

本研究計画(当初計画からの変更点):

主要評価項目(全生存期間)や研究期間に変更はないが、症例集積遅延のために最終的な症例数は86例になることが見込まれる(目標症例数110例)。現在国内でアバスチン抵抗性症例が増加しつつあるために、平成26年度の目標は2例/月で年度末に65例、平成27年度は3例/月で10月の登録終了時まで86例とした。その結果、検出力は80%以上から75%前後に低下するが主目的は評価可能と考える。また、平成25年度がん臨床研究成果発表会でのアドバイスをうけたQOLについては、副次目的の「総合的臨床効果」の中で評価する。

倫理面への配慮

臨床試験(治験)に先立ち、安全性を担保する為の安全性薬理試験並びに必要な不可欠なラットを用いた各種毒性試験をGLP基準に基づき実施し、ヒトにおける臨床試験の実施に問題は無いと判断された。

本研究は患者を対象とした介入試験であり、薬事法下の医師主導治験である。「ヘルシンキ宣言」ならびに「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP)」を遵守して実施される。治験実施計画書及び患者同意説明文書は医薬品医療機器総合機構による治験相談は実施済みであり、各実施医療機関のIRBにより科学的及び倫理的な面からの審査・承認を経て、治験届出後に治験が開始されている。さらに公的登録サイト(UMIN)に登録した。被験者からの同意取得に当たっては同意説明文書を用いて試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等を説明し、被験者が説明内容を十分に理解したことを確認した上で、本試験への参加について本人の自由意志による同意を文書にて取得している(インフォームドコンセント)。また、試験開始後も、GCPに基づくモニタリングおよび監査を実施している。

C. 研究成果

61. 臨床試験全体の研究成果については研究報告書(総括)に記載

62. 当該分担での研究成果は現時点で以下の通りである。

同意取得例の内訳等

平成27年3月2日時点の平成26年度の北里大学における同意取得例は4例、その内、スクリーニング脱落例(HLA-A24陰性)が1例あり、本登録例症例は3例であった。1例は第1コース1回投与を行なったが、進行大腸がんが見つかり、試験中止となったが、残りの2例は第1コース投与継続中および投与開始前の状態である。

当院において、本年度内での死亡イベントはな

かったが、重篤な有害事象(SAE)として、進行大腸癌が見つかったが、潜血便陽性の反応が治験薬投与前から認められていたため、治験薬との因果関係は否定された。

本同意取得例の被験者背景(本年度の当院における症例を赤字)を下図に示した。

同意取得例の内訳

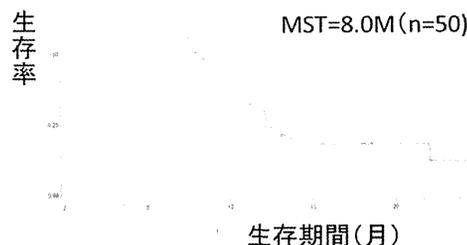
平成27年3月2日時点



63. 生存期間曲線 (参考)

死亡イベントが35例に達したので、参考資料として、盲検性を保った状態で生存期間曲線を解析した。その結果、全症例でのMSTは8.0ヶ月であった。尚、生存例は平成26年11月21日で一旦打ち切りとして算出した。

Product-Limit 生存推定



D. 考察

平成25年はギリアデルとアバスチンが相次いで悪性神経膠腫に対して医薬品承認された影響もあり当該治験は当初予定より遅延しているものの、安全性に問題はなく、ブラインド(ワクチン群とプラセボ群の併合)での生存期間中央値も8.0ヶ月と想定どおりの結果がみられていることから、症例集積遅延以外は順調に進捗しているものと考えている。

目標症例数は110例で計画しているが、最終的な症例数は86例になることが見込まれる。その結果をうけて検出力は80%から75%前後に低下するものの主目的は評価可能と考える。

E. 結論

申請時研究計画に沿って、症例集積遅延以外は概

ね順調に経過していると自己評価している。今後はアバスチンfailure症例が増えてくることが見込まれること、また本年度に新たに2施設追加し、症例登録を加速させる。

F. 健康危険情報
該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
・該当なし
2. 学会発表

・該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況：

・該当なし

標準治療抵抗性神経膠芽腫に対するペプチドワクチンの第三相臨床研究に関する研究

研究分担者 荒川 芳輝 京都大学 助教

研究要旨

本研究では、進行、再発、難治がんに対する新規の治療法確立を最終目的として、まず HLA-A24 陽性のテモゾロミド治療抵抗性膠芽腫患者を対象としたテラーメイドペプチドワクチン投与の有効性と安全性を検証する臨床試験を第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験として実施して医薬品承認を目指す。その後適応拡大を目指す。

平成 27 年 3 月 2 日時点の平成 26 年度の京都大学における同意取得例は 5 例、その内、スクリーニング脱落例（HLA-A24 陰性）が 1 例あり、本登録例症例は 4 例であった。但し、その 1 例は選択基準の放射線照射量を満たしていないため、投与開始前に試験中止となった。2 例は第 1 コース投与を行なったが、原疾患の悪化のため試験中止となり、1 例は現在、第 1 コースを投与継続中である。

A. 研究目的

(1)本研究目的は、進行、再発、難治がんに対する新規の治療法確立である。具体的には、平成 23 年度から厚生労働科学研究費の助成をうけて実施してきた HLA-A24 陽性のテモゾロミド治療抵抗性神経膠芽腫患者を対象としたテラーメイドペプチドワクチン投与の有効性と安全性を検証する第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験を終了させ、医薬品としての薬事承認を取得し、がん治療の現場に新しい治療法を提供することである。

当該研究によりがんペプチドワクチンが実用化された暁には多くのがん患者の福音となると思われる。また共通がん関連抗原由来ペプチドを用いているので、膠芽腫以外のがん患者に対しても、適応症拡大の可能性が高い。この場合には、製薬企業の積極参加が期待でき日本から世界へがん治療薬の提供が可能になる。日本では抗がん剤は欧米からの輸入医薬に頼っており、厚生労働行政の観点からも、本邦発の副作用の少ない新規抗がん剤の開発は意義が大きい。

B. 研究方法

本研究では、テモゾロミド治療抵抗性の HLA-A24 陽性の膠芽腫患者を対象とし、BSC 下にプラセボ群を対照として、ペプチドワクチン投与(以下 ITK-1 と記載)群の臨床効果を検証する多施設共同無作為割付第Ⅲ相二重盲検比較臨床試験を実施する。「基本デザイン」は第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験であり、「目標症例数」は 86 症例、内訳はワクチン・BSC 群 57 例、プラセボ・BSC 群 29 例とする。症例数の設定根拠としては登録期間 48 カ月、投与期間 12 カ月、投与後追跡期間 5 カ月、全試験期間は 65 カ月とし、 α エラーは 0.05、検出力は 0.76、対照群（プラセボ+BSC 群）とワクチン群(ワクチン

+BSC 群)との例数比を 1 : 2 とした。推定値の仮定およびその根拠として、第 I 相多施設共同臨床試験(探索的臨床研究)及び企業主導の第 I 相治験・継続投与試験結果及び標準治療抵抗性膠芽腫の全生存期間解析で得られた結果から対照群とワクチン群の試験登録後の全生存期間の中央値を各々 6 カ月及び 10.6 カ月とすると必要症例数は各々 29 例及び 57 例となる。

主要評価項目はワクチン群とプラセボ群の全生存期間であり、副次評価項目は 12 カ月生存率、腫瘍縮小効果、総合的抗腫瘍効果 (PS や KPS の経時的変動からみた QOL 評価を含む)、無増悪生存期間、抗ペプチド抗体価および CTL の推移、安全性評価としては、副作用発現頻度および有害事象発現頻度である。統計手法として、全生存期間を Harrington-Fleming 検定を用いて群間比較する。また、参考として log-rank 検定を実施する。

