

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、2007/08/24、60/957,923

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

本申請案主張 2007 年 8 月 24 日提出之美國預備申請案第 60/957,923 號的優先權，其內容在此全部加入作為本發明之引用文獻。

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於以抗原胜肽合併化療藥劑治療胰臟癌之新穎療法。

【先前技術】

胰臟癌具有任何惡性腫瘤的最高致死率之一，而患者的五年存活率為 4%。每年大約有 2 萬 8 千位患者被診斷為胰臟癌，且幾乎全部的患者死於其疾病 (Greenlee, R.T., *et al.*, (2001) CA Cancer J Clin, 51: 15-36)。有關這種惡性腫瘤的不足診斷起因於早期診斷的困難，並且對於現今治療方法反應不良 (Greenlee, R.T., *et al.* (2001) CA Cancer J Clin, 51: 15-36; Klinkenbijl, J.H., *et al.* (1999) Ann Surg, 230: 776-82; discussion 782-4)。尤其，目前並無確定的腫瘤標記，以便在疾病的早期、潛伏期間進行可信的篩選。

關注於解釋癌化機制的研究顯示一些可能用於發展抗腫瘤藥劑的標記分子。例如，法尼西基轉移酶抑制劑 (farnesyltransferase inhibitor) 在動物模型被發現對於 Ras 依賴型 (Ras-dependent) 腫瘤的治療有效果 (Sun J *et al.*, (1998) Oncogene, 16: 1467-73)。這個藥劑接

著被發展以抑制與 Ras 相關之生長訊號路徑，其與轉錄後法尼西基作用 (post-transcriptional farnesylation) 有關。在抗腫瘤藥劑與抗 HER2/neu 單株抗體 (曲妥珠單抗, trastuzumab) 合併應用以對抗原致癌基因 (proto-oncogene) HER2/neu 的人體臨床實驗，已經成功改善臨床反應，並增進乳癌患者之整體存活率。酪胺酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitor) STI-571 是一種抑制劑，其選擇性地去活化 bcr-abl 融合蛋白 (bcr-abl fusion protein)。這個藥劑後續被發展用於慢性骨髓性白血病 (chronic myeloid leukemia) 的療法，在慢性骨髓性白血病 bcr-abl 酪胺酸激酶的持續活化對於白血球細胞的轉型作用扮演顯著的角色。這類藥劑被設計於抑制特定基因產物的癌化活性 (Molina MA, *et al.*, (2000) *Cancer Res*, 16: 4744-9)。因此，在癌症細胞過渡表現的基因產物通常被當作新穎抗腫瘤藥劑開發的潛在標靶。例如，吉西他濱 (gemcitabine, Gemzar®) 是第一線胰臟癌的治療。吉西他濱與紫杉醇 (paclitaxel) 的合併療法亦被用於胰臟癌的治療。

同時，腫瘤血管新生 (tumor angiogenesis) 重要地與腫瘤的發生有關。先前已被展示有效對抗腫瘤血管新生的疫苗可以被開發，依據以內皮細胞為基礎的方法，標定血管內皮細胞生長因子受器 (VEGFRs) 1 與 2，如第 1 型 HLA 分子，不會在內皮細胞負調控 (Wada S *et al.*, *Cancer Res* 2005 Jun 1, 65(11): 4939-46; Ishizaki H *et al.*,

Clin Cancer Res 2006 Oct 1, 12(19): 5841-9)。引起對表現 VEGFR 細胞專一性之細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTLs)，以及因此由專一性與有效的 CTL 反應壓抑腫瘤血管新生作用的胜肽，已被揭露於先前文獻（參照 WO/2004/024766 號專利申請案，在此加入作為本發明之引用文獻）。

本發明提出本領域所需改善的胰臟癌療法，經由提供一種用於胰臟癌之新穎的合併療法，係利用抗原胜肽，尤其是抗原胜肽與以 VEGFR2 為標靶之癌症疫苗、以及化療藥劑，例如吉西他濱 (gemcitabine)。

【發明內容】

基於癌症療法領域之現況，本發明之一目的在於找到增強化療藥劑的療效之方法。VEGFR2 係強烈地表現於腫瘤組織內皮細胞，且被認為與內皮細胞基於 VEGF 訊號的增生有關。因此，本發明著重於可能的癌症疫苗療法，其係以 VEGFR2 (KDR/flk-1，以下係以 KDR 表示) 為標靶。後續發現化療藥劑，例如吉西他濱的療效，被 VEGFR2 (KDR/flk-1，以下係以 KDR 表示) 胜肽促進，其產生對抗表現 VEGFR2 細胞之細胞毒性 T 細胞。因此，本發明之一目的係提供：

[1] 一種在個體治療癌症的方法，包括對該個體施用 (i) 與 (ii) 的步驟；

(i) 一或複數個選自以下組成之群組的胜肽；

(a) 一或複數個胜肽，具有選自 RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1)、VYSSEEAEI (SEQ ID NO: 2)、GYRIYDVVL (SEQ

ID NO: 3) 、SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4) 、KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5) 、DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6) 所組成之群組的胺基酸序列；

(b) 如(a)的胜肽，其中 1、2、或數個胺基酸被取代、刪除、或增加，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性 (cytotoxic T cell inducibility) ；

(c) 如(b)的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸係為苯丙胺酸 (phenylalanine) 、酪胺酸 (tyrosine) 、甲硫胺酸 (methionine) 、或色胺酸 (tryptophan) ；

(d) 如(b)或(c)的胜肽，其中 C 端胺基酸係為苯丙胺酸 (phenylalanine) 、白胺酸 (leucine) 、異白胺酸 (isoleucine) 、色胺酸 (tryptophan) 、或甲硫胺酸 (methionine) ；

(e) 一或複數個胜肽，具有選自 AMFFWLLL (SEQ ID NO: 7) 、VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8) 、AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9) 、KLIEIGVQT (SEQ ID NO: 10) 、YMISYAGMV (SEQ ID NO: 11) 、IQSDVWSFGV (SEQ ID NO: 12) 以及 VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13) 所組成之群組的胺基酸序列；

(f) 如(e)的胜肽，其中 1、2、或數個胺基酸被取代、刪除、或增加，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性 (cytotoxic T cell inducibility) ；

(g) 如(f)的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸係為白胺酸 (leucine) 或甲硫胺酸 (methionine) ；以及

(h) 如(f)或(g)的胜肽，其中 C 端胺基酸係為

胺酸 (valine) 或白胺酸 (leucine) ；

(ii) 一或複數個化療藥劑，係選自吉西他濱 (gemcitabine)、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組。

[2] 如 [1] 的方法，其中該個體係為 HLA-A24 陽性 (HLA-A24-positive) 或 HLA-A02 陽性 (HLA-A02-positive)。

[3] 如 [1] 的方法，其中該癌症係為胰臟癌。

[4] 一種用於在個體治療癌症的套組，包括醫藥組合物，該醫藥組合物包括 (i) 與 (ii) 以分別作為活性成分與藥學上可接受的載體；

(i) 一或複數個胜肽，係選自 [1]-(i) 的 (a) 至 (h) 所組成之群組；以及

(ii) 一或複數個化療藥劑，係選自吉西他濱 (gemcitabine)、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組。

[5] 如 [4] 的套組，其中該個體係為 HLA-A24 陽性 (HLA-A24-positive) 或 HLA-A02 陽性 (HLA-A02-positive)。

[6] 如 [4] 的套組，其中該癌症係為胰臟癌。

[7] 一種用於在個體治療癌症的抗癌藥劑，包括 (i) 與 (ii) 合併；

(i) 一或複數個胜肽，係選自 [1]-(i) 的 (a) 至 (h) 所組成之群組；以及

(ii) 一或複數個化療藥劑，係選自吉西他濱 (gemcitabine)、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組。

[8] 如[7]的抗癌藥劑，其中該個體係為 HLA-A24 陽性 (HLA-A24-positive) 或 HLA-A02 陽性 (HLA-A02-positive)。

[9] 如[7]的抗癌藥劑，其中該癌症係為胰臟癌。

[10] 一種(i)與(ii)的組合於個體治療癌症的用途；

(i) 一或複數個胜肽，係選自[1]-(i)的(a)至(h)所組成之群組；以及

(ii) 一或複數個化療藥劑，係選自吉西他濱 (gemcitabine)、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組。

[11] 如[10]的用途，其中該個體係為 HLA-A24 陽性 (HLA-A24-positive) 或 HLA-A02 陽性 (HLA-A02-positive)。

[12] 如[10]的用途，其中該癌症係為胰臟癌。

[13] 一或複數個選自[1]-(i)的(a)至(h)所組成之群組的胜肽用於製造醫藥組合物，以增強吉西他濱 (gemcitabine) 之療效的用途。

[14] 如[13]的用途，其中該被增強之療效係為吉西他濱 (gemcitabine) 在個體治療癌症的療效，其中該個體係為 HLA-A24 陽性 (HLA-A24-positive) 或 HLA-A02 陽性 (HLA-A02-positive)。

[15] 如[14]的用途，其中該癌症係為胰臟癌。

需要瞭解對於那些熟悉本技術領域人士，本發明之一或複數個型態可以滿足某些目的，而一或複數個其他型態可以滿足其他的目的。就其全部觀點，每個目的可能不是平均地被應用於本發明的每個型態。例如，前述目的可用本發明任何一種型態的變化觀點檢視。本發明之這些與其他目的與特徵將更為明顯，經由下列配合圖式與實施例之詳細說明。然而，需要瞭解前述之本發明的摘要與以下的詳細說明係為較佳的實施例，並非限制本發明或其他的變化實施例。

【實施方式】

雖然方法與材料近似或相等於那些此處所述者可以被用於本發明之實施例的實施或測試，較佳的方法與材料將被說明。然而，需要瞭解本發明並非限制於此處所述之特定的分子、組合物、方法學或程序，如同這些可能對應於日常實驗與最佳化調整的變化。亦需要瞭解的是，說明書所使用之名詞僅係基於描述特定版本或實施例的目的，並非用於限制本發明之範圍，僅可由附隨的申請專利範圍所限制。

除非另有定義，此處所使用之全部技術與科學名詞具有與熟悉本發明所屬技術領域人士所通常瞭解者相同的意義。然而，發生疑義時，以本發明之說明書包括定義為準。因此，在本發明之文字範圍內，使用如下定義：

定義

此處所使用之名詞“一”、“一個”及“該”除非另有特別說明，係指“至少一個”。

在本發明之文義範圍內，用於胺基酸之增加、刪除、及/或取代的名詞“複數個”，係指3至7，較佳為3至5，更佳為3至4，再更佳為3個胺基酸殘基。

此處所使用之名詞“有機體(organism)”，係指至少一個細胞所組成之任何活的個體。活的有機體可以舉例為，例如，單一的真核細胞，或複雜如哺乳動物，例如人類。

此處所使用之名詞“生物樣本”，係指整個有機體或其組織、細胞或構成部分的次集合(subset)，例如體液，包括但不限於血液、黏液、淋巴液、關節滑液、腦髓液、唾液、羊膜液、血清羊水、尿液、陰道液、精液。名詞“生物樣本”更係指由整個有機體或其細胞、組織或構成部分的次集合、或其片段或部分所製備之均質物(homogenate)、裂解物(lysate)、萃取物、細胞培養或組織培養。最後，“生物樣本”係指培養液，例如用於培養有機體之營養液或膠體，其具有細胞成分，例如蛋白質或聚胜肽。

名詞“聚胜肽”、“胜肽”以及“蛋白質”在此係可交替使用，係指胺基酸殘基的聚合物。名詞被用於胺基酸聚合物，其中一或複數個胺基酸係為被修飾的殘基，或非自然產生的殘基，例如對應自然產生之胺基酸以及自然產

生的胺基酸聚合物之人造的化學模擬物。

名詞“聚核酸”、“寡核酸”、“核苷酸”、“核酸”以及“核酸分子”在此係可交換使用，係指核酸殘基的聚合物，除非另有所指，係相似於胺基酸對應其通常可接受的單符號密碼。類似於胺基酸，亦同時包括自然產生以及非自然產生之核酸聚合物。

此處所使用之名詞“化療藥劑(chemotherapeutic agent)”，係指用於癌症治療之化學化合物。化療藥劑的例子包括，但不限於，下列物質及其藥學上可接受的鹽類、酸類與衍生物：烷化劑(alkylating agent)，例如噻替派(thiotepa)及環磷醯胺(cyclophosphamide)；烷基磺(alkyl sulfones)，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridines)，例如苯哆帕(benzodopa)、卡巴醯(carboquone)、米促哆帕(meturedopa)、及尿哆帕(uredopa)；次乙亞胺(ethylenimines)及甲基三聚氰胺(methylamelamines)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三亞乙基密胺(triethylenemelamine)、三亞乙基磷酸醯胺(triethylenephosphoramidate)、三亞甲基硫代磷醯胺(trimethylenethiophosphoramidate)以及n0 三甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine)；氮芥(nitrogen mustards)，例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌二醇氮芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、

氮芥 (mechlorethamine)、鹽酸氮氮芥 (mechlorethamine
 oxide hydrochloride)、美法倫 (melphalan)、諾凡必
 恩 (novembiehin)、膽固醇對苯乙酸氮芥 (phenesterine)、
 潑尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、
 尿嘧啶氮芥 (uracil mustard)；硝脲 (nitrosureas)，
 例如卡莫司汀 (carmustine)；葡糖氯乙亞硝脲
 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司
 汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine)、雷莫司汀
 (ranimustine)；抗生素，例如阿克拉黴素
 (aclacinomycins)、放線菌素 (actinomycin)、奧卓黴
 素 (authramycin)、氮絲氨酸 (azaserine)、博萊黴素
 (bleomycins)、放線菌素 C (cactinomycin)、加里剎
 黴素 (calicheamicin)、卡拉比星 (carabycin)、6-
 重氮-5-氧-L-正白氨酸 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、
 阿黴素 (doxorubicin)、表阿黴素 (epirubicin)、依索
 比星 (esorubicin)、依丹比星 (idambicin)、麻西羅黴
 素 (marcellomycin)、絲裂黴素 (mitomycins)、黴酚酸
 (mycophenolic acid)、諾加黴素 (nogalamycin)、橄
 欖黴素 (olivomycins)、培洛黴素 (peplomycin)、普非
 羅黴素 (poffiromycin)、嘌呤黴素 (puromycin)、三鐵
 阿黴素 (quelamycin)、羅多比星 (rodorubicin)、鏈黑
 菌素 (streptonigrin)、鏈脲佐菌素 (streptozocin)、
 殺結核菌素 (tubercidin)、烏苯美司 (ubenimex)、淨
 司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin)；抗-代

