, K., Namekawa, H., Mabuchi, K., Sakai, T., Shimahashi, H., Kawai, K., Yoden, H., Koyama, S., Odgaard Herr, S., Natsuka, S., Yamaguchi, T., Kawasaki, N.: Determination of Galactosamine

Impurities in Heparin Sodium using Fluorescent Labeling and Conventional High-Performance Liquid Chromatography. *Biologicals*, in press

- 3) Yamaguchi T, Kanayasu-Toyoda T, Uchida E: Angiogenic Cell Therapy for Severe Ischemic Diseases. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 176-181 (2013)
- 4) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英:細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験のPCR法の見直しに関する研究. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 印刷中
- 5) 山口照英: バイオ医薬品の効率的製造に向けた世界動向と規制状況. *BioIndustry*, 30, 47-54 (2013)

G-2 学会発表

- 1) Kishioka,Y, Sakurai,K, Yamaguchi,T.: Current Situation of Japanese Biosimilar Regulation. *APEC International Symposium Soul Korea*, (2013)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- H-1 特許取得 なし
- H-2 実用新案登録 なし
- H-3 その他 なし

図. 1 製品群別のがんワクチンプロトコール数

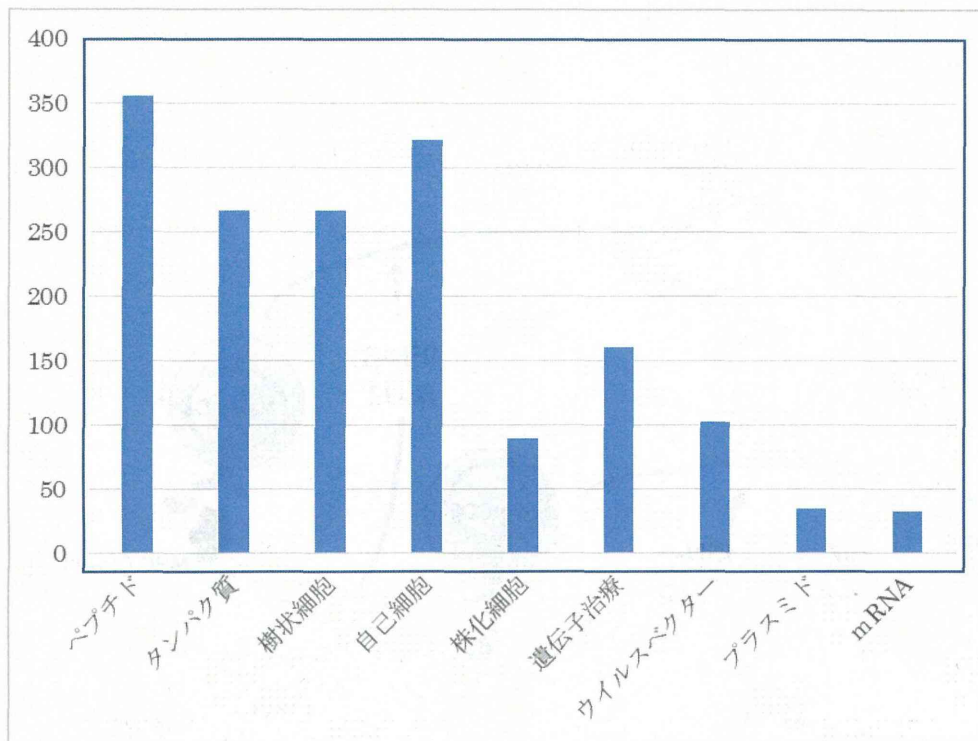


図 2. Treg 細胞とその機能分子

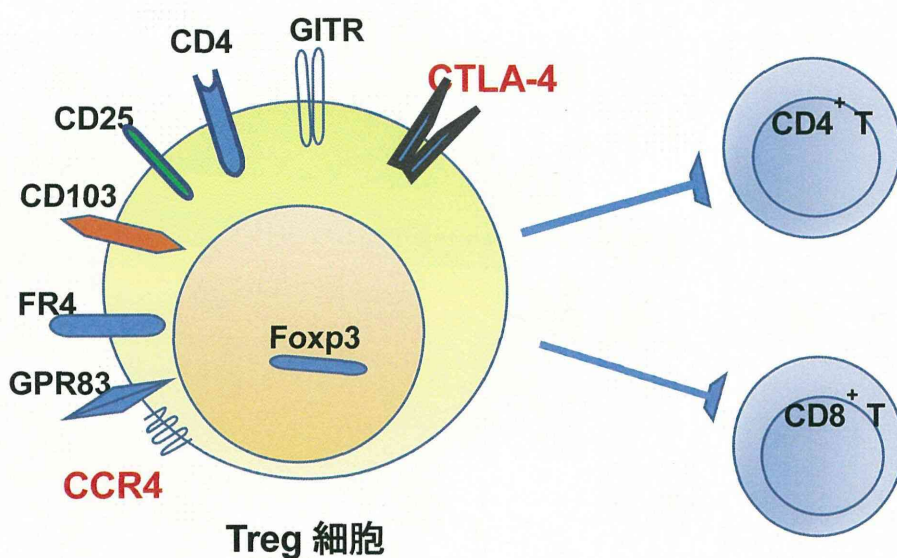
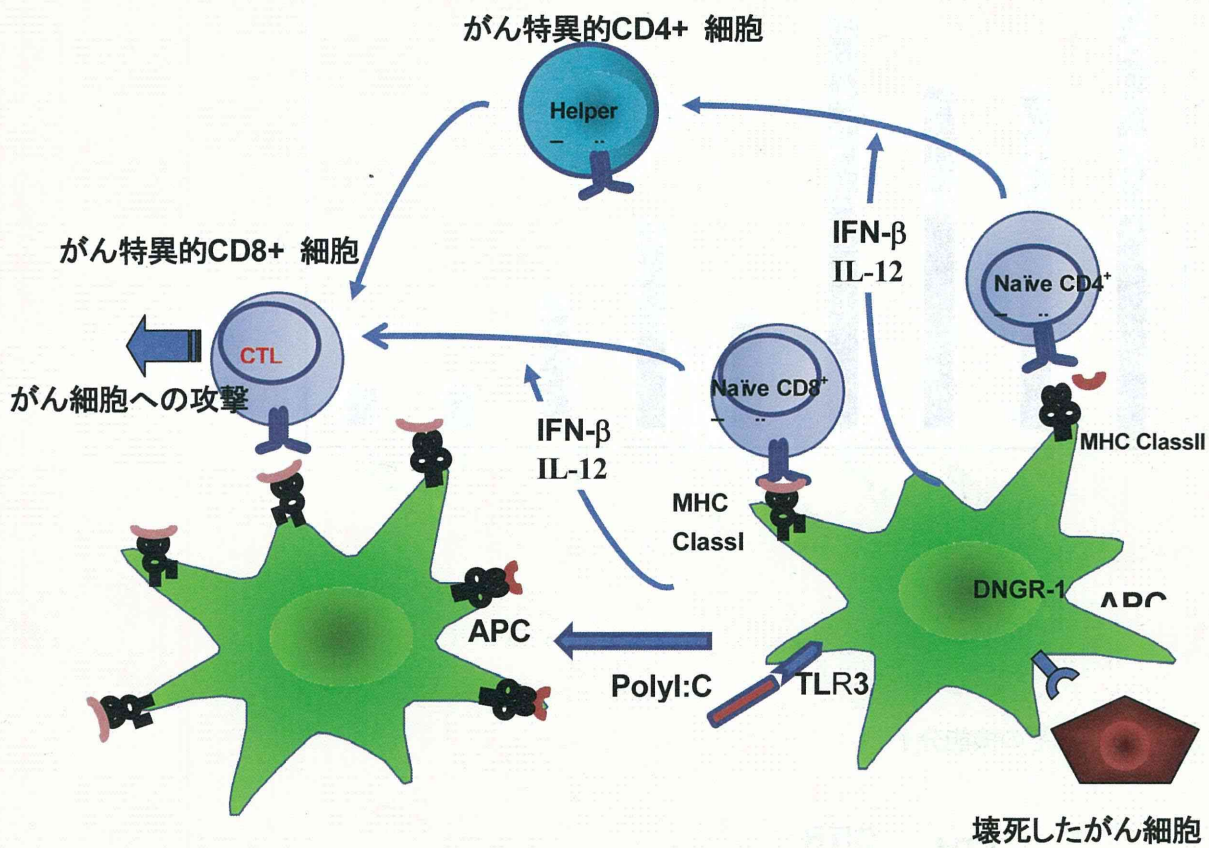