ペプチド製剤の選択方法として、まず被験者の末梢血検体を用いて、ペプチド製剤 12 種類への「抗体検査」を実施し、抗ペプチド抗体価が高かった順位に従って、2~4 種類以上のペプチド製剤またはプラセボの投与数を決定する。ただし、GP-108、GP-109、GP-110 のペプチド(第 2 選択ペプチド)については膠芽腫患者では発現頻度が低いので、他の 9 種のペプチド製剤(第 1 選択ペプチド)を優先して選択する。

第 1 選択ペプチド: GP-101, GP-104, GP-105, GP-106, GP-107, GP-111, GP-112, GP-113, GP-114

第 2 選択ペプチド: GP-108, GP-109, GP-110

本研究計画(当初計画からの変更点):

主要評価項目（全生存期間）や研究期間に変更はないが、症例集積遅延のために最終的な症例数

は 86 例になることが見込まれる（目標症例数 110 例）。現在国内でアバスチン抵抗性症例が増加しつつあるために、平成 26 年度の目標は 2 例/月で年度末に 65 例、平成 27 年度は 3 例/月で 10 月の登録終了時まで 86 例とした。その結果、検出力は 80% 以上から 75% 前後に低下するが主目的は評価可能と考える。また、平成 25 年度がん臨床研究成果発表会でのアドバイスをうけた QOL については、副次目的の「総合的臨床効果」の中で評価する。

倫理面への配慮

臨床試験(治験)に先立ち、安全性を担保する為の安全性薬理試験並びに必要な不可欠なラットを用いた各種毒性試験を GLP 基準に基づき実施し、ヒトにおける臨床試験の実施に問題は無いと判断された。

本研究は患者を対象とした介入試験であり、薬事法下の医師主導治験である。「ヘルシンキ宣言」ならびに「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (GCP)」を遵守して実施される。治験実施計画書及び患者同意説明文書は医薬品医療機器総合機構による治験相談は実施済みであり、各実施医療機関の IRB により科学的及び倫理的な面からの審査・承認を経て、治験届出後に治験が開始されている。さらに公的登録サイト (UMIN) に登録した。被験者からの同意取得に当たっては同意説明文書を用いて試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等を説明し、被験者が説明内容を十分に理解したことを確認した上で、本試験への参加について本人の自由意志による同意を文書にて取得している (インフォームドコンセント)。また、試験開始後も、GCP に基づくモニタリングおよび監査を実施している。

C. 研究成果

64. 臨床試験全体の研究成果については研究報告書 (総括) に記載

65. 当該分担での研究成果は現時点で以下の通りである。

同意取得例の内訳等

平成 27 年 3 月 2 日時点の平成 26 年度の京都大学における同意取得例は 5 例、その内、スクリーニング脱落例 (HLA-A24 陰性) が 1 例あり、本登録例症例は 4 例であった。但し、その 1 例は選択基準の放射線照射量を満たしていないため、投与開始前に試験中止となった。2 例は第 1 コース投与を行なったが、原疾患の悪化のため試験中止となった。尚、現在、1 例は第 1 コースとして投与継続中である。

当院において、本年度内での死亡イベントは 2 例認められたが、それ以外の重篤な有害事象 (SAE) はなかった。

本同意取得例の被験者背景 (本年度の当院における症例を赤字) を下図に示した。

同意取得例の内訳

平成27年3月2日時点



66. 生存期間曲線 (参考)

死亡イベントが 35 例に達したので、参考資料として、盲検性を保った状態で生存期間曲線を解析した。その結果、全症例での MST は 8.0 ヶ月であった。尚、生存例は平成 26 年 11 月 21 日で一旦打ち切りとして算出した。

Product-Limit 生存推定

生存率

MST=8.0M (n=50)

生存期間(月)

D. 考察

平成26年はギリアデルとアバスチンが相次いで悪性神経腫瘍に対して医薬品承認された影響もあり当該治験は当初予定より遅延しているものの、安全性に問題はなく、ブラインド(ワクチン群とプラセボ群の併合)での生存期間中央値も8.0ヶ月と想定どおりの結果がみられていることから、症例集積遅延以外は順調に進捗しているものと考えている。

目標症例数は110例で計画しているが、最終的な症例数は86例になることが見込まれる。その結果をうけて検出力は80%から75%前後に低下するものの主目的は評価可能と考える。

E. 結論

申請時研究計画に沿って、症例集積遅延以外は概ね順調に経過していると自己評価している。今後はアバスチンfailure症例が増えてくることが見込まれること、また本年度に新たに2施設追加し、症例登録を加速させる。

F. 健康危険情報
該当せず

G. 研究発表
1. 論文発表
・該当なし
2. 学会発表
・該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況：
・該当なし

標準治療抵抗性神経膠芽腫に対するペプチドワクチンの第三相臨床研究に関する研究

研究分担者 夏目敦至 名古屋大学 准教授

研究要旨

本研究では、進行、再発、難治がんに対する新規の治療法確立を最終目的として、まず HLA-A24 陽性のテモゾロミド治療抵抗性膠芽腫患者を対象としたテーラーメイドペプチドワクチン投与の有効性と安全性を検証する臨床試験を第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験として実施して医薬品承認を目指す。その後適応拡大を目指す。

名古屋大学医学部附属病院では、平成 26 年 10 月に IRB の承認を取得し、患者のリスクに努めたが、平成 27 年 3 月 2 日時点で平成 26 年度の当院における同意取得例はなかった。

A. 研究目的

(1)本研究目的は、進行、再発、難治がんに対する新規の治療法確立である。具体的には、平成 23 年度から厚生労働科学研究費の助成をうけて実施してきた HLA-A24 陽性のテモゾロミド治療抵抗性神経膠芽腫患者を対象としたテーラーメイドペプチドワクチン投与の有効性と安全性を検証する第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験を終了させ、医薬品としての薬事承認を取得し、がん治療の現場に新しい治療法を提供することである。

当該研究によりがんペプチドワクチンが実用化された暁には多くのがん患者の福音となると思われる。また共通がん関連抗原由来ペプチドを用いているので、膠芽腫以外のがん患者に対しても、適応症拡大の可能性が高い。この場合には、製薬企業の積極参加が期待でき日本から世界へがん治療薬の提供が可能になる。日本では抗がん剤は欧米からの輸入医薬に頼っており、厚生労働行政の観点からも、本邦発の副作用の少ない新規抗がん剤の開発は意義が大きい。

B. 研究方法

本研究では、テモゾロミド治療抵抗性の HLA-A24 陽性の膠芽腫癌患者を対象とし、BSC 下にプラセボ群を対照として、ペプチドワクチン投与(以下 ITK-1 と記載)群の臨床効果を検証する多施設共同無作為割付第Ⅲ相二重盲検比較臨床試験を実施する。「基本デザイン」は第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験であり、「目標症例数」は 86 症例、内訳はワクチン・BSC 群 57 例、プラセボ・BSC 群 29 例とする。症例数の設定根拠としては登録期間 48 カ月、投与期間 12 カ月、投与後追跡期間 5 カ月、全試験期間は 65 カ月とし、 α エラーは 0.05、検出力は 0.76、対照群（プラセボ+BSC 群）とワクチン群(ワクチン+BSC 群)との例数比を 1:2 とした。推定値の仮定およびその根拠として、第 I 相多施設共同

臨床試験(探索的臨床研究)及び企業主導の第 I 相治験・継続投与試験結果及び標準治療抵抗性膠芽腫の全生存期間解析で得られた結果から対照群とワクチン群の試験登録後の全生存期間の中央値を各々 6 カ月及び 10.6 カ月とすると必要症例数は各々 29 例及び 57 例となる。

主要評価項目はワクチン群とプラセボ群の全生存期間であり、副次評価項目は 12 カ月生存率、腫瘍縮小効果、総合的抗腫瘍効果 (PS や KPS の経時的変動からみた QOL 評価を含む)、無増悪生存期間、抗ペプチド抗体価および CTL の推移、安全性評価としては、副作用発現頻度および有害事象発現頻度である。統計手法として、全生存期間を Harrington-Fleming 検定を用いて群間比較する。また、参考として log-rank 検定を実施する。