謝物 (anti-metabolites) ， 例如 甲 氨 蝶 呤 (methotrexate) 、 以及 5-氟 尿 嘧 啶 (5-fluorouracil, 5-FU) ； 葉 酸 類 似 物 (folic acid analogues) ， 例如 氨基 二甲 葉 酸 (denopterin) 、 甲 氨 蝶 呤 (methotrexate) 、 蝶 羅 呤 (pteropterin) 、 三甲 曲 沙 (trimetrexate) ； 嘌 呤 類 似 物 (purine analogs) ， 例如 氟 達 拉 濱 (fludarabine) 、 6-巯 基 嘌 呤 (6-mercaptopurine) 、 泰 安 嘌 呤 (thiamiprine) 、 硫 烏 嘌 呤 (thioguanine) ； 嘧 啶 類 似 物 (pyrimidine analogs) ， 例如 安 西 他 濱 (ancitabine) 、 阿 扎 胞 苷 (azacitidine) 、 6-氮 雜 尿 苷 (6-azauridine) 、 卡 莫 氟 (carmofur) 、 阿 糖 胞 苷 (cytarabine) 、 二 脫 氧 尿 苷 (dideoxyuridine) 、 去 氧 氟 尿 苷 (doxifluridine) 、 依 諾 他 濱 (enocitabine) 、 氟 尿 苷 (floxuridine) 、 5-FU ； 雄 激 素 (androgens) ， 例如 卡 魯 甾 酮 (calusterone) 、 屈 他 雄 酮 丙 酸 酯 (dromostanolone propionate) 、 環 硫 雄 醇 (epitiostanol) 、 美 雄 烷 (mepitiothane) 、 甾 內 酯 (testolactone) ； 抗 腎 上 腺 素 (anti-adrenals) ， 例如 氨 魯 米 特 (aminogluthethimide) 、 米 托 坦 (mitotane) 、 曲 洛 司 坦 (trilostane) ； 葉 酸 補 充 劑 (folic acid replenisher) ， 例如 福 林 酸 (frolinic acid) ； 醋 葡 醛 內 酯 (aceglatone) ； 醛 固 酮 磷 醯 胺 糖 苷 (aldophosphamide glycoside) ； 氨基 乙 醯 丙 酸 (aminolevulinic acid) ； 安 吡 啶 (amsacrine) ； 貝 司 布 西 (bestrabucil) ； 比 生

群 (bisantrene) ; 依達曲沙 (edatraxate) ; 地福安明 (defofamine) ; 秋水仙胺 (demecolcine) 、 地吡醌 (diaziquone) ; 安福奈西 (elfornithine) ; 依利醋鉍 (elliptinium acetate) ; 依托格魯 (etoglucid) ; 硝酸鎢 (gallium nitrate) ; 羥基脲 (hydroxyurea) ; 香菇多醣 (lentinan) ; 氯尼達明 (lonidamine) ; 米托胍脲 (mitoguazone) ; 米托蒽醌 (mitoxantrone) ; 莫哌達醇 (mopidamol) ; 硝氮丙吡啶 (nitracrine) ; 噴司他丁 (pentostatin) ; 吩納美 (phenamet) ; 吡柔比星 (pirarubicin) ; 鬼臼毒素 (podophyllinic acid) ; 2-乙醯肼 (2-ethylhydrazide) ; 甲基苄肼 (procarbazine) ; PSK (PSK&commat) ; 丙亞胺 (razoxane) ; 西左法藍 (sizofrran) ; 鍺螺胺 (spirogermanium) ; 細交鏈格孢酮酸 (tenuazonic acid) ; 三亞胺醌 (triaziquone) ; 2,2',2''-三氯三乙基胺 (2,2',2''-trichlorotriethylamine) ; 烏拉坦 (urethan) ; 長春地辛 (vindesine) ; 達卡巴仁 (dacarbazine) ; 甘露醇氮芥 (mannomustine) ; 二溴甘露醇 (mitobronitol) ; 二溴衛矛醇 (mitolactol) ; 呱泊溴烷 (pipobroman) ; 鎢胞嘧啶 (gacytosine) ; 阿糖胞苷 (arabinoside, Ara-C) ; 環磷醯胺 (cyclophosphamide) ; 噻替派 (thiotepa) ; 紫杉醇類 (taxoids.) , 例如紫杉醇 (paclitaxel (TAXOLO, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)) 以及

歐洲紫杉醇 (doxetaxel (TAXOTEW, Rh6ne-Poulenc Rorer, Antony, France)) ; 苯丁酸氮芥 (chlorambucil) ; 吉西他濱 (gemcitabine) ; 6-硫鳥嘌呤 (6-thioguanine) ; 巰基嘌呤 (mercaptopurine) ; 甲氨蝶呤 (methotrexate) ; 鉑類似物 (platinum analogs) , 例如順鉑 (cisplatin) 與卡鉑 (carboplatin) ; 長春鹼 (vinblastine) ; 鉑 (platinum) ; 足葉乙甙 (etoposide, VP-16) ; 異環磷酰胺 (ifosfamide) ; 絲裂黴素 C (mitomycin C) ; 米托蒽醌 (mitocantrone) ; 長春新鹼 (vincristine) ; 長春瑞濱 (vinorelbine) ; 溫諾平 (navelbine) ; 鹽酸米托恩醌 (novantrone) ; 替尼泊甙 (teniposide) ; 道諾黴素 (daunomycine) ; 氨基蝶呤 (aminopterin) ; 截瘤達 (xeloda) ; 伊班膦酸 (ibandronate) ; CPT-11 ; 拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000 (topoisomerase inhibitor RFS 2000) ; 二氟甲基鳥氨酸 (difluoromethylornithine, DMSO) ; 維甲酸 (retinoic acid) ; 烯二炔類抗生素 (esperamicins) ; 以及卡培他濱 (capecitabine) ; 亦包括於本定義者為抗激素藥劑 (anti-hormonal agents) , 作用於對腫瘤的調節或抑制激素作用 , 例如抗雌激素 (anti-estrogens) , 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) 、雷洛昔芬 (raloxifene) 、芳香化酶抑制 4(5)-咪唑 (aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles) 、4 羥基他莫昔芬 (4 hydroxytamoxifen) 、曲沃昔芬 (trioxifene) 、雷洛昔芬鹽酸鹽 (keoxifene) 、奧那司酮 (onapristone) 、

及托瑞米芬 (toremifene (Farestone)) ; 以及抗雄激素 (anti-androgens) , 例如氟他胺 (flutamide) 、尼魯米特 (nilutamide) 、比卡魯胺 (bicalutamide) 、柳培林 (leuprolide) 、及戈舍瑞林 (goserelin) ; 以及前述任何之藥學上可接受鹽類、酸類或衍生物。

抗原胜肽 (antigenic peptides)

如先前所述, 本發明係有關於增強或改善化療療效的藥劑, 更尤其是以 VEGFR2 為標靶的抗原胜肽, 包括對抗表現 VEGFR2 之細胞的細胞毒性 T 細胞 (cytotoxic T-cells) , 以及後續增強或改善化療藥劑, 例如吉西他濱的療效。

具有 VEGFR2 次序列之抗原胜肽可被用於本發明之方法、套組或組合物。在本發明內文中, 適用的抗原胜肽較佳地具有選自以下所示的胺基酸序列。

VYSSEEAEEL (SEQ ID NO: 2) 、

GYRIYDVVL (SEQ ID NO: 3) 、

SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4) 、

RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1) 、

KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5) 、或

DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6) 。

突變或被修飾的胜肽、具有被刪除、增加、及/或取代一或複數個某些胺基酸序列之胺基酸殘基的胜肽, 已知可保持原來的生物學活性 (Mark, D.F. *et al.*, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA(1984) 81, 5662-5666, Zoller, M. J. & Smith, M., Nucleic Acids Research(1982) 10, 6487-6511, Wang, A. *et al.*, Science 224, 1431-1433, Dalbadie-McFarland, G. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1982) 79, 6409-6413)。因此，本發明考量對前述序列的變異與修飾。特別是，前述胺基酸序列之一的 1、2、或數個胺基酸被取代或增加之抗原胜肽亦發現可用於本發明，提供所產生的被修飾胜肽維持必要的細胞毒性 T 細胞誘導性 (cytotoxic T cell inducibility)。此種具有細胞毒性 T 細胞誘導性及前述 1、2、或數個胺基酸被取代或增加之胺基酸序列的被修飾胜肽，在此被考量提供與其他蛋白質的序列並不相同。

因此，在一較佳實施例，N 端的第二個胺基酸較佳被取代為苯丙胺酸 (phenylalanine)、酪胺酸 (tyrosine)、甲硫胺酸 (methionine)、或色胺酸 (tryptophan)，或 C 端胺基酸較佳被取代為苯丙胺酸 (phenylalanine)、白胺酸 (leucine)、異白胺酸 (isoleucine)、色胺酸 (tryptophan)、或甲硫胺酸 (methionine)；或 1 或 2 個胺基酸被增加於 N 端及/或 C 端。

可選擇地，具有選自下列所示胺基酸序列之九胜肽 (nonapeptide) 或十胜肽 (decapeptide) 亦較佳地為具有高度 CTL 誘導性之胜肽。

AMFFWLLLV (SEQ ID NO: 7)、

VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8)、

AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9) 、
 KLIEIGVQT (SEQ ID NO: 10) 、
 YMISYAGMV (SEQ ID NO: 11) 、
 IQSDVWSFGV (SEQ ID NO: 12) 、或
 VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13) 。

在本發明之文章內，具有細胞毒性 T 細胞誘導性之胜肽，其中 1、2、或複數個胺基酸被取代或增加至前述胺基酸序列之一者，係可以被使用。具有前述 9 或 10 個胺基酸組成之胺基酸序列的胜肽，其中 1、2、或複數個胺基酸被取代或被增加，可能具有 CTL 誘導性，儘管它們與其他蛋白質的胺基酸序列並不相同。特別是，例如，N 端的第二個胺基酸較佳地被取代為白胺酸 (leucine) 或甲硫胺酸 (methionine)，或 C 端胺基酸較佳地被取代為頤胺酸 (valine) 或白胺酸 (leucine)；或 1 或 2 個胺基酸被增加於 N 端及 / 或 C 端。

此種被修飾的胜肽例子為 VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8) 的胜肽，在其中 N 端的第二個胺基酸被取代為白胺酸 (VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13))；然而，本發明並非僅限於此例子。具有這些被修飾胜肽之刺激而得到的 CTL 選殖株可以辨識原來的胜肽，並且產生傷害。

被考量的胺基酸序列插入的範例，包括長度為 1 至數個殘基之胺基 (amino) - 及 / 或羧基 (carboxyl) - 融合，以及單一或複數個胺基酸殘基序列之間的插入。末端插入的例子包括 N 端甲硫氨醯 (methionyl) 殘基或融合至細胞

毒性聚胜肽之抗體。用於本發明之胜肽亦包括修飾，例如糖化作用（glycosylation）、側鏈氧化作用（side chain oxidation）、磷酸化作用（phosphorylation），以及此處所述不會破壞生物學活性之修飾。其他修飾作用包括酵素或聚胜肽的融合，可增加抗體對於胜肽 N 端或 C 端之血清半衰期。後者的例子包括 D-胺基酸或其他胺基酸模擬物。

在胺基酸插入的說明，其中 1 或複數個胺基酸殘基被加入本發明之胜肽，本發明亦考慮融合蛋白質。融合蛋白質通常由聚胜肽或蛋白質與已知功能的聚胜肽或蛋白質所組成。融合蛋白質可以由熟悉技藝人士已知的技術而製備，例如經由連接編碼本發明之胜肽的 DNA 以及編碼其他胜肽或蛋白質的 DNA，使其骨架（frame）符合，將融合 DNA 嵌入表現載體並於寄主內表現。對於融合至本發明之蛋白質的胜肽或蛋白質並無限制。然而，可用於融合蛋白質之習知胜肽的例子包括，但不限於，FLAG (Hopp, T.P. *et al.*, *Biotechnology*(1988) 6, 1204-1210)、具有 6 個 His (組氨酸，histidine) 殘基的 6xHis、10xHis、流感病毒凝集素 (Influenza agglutinin, HA)、人類 c-myc 片段 (human c-myc fragment)、VSP-GP 片段、p18HIV 片段、T7-標籤 (T7-tag)、HSV-標籤、E-標籤、SV40T 抗原片段、lck 標籤、 α -微管蛋白片段 (alpha-tubulin fragment)、B-標籤、蛋白質 C 片段、以及類似物。可融合於本發明之蛋白質的蛋白質例子包括谷胱甘肽-s-轉移酶 (glutathione-S-transferase, GST)、流感病毒凝集素

(Influenza agglutinin, HA)、免疫球蛋白保守區域、 β -半乳糖苷酶 (beta-galactosidase)、麥芽糖結合蛋白 (maltose-binding protein)、以及類似物。在胺基酸取代的情形，被取代的胺基酸殘基較佳地係突變為不同的胺基酸，其胺基酸側鏈的性質仍然保持（已知為保守性胺基酸取代的過程）。胺基酸側鏈性質的例子為疏水性胺基酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性胺基酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)，以及具有下列官能基或共同特性之側鏈：脂肪族 (aliphatic) 側鏈 (G, A, V, L, I, P)；具有羥基 (hydroxyl) 的側鏈 (S, T, Y)；具有硫原子的側鏈 (C, M)；具有羧酸 (carboxylic acid) 及醯胺 (amide) 的側鏈 (D, N, E, Q)；具有鹼基 (base) 的側鏈 (R, K, H)；以及具有芳香基 (aromatic) 的側鏈 (H, F, Y, W)。要注意的是，刮號內的字母係指胺基酸的單字母密碼。

本發明之抗原胜肽可用已知的技術製備。例如，胜肽可用合成地製備，利用重組 DNA 技術或化學合成。胜肽可以被獨立地合成，或由 2 或複數個胜肽組成較長的聚胜肽。這些胜肽較佳地被分離，亦即，實質地除去其他自然產生的寄主細胞蛋白質及其片段。

本發明之抗原胜肽可以被混合提供或可以利用標準技術互相接合。例如，胜肽可以被表現為單一的聚胜肽序列。組合的胜肽可為相同或不同。經由使用本發明之胜肽，胜肽被抗原表現細胞的 HLA 抗原以高濃度表現，依序誘導

CTL，特別地對被展示的胜肽及 HLA 抗原之間形成的複合體反應。可選擇地，表面具有被固定的本發明之胜肽的抗原表現細胞，從個體移除突觸細胞（dendritic cells）而被獲得，可以被本發明之胜肽刺激。這些細胞對分別個體的重新給藥誘導 CTL，而其結果為對標的細胞之凝集反應被增加。