図 3. 樹状細胞のクロスプレゼンテーションと CTL 活性化



Status	資料1.	NIH Clinical Study Protocol
Completed	NY-ESO-1 Plasmid DNA (pPJV7611) Cancer Vaccine	
	Conditions:	Prostate Cancer; Bladder Cancer; Non-Small Cell Lung Cancer; Esophageal Cancer; Sarcoma
	Intervention:	Biological: NY-ESO-1 plasmid DNA Cancer Vaccine 2005
	<p>Primary Outcome: estimate the safety of NY-ESO-1 Plasmid DNA (pPJV7611) Cancer Vaccine given by PMED in patients with tumor type known to express NY-ESO-1 or LAGE-1 using frequency, severity, and duration of treatment-related adverse effects as endpoints.</p> <p>Secondary Outcome: evaluate NY-ESO-1 specific cellular and humoral immunity by determination of: a) NY-ESO-1 specific antibody, NY-ESO-1 specific CD8+ and CD4+ cells and b) delayed-type-hypersensitivity [DTH] induced by NY-ESO-1 Plasmid DNA (pPJV7611)</p> <p>Eligible patients with tumor type known to express NY-ESO-1 or LAGE-1 antigen will be assigned to cohorts. NY-ESO-1 Plasmid DNA (pPJV7611) Cancer Vaccine will be administered by PMED at a pressure of 500 psi using the XR-1 Powderject delivery device. The 4 microgram dosage of NY-ESO-1 will be administered as 4 X 1 microgram PMEDs in close proximity. Similarly, the 8 microgram dosage will be administered as 8 X 1 microgram PMEDs. The third cohort of patients will receive the 8 microgram dosage as a cluster dosage of 4 doses (day 1, 3, 5, 8) as 2 X 1 microgram PMEDs per day.</p> <p>Blood samples will be obtained at baseline, 2 weeks after each vaccination, prior to the second and third vaccination, and 4 weeks after the third vaccination for the assessment of clinical hematology, biochemistry measurements and immunology responses. Patients will be evaluated for toxicity throughout the study.</p> <p>DTH testing will be performed with NY-ESO-1 protein in all patients, with NY-ESO-1b peptide in HLA-A2+ patients and with NY-ESO-1 DP4 peptide in HLA-DP4+ patients at baseline and at the 2-week visit following the first and third vaccinations.</p> <p>NY-ESO-1 and/or LAGE-1 specific antibodies will be assessed in all patients by ELISA using recombinant NY-ESO-1 protein. NY-ESO-1 specific CD4+ and CD8+ T cells will be assessed in all patients by tetramer and/or ELISPOT assays (cross-presentation).</p>	
Active, not recruiting	Vaccine Maintenance Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer	
	Condition:	Carcinoma, Non-Small-Cell Lung
	Intervention:	Biological: HyperAcute-Lung Cancer Vaccine 2007
	<p>Primary Outcome: To determine the response rate of the administration of HyperAcute® Lung (HAL) Cancer Vaccine cells by injection into subjects with stage IIIB (pleural effusion) or stage IV non-small cell lung carcinoma who have been treated with first line platinum-dou [Time Frame: 4 months]</p> <p>Secondary Outcome: To conduct correlative scientific studies of subject samples to determine the mechanism of any observed antitumor effect. In these studies human humoral and cellular immune responses to HAL cells will be evaluated. [Time Frame: while on study]</p> <p>In this project, we have put a mouse gene into human lung cancer cells that produces these abnormal sugar patterns and stimulates the immune system to attack the lung cancer. This strategy works well to kill human other cancer cells in the laboratory, but it needs to be tried in lung cancer patients to see if it will be effective and to determine if such a treatment causes any side effects. We propose to test this new treatment in subjects with non-small cell lung cancer to see if it can stop, slow or destroy tumors in these subjects. Subjects will be injected with an anti-tumor vaccine consisting of a mixture of three types of dead human lung cancer cells that have been genetically altered to express the mouse gene responsible for making this abnormal sugar-protein on the cells.</p>	
Completed	A Cancer Vaccine (CG8123) Given With and Without Cyclophosphamide for Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)	
	Conditions:	Lung Cancer; Carcinoma, Non-Small-Cell Lung
	Interventions:	Biological: CG8123; Drug: Cyclophosphamide 2004
		GM-CSF Gene-Modified Autologous Tumor Vaccine (CG8123) Trastuzumab + Cyclophosphamide