ペプチド製剤の選択方法として、まず被験者の末梢血検体を用いて、ペプチド製剤 12 種類への「抗体検査」を実施し、抗ペプチド抗体価が高かった順位に従って、2~4 種類以上のペプチド製剤またはプラセボの投与数を決定する。ただし、GP-108、GP-109、GP-110 のペプチド(第 2 選択ペプチド)については膠芽腫患者では発現頻度が低いので、他の 9 種のペプチド製剤(第 1 選択ペプチド)を優先して選択する。

第 1 選択ペプチド: GP-101, GP-104, GP-105, GP-106, GP-107, GP-111, GP-112, GP-113, GP-114

第 2 選択ペプチド: GP-108, GP-109, GP-110

本研究計画(当初計画からの変更点):

主要評価項目(全生存期間)や研究期間に変更はないが、症例集積遅延のために最終的な症例数は 86 例になることが見込まれる(目標症例数 110 例)。現在国内でアバスチン抵抗性症例が増加しつつあるために、平成 26 年度の目標は 2 例/月で年度末に 65 例、平成 27 年度は 3 例/月で 10 月の

登録終了時までには 86 例とした。その結果、検出力は 80%以上から 75%前後に低下するが主目的は評価可能と考える。また、平成 25 年度がん臨床研究成果発表会でのアドバイスをうけたQOLについては、副次目的の「総合的臨床効果」の中で評価する。

生存率

MST=8.0M(n=50)

倫理面への配慮

臨床試験(治験)に先立ち、安全性を担保する為の安全性薬理試験並びに必要な不可欠なラットを用いた各種毒性試験を GLP 基準に基づき実施し、ヒトにおける臨床試験の実施に問題は無いと判断された。

本研究は患者を対象とした介入試験であり、薬事法下の医師主導治験である。「ヘルシンキ宣言」ならびに「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (GCP)」を遵守して実施される。治験実施計画書及び患者同意説明文書は医薬品医療機器総合機構による治験相談は実施済みであり、各実施医療機関の IRB により科学的及び倫理的な面からの審査・承認を経て、治験届出後に治験が開始されている。さらに公的登録サイト (UMIN) に登録した。被験者からの同意取得に当たっては同意説明文書を用いて試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等を説明し、被験者が説明内容を十分に理解したことを確認した上で、本試験への参加について本人の自由意志による同意を文書にて取得している (インフォームドコンセント)。また、試験開始後も、GCP に基づくモニタリングおよび監査を実施している。

C. 研究成果

67. 臨床試験全体の研究成果については研究報告書 (総括) に記載
68. 当該分担での研究成果は現時点で以下の通りである。

名古屋大学医学部附属病院では、平成 26 年 10 月に IRB の承認を取得し、患者のリクルートに努めたが、平成 27 年 3 月 2 日時点で平成 26 年度の当院における同意取得例はなかった。

69. 生存期間曲線 (参考)

死亡イベントが 35 例に達したので、参考資料として、盲検性を保った状態で生存期間曲線を解析した。その結果、全症例での MST は 8.0 ヶ月であった。尚、生存例は平成 26 年 11 月 21 日で一旦打ち切りとして算出した。

生存期間(月)

D. 考察

平成25年はギリアデルとアバスチンが相次いで悪性神経膠腫に対して医薬品承認された影響もあり当該治験は当初予定より遅延しているものの、安全性に問題はなく、ブラインド(ワクチン群とプラセボ群の併合)での生存期間中央値も8.0ヶ月と想定どおりの結果がみられていることから、症例集積遅延以外は順調に進捗しているものと考えている。

目標症例数は110例で計画しているが、最終的な症例数は86例になることが見込まれる。その結果をうけて検出力は80%から75%前後に低下するものの主目的は評価可能と考える。

E. 結論

申請時研究計画に沿って、症例集積遅延以外は概ね順調に経過していると自己評価している。今後はアバスチンfailure症例が増えてくることが見込まれること、また本年度に新たに2施設追加し、症例登録を加速させる。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
 - ・該当なし
2. 学会発表
 - ・該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況：

・該当なし

標準治療抵抗性神経膠芽腫に対するペプチドワクチンの第三相臨床研究に関する研究

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、進行、再発、難治がんに対する新規の治療法確立を最終目的として、まず HLA-A24 陽性のテモゾロミド治療抵抗性膠芽腫患者を対象としたテーラーメイドペプチドワクチン投与の有効性と安全性を検証する臨床試験を第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験として実施して医薬品承認を目指す。その後適応拡大を目指す。

平成 26 年 11 月 21 日で一旦打ち切りとし、参考資料として、盲検性を保った状態で生存期間曲線を解析した。その結果、全症例での MST は 8.0 ヶ月であった。また、平成 26 年 12 月 12 日に死亡イベントが 35 例に達し、平成 27 年 3 月 10 日に中間解析の効果安全性評価委員会を実施する。

A. 研究目的

(1)本研究目的は、進行、再発、難治がんに対する新規の治療法確立である。具体的には、平成 23 年度から厚生労働科学研究費の助成をうけて実施してきた HLA-A24 陽性のテモゾロミド治療抵抗性神経膠芽腫患者を対象としたテーラーメイドペプチドワクチン投与の有効性と安全性を検証する第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験を終了させ、医薬品としての薬事承認を取得し、がん治療の現場に新しい治療法を提供することである。

当該研究によりがんペプチドワクチンが実用化された暁には多くのがん患者の福音となると思われる。また共通がん関連抗原由来ペプチドを用いているので、膠芽腫以外のがん患者に対しても、適応症拡大の可能性が高い。この場合には、製薬企業の積極参加が期待でき日本から世界へがん治療薬の提供が可能になる。日本では抗がん剤は欧米からの輸入医薬に頼っており、厚生労働行政の観点からも、本邦発の副作用の少ない新規抗がん剤の開発は意義が大きい。

B. 研究方法

本研究では、テモゾロミド治療抵抗性の HLA-A24 陽性の膠芽腫患者を対象とし、BSC 下にプラセボ群を対照として、ペプチドワクチン投与(以下 ITK-1 と記載)群の臨床効果を検証する多施設共同無作為割付第Ⅲ相二重盲検比較臨床試験を実施する。「基本デザイン」は第Ⅲ相プラセボ対照二重盲検比較試験であり、「目標症例数」は 86 症例、内訳はワクチン・BSC 群 57 例、プラセボ・BSC 群 29 例とする。症例数の設定根拠としては登録期間 48 カ月、投与期間 12 カ月、投与後追跡期間 5 カ月、全試験期間は 65 カ月とし、 α エラーは 0.05、検出力は 0.76、対照

群(プラセボ+BSC 群)とワクチン群(ワクチン+BSC 群)との例数比を 1:2 とした。推定値の仮定およびその根拠として、第Ⅰ相多施設共同臨床試験(探索的臨床研究)及び企業主導の第Ⅰ相治療・継続投与試験結果及び標準治療抵抗性膠芽腫の全生存期間解析で得られた結果から対照群とワクチン群の試験登録後の全生存期間の中央値を各々 6 カ月及び 10.6 カ月とすると必要症例数は各々 29 例及び 57 例となる。

主要評価項目はワクチン群とプラセボ群の全生存期間であり、副次評価項目は 12 カ月生存率、腫瘍縮小効果、総合的抗腫瘍効果(PS や KPS の経時的変動からみた QOL 評価を含む)、無増悪生存期間、抗ペプチド抗体価および CTL の推移、安全性評価としては、副作用発現頻度および有害事象発現頻度である。統計手法として、全生存期間を Harrington-Fleming 検定を用いて群間比較する。また、参考として log-rank 検定を実施する。

ペプチド製剤の選択方法として、まず被験者の末梢血検体を用いて、ペプチド製剤 12 種類への「抗体検査」を実施し、抗ペプチド抗体価が高かった順位に従って、2~4 種類以上のペプチド製剤またはプラセボの投与数を決定する。ただし、GP-108、GP-109、GP-110 のペプチド(第 2 選択ペプチド)については膠芽腫患者では発現頻度が低いので、他の 9 種のペプチド製剤(第 1 選択ペプチド)を優先して選択する。