醫藥組合物及其使用方法

本發明提供用於治療及/或預防胰臟癌之藥品，與化療藥劑例如吉西他濱合併使用。用於本發明之胜肽在胰臟癌的治療發現特殊用途。

以本發明之胜肽對突觸細胞的活體內與活體外刺激可以輕易地進行，經由暴露細胞於高濃度胜肽，其造成這些胜肽替代原先固定於細胞表面的胜肽。因此，為了用於本發明，抗原胜肽必須至少具有某些程度對 HLA 抗原的親合性。

具有此類胜肽的藥品可以直接地以胜肽本身使用，或可被以傳統配製方法所配方之醫藥組合物使用。在此情形，藥品除了胜肽可以適當地包括，載體、賦型劑、以及通常可用於藥品的類似物，而無特殊限制。藥品可與吉西他濱合併被用於胰臟癌的治療與預防。

用於治療及/或預防胰臟癌之藥品包括本發明之抗原胜肽作為活性成分，可與佐劑一同給藥，能有效地誘導細胞的免疫性，並可以粒劑形式給藥。適合的佐劑係如文獻

所述 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994)。此外，本發明之藥品可用微脂體配方、結合於幾微米直徑珠體之粒劑配方、以及與脂肪接合之配方給藥。

給藥方法可以被進行，例如，口服地、腹腔地、或皮下地、或經過靜脈注射，或類似方法。系統性給藥或局部性給藥對於標的腫瘤附近或直接對於標的腫瘤給藥可以被應用。本發明之胜肽的劑量可以適當地被調整，依據所欲治療之疾病、患者的年齡與體重、給藥方式、以及類似條件。通常，0.001 毫克 (mg) 至 1,000 毫克，較佳為 0.001 毫克至 1,000 毫克，更佳為 0.1 毫克至 10 毫克的胜肽被較佳地在幾天至幾個月給藥一次。更特別地，為了增強吉西他濱的療效，於一較佳實施例，0.5 毫克至 2.0 毫克的胜肽被較佳地在幾天至幾個月給藥一次被，更佳地為一週 (7 天)，與吉西他濱合併給藥。熟悉技藝人士可以適當地選擇合適的劑量。

可選擇地，本發明之文章中，表現本發明之胜肽與表面 HLA 抗原之間複合體的細胞內載具可被用於本發明之目的。這些細胞內載具被稱為外吐小體 (exosomes)。外吐小體可以被製被，例如，依據特別被描述於公開之國際申請案的日本翻譯第 Hei 11-510507 與 2000-512161 號的方法。外吐小體可以較佳地被製備，利用從所欲治療或預防之個體獲得的抗原表現細胞。本發明之外吐小體可以被當作癌症疫苗接種，如本發明之胜肽一樣。

所使用之 HLA 抗原類型必須符合需要治療及/或預防

之個體。例如，對日本人而言，HLA-A24 或 HLA-A02，特別是 HLA-A2402 或 HLA-0201，通常較適當。

類似地，在本發明之文章中，由胜肽誘導產生之分離的細胞毒性 T 細胞亦可被用於本發明之目的。細胞毒性 T 細胞，其係被表現本發明之胜肽的抗原表現細胞所刺激而誘導，較佳地係來自治療及/或預防之標的個體。細胞毒性 T 細胞可以被單獨給藥，或，基於抗腫瘤效果之目的，與其他藥物合併給藥，包括本發明之胜肽、外吐小體等等。所得到的細胞毒性 T 細胞特別地針對表現本發明之胜肽的目標細胞反應，或較佳地，針對表現用於培養之相同胜肽的目標細胞。目標細胞可以為內在地表現 KDR 的細胞，或是被強迫表現 KDR 的細胞。此外，因為被胜肽刺激而在細胞表面表現本發明之胜肽的細胞亦可以是標的。

在本發明之內文中，表現 HLA 抗原與胜肽之間形成的複合體之抗原表現細胞亦可以被用於本發明之目的。經由與胜肽或編碼胜肽之核苷酸接觸而得到的抗原表現細胞，較佳地係來自作為治療及/或預防之目標的個體。抗原表現細胞可以單獨被當作疫苗給藥，或與其他藥物合併給藥，例如本發明之胜肽、外吐小體、以及細胞毒性 T 細胞。

在本發明之內容中，胜肽較佳地係被與吉西他濱合併給藥。吉西他濱 (gemcitabine) 係為對化合物 2'-去氧-2',2'-二氟胞苷單氯酸鹽 (β -異構物) (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride(β -isomer)) 的通稱。吉西他濱氯酸

鹽（吉西他濱氫酸）組成之醫藥組合物通常係可以品牌名稱 Gemzar 商業購得。在本發明之文章中，至少吉西他濱、吉西他濱之藥學上可接受的鹽類、或其前驅藥物的其中之一，可被與前述之胜肽合併給藥。因此，除非另有說明，此處所指的吉西他濱包括其鹽類與前驅藥物。

吉西他濱是一種化療藥劑，其已被臨床使用為多種癌症包括胰臟癌之治療藥劑。對成人給予吉西他濱以治療胰臟癌之標準治療程序，需要每週給藥 1000 毫克/公尺²的吉西他濱至七週。吉西他濱典型地係經由靜脈注射給藥。在胰臟癌的治療，通常，給藥三週接著停藥一週的進度被設定為一個療程，且視需要繼續治療並重複。在此期間，吉西他濱的劑量可以被調整，透過血液毒性或類似的指標。在本發明中，胜肽依此吉西他濱之給藥進度給予。本發明之抗原胜肽可以在吉西他濱給藥期間的任何階段給藥。可選擇地，只要由本發明之抗原胜肽誘導的 CTL 在體內維持其活性，這類胜肽可以在吉西他濱給藥之前被給予。通常，與吉西他濱給藥相同的進度給藥是合理的，因而保持花費患者最少的時間。

如此處所揭露者，具有胺基酸序列，例如 RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1) 之 VEGFR2 衍生胜肽的給藥可以改善吉西他濱的療效。可用於本發明之內文的範例 VEGFR2 衍生胜肽之胺基酸序列係如下列再次說明。在本發明之文章中，這些胺基酸序列被修飾的或突變的版本亦可被用於本發明，只要其仍維持預期的 CTL 誘導能力。

VYSSEEAEL (SEQ ID NO: 2) 、
 GYRIYDVVL (SEQ ID NO: 3) 、
 SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4) 、
 RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1) 、
 KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5) 、
 DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6) 、
 AMFFWLLLV (SEQ ID NO: 7) 、
 VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8) 、
 AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9) 、
 KLIEIGVQT (SEQ ID NO: 10) 、
 YMISYAGMV (SEQ ID NO: 11) 、
 IQSDVWSFGV (SEQ ID NO: 12) 、 或
 VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13) 。

因此，本發明提供可以增強吉西他濱的胰臟癌療效之藥劑，這類藥劑包括前述 VEGFR2 衍生胜肽作為活性成分。可選擇地，本發明提供 VEGFR2 衍生胜肽增強吉西他濱對胰臟癌療效之醫藥組合物製造的用途。此外，本發明提供 VEGFR2 衍生胜肽在胰臟癌治療使用吉西他濱期間的合併使用（組合）。

依據本發明，VEGFR2 衍生胜肽可被與吉西他濱合併用於胰臟癌治療。更特別地，本發明提供一種套組用於治療胰臟癌，其係由醫藥組合物組成，包括藥學上可接受的載體、前述 VEGFR2 衍生胜肽、以及吉西他濱作為活性成分。此外，本發明提供用於胰臟癌之抗癌藥劑，其包括前述

VEGFR2 衍生胜肽與吉西他濱的組合。可選擇地，本發明提供一種用於治療胰臟癌之套組，其包括前述 VEGFR2 衍生胜肽以及陳述當胜肽與吉西他濱合併對胰臟癌病患使用時，吉西他濱的療效被增強的指示單。

在另一實施例中，本發明亦提供一種 VEGFR2 衍生胜肽與一或多種化療藥劑合併使用之用途，這些化療藥劑係選自吉西他濱、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組，以製備為治療包括胰臟癌等癌症之醫藥組合物。可選擇地，在另一實施例中，本發明提供一種 VEGFR2 衍生胜肽的用途，以製造用於治療包括胰臟癌等癌症之醫藥組合物，其中該醫藥組合物被用於與一或多種化療藥劑合併使用，這些化療藥劑係選自吉西他濱、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組。在另一實施例，本發明更提供一種 VEGFR2 衍生胜肽的用途，以製造用於增強一或多種化療藥劑治療包括胰臟癌之癌症療效的醫藥組合物，這些化療藥劑係選自吉西他濱、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組。

在其他實施例中，本發明更提供一種方法或程序，用於製造增強一或多種化療藥劑治療包括胰臟癌之癌症療效的醫藥組合物，這些化療藥劑係選自吉西他濱、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組，其中該方法或程序包括配製藥學上或生理學上可接受載體與 VEGFR2 衍生胜肽作為活性成分的步驟。在另一實施例，本發明更提供一種方法或程序，用於製造增強一或多種化療藥劑治

療包括胰臟癌之癌症療效的醫藥組合物，這些化療藥劑係選自吉西他濱、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組，其中該方法或程序包括混合 VEGFR2 衍生胜肽以及藥學上或生理學上可接受載體的步驟。

在另一實施例，本發明亦提供一種方法或程序，以製造用於治療包括胰臟癌之癌症的套組，其中該方法或程序包括組合或包裝包括 VEGFR2 衍生胜肽與藥學上或生理學上可接受載體，共同加上一或多種化療藥劑之醫藥組合物的步驟，這些化療藥劑係選自吉西他濱、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組。可選擇地，於另一實施例，本發明亦提供一種 VEGFR2 衍生胜肽與選自吉西他濱、其藥學上可接受的鹽類、及其前驅藥物所組成之群組的化療藥劑的組合，以製造用於治療包括胰臟癌等癌症之套組的用途。

在前述本發明之實施例中，所欲治療癌症之個體可能為 HLA-A24 陽性 (HLA-A24-positive) 或 HLA-A02 陽性 (HLA-A02-positive)。所欲治療的癌症包括胰臟癌。

實施例

在此之後，本發明將參照實施例詳細說明，更特別地參照臨床試驗，以分析用於無法切除的晚期復發性 (unresectable advanced recurrent) 胰臟癌的治療，以新腫瘤血管為標靶之抗原決定位胜肽與吉西他濱合併的利用。然而，材料、方法以及此處類似的說明，僅為例示本

發明之型態，並非用以限制本發明之範圍。因此，材料、方法以及這些相似或同等於此處所述者，可用於實施或測試本發明。

簡介

此處所述者係為用於無法切除的晚期復發性胰臟癌患者之新穎疫苗化療方法的臨床試驗，在其中血管內皮生長因子受體 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, VEGFR2/KDR) 衍生之抗原決定位胜肽被與弗氏不完全佐劑 (Incomplete Freund's Adjuvant, IFA) 混合，隨後以經皮方式對患者給藥。胜肽疫苗被預期對腫瘤產生效果，經由對腫瘤新生血管作用的抑制。此處的胜肽疫苗係與吉西他濱合併使用，後者為目前胰臟癌化療的標準。本臨床實驗想評估新穎疫苗化療的安全性，其針對抑制新腫瘤血管與經由化療產生抗腫瘤效果，藉由進行所給藥之抗原決定位胜肽每三位患者為一組的劑量評估。第二個目的在於評估反應速率、存活時間、以及免疫反應。

對於治療胰臟癌，外科手術切除是必需的；然而，早期偵測很困難，而且在診斷時，大約有 60% 的患者是無法切除的情形 (Matsuno S *et al.*, Int J Clin Oncol. 5:153-157, 2000., Pantalone D *et al.*, 18:41-46, 2001.)。目前，吉西他濱被用於無法切除之胰臟癌的標準療法；然而，儘管半數存活期與一年存活率相較於僅給予 5-FU 的組別有改善，仍分別僅有 5.7 個月以及 18%，不能

說是令人滿意的。此外，反應速率由 5.4% 至 14.3%，並不高 (Burris HA *et al.* J. Clin Oncol. 15:2403-2413, 1997., Casper ES *et al.* Ann Oncol. 7:347-53, 1996.)，仍需要檢驗新穎的治療方法，經由與吉西他濱合併使用，可能改善反應速率以及存活期間。

另一方面，近年來 T 細胞辨識抗原的機制已被說明，另外，蛋白質被 CTL 辨識作為腫瘤抗原已被發現，以及關於使用腫瘤抗原或抗原基因的治療方法已開始調查。利用這個特定腫瘤排斥抗原胜肽的免疫療法迅速地被採用於惡性黑色素瘤 (malignant melanoma)，其結果主要由 Rosenberg 等人自 1998 年以來的報導 (Celis E *et al.* Cancer Biology 6:329-336, 1995., Marchard M, *et al.* Int. J. Cancer 63:883-885, 1995.)。此後，與 IL-2 或 GM-CSF 的結合使用、給予複數個腫瘤排斥抗原胜肽之流程的發展、被修飾胜肽的發展、與胜肽加上突觸細胞之臨床試驗的進行、以及利用腫瘤排斥抗原胜肽的抗腫瘤免疫療法，已經受到注目，目前作為補充傳統治療方法，例如外科手術與化療，的治療方法。

被細胞毒性 T 細胞 (CTL) 所辨識與攻擊的腫瘤抗原已被發現，之後，腫瘤特異性抗原陸續被鑑定，而使用抗原決定位胜肽之癌症疫苗療法的臨床實驗已在進行，係為一種以這些抗原為標靶之專一性免疫療法。然而，新的問題也顯現。即使有效的 CTL 可以被誘導，腫瘤細胞之 MHC 分子的被降低或消失，腫瘤細胞缺乏標的分子，如此可能造

成 CTL 抗腫瘤效果的損失。此外，至今被鑑定的腫瘤抗原胜肽係表現於某些類型的腫瘤，但並未包括全部的腫瘤。所以，為了克服這些問題，疫苗療法中 CTL 的目標細胞被設定為腫瘤新生血管內皮細胞，而非腫瘤細胞本身，且以新腫瘤血管相關分子為目標之疫苗療法被制訂。作為標的分子，注意力係集中在血管內皮生長因子受體 2 (VEGFR2/KDR)，其在正常內皮細胞幾乎不會被表現，但在腫瘤新生血管內皮細胞被大量表現，且血管內皮細胞生長因子受體為這些細胞生長所必需的。