NY-ESO-1 NY-ESO-1 Plasmid DNA (pPJV7611)

gene-modified lung cancer cells (sugar chain) HAL-1, HAL-2, HAL-3 (遺伝子改変がん細胞)

	<p>The main purpose of this research study is to determine if a vaccine made from a patient's lung cancer tumor cells will be effective in making the cancer shrink or disappear. The vaccine will be given by itself to some patients, while other patients will get the vaccine with cyclophosphamide (a type of chemotherapy). Studies in animals and other cancer vaccine trials suggest that cyclophosphamide may make tumor vaccines more potent. This study will try to determine if vaccine given with or without this chemotherapy is effective in destroying lung cancer cells. Additionally, the study will collect information on vaccine safety, both with and without chemotherapy, and whether the vaccine improves lung cancer-related symptoms (e.g., shortness of breath).</p> <p>Tumors from surgical resection will be processed and made into a vaccine. Prior to treatment, patients will be randomized equally to one of two treatment groups, Cohort A and Cohort B. Patients in Cohort A will be treated with CG8123 vaccine only and patients in Cohort B will be treated with CG8123 vaccine plus a single dose of cyclophosphamide administered one day prior to the first, third, and fifth vaccine treatments. Patients will receive intradermal (beneath the skin) vaccine injections every two weeks for up to eight weeks, for a total of up to five vaccine treatments. The duration of this study, including active follow up, is approximately</p>	
Active, not recruiting	Trastuzumab, Cyclophosphamide, and an Allogeneic GM-CSF-secreting Breast Tumor Vaccine for the Treatment of HER-2/Neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer	allogeneic GM-CSF-secreting whole breast cancer cells(遺伝子改変細胞) re-evaluating disease status with tumor markers and RECIST criteria for 30 days. Immunological response [30 days after
	Condition: Breast Neoplasms 2006 Interventions: Biological: Allogeneic GM-CSF-secreting breast cancer vaccine; Drug: Trastuzumab; Drug: Cyclophosphamide 2006	
	<p>Purpose This is a feasibility study to examine combination therapy with Trastuzumab (T), Cyclophosphamide (CY), and an allogeneic GM-CSF-secreting whole cell breast cancer vaccine in patients with Stage IV HER-2/neu-overexpressing breast cancer. The main purposes of this study are to test the safety, clinical benefit, and bioactivity of vaccine therapy in combination with Cyclophosphamide and Trastuzumab in patients with HER-2/neu-overexpressing Stage IV breast cancer. This study will also to test whether the Cyclophosphamide can eliminate the suppressive influence of regulatory T cells, and whether Trastuzumab can increase antigen processing and presentation. These drug activities may make the immune system react better and enhance the effects of the vaccine in treating breast cancer. The vaccine consists of two irradiated allogeneic mammary carcinoma cell lines genetically modified to secrete human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). This open label, single arm study is designed to recruit up to 40 subjects to identify 20 research subjects with HER-2/neu-overexpressing Stage IV breast cancer eligible for study treatment.</p> <p>Primary: Safety will be evaluated by assessing toxicity related to the vaccine, CY, Trastuzumab, cardiac dysfunction, and the potential induction of autoimmunity. [30 days] . /Clinical benefit will be assessed by re-evaluating disease status with tumor markers and RECIST criteria, or with full evaluation upon the development of new symptoms. [Time Frame: Until 30 days after intervention]</p> <p>Secondary: Immunological response [Time Frame: Until 30 days after intervention]</p>	
Completed	Dose Escalation and Efficacy Trial of GVAX® Prostate Cancer Vaccine	allogeneic GM-CSF secreting cellular vaccine cells
	Condition: Prostate Cancer Intervention: Biological: Immunotherapy allogeneic GM-CSF secreting cellular vaccine 2005	
Active, not recruiting	Vaccine Study for Surgically Resected Pancreatic Cancer	HAPa-1 and HAPa-2 cancer cell vaccine components (DFS) at one (1) year. OS.
	Condition: Pancreatic Cancer Intervention: Biological: HyperAcute(R)-Pancreatic Cancer Vaccine 2007	