第 1 選択ペプチド: GP-101, GP-104, GP-105, GP-106, GP-107, GP-111, GP-112, GP-113, GP-114

第 2 選択ペプチド: GP-108, GP-109, GP-110

本研究計画(当初計画からの変更点):

主要評価項目(全生存期間)や研究期間に変更はないが、症例集積遅延のために最終的な症例数は86例になることが見込まれる(目標症例数110例)。現在国内でアバスチン抵抗性症例が増加しつつあるために、平成26年度の目標は2例/月で年度末に65例、平成27年度は3例/月で10月の登録終了時まで86例とした。その結果、検出力は80%以上から75%前後に低下するが主目的は評価可能と考える。また、平成25年度がん臨床研究成果発表会でのアドバイスをうけたQOLについては、副次目的の「総合的臨床効果」の中で評価する。

倫理面への配慮

臨床試験(治験)に先立ち、安全性を担保する為の安全性薬理試験並びに必要な不可欠なラットを用いた各種毒性試験をGLP基準に基づき実施し、ヒトにおける臨床試験の実施に問題は無いと判断された。

本研究は患者を対象とした介入試験であり、薬事法下の医師主導治験である。「ヘルシンキ宣言」ならびに「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP)」を遵守して実施される。治験実施計画書及び患者同意説明文書は医薬品医療機器総合機構による治験相談は実施済みであり、各実施医療機関のIRBにより科学的及び倫理的な面からの審査・承認を経て、治験届出後に治験が開始されている。さらに公的登録サイト(UMIN)に登録した。被験者からの同意取得に当たっては同意説明文書を用いて試験の内容、予想される不利益・危険性、同意撤回の自由等を説明し、被験者が説明内容を十分に理解したことを確認した上で、本試験への参加について本人の自由意志による同意を文書にて取得している(インフォームドコンセント)。また、試験開始後も、GCPに基づくモニタリングおよび監査を実施している。

C. 研究成果

70. 臨床試験全体の研究成果については研究報告書(総括)に記載

71. 当該分担での研究成果は現時点で以下の通りである。

死亡イベントが35例に達したので、平成26年11月21日で一旦打ち切りとし、参考資料として、盲検性を保った状態で生存期間曲線を解析した。その結果、全症例でのMSTは8.0ヶ月であった。

また、中間解析を行なうために、平成26年12月12日に死亡イベントが35例に達し、それまで

に集積した52症例について、平成27年1月30日に症例検討会において解析対象集団の検討を行った。その結果、治験薬投与前に中止しており、治験薬の投与がおこなわれていない2症例については、安全性および有効性解析集団から除外することとし、50例を解析集団とすることにした。

Product-Limit生存推定

生存率

MST=8.0M(n=50)

生存期間(月)

D. 考察

平成25年はギリアデルとアバスチンが相次いで悪性神経膠腫に対して医薬品承認された影響もあり当該治験は当初予定より遅延しているものの、安全性に問題はなく、ブラインド(ワクチン群とプラセボ群の併合)での生存期間中央値も8.0ヶ月と想定どおりの結果がみられていることから、症例集積遅延以外は順調に進捗しているものと考えている。

目標症例数は110例で計画しているが、最終的な症例数は86例になることが見込まれる。その結果をうけて検出力は80%から75%前後に低下するものの主目的は評価可能と考える。

E. 結論

申請時研究計画に沿って、症例集積遅延以外は概ね順調に経過していると自己評価している。今後はアバスチンfailure症例が増えてくることが見込まれること、また本年度に新たに2施設追加し、症例登録を加速させる。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
・該当なし
2. 学会発表
・該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況:

・該当なし

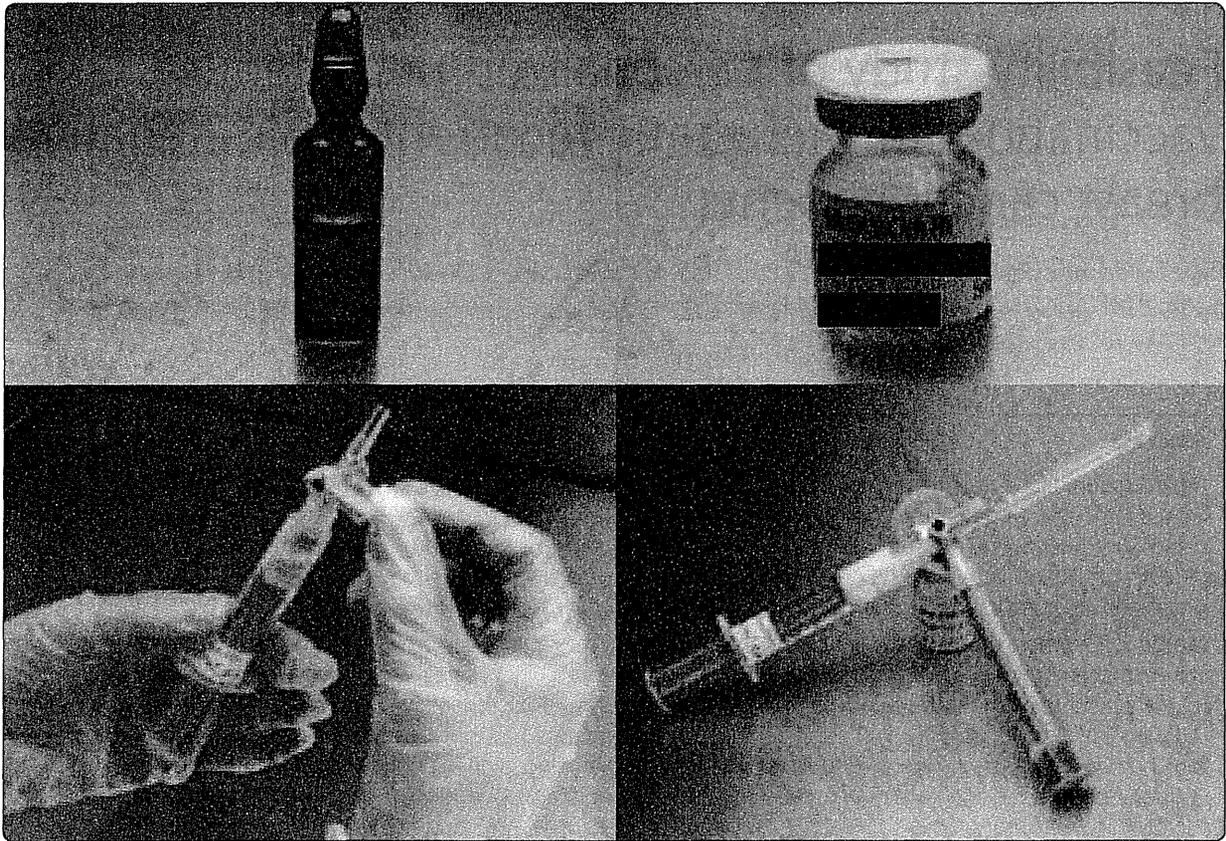
III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