VEGFR2 已知表現於許多實體腫瘤的腫瘤組織內，例如乳癌、直腸癌、腎臟癌、惡性黑色素瘤以及肺癌 (Folkman J. *Nature Biotechnol.* 15, 510, 1997., Folkman J. *EXS* 79, 1-8, 1997.)。VEGFR2 的表現係被顯示與癌症細胞的增生有強烈的關係 (Kranz A, *et al.* *Int J Cancer* 84:293-298, 1999., Nakopoulou L, *et al.* *Hum Pathol* 33:863-870, 2002., Reden L, *et al.* *Breast Cancer Res. & Treat.* 82:147-154, 2003.)。

另一方面，無論如何 VEGFR2 可能成為免疫療法的目標，基於對於接種 VEGFR2 蛋白質與 DNA 之基礎研究，顯示抗腫瘤效果可被辨識，經由對於不論腫瘤類型之新腫瘤血管的抑制，因此，確認 VEGFR2 專一性細胞毒性 T 細胞係有關於此抗腫瘤效果。以上顯示 VEGFR2 可能成為腫瘤免疫療法的目標 (Yiwen, Li. *et al.* *J. Exp. Med.* 195, 1575-1584, 2002. Niethammer, A.G. *et al.* *Nature Med.* 8, 1369-1375,

2002.)。此外，如我們在人體的基礎分析結果，辨識並破壞 VEGFR2 之 CTL 選植株的出現已被證實，且數種能誘導有效 CTL 之 HLA-A24 或 A02 限制的抗原決定位胜肽已被鑑定。由這些抗原決定位胜肽誘導的 CTL 破壞培養的人類臍帶內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)，其原生地以 HLA 限制 (HLA-restricted) 的型態表現 VEGFR2。更進一步，使用表現 HLA 之 A2/Kb 基因轉殖小鼠在體內抗腫瘤效果的試驗中，不論癌症類型之強力的抗腫瘤效果已被證實，經由使用 VEGFR2 衍生抗原決定位胜肽之癌症疫苗療法。既然癌症患者周邊血液 CTL 的亦可被本臨床實驗之胜肽所誘導，CTL 前驅細胞被發現亦存在於癌症患者 (Wada S, Cancer Res. 65, 4939-4946, 2005.)。根據以上所述，藉由對患者施用本發明之胜肽與誘導 VEGFR2-專一性 CTL，腫瘤新血管生成作用可以被抑制，且有效的抗腫瘤效果可以被得到。

因此，一種新的疫苗化療法被建議，在其中胜肽疫苗被預期顯示抗腫瘤效果，透過腫瘤新血管生成的抑制作用，被與吉西他濱合併使用，吉西他濱係為目前對抗胰臟癌的標準化療。源自 VEGFR2 且為 HLA-A24 或 A02 限制的抗原決定位胜肽之 RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1)、VYSSEEAEI (SEQ ID NO: 2)、GYRIYDVVL (SEQ ID NO: 3)、SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4)、KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5)、DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6)、AMFFWLLL (SEQ ID NO: 7)、VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8)、AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9)、KLIEIGVQT

(SEQ ID NO: 10)、YMISYAGMV(SEQ ID NO: 11)、IQSDVWSFGV(SEQ ID NO: 12)、或 VLAMFFWLL(SEQ ID NO: 13) [Wada S, Cancer Res. 65, 4939-4946, 2005., 專利申請案 W02004/024766 號], 被用於合併使用的疫苗配方。

基本原理的摘要係如下所述：

1. VEGFR2 為一種與腫瘤新血管內皮細胞的生長有關之重要分子，而這個分子可被用於在體外誘導專一性的 CTL (Wada S, Cancer Res. 65, 4939-4946, 2005., 專利申請案 W02004/024766 號)。

2. 專一性 CTL 亦可以被體外誘導，經由利用 VEGFR2 衍生之 HLA-A24 或 HLA-A02 限制的抗原決定位胜肽的癌症患者周邊血液單核細胞 (Wada S, Cancer Res. 65, 4939-4946, 2005.)。

3. 大部分日本人帶有 HLA-A24 或 HLA-A02 (Date Y, et al. Tissue Antigen, 47, 93-101, 1996.)。

4. 這些係為生物化學上穩定的，且適合用於臨床實驗 (Wada S, Cancer Res. 65, 4939-4946, 2005.)。

5. 吉西他濱已被證實作為對抗胰臟癌之化療藥劑。

6. 吉西他濱已知可增強免疫活性 (immunocompetence)，例如 CTL 誘導性 (Correale P, et al. J Immunol. 175, 820-828, 2005., Dauer M, et al. J Immunother. 28, 332-342, 2005.)，與疫苗配方合併使用的效果可以被期待。

本臨床實驗係基於上述基本原理而被進行。

材料與方法

實驗對象 (Subject) :

受試患者被篩選，依據下列選擇條件與排除條件。

選擇條件 (Selection Criteria) :

1. 原發性胰臟癌，其被判斷無法進行根治性切除 (radical resection)，因為，不同的診斷，例如 CT 或超音波檢驗得知的遠處轉移，如肝臟轉移、腹腔轉移、以及骨頭轉移；如日本胰臟學會編輯的第五版胰臟癌分類所定義之末端淋巴結轉移；或浸潤至大血管（腹部主動脈、肝固有動脈、左右肝動脈、腸繫膜上動脈、以及腸繫膜上靜脈，其無法重建）；或復發性胰臟癌。
2. 儘管可由 RECIST 測量創傷的存在或缺乏，但並非目的，在腫瘤的臨床效果之評估必須為可行。
3. ECOG 表現程度為 0 至 2。
4. 得到同意受試者的年紀為 20 歲或以上以及 80 歲或以下。
5. 在吉西他濱與疫苗療法開始之時，預定之生命預後 (expected life prognosis) 必須為 3 個月或更久。
6. 若患者接受某些手術，該患者應該從手術影響康復。可選擇地，自前次治療後，必須經過四周或更久。
7. 主要器官的功能必須被維持：骨髓功能（白血球計

數為 2000/公釐³以上以及 15000/公釐³以下，血小板計數為 7.5/公釐³以上)；肝功能(GOT 為 150 IU/L 以下，GPT 為 150 IU/L 以下，以及 T-bil 為 3.0 公克/公合(dL)以下)；以及腎功能(Cr 為 3.0 以下)。

8. 適當之 HLA 的存在。

9. 沒有使用吉西他濱對抗原發性疾病的歷史。

排除條件 (Exclusion Criteria)：

1. 懷孕的婦女 (可能懷孕的婦女在此臨床研究開始後進行避孕措施)。
2. 哺乳 (nursing) 的婦女 (哺乳在本臨床研究開始後暫停)。
3. 傾向懷孕的婦女 (在試驗期間，男女雙方都要進行適當的避孕措施)。
4. 具有難以控制之活動性感染 (active infection) 的患者。
5. 受試期間需要服用下列藥劑的患者：腎上腺類固醇藥劑的系統性給藥；或免疫抑制劑的系統性給藥。
6. 具有無法控制之雙重癌症的患者。
7. 具有尚未治癒之創傷的患者。
8. 容易得到腸道麻痺或間質性肺炎的患者。
9. 由醫生或主治醫師決定不適合的患者。

治療計畫 (Treatment Plan)：

目標癌症患者的選擇：

目標患者係為那些帶有合適 HLA 與具有被判斷為不可能根治切除之原發性胰臟癌或具有復發性胰臟癌者。經影像診斷認為有高度嫌疑的案例亦被包括於目標患者中。

檢驗 HLA 表現之方法：

外部檢驗係委託 SRL 公司（東京）。

吉西他濱的劑量：

1000 毫克/公尺²的吉西他濱（鹽酸吉西他濱），係為安全劑量標準且經過保險範圍許可給藥，被給藥三週，接著停藥一週。

施用胜肽與佐劑之劑量與方法：

0.5 毫克、1 毫克、以及 2 毫克的合成胜肽被分別與 0.5 毫升、1 毫升、及 2 毫升的弗氏不完全佐劑（MONTANIDE*ISA51VG, SEPPIC, France）混合，並在患者的腋下或腹股溝區域附近經皮下給藥。

給藥進度：

進度係如第 1 圖所示。一個療程被設定為起始給藥開始的 28 天。

劑量增加方法與三位患者群組：

吉西他濱的劑量與給藥（1000 毫克/公尺²，給藥三週，停藥一週）是被固定的，疫苗給藥劑量是以 0.5 毫克、1 毫克、以及 2 毫克逐漸增加的。特別地，0.5 毫克的胜肽被給藥予三個患者。如果沒有單一個體顯示無法否認地相關第四級血液毒性（Grade 4, NCI-CTC version 3.0）或

更高（除了噁心／嘔吐），或第三級血液毒性（Grade 3, NCI-CTC version 3.0）或更高，該胜肽以下一個劑量（1 毫克）對三個患者給藥。如果副作用表現於二或更多個體，這個臨床實驗將不會繼續。如果副作用表現於一個個體，另外三位患者將以相同劑量加入，而若副作用係表現於六個案例之中的一個，試驗將進行至下一個劑量。如果此階段副作用僅在一個體被觀察到，本實驗仍不會繼續。由 1 毫克至 2 毫克的劑量增加以同樣方式進行。

品質控制

關於所使用的胜肽，cGMP 等級胜肽（Neo-MPS, San Diego）是由東京大學人類基因組中心（Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo）所贈送。關於佐劑，GMP 等級相容之弗氏不完全佐劑（MONTANIDE*ISA51VG）係從法商 SEPPIC 公司購得。胜肽的儲存與胜肽疫苗的製備則在 Wakayama 醫學大學醫院的藥學部進行。

關於“初步試驗給藥（preliminary test administration）”

為了避免意料之外的負面事件例如過敏性休克之目的，10 微克（ μg ）胜肽被皮下給藥以作為初步試驗給藥，在第一次疫苗給藥之前於真正給藥位置之外的其他位置給藥，並監視 30 分鐘。如果等級三或更高的局部反應或系統性負面事件沒有被觀察到，將可進行真正的給藥。關於“初步試驗給藥”，局部負面事件與系統性負面事件在任何案

例之中沒有被觀察到。

結果

實驗數據的評估：

安全性評估：

安全性評估的對象為接受吉西他濱與胜肽至少一種給藥的患者。負面事件的存在與程度被決定，經由參照第三版的 NCI-CTC (National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria, JCOG 日文翻譯版)。

免疫學的評估：

疫苗給藥之前，在每個過程完成後（起始給藥之後第 28 天），50 毫升周邊血液被收集，且周邊血液單核細胞（PBMC）被分離與測量，經由 Ficoll-paque 密度離心。

CTL 反應的分析：

由被給藥之胜肽所導致的 CTL 反應係利用 IFN- γ ELISPOT 試驗（ELISPOT Human IFN-gamma set, BD）測量。更特別地，刺激物經由脈衝 VEGFR2-169（SEQ ID NO: 1）與 HIV-A24 胜肽進入 A24-LCL（HLA-A*2402-陽性）而被製備，而 HIV 胜肽被當作陰性對照組。試驗同時在三個反應井（well）以每一個 R/S 比例與刺激物進行，而平均值以每一個井中點的數量之形式而被計算。點的數目在 ELISPOT 讀取儀（IMMUNO SPOT, Cellular Technology Ltd.）上被讀取。經由 HIV 脈衝之點數與來自 VEGFR3-169 脈衝之點數相減所得到的數值，被當作對應於 VEGFR2-169 的專一性

INF- γ 產物點（專一的點 (Specific Spots)）。在一個療程後與二個療程後，如果專一性 INF- γ 產物點的增加被觀察到，被認為有疫苗給藥引起的免疫反應。

CD8-陽性 T 細胞的族群分析（第 2 圖）：

不論 CD8-陽性 T 細胞之原生 (naïve)、記憶 (memory)、作用記憶 (effector memory)、以及作用 (effector) T 細胞區段 (fraction) 的每一個部分是否有改變，經由流式細胞儀 (FACS Calibur, BD) 以四色染色分析。如第 2 圖所示，PBMC 的淋巴細胞區段被限制 (gated)，以及 CD8-陽性區段被限制。CD8-陽性區段進一步被發展，利用 CD27 (BD) 與 CD45RA (SD)，以得到作用區段 (CD27-陰性 / CD45RA-陽性)、作用記憶區段 (CD27-陰性 / CD45RA-陰性)、記憶區段 (CD27-陽性 / CD45RA-陰性)、以及原生區段 (CD27-陽性 / CD45RA-陽性)。同時，功能性淋巴細胞區段經由穿孔素 (perforin) 染色而被決定 (Cytotfix/Cytoperm kit, BD)。

調節 T 細胞的分析（第 3 圖）：

CD4-陽性 T 細胞之 CD25 高表現 (CD25^{high}) 與 Foxp3-陽性細胞被認為是調節 T 細胞 (regulatory T cells)，而其接受疫苗前後之數量變化，於四色染色後，被以流式細胞儀 (FACS Calibur, BD) 測量。更特別地，如第 3 圖所示，PBMC 的淋巴細胞區段被限制，而在利用 CD4 與 CD25 發展後，CD4-陽性 T 細胞之 CD25 高表現與 Foxp3-陽性細胞 (Human Regulatory Staining Kit, eBioscience) 的

部分被計算。

臨床療效評估

細胞減滅效果 (Cytoreductive Effects)

完成至少一個本實驗所定義之療程的患者被選為目標。對於可由影像決定之腫瘤，臨床效果被評估，在每個療程最後一次接種後，主要依據日文翻譯版的“在固體腫瘤評估療效的新指引 (New Guidelines to Evaluate the Effect of Treatment in Solid Tumors (RECIST guideline Version 2) Japanese Translation, JCG Edition)”。即使在臨床評估時不足四周期間的案例，仍被註記為目標反應，且其臨床特性被評估作為參考數據。CT 與 PET 被用於抗腫瘤效果評估。

存活時間 (Survival Time) :

長期追蹤觀察被進行，以及存活時間與存活率被調查。

患者結果 (Patient Results) :

每階段有三人參加，而安全性評估成為可能的。七月三十一日的案例係摘要於表 1 (如下所示)。

案例 1 (階段 I/0.5 毫克)

案例 1 是六十八歲女性，先前被以 TS-1 進行化療，變得沒有反應，之後加入即時試驗。進行二個療程，但系統性不良事件沒出現，而接種位置的局部性不良事件亦不存在 (表 1，如下所示)。影像評估為 PD，並增加腫瘤標記。依據免疫學的監測，並未觀察到對抗使用胜肽的特定 CTL