	<p>Primary: The primary objective of this Phase II trial is to assess disease-free survival (DFS) at one (1) year following initiation of treatment as the primary endpoint of the study in subjects treated with the HyperAcute®-Pancreatic Cancer Vaccine [Time Frame: one year]</p> <p>Secondary: We will use overall survival and adverse events rates as secondary endpoints.</p> <p>Unfortunately, despite the best clinical efforts and breakthroughs in biotechnology, most patients diagnosed with pancreatic cancer continue to die from their disease in a very short period of time. The primary reason for this is the short progression time of the disease; in fact, most patients with pancreatic cancer have symptoms at the time of the diagnosis. Moreover, lack of any single agent or procedure to have any significant impact on long term survival rates further contributes to poor prognostic outcomes observed with this disease.</p> <p>These reasons are the major causes of cancer progression that are usually discussed when considering treatment options for patients with disease that continues to grow and spread. However, another important part of the body should be considered-- the immune system. Scientists have clearly shown that pancreatic cancer cells as well as other cancer cells produce a number of abnormal proteins or abnormal amounts of certain proteins not found in normal cells. Normally one would expect a patient to develop an immune response against these abnormal proteins found in their cancer and attack them much the way we would fight off an infection from a foreign bacteria or virus. However, for reasons that scientists do not fully understand, the immune system fails to respond to these abnormal proteins and does not attack the cancer cells. This human clinical trial proposes a new way to make the immune system recognize the cancer and encourage it to attack the cancer cells</p>		
Active, not recruiting	Low Dose Vaccine Study for Surgically Resected Pancreatic Cancer		HyperAcute(R)-Pancreatic Cancer cells vaccine HAPa-1 and HAPa-2 vaccine components. (DFS) at one (1) year. OS
	Condition:	Pancreatic Cancer	
	Intervention:	Biological: HyperAcute(R)-Pancreatic Cancer Vaccine 2008	
	<p>Primary: The primary objective of this Phase II trial is to assess disease-free survival (DFS) at one (1) year following initiation of treatment as the primary endpoint of the study in subjects treated with the HyperAcute®-Pancreatic Cancer Vaccine [Time Frame: One year]</p> <p>Secondary: We will use overall survival and adverse events rates as secondary endpoints.</p> <p>In this project, we propose to put a mouse gene into human pancreatic cancer cells that produces these abnormal sugar patterns and stimulates the immune system to attack the pancreatic cancer. This strategy works well to kill other human cancer cells in the laboratory, but it needs to be tried in pancreatic cancer patients to see if it will be effective. We propose to test this new treatment in patients with pancreatic cancer who have undergone tumor resection to see if it can stop or slow recurrence of tumors in these patients. Patients will be injected with an anti-tumor vaccine consisting of a mixture of two types of dead human pancreatic cancer cells that have been genetically altered to express the mouse gene responsible for making this abnormal sugar-protein on the cells.</p>		
Recruiting	Cancer Vaccine Study for Unresectable Stage III Non-small Cell Lung Cancer		Stimuvax: L-BLP25 or BLP25 Liposome Vaccine. 糖たんぱく質抗原MUC1 Merck.
	Condition:	Non-small Cell Lung Cancer	
	Interventions:	Biological: Stimuvax; Biological: Placebo 2006	