学会誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌 等名）	発表した時期	国内・外の別
Feasibility study of personalized peptide vaccination for metastatic recurrent triple-negative breast cancer patients.	Takahashi R, Toh U, Iwakuma N, Takenaka M, Otsuka H, Furukawa M, Fujii T, Seki N, Kawahara A, Kage M, Matsueda S, Akagi Y, Yamada A, Itoh K, Sasada T	Breast Cancer Res. 16:R70 doi:10.1186/bcr3685	2014	国外
Feasibility study of personalized peptide vaccination for recurrent ovarian cancer patients.	Kawano K, Tsuda N, Sasada T, Watanabe N, Ushijima K, Yamashita T, Yokomine M, Itoh K, Yamada A, Kamura Y.	Immunopharmacol Immunotoxicol. 36(3) 224-236	2014	国外
Phase II Study of Personalized Peptide Vaccination for Previously Treated Advanced Colorectal Cancer.	Kibe S, Yutani S, Motoyama S, Nomura T, Tanaka N, Kawahara A, Yamaguchi T, Matsueda S, Komatsu N, Miura M, Hinai Y, Hattori S, Yamada A, Kage M, Itoh K, Akagi Y, Sasada T.	Cancer Immunology Research 2(12), 1154-62.	2014	国外
Feasibility study of personalized peptide vaccination for advanced non-small cell lung cancer patients who failed two or more treatment regimens.	Yamada T, Terasaki Y, Sakamoto S, Yoshiyama K, Matsueda S, Komatsu N, Waki K, Yamada A, Kawahara A, Kage M, Sugawara S, Yamashita Y, Sasada T, Takamori S, Itoh K.	Int. J. Oncology, 46:55-62	2015	国外
Phase II Study of Personalized Peptide Vaccination with Both a Hepatitis C Virus-Derived Peptide and Peptides from Tumor-Associated Antigens for the Treatment of HCV-Positive Advanced Hepatocellular Carcinoma Patients.	Yutani S, Ueshima K, Abe K, Ishiguro A, Eguchi J, Matsueda S, Komatsu N, Shichijo S, Yamada A, Itoh K, Sasada T, Kudo M, Noguchi M	Journal Immunol Res., in press	2015	国外
Personalized peptide vaccine for Treatment of Advanced Cancer.	Sasada T, Yamada A, Noguchi M, Itoh K.	Current Medicinal Chemistry. 21: 2332-2345.	2014	国外

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Feasibility study of personalized peptide vaccination for metastatic recurrent triple-negative breast cancer patients

Takahashi *et al.*

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Feasibility study of personalized peptide vaccination for metastatic recurrent triple-negative breast cancer patients

Ryuji Takahashi^{1*}, Uhi Toh^{1*}, Nobutaka Iwakuma¹, Miki Takenaka¹, Hiroko Otsuka¹, Mina Furukawa¹, Teruhiko Fujii², Naoko Seki², Akihiko Kawahara³, Masayoshi Kage³, Satoko Matsueda⁴, Yoshito Akagi¹, Akira Yamada², Kyogo Itoh⁴ and Tetsuro Sasada⁴

Abstract

Introduction: Since treatment modalities for metastatic recurrent triple-negative breast cancer (mrTNBC) are limited, a novel treatment approach including immunotherapy is required. We have developed a novel regimen of personalized peptide vaccination (PPV), in which vaccine antigens are individually selected from a pool of different peptide candidates based on the pre-existing host immunity. Herein we conducted a phase II study of PPV for metastatic recurrent breast cancer patients to investigate the feasibility of PPV for mrTNBC.

Methods: Seventy-nine patients with metastatic recurrent breast cancer who had metastases and had failed standard chemotherapy and/or hormonal therapy were enrolled. They were subgrouped as the mrTNBC group (n = 18), the luminal/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative group (n = 41) and the HER2-positive group (n = 18), while the remaining two patients had not been investigated. A maximum of four human leukocyte antigen (HLA)-matched peptides showing higher peptide-specific immunoglobulin G (IgG) responses in pre-vaccination plasma were selected from 31 pooled peptide candidates applicable for the four HLA-IA phenotypes (HLA-A2, -A24, or -A26 types, or HLA-A3 supertypes), and were subcutaneously administered weekly for 6 weeks and bi-weekly thereafter. Measurement of peptide-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) and IgG responses along with other laboratory analyses were conducted before and after vaccination.

Results: No severe adverse events associated with PPV were observed in any of the enrolled patients. Boosting of CTL and/or IgG responses was observed in most of the patients after vaccination, irrespective of the breast cancer subtypes. There were three complete response cases (1 mrTNBC and 2 luminal/HER2-negative types) and six partial response cases (1 mrTNBC and 5 luminal/HER2-negative types). The median progression-free survival time and median overall survival time of mrTNBC patients were 7.5 and 11.1 months, while those of luminal/HER2-negative patients were 12.2 and 26.5 months, and those of HER2-positive patients were 4.5 and 14.9 months, respectively.

Conclusions: PPV could be feasible for mrTNBC patients because of the safety, immune responses, and possible clinical benefits.

Clinical Trial Registration Number: UMIN000001844 (Registration Date: April 5, 2009)

* Correspondence: takahashi_ryuujii@med.kurume-u.ac.jp;
utoh@med.kurume-u.ac.jp

¹Department of Surgery, Kurume University School of Medicine, 67
Asahi-machi, Kurume 830-0011, Japan

Full list of author information is available at the end of the article



Introduction

Recent advances in chemotherapies, hormonal therapies and anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) therapies have significantly improved the prognosis in metastatic recurrent breast cancer patients. For example, new chemotherapies using agents such as nanoparticle albumin-bound paclitaxel (nab-PTX) [1,2], eribulin mesylate [3,4] and bevacizumab [5-7], new hormonal therapies such as fluvestran injection [8,9] or new anti-HER2 therapies such as those using pertuzumab [10,11] and trastuzumab emtansine (T-DM1) [12] have shown significant clinical benefits in metastatic recurrent breast cancer patients. Despite these novel therapeutic advances, the treatment modalities for chemotherapy-resistant triple-negative breast cancer (TNBC) remain limited, and thus a novel treatment approach including immunotherapy is required. Nevertheless, no randomized controlled trials of cancer vaccine have shown promise of clinical benefit for metastatic recurrent breast cancer patients, particularly in metastatic recurrent TNBC (mrTNBC).

We have developed a novel regimen of personalized peptide vaccination (PPV), in which vaccine antigens are selected from a pool of 31 different peptide candidates based on the pre-existing immunoglobulin G (IgG) responses specific to each peptide before vaccination [13-17]. Most of the peptides employed for PPV, except for those derived from prostate-related antigens, are known to be commonly expressed in various types of advanced cancers. Our previous clinical trials of PPV for patients with advanced cancers demonstrated the safety and feasibility of this new approach [13-17]. Here we conducted a phase II study of PPV for metastatic recurrent breast cancer to investigate the feasibility of PPV for mrTNBC.

Methods

Patients and methods

Women with a histological diagnosis of metastatic recurrent breast cancer were eligible for inclusion in the present study. All patients were required to have evaluable recurrent and/or metastatic tumors at the time of entry. Patients were divided into three different intrinsic subtypes as follows: luminal (estrogen-receptor-positive)/HER2-negative type, HER2-positive type (immunohistochemical score 3+ or HER2 gene/chromosome 17 ratio >2.2 in fluorescence *in situ* hybridization) and TNBC (hormone-receptor-negative and HER2-negative). Most patients had failed standard chemotherapy, but a few patients who had failed hormonal therapy alone were also eligible for this study. All patients were required to show positive IgG responses to at least 2 of the 31 different vaccine candidate peptides, as reported previously [13-17]. Other inclusion criteria were as follows: age between 20 and 80 years; an Eastern Cooperative Oncology

Group (ECOG) performance status of 0 or 1; positive status for human leukocyte antigen (HLA)-A2, -A24 or -A26 types, or HLA-A3 supertypes (A3, A11, A31 or A33); life expectancy of at least 12 weeks; and adequate hematologic, hepatic and renal function. Exclusion criteria included pulmonary, cardiac or other systemic diseases; an acute infection; a history of severe allergic reactions; pregnancy or nursing; and other inappropriate conditions for enrollment as judged by clinicians. Patients with a lymphocyte count of <1,000/ μ L were excluded from the study, since we previously reported that pre-vaccination lymphocytopenia (<1,000 cells/ μ L) is an unfavorable factor for overall survival (OS) in cancer patients receiving PPV [17]. The protocol was approved by the Kurume University Ethical Committee and registered in the UMIN Clinical Trials Registry (Registration, number UMIN000001844; Registration date, 5 April 2009). All patients were given a full explanation of the protocol and provided their informed consent before enrollment.