反應（表 2，如下所示）。接種之前，調節 T 細胞在正常範圍內（平均為 $3.9 \pm 1.2\%$ ），但超過正常範圍的增加被觀察到，在一個療程以及第二個療程也有（表 6，如下所示）。在起始接種後 3.3 個月，患者死於原先疾病的惡化。

案例 2（階段 I/0.5 毫克）

案例 2 為一個六十六歲男性，接受二次接種，但依其要求轉至別的醫院，隨後退出試驗（表 1，如下所示）。系統性不良事件不存在，而局部性不良事件亦不存在。

案例 3（階段 I/0.5 毫克）

案例 3 是一個六十四歲男性，進行了一個療程。可觀察到等級 3 的中性粒細胞減少（neutropenia）與肝功能異常（hepatic dysfunction），當作系統性不良事件（表 1，如下所示）。停用吉西他濱一週，能從這兩種情形回復，而後再繼續給藥。接種位置之等級 2 的硬化（induration）與潮紅（redness）被觀察到，而靠近接種位置之腹股溝腫脹（inguinal swelling）的淋巴結病變（lymphadenopathy）被觀察到，當作局部性不良事件。利用 PET，影像顯示在這個腫脹位置被觀察到大量累積現象（第 4 圖），而且組織檢查（biopsy）的結果觀察到組織病理學上強烈發炎反應，暗示對應於胜肽接種之免疫反應。影像評估為 SD，且腫瘤標記（CA19-9）降低（第 5 圖）。根據免疫學監測，對抗所給藥之胜肽的特定 CTL 反應被觀察到（第 6 圖），在 CD8-陽性 T 細胞分析，觀察到原生 T 細胞區段以及作用 T 細胞區段的增加（表 3，如下所示）。接種開始之前，作

用 T 細胞高於正常範圍（平均值為 $3.9 \pm 1.2\%$ ），但在一個療程後降低至正常範圍（表 6，如下所示）。之後，起始接種後 7.3 個月，患者死於原先疾病的惡化。

案例 4（階段 I/0.5 毫克）

案例 4 是一個六十一歲男性，進行二次的療程。沒有系統性不良事件，而為局部性不良事件，等級 2 的硬化與潮紅在接種位置被觀察到（表 1，如下所示）。影像評估為目標響應（Object Response）。更特別地，在胰臟末端的原發病灶在一個療程後被發現為 SD，二個療程後清楚地降低，且效果被維持將近二個月（第 7 圖）。肝門區的肝轉移灶在二個療程後變得完全不顯著（第 8 圖）。靠近膽囊的肝轉移灶在一個療程後變得不顯著，並且在二個療程後幾乎消失（第 9 圖）。另一方面，腫瘤標記（CA19-9 與 CEA），接種前為高濃度，在一個療程與二個療程後降低，而且腫瘤標記降低的趨勢甚至持續到一個月以後（第 10 圖）。根據免疫學監測，觀察到對抗所給藥之胜肽的特定 CTL 反應（第 11 圖）。調節 T 細胞在接種開始前、一個療程後、與二個療程後為正常範圍（表 6，如下所示）。首次接種 6.3 個月後，患者仍存活。

案例 5（階段 II/1 毫克）

案例 5 是六十五歲男性，進行二個療程，沒有系統性不良事件與局部性不良事件（表 1，如下所示）。影像評估為 PD。腫瘤標記亦提高。根據免疫學監測，對抗所給藥之胜肽的特定 CTL 反應被觀察到（表 2，如下所示），在

CD8-陽性 T 細胞分析，在原生 T 細胞區段與作用 T 細胞區段被觀察到（表 4，如下所示）。調節 T 細胞在接種開始前、一個療程後、與二個療程後為正常範圍（表 6，如下所示）。之後，在首次接種後 4.5 個月，患者死於原先疾病的惡化。

案例 6（階段 II/1 毫克）

案例 6 是五十七歲女性，進行二個療程。觀察到系統性不良事件之等級 3 的中性粒細胞減少（表 1，如下所示）。取消 GEM 一週使其回復，隨後再繼續給藥。接種位置之等級 2 的硬化與潮紅被觀察到，而靠近接種位置之淋巴結病變（腹股溝腫脹），當作局部性不良事件被觀察到。影像評估為目標響應。更特別地，胰臟頭部區域的原發性病灶在二個療程後被降低，而且這個效果被維持近 2.5 個月（第 12 圖）。二個療程完成前後所取得之 PET 掃描被比較。腫瘤的積累在二個療程後清楚地降低（第 13 圖）。與客觀地代表腫瘤累積量之 SUV 值相比，由 6 降至 4.5 明白地暗示具有抗腫瘤的效果。此外，腫瘤標記（除了 DUPAN2 之腫瘤標記從登記時起均為正常）在二個療程後降低，而且降低的效果甚至持續 2 個月以後（表 7，如下所示）。依據免疫學監測，對抗所給藥之胜肽的特定 CTL 反應被觀察到（第 14 圖），在 CD8-陽性 T 細胞區段分析中，在原生 T 細胞區段的增加被觀察到，以及在作用 T 細胞區段的降低被觀察到（表 4，如下所示）。調節 T 細胞在接種開始前、一個療程後、與二個療程後為正常範圍之內（表 6，如下所示）。

首次接種 6 個月後，QOL 維持良好，而個體仍存活。

案例 7 (階段 II/1 毫克)

案例 7 是一位六十九歲男性，進行二次療程。觀察到系統性不良事件之等級 3 的中性粒細胞減少（表 1，如下所示）。取消 GEM 一週使其回復，隨後再繼續給藥。接種位置之等級 2 的硬化與潮紅被觀察到，而靠近接種位置之淋巴結病變（腹股溝腫脹），當作局部性不良事件被觀察到。影像評估為 SD（第 15 圖）。更特別地，胰臟頭部區域的原發性病灶在二個療程後並未顯示任何的尺寸上的變化，而這個效果被維持近 2 個月（第 15 圖）。此外，腫瘤標記（除了 CA125 之腫瘤標記從登記時起均為正常）在一個療程後降低，而且降低的效果甚至持續 2 個月以後（第 16 圖）。根據免疫學監測，對抗所給藥之胜肽的特定 CTL 反應被觀察到（第 17 圖），而在 CD8-陽性 T 細胞區段分析中，在原生 T 細胞區段的降低被觀察到，以及在作用 T 細胞區段的增加被觀察到（表 4，如下所示）。調節 T 細胞在接種開始前、一個療程後、與二個療程後均在正常範圍之內（表 6，如下所示）。首次接種後 4.3 個月後，QOL 維持良好，且個體仍存活。

案例 8 (階段 III/2 毫克)

案例 8 是一位五十八歲男性，完成一個療程，而當第二個療程要開始時，由擴大的腫瘤發生消化道出血。判斷係因為腫瘤增大所造成，而試驗不繼續（表 1，如下所示）。肝功能異常被觀察當作系統性不良事件。無局部性不良事

件。一個療程完成時的影像評估為 PD。腫瘤標記亦增加。

案例 9 (階段 III/2 毫克)

案例 9 為七十三歲男性。在一次給藥後，研究被擱置，因為腫瘤漲大造成之消化道阻塞（表 1，如下所示）。

案例 10 (階段 III/2 毫克)

案例 10 係為六十二歲男性，進行一個療程。無系統性不良事件，而觀察到局部性不良事件之等級 2 或以下的硬化與潮紅（表 1，如下所示）。影像評估為 SD（第 18 圖）。此外，腫瘤標記（除了 CA125 之腫瘤標記從登記時起均為正常）降低，而腫瘤標記的降低持續大約一個月（第 19 圖）。根據免疫監測，對抗所給藥之胜肽的特定 CTL 反應被觀察到（表 2，如下所示），而在 CD8-陽性 T 細胞區段分析中，在原生 T 細胞區段的增加被觀察到，以及在作用 T 細胞區段的降低被觀察到（表 5，如下所示）。調節 T 細胞在接種開始前為 6.4 的高數值，但在一個療程後降低至 2.1 之正常範圍（表 6，如下所示）。

與單獨使用吉西他濱比較 (Comparison with Gemcitabine Alone)

在表 8（如下所示），以在案例抗腫瘤效果之觀點以及免疫反應之一的 DTH 反應之觀點，與單獨使用吉西他濱而得到之數據的比較被進行。抗腫瘤效果依據疾病控制率（disease control rate; CR 數+PR 數+SD 數/總案例數），以及明顯抗腫瘤效果表現率（clear antitumor effect

expression rate；客觀療效(objective response)) 而被比較。若單獨使用吉西他濱之效率停留在 45% 至 48%，本程序的效率以 62.5% 遠遠超過。客觀療效亦大於二倍或更多。DTH 反應係為一種免疫反應，被大量地觀察到。既然，單獨以 VEGFR2 幾乎觀察不到（私人聯絡），吉西他濱被認為可增強免疫反應。實際上，在 DTH 反應發生的案例，SD 或更高的反應在臨床上可被獲得，而 PD 案例與缺乏 DTH 的案例完全相符。因此，引起某些種類免疫反應的案例也被認為臨床上有效果。

表

[表 1] 臨床試驗的結果

案例	胚胎	年齡/性別	接種情形	系統性不良事件	局部性不良事件	可評估的病變	評估	腫瘤標記	觀察期間, 存活
1	階段 I 0.5 毫克	68/女性	完整 2 個療程	無	無	基本評估	PD	增加	3.3 個月, 死亡
2		66/男性	D/O(2 次接種)	無	無				
3		64/男性	完整 1 個療程	中性細胞粒減少/肝功能異常	硬化/潮紅/淋巴結病變	基本評估	SD	減少	7.3 個月, 死亡
4		61/男性	完整 2 個療程	無	硬化/潮紅	基本/肝功能異常評估	客觀療效	減少	6.3 個月, 存活
5	階段 II 1 毫克	65/男性	完整 2 個療程	無	無	基本評估	PD	增加	4.5 個月, 死亡
6		57/女性	完整 2 個療程	中性細胞粒減少	硬化/潮紅/淋巴結病變	基本評估	客觀療效	減少	6.0 個月, 存活
7		69/男性	完整 2 個療程	中性細胞粒減少	腹股溝腫脹	基本評估	SD	減少	4.3 個月, 存活
8	階段 III 2 毫克	58/男性	第 2 療程期間	中性細胞粒減少/腫瘤出血	無	基本評估	PD	增加	3.7 個月, 存活
9		73/女性	1 次接種	因腫瘤漲大造成消化道阻塞而試驗擱置		基本/肝功能異常評估			2.8 個月, 存活
10		62/男性	完整 1 個療程	無	硬化/潮紅	基本評估	SD	減少	2.4 個月, 存活

[表 2] 對抗所給藥之胜肽的特定 CTL 反應 / DTH 反應

		給藥前	給藥後	DTH 反應	臨床評估
階段	案例 1	—	—	—	PD
I	案例 3	—	+	+	SD
0.5 毫克	案例 4	NT	+	+	客觀療效
階段	案例 5	—	+	—	PD
II	案例 6	—	+	+	客觀療效
1 毫克	案例 7	—	+	+	SD
階段 L	案例 8	NT	NT	—	PD
III	案例 9	NT			NT
2 毫克	案例 10	—	—	+	SD

※ NT: 未檢測

[表 3] 階段 1 之 CD8-陽性 T 細胞區段的分析

		給藥前	一個療程後	二個療程後	臨床評估
案例	原生 / CD8+ (%)				
I	記憶 / CD8+ (%)		NT		PD
	作用記憶 / CD8+ (%)				
	作用 / CD8+ (%)				
案例	原生 e / CD8+ (%)	12.5	16.9		
3	記憶 / CD8+ (%)	11.8	10.9		SD
	作用記憶 / CD8+ (%)	3.7	2.4		
	作用 / CD8+ (%)	60.9	64.0		
案例	原生 / CD8+ (%)				
4	記憶 / CD8+ (%)		NT		客觀療效
	作用記憶 / CD8+ (%)				
	作用 / CD8+ (%)				

※ 案例 3: 第 1 療程後停止給藥

NT: 未檢測

[表 4] 階段 2 之 CD8-陽性 T 細胞區段的分析

		給藥前	一個療程後	二個療程後	臨床評估
案例 5	原生/CD8+ (%)	0	11.9	3.9	PD
	記憶/CD8+ (%)	0.1	11.5	8.8	
	作用記憶/CD8+ (%)	21.5	22.3	24.3	
	作用/CD8+ (%)	14.0	11.2	19.2	
案例 6	原生/CD8+ (%)	54.3	64.5	69.3	客觀療效
	記憶/CD8+ (%)	25.8	22.1	20.6	
	作用記憶/CD8+ (%)	1.2	0.4	0.3	
	作用/CD8+ (%)	10.2	5.9	3.9	
案例 7	原生/CD8+ (%)	9.4	1.1	0.1	SD
	記憶/CD8+ (%)	4.4	0.1	0	
	作用記憶/CD8+ (%)	10.6	12.0	8.3	
	作用/CD8+ (%)	14.4	17.8	18.0	

[表 5] 階段 3 之 CD8-陽性 T 細胞區段的分析

		給藥前	一個療程後	二個療程後	臨床評估
案例 8	原生/CD8+ (%)				PD
	記憶/CD8+ (%)		NT		
	作用記憶/CD8+ (%)				
	作用/CD8+ (%)				
案例 9	原生/CD8+ (%)				客觀療效
	記憶/CD8+ (%)		NT		
	作用記憶/CD8+ (%)				
	作用/CD8+ (%)				
案例 10	原生/CD8+ (%)	51.0	57.2		SD
	記憶/CD8+ (%)	10.7	11.4		
	作用記憶/CD8+ (%)	4.7	3.4		
	作用/CD8+ (%)	18.2	14.8		

※案例 8 10: 第 1 療程後停止給藥

NT: 未檢測

[表 6] CD4-陽性/CD25 高表現/Foxp3-陽性調節 T 細胞之分析

階段	案例	治療前	一個療程後	二個療程後	臨床評估
I	1	2.4	<u>9.5</u>	<u>7.8</u>	PD
	3	<u>10.6</u>	4.4		SD
	4	3.2	2.2	1.5	客觀療效
II	5	4.6	2.3	1.8	PD
	6	3.1	3.9	4.1	客觀療效
	7	3.1	3.3	3.1	SD
III	8	N. T.	N. T.		PD
	9	N. T.	N. T.		N. T.
	10	<u>6.4</u>	2.1		SD

健康受試者之平均值(SD) …

SD4+CD254^{高表現}Foxp3+:3.9%(±1.2)

[表 7] 腫瘤標記在案例 6 整個治療程序增加之變化

	1/26 接種前 4 週	2/8 接種前	3/15 第 1 療程後	4/24 第 2 療程後	5/29 治療後 1 個月	6/26 治療後 2 個月
DUPAN2	1600<	1600<	1600<	1200	960	880