	<p>Survival duration of all randomized subjects by treatment arm [Time Frame: Interim analysis at 353 + 529 events (deaths); Final analysis at 705 events (deaths). Time To Symptom Progression (TTSP) One-, 2- 3-year survival</p> <p>Primary: To compare survival duration of all randomized subjects by treatment arm [Time Frame: Interim analysis at 353 + 529 events (deaths); Final analysis at 705 events (deaths)</p> <p>Secondary: To compare all randomized subjects by treatment arm for: Time To Symptom Progression (TTSP) as measured by the Lung Cancer Symptom Scale (LCSS) [Time Frame: Interim analysis at 353 + 529 events (deaths); Final analysis at 705 events (deaths)]</p> <p>Time To Progression (TTP) as determined by the investigator [Time Frame: Interim analysis at 353 + 529 events (deaths); Final analysis at 705 events (deaths)]</p> <p>One-, two- and three-year survival [Time Frame: Analyzed at 1, 2, & 3 years post treatment onset] [Designated as safety issue: No] Safety</p>	
Not yet recruiting	Experimental Therapeutic Cancer Vaccine Created In-situ in Patients With Stage II-Stage IV Cancer	
	Conditions:	Solid Tumors Stage II, Stage III and Stage IV; Breast Cancer; Colorectal Cancer; Prostate Cancer; Melanoma; Ovarian Cancer; Sarcoma; Non-small Cell Lung Cancer
	Interventions:	Biological: AlloStim; Procedure: Cryoablation 2010
	<p>tumor-specific CTL killer cells in the circulation.anti-tumor effect of AlloStim™ administration. [Time Frame: 1 year. immunological response[90 days]</p> <p>This is a Phase I/II clinical study to investigate the optimal protocol and indication for creating a personalized anti-tumor vaccine within the body of patients with cancer. The aim of the study is to evaluate the safety of administration and anti-tumor effect of a vaccine protocol that has three separate steps. Cancer patients generally present with an immune response to cancer biased to a Th2 response, while a Th1 response is considered necessary for mediating anti-tumor immunity. The first step of the study consists of multiple intradermal priming doses of AlloStim™. The aim of this step is to create Th1 immunity to the alloantigens in AlloStim™, thus increasing the number of Th1 cells in circulation. The second step of the protocol involves the cryoablation of a selected tumor lesion followed by an intratumoral AlloStim™ injection. The aim of this step is to generate tumor-specific CTL killer cells in the circulation. The final step is an intravenous infusion of AlloStim™. The aim of this step is to activate circulating Th1 cells, killer cells, and natural killer cells. The further aim of this step is to create an inflammatory environment that can break-down the ability of the tumor to avoid an anti-tumor immune response. In patients with partial responses and recurrence of disease, additional intravenous "booster" infusions are utilized to reactivate the circulating immune cells.</p>	
Completed	Prime-Boost Dose Scheduling Trial for Human GM-CSF Gene Transduced Irradiated Prostate Allogeneic Cancer Vaccine (Allogeneic Prostate GVAX®) in Patients With Hormone-Refractory Prostate Cancer	
	Condition:	Prostate Cancer
	Intervention:	Biological: Immunotherapy allogeneic GM-CSF secreting cellular vaccine 2005
	<p>The objective of this study is to evaluate the safety and efficacy of a prime-boost dose schedule of Human GM-CSF Gene Transduced Irradiated Prostate Allogeneic Cancer Vaccine (Allogeneic Prostate GVAX®) as measured by standard toxicity evaluation, changes in PSA, and tumor responses. Additional objectives are to measure the time to PSA and/or clinical disease progression as well as local and systemic immune responses to the vaccine.</p>	
Recruiting	Vaccine Therapy With or Without Cyclophosphamide in Treating Patients Undergoing Chemotherapy and Radiation Therapy for Stage I or Stage II Pancreatic Cancer That Can Be Removed by Surgery	
	Condition:	Pancreatic Cancer
	Interventions:	Biological: GVAX pancreatic cancer vaccine; Drug: cyclophosphamide 2008
	<p>GVAX pancreatic cancer vaccine: GM-CSF Secreting Allogeneic Pancreatic Cancer cells</p>	