Clinical protocol

This was a phase II study to evaluate the safety and immunological responses in metastatic recurrent breast cancer patients under PPV. Thirty-one peptides, whose safety and immunological effects for other types of cancer were confirmed in previously conducted clinical studies [14-17], were employed for vaccination (12 peptides for HLA-A2, 16 peptides for HLA-A24, 9 peptides for HLA-A3 supertypes (-A3, -A11, -A31, and -A33) and 4 peptides for HLA-A26) (Additional file 1: Table S1). These peptides were prepared under the conditions of Good Manufacturing Practice (GMP) by the PolyPeptide Laboratories (San Diego, CA, USA) and American Peptide Company (Vista, CA, USA). Peptides for vaccination of individual patients were selected in consideration of the pre-existing host immunity before vaccination, as assessed by the titers of IgG specific to each of the 31 different vaccine candidates.

A maximum of four peptides (3 mg/each peptide), which were selected based on the results of HLA typing and peptide-specific IgG titers, were subcutaneously administered with incomplete Freund's adjuvant (Montanide ISA51; Seppic, Paris, France) once a week for six consecutive weeks. After the first cycle of six vaccinations, up to four antigen peptides, which were re-selected according to the titers of peptide-specific IgG at the sixth vaccination, were administered every two weeks. After the second cycle of six vaccinations, up to four antigen peptides, which were also re-selected, were administered every four to eight weeks according to the immune responses after PPV. These protocols were continued until remarkable disease progression or disease in remission was shown, according to the will of the individual patient. During the PPV, patients were allowed to receive combination therapies

such as chemotherapy, hormonal therapy, anti-HER2 therapy and radiotherapy. Adverse events were monitored according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 3.0 (NCI-CTC Ver.-3.0). Complete blood counts and serum biochemistry tests were performed after every six vaccinations. The clinical responses were determined by the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) in the vaccinated patients. The RECIST-based clinical responses were evaluated after nearly 12 vaccinations by radiological findings of computed tomography (CT) scan and/or magnetic resonance imaging (MRI), and the best overall responses during PPV treatment were shown. For the patients who did not complete the second cycle of 12 vaccinations, the newest radiological findings

were evaluated, except in the case of patients who had died before the RECIST-based radiological evaluation.

Measurement of humoral and cellular immune responses

Humoral immune responses specific to each of the 31 peptide candidates were determined by peptide-specific IgG levels using the Luminex system (Luminex, Austin, TX, USA), as previously reported [18]. If the titers of peptide-specific IgG to at least one of the vaccinated peptides in the post-vaccination plasma were more than two-fold higher than those in the pre-vaccination plasma, the changes were considered to be significant, as previously reported [14-17]. Cellular immune responses specific to the vaccinated peptides were evaluated by interferon (INF)- γ ELISPOT using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as previously

Table 1 Comparison of patient characteristics for overall and breast cancer subtypes

Character	Overall (number = 79)	mrTNBC (number = 18)	Luminal/HER2-negative (number = 41)	HER2-positive (number = 18)	P-value ^a
Median age (range)	57 (30 to 77)	55 (30 to 65)	55 (39 to 76)	62 (51 to 70)	0.019
Performance status					0.046
0/1	58/21	14/4	32/9	11/7	
Median time to the first PPV from recurrence, months (range)	35 (1.2 to 165)	8 (1.2 to 99)	40 (2 to 123)	55 (19 to 165)	0.101
Histopathology					0.079
Ductal carcinoma	71	16	37	17	
Lobular carcinoma	4	1	2	1	
Others	4	1	2		
Positive status of HLA-A24	55	10	29	14	0.039
Positive status of HLA-A2	22	6	8	8	0.015
Visceral metastasis					0.009
Yes/No	60/19	8/6	29/11	16/2	
Brain metastasis					0.002
Yes/No	11/68	3/11	2/38	6/12	
Median duration of previous chemotherapies, months (range)	12 (2 to 148)	9 (4 to 43)	12 (2 to 9)	37 (10 to 148)	<0.0001
Usage of previous standard chemotherapy					
Anthracycline	50	16	22	12	0.003
Taxane	58	16	24	17	0.0006
Trastuzumab	18		3	15	<0.0001
Regimen number of previous chemotherapies					0.008
<4/ \geq 4	36/36	8/9	22/14	6/12	
Combined therapies					
Oral chemotherapy	19	5	8	6	0.060
Infusion chemotherapy	32	10	15	7	0.038
Anti-HER2 therapy	11			11	<0.0001
Hormonal therapy	23	2	17	4	0.006
Median times of peptide vaccination	14 (2 to 39)	12 (2 to 30)	15 (4 to 39)	12 (6 to 22)	0.021

^aThe Mann-Whitney U test and Fisher-Freeman-Halton exact test were performed to examine P-values for continuous values and categorical values. HER2, human epidermal growth factor 2; HLA, human leukocyte antigens; mrTNBC, metastatic recurrent triple-negative breast cancer; PPV, personalized peptide vaccination.

Table 2 Adverse events during the PPV

Adverse event	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Injection site reaction	42	37		
Constitutional symptom				
Fever	8	1		
Malaise	7	3		
Edema limbs	2	3		
Pain	5			
Tumor pain	4	9		
Gastrointestinal				
Nausea	4			
Mucositis oral		1		
Abdominal pain			1	
Constipation	1	1		
Diarrhea	2			
Respiratory				
Dyspnea	5	1	1	
Cough	5			
Hoarseness	2			
Pneumonitis		1		
Pleural effusion	1			
Hypoxia		1	2	
Neurological				
Headache	1	1		
Dysgeusia	1			
Dizziness	2	1		
Peripheral sensory neuropathy	8	2		
Peripheral motor neuropathy	1			
Endocrine disorder				
Hypothyroidism		1		
Skin and subcutaneous				
Pruritis	33	3		
Urticaria	4	1		
Reproductive system				
Vaginal hemorrhage	2			
Vascular disorders				
Hot flashes	1			
Lymphedema		1		
Hypertension		1		
Blood/Bone marrow				
Anemia	18	9	2	2
Hemoglobin increased	1			
Leukocytopenia	22	11	4	
Neutropenia	2	6	5	1

Table 2 Adverse events during the PPV (Continued)

Lymphocytopenia	29	7	12
Thrombocytopenia	6		1
Metabolism and nutrition			
Anorexia	2		
Hyponatremia	1		
Hyperkalemia	3		
Hypocalcemia	2		
Hyperglycemia	2		
Laboratory			
AST increased	14	9	2
ALT increased	19	4	2
γ-GTP increased	7	3	2
ALP increased	6	1	1
Hyperbilirubinemia	3	1	1
Creatinine increased	10	3	1
Cholesterol high	4		
Hypoalbuminemia	46	7	
INR increased	1	1	1
APTT increased	1		

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; APTT, activated partial thromboplastin time; γ-GTP, gamma-glutamyl transpeptidase; INR, international normalized ratio; PPV, personalized peptide vaccination.

reported [14-17]. As a control, cellular immune responses specific to CEF peptides (MABTECH, Cincinnati, OH, USA), a mixture of virus-derived cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes, were also examined.

Statistical analyses

The Mann-Whitney U test and Fisher-Freeman-Halton exact test were used to examine statistical differences for continuous values and categorical values, respectively. *P*-values less than 0.05 were considered to be statistically significant. Progression-free survival (PFS) or OS was calculated from the date of the first vaccination until the date of disease progression or death, respectively, or the last date when the patient was known to be alive. The survival analysis was performed using the Kaplan-Meier method, and a comparison of the survival curves was performed with the log-rank test. Statistical tests were performed using JMP version 10 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and StatXact version 8 (Cytel Inc., Cambridge, MA, USA).