(CEA, CA19-9, CA125: 正常範圍)

[表 8] 與本發明之治療有關之抗腫瘤效果與 DTH 反應的摘要

	單獨使用吉西他濱	GEM+R2-169 (正反應案例數/ 總案例數)
疾病控制率 (SD 或更高)	45-48%	62.5% (5/8)
顯著腫瘤降低作用 (客觀療效)	10%	25% (2/8)
DTH 反應	N. T.	62.5% (5/8)

討論

對於胰臟癌無法以手術清除，是一種最難預後的腫瘤並無疑問。目前，為一對抗胰臟癌的藥學療法是吉西他濱，但在臨床上仍不能令人滿意。

另一方面，對抗腫瘤抗原之抗原決定位胜肽鑑定之後，對於癌症疫苗療法有更高的期待；然而，已知事實是至今的臨床表現尚無法滿足這類期待。主要原因在於 MHC 分子在腫瘤細胞之低表現或缺乏。更特別地，即便利用疫苗誘導很強的 CTL，如果缺乏 MHC 分子，抗腫瘤效果仍無法實驗。

針對 MHC 分子之低表現與缺乏的測量是非常重要的課題，考量甚至當疫苗引起的 CTL 反應可以被免疫監測所偵測，並非直接與抗腫瘤效果相關的事實。此外，腫瘤的異質性也是一個重要的問題。即便 CTL 可以被誘導對抗一個腫瘤抗原，在所表現的分子並非腫瘤生長所需之基礎分子的情形下，而被偵測到的分子並非 CTL 的目標，腫瘤可以繼續生長。基於解決這些疫苗療法與抗腫瘤效果相關之基本問題的目的，發明人集中注意於 VEGFR2，在腫瘤新生血管內皮細胞高度表現，且被鑑定為抗原決定位胜肽，可以被當成疫苗（Wada S, Cancer Res. 65, 4939-4946, 2005., 專利申請案第 WO 2004/024766 號）。

照慣例，疫苗療法與化學療法的合併使用被認為基於其生物學特性是不相容的。然而，由腫瘤免疫性的立場，例如調節 T 細胞及其抵銷的發現，與化學療法的合併使用

被建議。因此，臨床實驗被計畫檢驗是否吉西他濱與以新腫瘤血管為標的之胜肽疫苗療法合併使用的效果可以被期待用於胰臟癌。

如結果所示，首先，發現以安全性的觀點而言是完全可以被接受的。考慮劑量的調升，等級 3 或更高的系統性不良事件（一個療程完成時）顯示中性粒細胞減少與肝功能異常出現於階段 1 的三個案例中的一個，階段 2 的三個案例之中的二個，以及階段 3 的二個案例中的一個；然而，停藥或 G-CSF 的給藥可以繼續被給藥。如前所述，目前，全部階段均在可接受的範圍。既然這是以腫瘤新生血管內皮細胞為標的之疫苗療法，出血傾向與其他不良事件會被考慮；然而，實現程序之理論基礎，例如在正常血管內皮細胞的少量表現，被證明某種程度的正確性。當劑量增加分析，透過免疫學監測與以 DTH 反應、CTL 反應與疾病控制率為依據之臨床效果，在階段 1 之三個案例中的二個案例、以及階段 3 之三個案例中的一個全部為陽性。在階段 2，單獨 CTL 反應在三個案例中的三個為陽性（DTH 反應與疾病控制率與在階段 1 與 3 相同）。如案例數目少，前述所建議的可能性，以階段 2 為建議劑量。

考量抗腫瘤效果，當疫苗化療合併使用的效果明白地被觀察到，疫苗增強吉西他濱之抗腫瘤效果的可能性被討論。如在表 8 的比較，明顯腫瘤降低效果與單獨使用吉西他濱的效果比較超過二倍以上。這表示吉西他濱的直接抗腫瘤效果被疫苗增強。更特別地，可想像疫苗所誘導之 CTL

破壞腫瘤新生血管內皮細胞，如同吉西他濱對腫瘤的有效率，而如結果所示，強大的抗腫瘤效果出現。下一步，吉西他濱增強疫苗的抗腫瘤效果之可能性被討論。針對所給藥之胜肽的免疫反應分析確定了有效的 CTL 反應被誘導主要在臨床上有效果之案例，包括 SD 案例。此外，既然 DTH 反應被增強，強烈暗示吉西他濱增強 CTL 反應的可能性，CTL 反應是疫苗抗腫瘤療效的核心元件。如臨床上，有五個案例中的四個案例，抗腫瘤療效持續一段很長的時間，包括 SD（案例 4：1 個月；案例 6：2 個月；案例 7：2 個月；以及案例 10：1 個月），且被認為是疫苗長期抗腫瘤效果的結果。更特別地，暗示 CTL 被吉西他濱有效地誘導，而這個 CTL 用於長期抗腫瘤效果之可能性。此外，有腫瘤經歷吉西他濱引起的細胞死亡，而這個反應與疫苗活化的抗腫瘤反應協力地作用之可能性。因此，抗腫瘤效果之增強，包括生命期的延長，不增加副作用，可以被強烈地期待，經由疫苗化療合併使用吉西他濱與 VEGFR2 胜肽。可被認為是朝向改善很難預後之胰臟癌的治療缺點之重大發現。

工業上可利用性：

在此發現對抗胰臟癌之化療藥劑，例如吉西他濱的療效可以顯著地被改善或增強，當與適當的抗原胜肽合併使用，例如在專利申請案第 WO 2004/024766 號被鑑定為癌症疫苗之 KDR 胜肽，其內容在此加入作為本發明之引用文

獻。因此，本發明提供用於對有需要之個體治療胰臟癌之改善的方法。

全部所引用之文獻、資料庫、序列、專利與專利申請案，在此均加入作為本發明之引用文獻。

當本發明被詳細描述，並參照其特定之實施例，對於熟悉本領域人士而言，不同的變化與修飾可以被達成，而不背離本發明之精神與範圍，其邊界與界線係如所附之申請專利範圍所界定。

【圖式簡單說明】

對於熟悉本技術領域之人士而言，配合以下的圖式簡單說明與本發明之詳細說明與其較佳實施例，將很清楚本發明之不同型態與應用：

第 1 圖表示用於本實施例之抗原胜肽與化療藥劑的給藥方式。

第 2 圖表示 CD8-陽性 T 細胞之原生、作用、與記憶 T 細胞的流式細胞儀分析的結果，其中功能性淋巴細胞部分經由穿孔素染色而被決定。

第 3 圖表示調節 T 細胞（例如，CD8 陽性 T 細胞之 CD25 高表現與 Foxp3 陽性細胞）在施用疫苗之前、後，於四色染色後，以流式細胞儀測量的數量變化。

第 4 圖表示案例 3 的 PET 掃描結果，尤其是接種後接種位置附近的淋巴結病變。

第 5 圖表示案例 3 腫瘤標記濃度隨著時間的變化。

第 6 圖表示案例 3 在接種前後特定 CTL 反應增加的程度。

第 7 圖表示案例 4 的連續 CT 掃描，描述在胰臟癌原發病灶治療的降低作用。

第 8 圖表示案例 4 的連續 CT 掃描，描述在胰臟癌肝臟轉移病灶 1 的腫瘤降低作用。

第 9 圖表示案例 4 的連續 CT 掃描，描述在胰臟癌肝臟轉移病灶 2 的腫瘤降低作用。

第 10 圖表示腫瘤標記 CEA 與 CA19-9 在案例 4 整個治療程序增加的變化。

第 11 圖表示案例 4 在接種前後的特定 CTL 反應增加。

第 12 圖表示案例 6 的連續 CT 掃描，描述在胰臟癌原發病灶的腫瘤降低作用。

第 13 圖表示案例 6 的連續 PET 掃描，描述在胰臟癌原發病灶的腫瘤降低作用。

第 14 圖表示案例 6 在接種前後的特定 CTL 反應增加。

第 15 圖表示案例 7 的連續 CT 掃描，描述在胰臟癌原發病灶的改變。

第 16 圖表示腫瘤標記 CA125 在案例 7 整個治療程序增加的變化。

第 17 圖表示案例 7 在接種前後的特定 CTL 反應增加。

第 18 圖表示案例 10 的連續 CT 掃描，描述在胰臟癌原發病灶的變化。

第 19 圖表示腫瘤標記 CA125 在案例 10 整個治療程序

增加的變化。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 山上裕機

<120> 以抗原胜肽合併化學藥劑治療胰臟癌

<130> ONC-A0719-TW

<150> US 60/957,923

<151> 2007-08-24

<160> 13

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 1

Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 2

Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 3

Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 4

Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 5

Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 6

Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 7

Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 8

Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 9

Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 10

Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人類

<400> 11

Tyr Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Val
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之胜肽

<400> 12

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成之胜肽

<400> 13

Val Leu Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu
1 5

五、中文發明摘要：

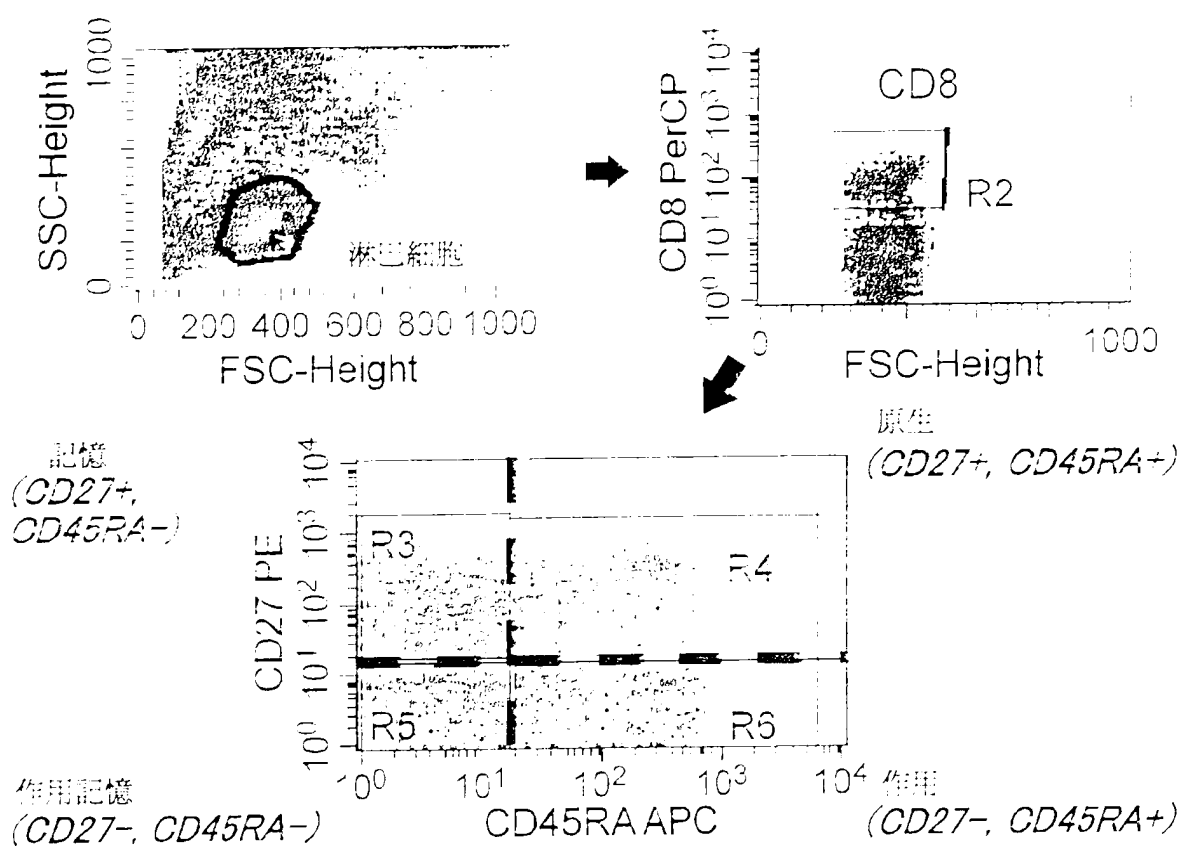
本發明所述者係為適合胰臟癌與類似癌症之治療的組合療法，亦描述加強化療藥劑，例如吉西他濱（gemcitabine）之療效的方法。

六、英文發明摘要：

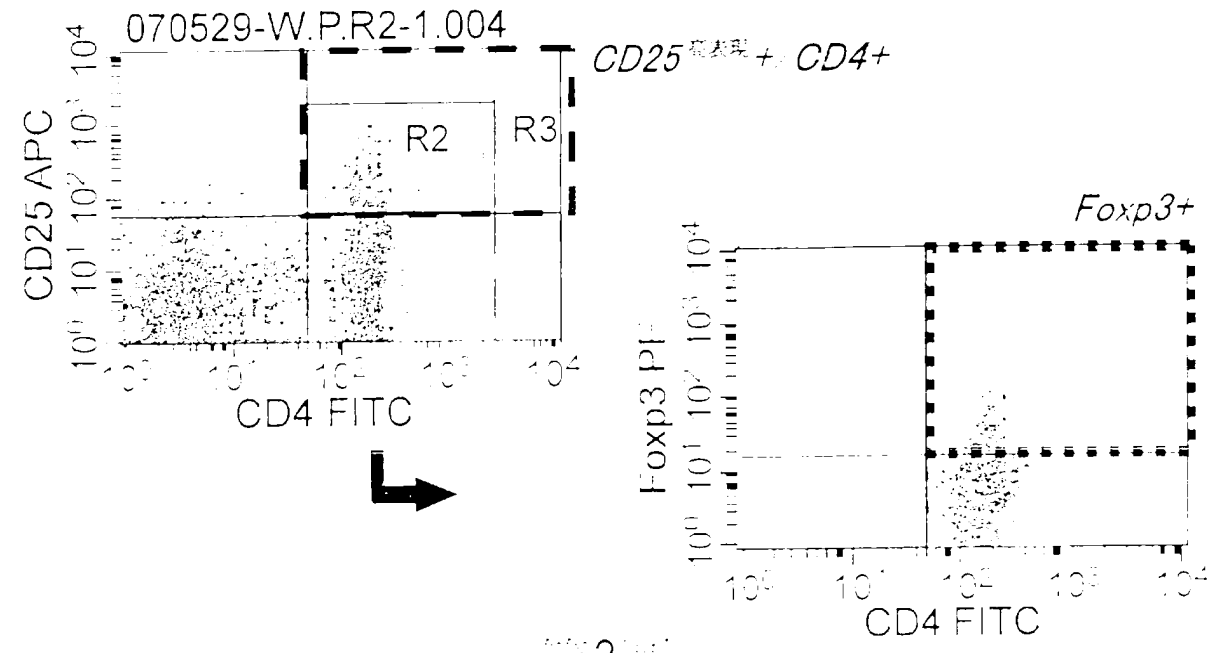
Described herein is a combination therapy suited to the treatment of pancreatic cancer and the like. Also described is a method of potentiating the therapeutic effect of chemotherapeutic agents such as gemcitabine.