	<p>Immune response [Time Frame: Unknown] . OS + PFS.</p> <p>RATIONALE: Vaccines made from gene-modified tumor cells may help the body build an effective immune response to kill pancreatic cancer cells. Drugs used in chemotherapy, such as cyclophosphamide, work in different ways to stop the growth of tumor cells, either by killing the cells or by stopping them from dividing. Giving vaccine therapy together with cyclophosphamide may kill more tumor cells. It is not yet known whether vaccine therapy is more effective with or without cyclophosphamide in treating patients with pancreatic cancer.</p> <p>PURPOSE: This randomized clinical trial is studying the side effects of vaccine therapy and to see how well it works when given with or without cyclophosphamide in treating patients undergoing chemotherapy and radiation therapy for stage I or stage II pancreatic cancer that can be removed by surgery.</p>					
Recruiting	<p>A Clinical Study to Assess Safety and Efficacy of a Tumor Vaccine in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma (ASET)</p> <table border="1"> <tr> <td>Condition:</td> <td>Stage IV Renal Cell Cancer</td> </tr> <tr> <td>Intervention:</td> <td>Biological: MGN1601 2010</td> </tr> </table>	Condition:	Stage IV Renal Cell Cancer	Intervention:	Biological: MGN1601 2010	MGN1601 : Genetically Modified Allogeneic (Human) Tumor Cells
Condition:	Stage IV Renal Cell Cancer					
Intervention:	Biological: MGN1601 2010					
	<p>Autoimmune effects [(12 w), extension phase (120 w) plus 5 years follow-up] the presence of MIDGE vectors. immune response (8 w, 120w)</p> <p>Primary: Assessment of safety profile of MGN1601 [Time Frame: Treatment phase (12 weeks), extension phase (120 weeks, if applicable), plus 5 years follow-up]</p> <p>Secondary : Assessment of potential autoimmune effects of MGN1601 [Time Frame: Treatment phase (12 weeks), extension phase (120 weeks, if applicable) plus 5 years follow-up (if applicable)] . /Assessment of the presence of MIDGE vectors [Time Frame: Treatment phase (12 weeks)] . /</p> <p>Assessment of the immune response to MGN1601 [Time Frame: Treatment phase (12 weeks), extension phase (120 weeks, if applicable)] . /Evaluation of clinical and radiological response to MGN1601 [Time Frame: Treatment phase (12 weeks), extension phase (120 weeks, if applicable) plus 5 years follow-up]</p>					
Recruiting	<p>Phase I Study To Test The Safety of TVAX Immunotherapy As A Treatment For Recurrent Grade III/IV Gliomas</p> <table border="1"> <tr> <td>Conditions:</td> <td>Glioma; High Grade Astrocytoma; Glioblastoma Multiforme</td> </tr> <tr> <td>Intervention:</td> <td>Biological: Cancer vaccine plus immune adjuvant, plus activated white blood cells 2010</td> </tr> </table>	Conditions:	Glioma; High Grade Astrocytoma; Glioblastoma Multiforme	Intervention:	Biological: Cancer vaccine plus immune adjuvant, plus activated white blood cells 2010	Cancer vaccine plus immune adjuvant, plus activated white blood cells.
Conditions:	Glioma; High Grade Astrocytoma; Glioblastoma Multiforme					
Intervention:	Biological: Cancer vaccine plus immune adjuvant, plus activated white blood cells 2010					
	<p>Primary: Relative toxicity [Time Frame: 8 weeks]. /To determine the relative toxicity (safety) of vaccinating recurrent grade III/IV glioma patients four times with live, attenuated cancer cells combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Toxicity will be assessed following delivery of each treatment.</p> <p>Secondary: Potency [Time Frame: 8 weeks]. /The potency of the modified vaccination regimen will be assessed by measuring immune responses following each vaccination. The study is designed to determine whether vaccinating recurrent grade III/IV glioma subjects four times with attenuated cancer cells stimulates more powerful immune responses than vaccinating subjects twice. Clinical effects also will be measured to determine whether the treatment causes the cancer to regress.</p>					
Active, not recruiting	<p>Safety and Efficacy Trial of a RNAActive®-Derived Prostate Cancer Vaccine in Hormone Refractory Disease</p> <table border="1"> <tr> <td>Condition:</td> <td>Hormonal Refractory Prostate Cancer</td> </tr> <tr> <td>Intervention:</td> <td>Biological: CV9103 2009</td> </tr> </table>	Condition:	Hormonal Refractory Prostate Cancer	Intervention:	Biological: CV9103 2009	CV9103 : a RNAActive®-Derived Prostate cancer
Condition:	Hormonal Refractory Prostate Cancer					
Intervention:	Biological: CV9103 2009					
	<p>vrecommended dose for exploration in the phase II part [Time Frame: 6-9 months]</p> <p>Immunotherapy of prostate cancer is a promising approach for the treatment of advanced or recurrent forms of prostate cancer. Recently, immunotherapy of prostate cancer has been facilitated by the identification of a number of prostate specific antigens that are expressed in healthy and tumor prostate tissues. For prostatectomized patients, such antigens offer ideal targets for immunotherapy as they are only present in tumor but not in healthy tissue. The use of prostate specific antigens in a cancer vaccine is one attractive option for cancer immunotherapy.</p>					
Terminated	<p>Trial of Melaxin Cancer Vaccine Plus Bacillus Calmette-Guerin (BCG) to Treat Malignant Melanoma</p>	Melaxin (autologous dendritoma vaccine) and				