Results

Patient characteristics

Between January 2009 and April 2013, 79 metastatic recurrent breast cancer patients were enrolled in this study. The patient characteristics are shown in Table 1

for the overall patient group and each of the three subtypes. Among the 79 patients, 77 patients had been investigated to determine their intrinsic subtype before vaccination, while the remaining 2 patients had not. The HER2-positive group was associated with older median age ($P = 0.019$), restricted performance status ($P = 0.046$), higher positivity of HLA-A24 or -A2 ($P = 0.039$ or $P = 0.015$), higher frequency of visceral or brain metastasis ($P = 0.009$ or $P = 0.002$) and longer duration of previous chemotherapies ($P < 0.0001$). Although the mrTNBC group had a shorter duration of previous chemotherapies ($P < 0.0001$), most of the mrTNBC patients had received previous standard chemotherapy (anthracycline, $P = 0.003$; taxane, $P = 0.0006$).

Combined therapies and adverse events

The median number of peptide vaccinations was 14, with a range from 2 to 39 vaccinations (Table 1). Table 2 shows all adverse events during the PPV. As the vaccination-related adverse events, all patients showed grade 1 or 2 dermatological reactions to PPV at the injection sites, but no patients showed severe adverse events (grade 3 or more). Forty-one patients (52.0%) showed grade 3 or 4 adverse events strongly associated

with combined chemotherapies and disease progression (Table 2).

During the PPV, 51 patients (64.6%; 32 cases with infusion chemotherapy and 19 cases with oral chemotherapy) received combined chemotherapies, while 23 patients (29.1%) and 11 patients (13.9%) received hormonal therapies and anti-HER2 therapies, respectively (Table 1). The mrTNBC patients received combined infusion chemotherapy more frequently than other breast cancer subtypes ($P = 0.038$). The most commonly used chemotherapy drug was capecitabine (fifteen cases; 19.0%), followed by gemcitabine (eight cases; 10.1%), eribulin mesylate (six cases; 7.6%), FEC (5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide), nab-PTX or vinorelbine (four cases each; 5.1%), paclitaxel (three cases; 3.8%), bevacizumab, irinotecan or S-1 (two cases each; 2.5%), and docetaxel, oral cyclophosphamide or tegafur (one case each; 1.3%). Eleven patients (13.9%) received combined anti-HER2 therapies including trastuzumab (six cases; 7.6%) and lapatinib (five cases; 6.3%); combined anti-HER2 therapy was the most used treatment for the HER2-positive group ($P < 0.0001$). In addition, 23 patients (29.1%) received combined hormonal therapies using agents, such as aromatase inhibitor (16 cases; 20.3%), high-dose toremifene (5 cases; 6.3%) and

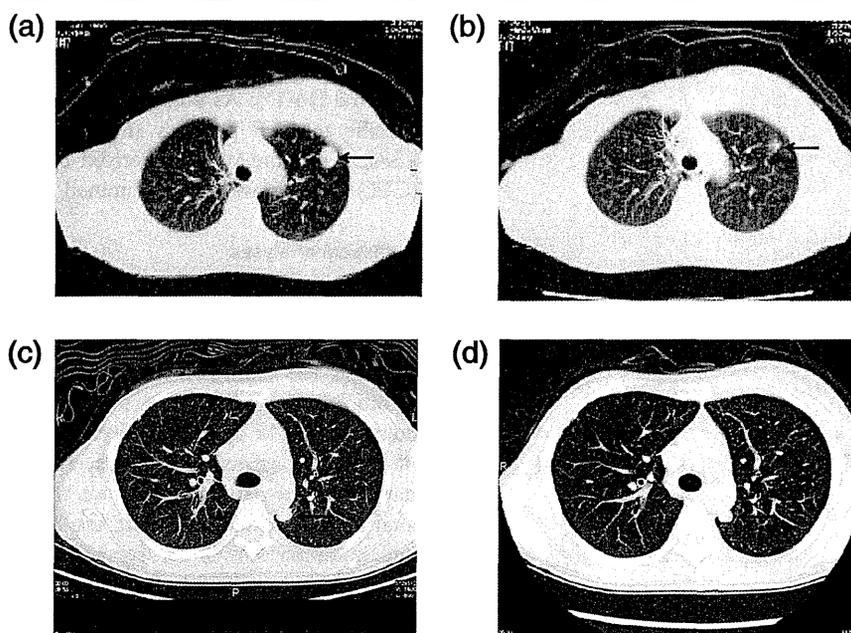


Figure 1 Clinical responses to PPV. **a, b)** Computed tomography findings of a PR case with mrTNBC (case 2 in Table S2) before and after the 12th vaccination. A 63-year-old woman with a recurrent lung mass underwent 12 vaccinations in combination with gemcitabine (1,000 mg/m²/week for three weeks followed by one week intermission). At four months after the first vaccination, the lung mass was remarkably reduced in size (arrow). **c, d)** Computed tomography findings of a SD case with mrTNBC (case 18 in Table S2) before and after the eighth vaccination. A 34-year-old woman with a recurrent lung mass underwent eight vaccinations in combination with two cycles of eribulin mesylate (1.4 mg/m²/week for two weeks followed by one week intermission). At three months after the first vaccination, the lung mass was slightly decreased in size (arrow). mrTNBC, metastatic recurrent triple negative breast cancer; PPV, personalized peptide vaccination; PR, partial response; SD, stable disease.

fluvestrant (2 cases; 2.5%); combined hormonal therapy was the most used treatment for the luminal/HER2-negative group ($P = 0.046$).

Immune responses to the vaccinated peptides

Both humoral and cellular immune responses specific to the vaccinated peptides were analyzed in blood samples before and after vaccination. Plasma samples were collected from 79, 75, or 53 patients before vaccination, at the 6th vaccination, or at the 12th vaccination, respectively. For the monitoring of humoral immune responses, peptide-specific IgGs reactive to each of the 31 different peptides, including both vaccinated and non-vaccinated peptides, were measured by bead-based multiplex assay. The numbers of peptides employed for the first cycle of vaccinations were 2, 3, or 4 in 8, 6, or 63 patients, respectively (Additional file 2: Table S2, Additional file 3: Table S3, and Additional file 4: Table S4). Augmentation of IgG responses specific to at least one of the vaccinated peptides after 6 or 12 vaccinations was observed in 53/75 (70.7%) patients or 50/53 (94.3%) patients, respectively. Peptide-specific IgG responses after 6 or 12 vaccinations were augmented in 7/15 (46.7%) patients or 9/10 (90%) patients with mrTNBC (Additional file 2: Table S2). Such augmentation was seen in 28/40 (70.0%) patients or 29/31 (93.5%)

patients in the luminal/HER2-negative group (Additional file 3: Table S3) and in 16/18 (88.9%) patients or 11/11 (100%) patients of the HER2-positive group (Additional file 4: Table S4), respectively.

Cellular immune responses to vaccinated peptides were assessed by IFN- γ ELISPOT assay. Antigen-specific CTL responses were detectable in 17/66 (25.8%) patients before vaccination (Additional file 2: Table S2, Additional file 3: Table S3 and Additional file 4: Table S4). In contrast, augmentation of the CTL responses specific to at least one of the vaccinated peptides after six vaccinations was observed in 34/63 patients (54.0%). Peptide-specific CTL responses after six vaccinations were augmented in 7/14 (50.0%) patients with mrTNBC (Additional file 2: Table S2), while such augmentation was seen in 18/31 (58.1%) patients and 7/16 (43.8%) patients in the luminal/HER2-negative group (Additional file 3: Table S3) and HER2-positive group (Additional file 4: Table S4), respectively. We also tested CTL responses to CEF peptides, a mixture of virus-derived CTL epitopes, as a control. CTL responses to CEF peptides were observed in 27/62 (43.5%) patients before vaccination and 15/58 (25.9%) patients after six vaccinations (Additional file 2: Table S2, Additional file 3: Table S3 and Additional file 4: Table S4).