	1 Vac	2 Vac	3 Vac	4 Vac
接種	第1天	第8天	第15天	第22天
抗原性液	第1天	第8天	第15天	抗原給與

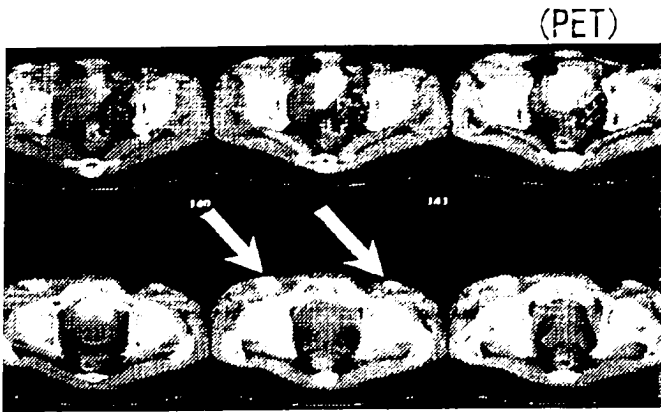
第1圖



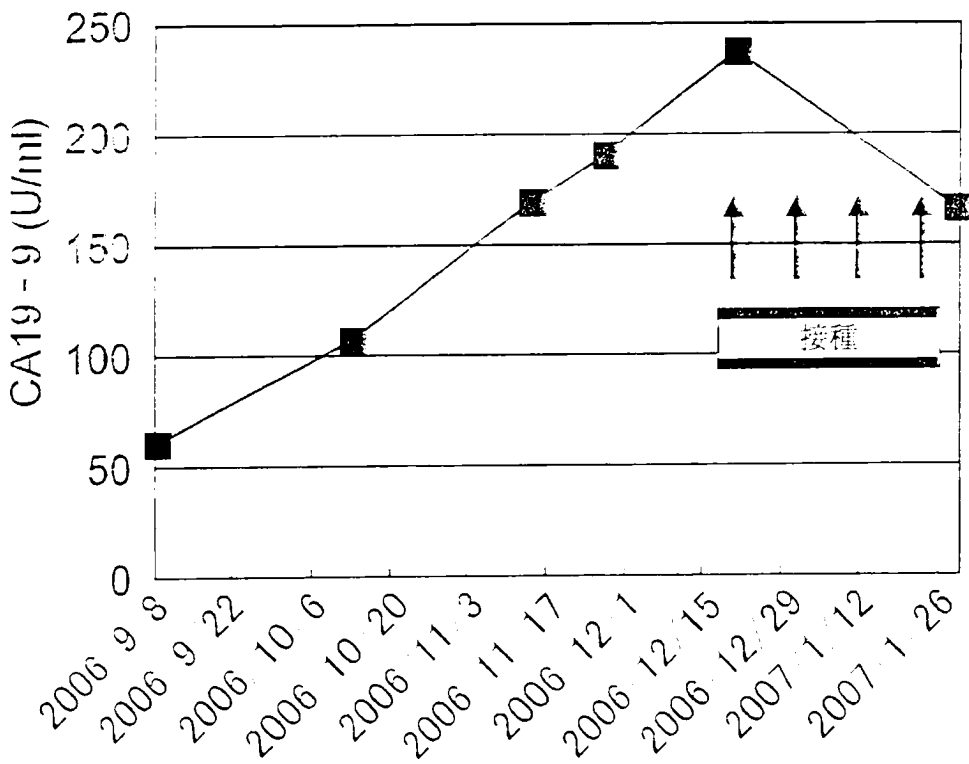
第2圖



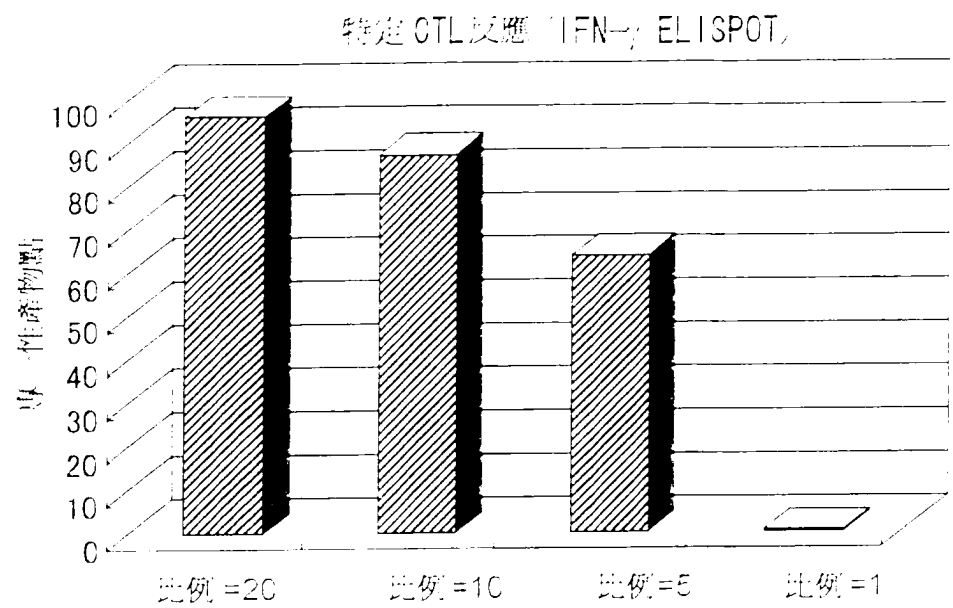
第3圖



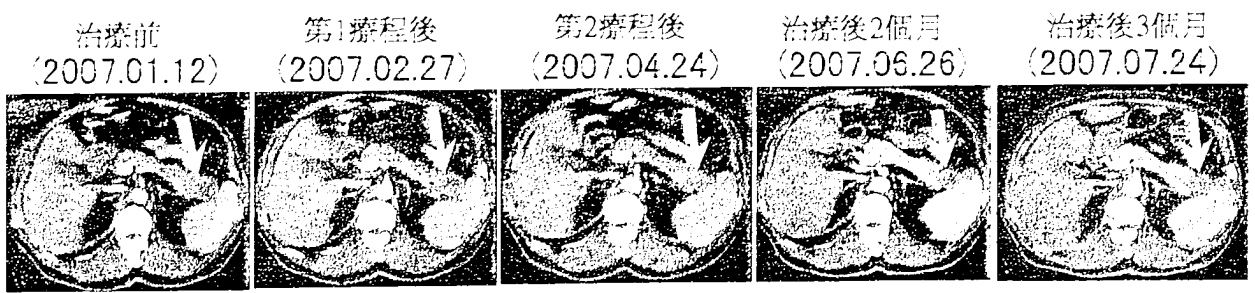
第4圖



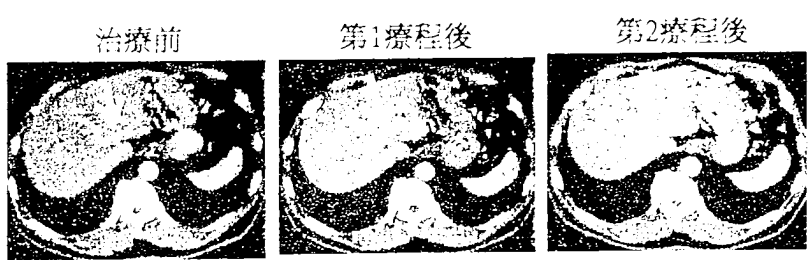
第5圖



第6圖



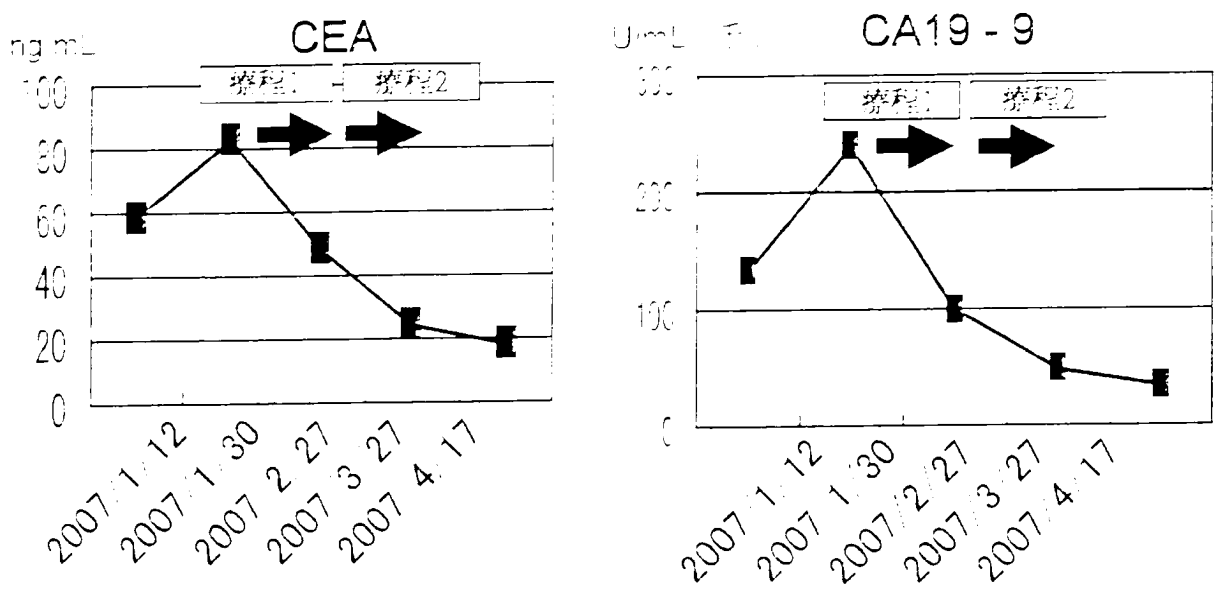
第7圖



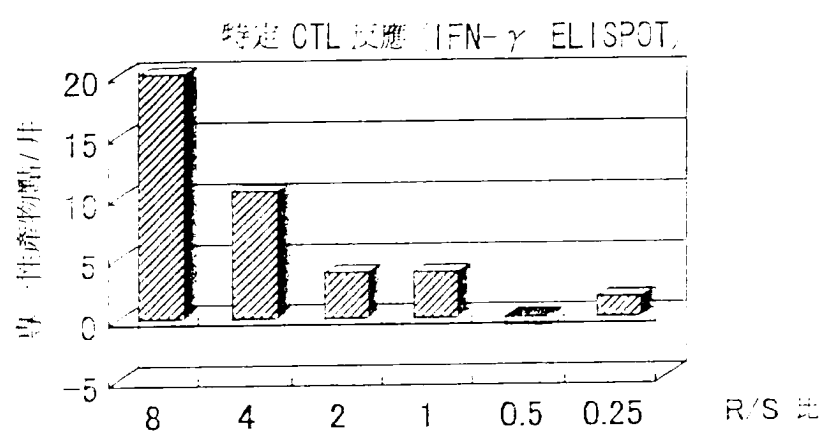
第8圖



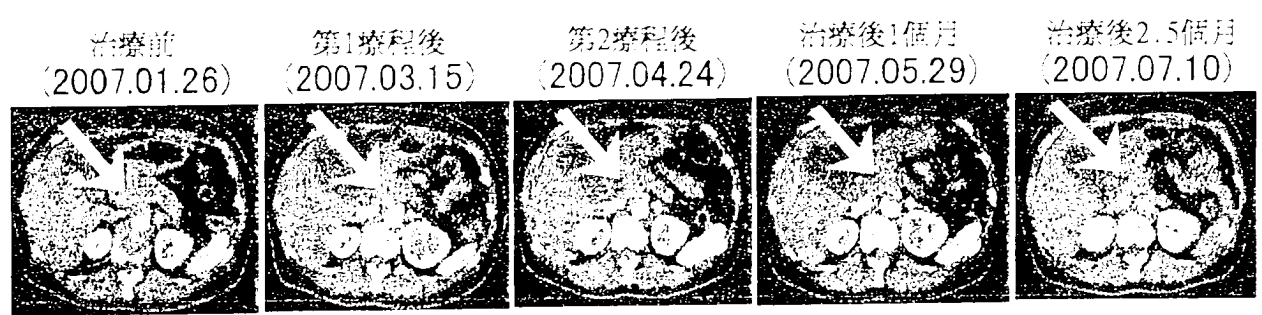
第9圖



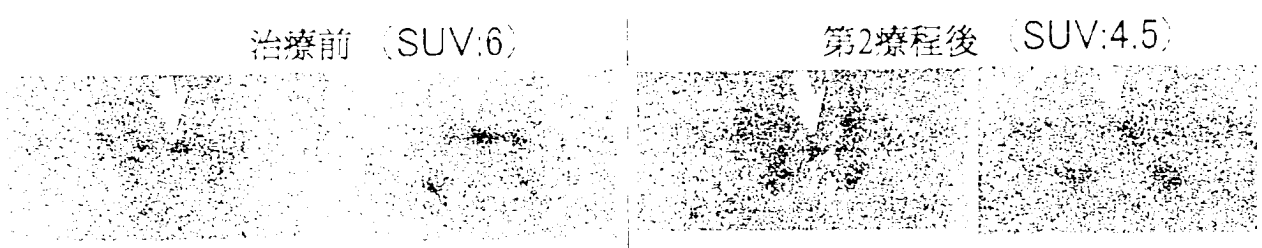
第10圖



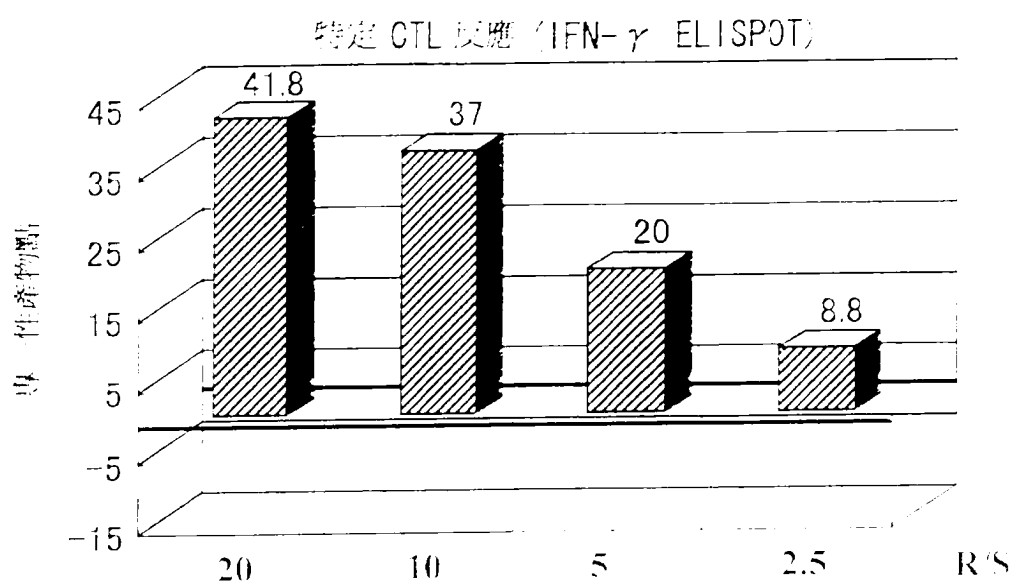
第11圖



第12圖

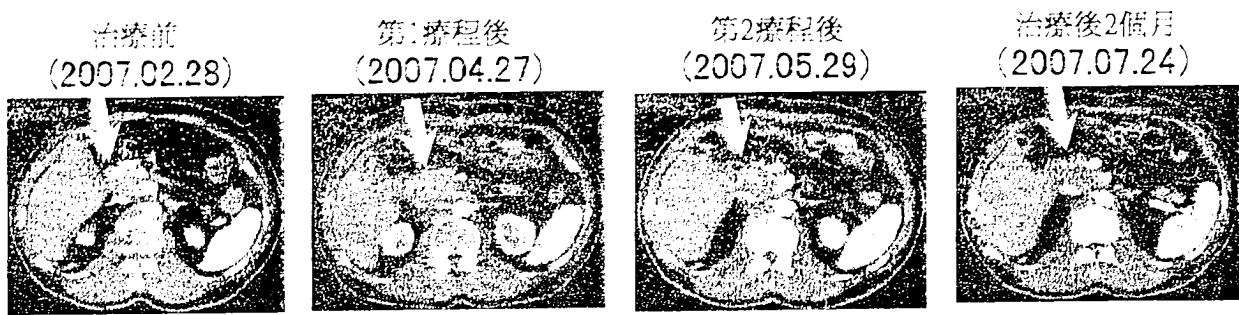


第13圖

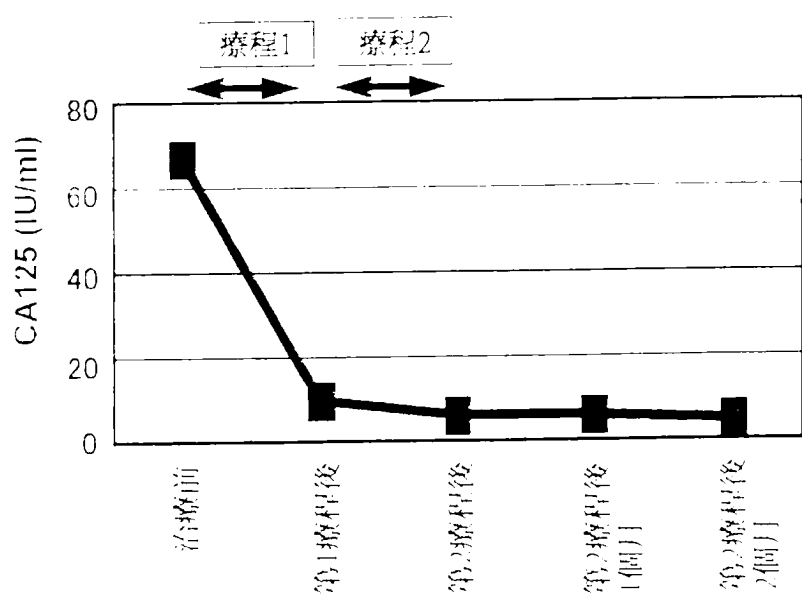


第14圖

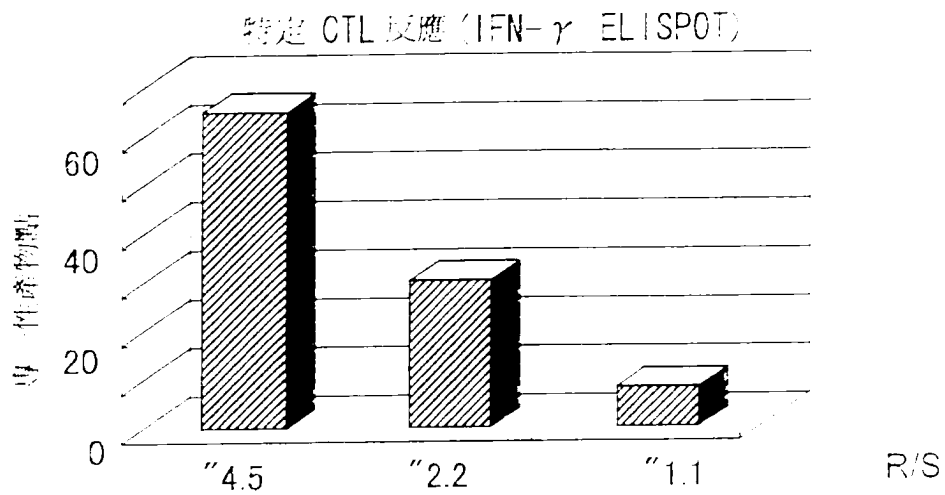
影像評估：SD



第15圖

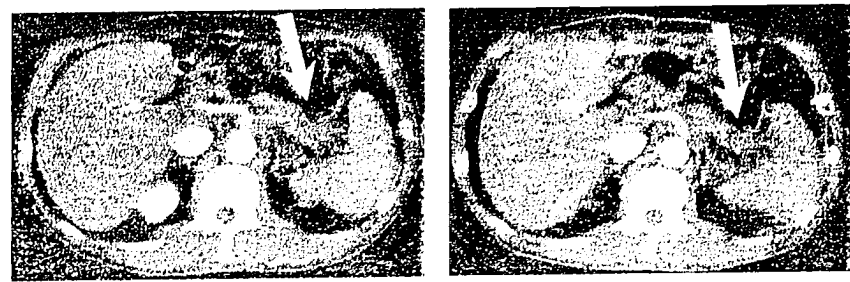


第16圖



第17圖

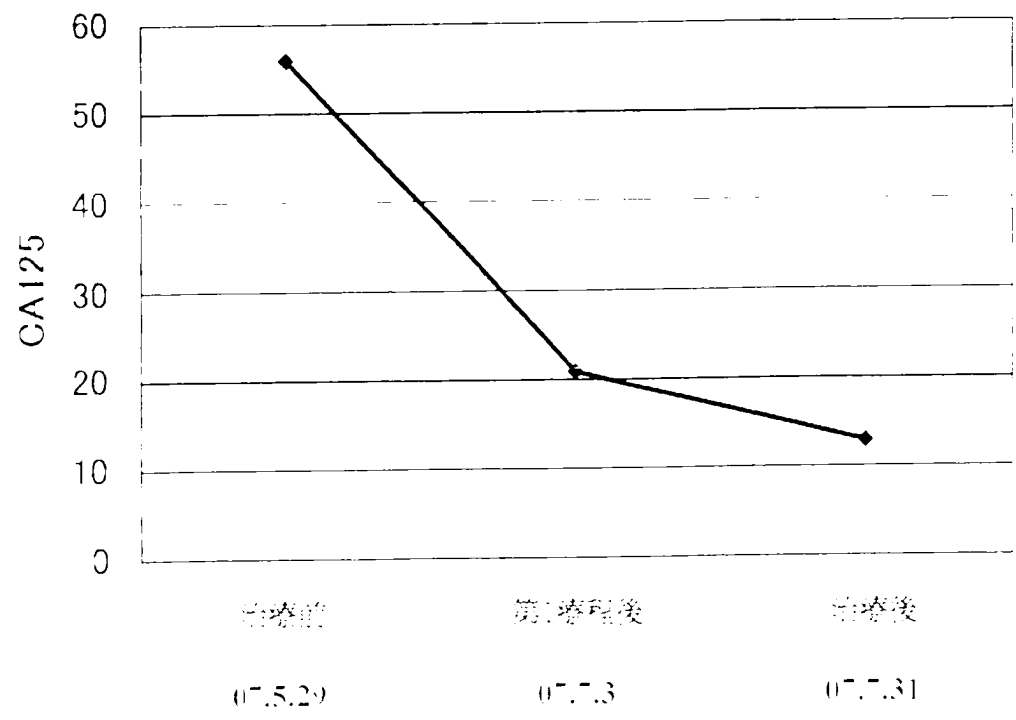
影像評估：SD



接種前 2007.05.02

第1療程後
2007.07.03

第18圖



第19圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(5)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

公告本

發明專利說明書

98年5月12日修正
補充頁

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97130789

A61K 38/04 (2006.01)

※申請日期：97.8.13

※IPC 分類：

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

以抗原胜肽合併化療藥劑治療胰臟癌/Combination Therapy for
Pancreatic Cancer Using an Antigenic Peptide and
Chemotherapeutic Agent

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

腫瘤療法・科學股份有限公司/ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.

代表人：(中文/英文) 富田憲介/TOMITA KENSUKE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國神奈川縣川崎市高津區坂戸三丁目2番1號

國籍：(中文/英文) 日本/JAPAN

三、發明人：(共1人)

姓名：(中文/英文)

山上裕機/YAMAUE, HIROKI

國籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

十、申請專利範圍：

1. 一種用於治療一個體胰臟癌的套組，其中該套組包括醫藥組合物，該醫藥組合物包括分別作為活性成分之(i)與(ii)與藥學上可接受的載體；

(i) 一或複數個選自以下組成之群組的胜肽；

(a) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1)、VYSSEEAEI (SEQ ID NO: 2)、GYRIYDVVL (SEQ ID NO: 3)、SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4)、KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5) 與 DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6)；

(b) 如(a)的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、或色胺酸、及/或 C 端胺基酸被取代為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸、或甲硫胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

(c) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：AMFFWLLLV (SEQ ID NO: 7)、VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8)、AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9)、KLIEIGVQT (SEQ ID NO: 10)、YMISYAGMV (SEQ ID NO: 11)、IQSDVWSFGV (SEQ ID NO: 12) 以及 VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13)；以及

(d) 如(c)的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為白胺酸或甲硫胺酸及/或 C 端胺基酸被取代為賴胺酸或白胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

(ii) 一或複數個化療藥劑，係選自吉西他濱

(gemcitabine) 及其藥學上可接受的鹽類所組成之群組，其中該個體係為 HLA-A24 陽性或 HLA-A02 陽性。

2. 一種用於治療一個體癌症的抗胰臟癌藥劑，其中該藥劑包括 (i) 與 (ii) 合併；

(i) 一或複數個選自以下組成之群組的胜肽；