	Condition: Melanoma	BCG, the professional antigen-presenting cell, the dendritic cell
	Intervention: Biological: Melaxin (autologous dendritoma vaccine) and BCG 2009	
	<p>Primary: Adverse events and clinical laboratory results [6 weeks] Secondary: Tumor response as measured using the RECIST criteria</p> <p>Chemotherapy and immunotherapy are the main therapies for metastatic melanoma with the hope of prolonging survival. The ideal immunotherapy would consist of the professional antigen-presenting cell, the dendritic cell, with the entire repertoire of tumor antigens inside. The best way to achieve this is by creating an autologous hybrid fusion cell of the dendritic cell and tumor cell. In this study, melanoma tumor tissue surgically removed from the patient will be disassociated into single cells, irradiated and fused to dendritic cells produced by culturing the patient's blood monocytes. Prior to the electrofusion procedure, the tumor cells are stained red and the dendritic cells are stained green. After fusion, the uniquely colored fused cells, or dendritomas, are separated from the unfused cells by use of a fluorescence activated cell sorter. This highly purified population is then divided into 4 doses containing 250,000 dendritomas each and frozen. Each dose is thawed, diluted to 1 ml with Sterile Saline for Injection containing 5% human serum albumin and administered subcutaneously over a lymph node bed to the patient once every 4 weeks. A separate injection of BCG is administered in the same area within 10 minutes of the dendritoma injection. The safety and efficacy of the therapy will be evaluated in 25 patients.</p>	
Recruiting	Cyclophosphamide and Vaccine Therapy With or Without Trastuzumab in Treating Patients With Metastatic Breast Cancer	
	Condition: Breast Cancer 2009	allogeneic GM-CSF-secreting breast cancer cells, Cyclophosphamide GM-CSF, Sargramostim, Trastuzumab
	Interventions: Biological: allogeneic GM-CSF-secreting breast cancer vaccine; Biological: trastuzumab; Drug:	
	<p>PFS (無増悪生存期間), PD: peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells CTL/ELISPOT, T cell memory pool,, Immune priming in in-vivo vaccine-site biopsies</p> <p>Primary: To evaluate the safety of cyclophosphamide-modulated vaccination with vs without trastuzumab in patients that does not overexpress HER-2/neu. To compare the clinical benefit of cyclophosphamide-modulated vaccination with vs without trastuzumab in these patients. To measure HER-2/neu-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity by delayed-type hypersensitivity (DTH) and ELISPOT. To measure the pharmacodynamics of CD4+CD25+ regulatory T cells by flow cytometry.</p> <p>Secondary: To assess the impact of trastuzumab on immune priming in vivo by immunohistochemistry of vaccine-site biopsies at day +3 and day +7 of courses 1 and 3 on the two study arms, comparing cellular infiltrates to those seen in previous preclinical and clinical models. To measure hTERT-specific CD8+ T-cell immunity by ELISPOT. To characterize the peripheral-memory T-cell pool.</p> <p>Tertiary: To determine baseline and change in vaccine site-draining lymph node immunohistology and gene expression profile. To develop the tandem tetramer/CD107a cytotoxicity assay for HER-2/neu-specific CD8+ T cells. To measure novel T-cell responses induced by trastuzumab and cyclophosphamide-modulated vaccination.</p> <p>OUTLINE: Patients are randomized to 1 of 2 treatment arms.</p> <p>Arm I: Patients receive cyclophosphamide IV over 30 minutes on day -1 and allogeneic GM-CSF-secreting breast cancer vaccine intradermally on day 0. Courses repeat every 4-6 weeks for 3 courses in the absence of disease progression or unacceptable toxicity. Patients then receive a fourth vaccination at 6-8 months.</p> <p>Arm II: Patients receive cyclophosphamide and the vaccine as in arm I and trastuzumab IV over 30-90 minutes on day -1. Courses repeat every 4-6 weeks for 3 courses in the absence of disease progression or unacceptable toxicity. Patients then receive a fourth vaccination at 6-8 months.</p>	
Recruiting	Trial of an RNActive®-Derived Cancer Vaccine in Stage IIIB/IV Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC)	
	Condition: Non Small Cell Lung Cancer	CV9201: mRNAs (drug product components) encoding antigens that are overexpressed or exclusively expressed in NSCLC cells.
	Intervention: Biological: CV9201 2009	