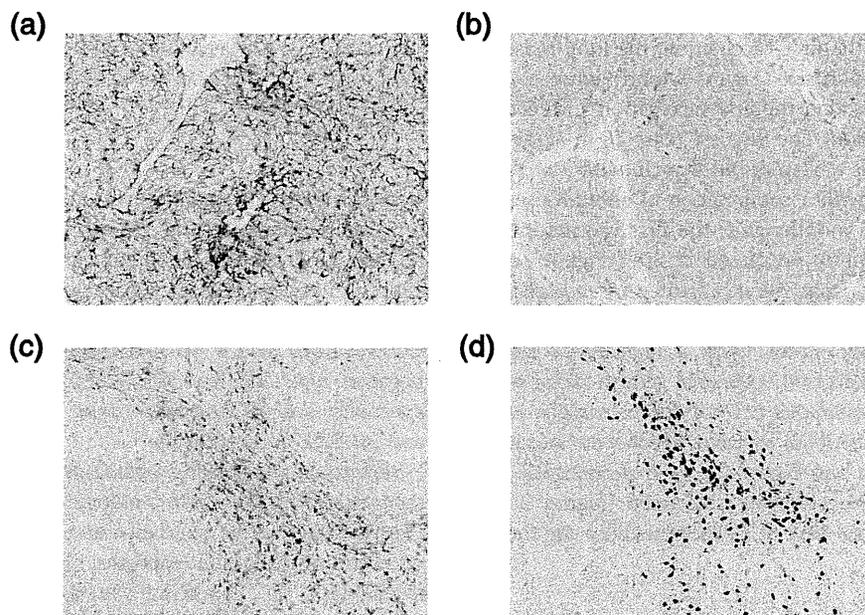


Figure 2 Expressions of TAAs and pathological responses to PPV. After completion of eight vaccinations in combination with two cycles of eribulin mesylate (1.4 mg/m²/week for two weeks followed by one week intermission), the lung metastasis of a SD case with mrTNBC (case 18 in Table S2) was resected at three months after the first vaccination. The TAA expression and T cell infiltration in the resected lung tissue were examined by immunohistochemistry. **a, b**) Among the four TAAs, that is, SART2, PSA, EGF-R and LCK, two TAAs were expressed in the lung tumor. **a**) EGF-R (X200); **b**) SART2 (X200). **c, d**) Peritumoral infiltration of T lymphocytes was confirmed in the lung tumor. **c**) CD4⁺ T lymphocytes (X200); **d**) CD8⁺ T lymphocytes (X200). EGF-R, epidermal growth factor receptor; LCK, lymphocyte specific protein tyrosine kinase; mrTNBC, metastatic recurrent triple negative breast cancer; PPV, personalized peptide vaccination; PSA, prostate specific antigen; SART2, squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 2; SD, stable disease; TAA, tumor associated antigens.

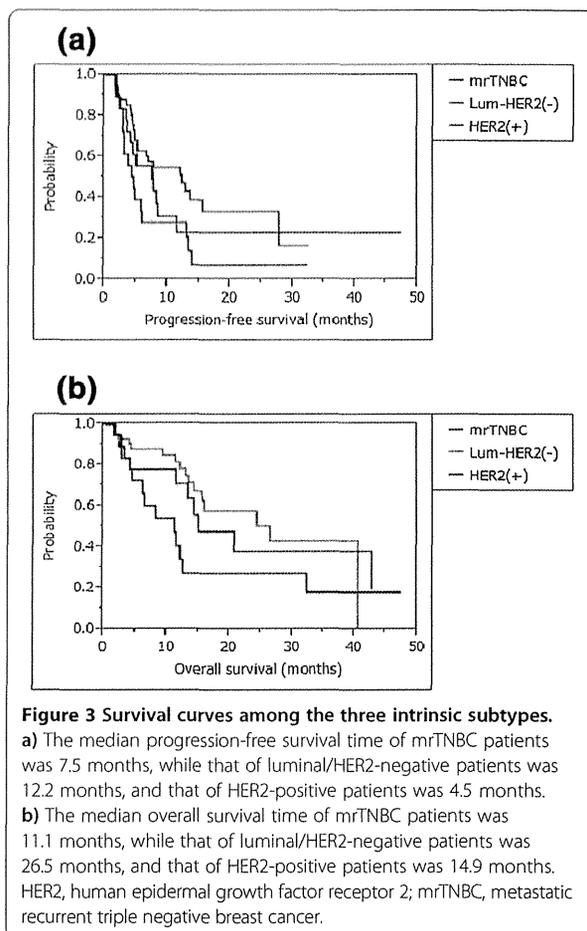
Collectively, 30/63 (47.6%) patients showed both increased CTL and IgG responses to the vaccinated peptides, 23/63 (36.5%) patients showed either increased CTL or IgG responses, and the remaining 10 (15.9%) patients showed neither CTL nor IgG boosting. In patients treated with PPV alone ($n = 27$), IgG responses were more frequently increased than those in patients treated with combined chemotherapies ($n = 47$) ($P = 0.002$), although there was no significant difference in the increase in CTL responses ($P = 1.000$).

Clinical responses to PPV

The RECIST-based clinical responses were evaluated in 64 patients by radiological findings. There were 3 complete response (CR), 6 partial response (PR), 27 stable disease (SD) and 28 progressive disease (PD). The overall response rate of PPV was 14%, including three CR and six PR cases. Among the responsive patients, combined chemotherapy was used in eight cases and hormonal therapy in one case. The intrinsic subtypes showed one mrTNBC and two luminal/HER2-negative types in the CR cases and one mrTNBC and five luminal/HER2-negative types in the PR cases. Computed tomography findings of each of the mrTNBC cases showing PR or SD are shown in Figure 1. The PR case (case 2 in Additional file 2: Table S2) was a 63-year-old woman with a recurrent lung mass treated with a combination of gemcitabine and PPV. At four months after the first vaccination, the lung mass was remarkably reduced in size (Figure 1a and Figure 1b). She survived 32 months after the first vaccination and died due to disease progression. The SD case (case 18 in Additional file 2: Table S2) was a 34-year-old woman with a recurrent lung mass treated with a combination of eribulin mesylate and PPV. At three months after the first vaccination, the lung mass was slightly decreased in size (Figure 1c and Figure 1d). She was subsequently treated by radical resection of the lung mass and pathological evaluation. The lung mass was metastatic TNBC with a high Ki-67 labeling index (42.0%). It expressed epidermal growth factor receptor (EGF-R) and squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 2 (SART2) antigens which were vaccinated antigens (Figure 2a and Figure 2b), and peritumoral infiltration of T lymphocytes was confirmed (Figure 2c and Figure 2d). She is still alive at 13 months following the first vaccination.

Survival analyses by intrinsic subtypes

Figure 3 shows survival curves for the three intrinsic subtypes. The median progression-free survival time (MPFST) and median overall survival time (MST) of mrTNBC patients were 7.5 and 11.1 months, while those of luminal/HER2-negative patients were 12.2 and 26.5 months, and those of HER2-positive patients were 4.5 and 14.9 months, respectively. For each intrinsic subtype, the survival curves



were compared for patients treated with PPV plus concurrent chemotherapies and those treated with PPV alone (Figure 4). There was no significant survival advantage of concurrent chemotherapies in each intrinsic subtype, compared with treatment with PPV alone (mrTNBC: PFS and OS, $P = 0.467$ and $P = 0.347$, respectively; luminal/HER2-negative type: PFS and OS, $P = 0.220$ and $P = 0.850$, respectively; and HER2-positive type: PFS and OS, $P = 0.296$ and $P = 0.957$, respectively).

Survival analyses along with analyses of the immune responses to PPV were also conducted in the three subtypes. Figure 5 shows the survival curves for patients with or without increased IgG responses after PPV in each intrinsic subtype. IgG boosting was a significant prognostic factor for OS and PFS in HER2-positive patients, whereas there was no significant difference between increased IgG responses and these prognoses in mrTNBC and luminal/HER2-negative patients (mrTNBC: PFS and OS, $P = 0.274$ and $P = 0.152$, respectively; luminal/HER2-negative type: PFS and OS, $P = 0.732$ and $P = 0.571$, respectively; HER2-positive type: PFS and OS, $P = 0.0001$ and $P = 0.001$, respectively). Figure 6 shows the survival curves for patients