(a) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1)、VYSSEEAEI (SEQ ID NO: 2)、GYRIYDVVL (SEQ ID NO: 3)、SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4)、KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5) 與 DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6)；

(b) 如 (a) 的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、或色胺酸、及 / 或 C 端胺基酸被取代為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸、或甲硫胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

(c) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：AMFFWLLV (SEQ ID NO: 7)、VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8)、AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9)、KLIEIGVQT (SEQ ID NO: 10)、YMISYAGMV (SEQ ID NO: 11)、IQSDVWSFGV (SEQ ID NO: 12) 以及 VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13)；以及

(d) 如 (c) 的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為白胺酸或甲硫胺酸及 / 或 C 端胺基酸被取代為頤胺酸或白胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

(ii) 一或複數個化療藥劑，係選自吉西他濱

(gemcitabine) 及其藥學上可接受的鹽類所組成之群組，其中該個體係為 HLA-A24 陽性或 HLA-A02 陽性。

3. 一種(i)與(ii)組合於製造一用於治療一個體胰臟癌之醫藥組合物的用途；

(i) 一或複數個選自以下組成之群組的胜肽；

(a) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1)、VYSSEEAEI (SEQ ID NO: 2)、GYRIYDVVL (SEQ ID NO: 3)、SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4)、KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5) 與 DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6)；

(b) 如(a)的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、或色胺酸、及/或 C 端胺基酸被取代為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸、或甲硫胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

(c) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：AMFFWLLLV (SEQ ID NO: 7)、VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8)、AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9)、KLIEIGVQT (SEQ ID NO: 10)、YMISYAGMV (SEQ ID NO: 11)、IQSDVWSFGV (SEQ ID NO: 12) 以及 VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13)；以及

(d) 如(c)的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為白胺酸或甲硫胺酸及/或 C 端胺基酸被取代為頤胺酸或白胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

(ii) 一或複數個化療藥劑，係選自吉西他濱

(gemcitabine) 及其藥學上可接受的鹽類所組成之群組，其中該個體係為 HLA-A24 陽性或 HLA-A02 陽性。

4. 一或複數個選自以下組成之群組之胜肽的用途；

(a) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：RFVPDGNRI (SEQ ID NO: 1)、VYSSEEAEEL (SEQ ID NO: 2)、GYRIYDVVL (SEQ ID NO: 3)、SYMISYAGM (SEQ ID NO: 4)、KWEFPRDRL (SEQ ID NO: 5) 與 DFLTLEHLI (SEQ ID NO: 6)；

(b) 如 (a) 的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為苯丙胺酸、酪胺酸、甲硫胺酸、或色胺酸、及/或 C 端胺基酸被取代為苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、色胺酸、或甲硫胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

(c) 一胜肽，其係由選自下列所組成群組之胺基酸序列所組成：AMFFWLLLV (SEQ ID NO: 7)、VIAMFFWLL (SEQ ID NO: 8)、AVIAMFFWL (SEQ ID NO: 9)、KLIEIGVQT (SEQ ID NO: 10)、YMISYAGMV (SEQ ID NO: 11)、IQSDVWSFGV (SEQ ID NO: 12) 以及 VLAMFFWLL (SEQ ID NO: 13)；以及

(d) 如 (c) 的胜肽，其中 N 端的第二個胺基酸被取代為白胺酸或甲硫胺酸及/或 C 端胺基酸被取代為賴胺酸或白胺酸，且其中該胜肽具有細胞毒性 T 細胞誘導性；

用於製造增強吉西他濱 (gemcitabine) 之療效以在個體治療胰臟癌的醫藥組合物，其中該個體係為 HLA-A24 陽性或 HLA-A02 陽性。