



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0618050-7 A2**

(22) Data de Depósito: 02/11/2006
(43) Data da Publicação: 16/08/2011
(RPI 2119)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/00 2006.01
A61K 38/18 2006.01

(54) Título: **USO DE PEPTÍDEO EGFRvIII E VACINA ANTITUMOR EM COMBINAÇÃO COM OUTROS COMPONENTES PARA O TRATAMENTO DE TUMOR**

(30) Prioridade Unionista: 02/11/2005 US 60/732.741

(73) Titular(es): Duke University, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center

(72) Inventor(es): Amy Heimberger, Darell D. Bigner, Duane Mitchell, John H. Sampson

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DANIEL-SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2006042812 de 02/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/056061 de 18/05/2007

(57) Resumo: USO DE PEPTÍDEO EGFRvIII E VACINA ANTITUMOR EM COMBINAÇÃO COM OUTROS COMPONENTES PARA O TRATAMENTO DE TUMOR A administração simultânea de quimioterapia e imunoterapia foi considerada uma contra-indicação devido à preocupação de que a linfopenia induzida removeria a eficácia terapêutica de imunoterapia. Temozolomida foi mostrado como sendo um quimioterapêutico eficaz para pacientes com gliomas malignos e privar pacientes com glioblastoma (CEM) desse a gente para tratar com imunoterapia é controverso. Apesar do dogma convencional, foi demonstrado que tanto quimioterapia como imunoterapia podem ser fornecidas simultaneamente sem negar os efeitos de imunoterapia, na realidade, a linfopenia induzida por temozolomida pode ser sinérgica com uma vacina de peptídeo.

"USO DE PEPTÍDEO EGFRvIII E VACINA ANTITUMOR EM COM-
BINAÇÃO COM OUTROS COMPONENTES PARA O TRATAMENTO DE TUMOR"

A presente invenção foi feita com apoio do governo dos Estados Unidos de acordo com a Concessão no. R01
5 CA097222 do National Institutes of health. O governo norte-americano retém, portanto, certos direitos em relação a essa invenção.

Esse pedido reivindica o benefício do pedido provisori-
onal US 60/732.741 depositado em 2 de novembro de 2005, cujo
10 teor integral é incorporado expressamente pela presente.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção é relacionada à área de imunote-
rapia de câncer. Em particular, refere-se ao aumento da res-
postas a vacinas contra tumor.

15 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Apesar da ressecção cirúrgica agressiva, terapia de
radiação focada de dose elevada, e quimioterapia, pacientes
diagnosticados com GBM têm uma sobrevivência média inferior
a 15 meses após o diagnóstico (Stupp e outros, Optimal role
20 of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. Curr
Neurol Neurosci Rep. 2005 maio; 5(3): 198-206). A falha da
terapia pode ser atribuída, pelo menos em parte, a um índice
terapêutico relativamente estreito de modo que tentativas em
aumento de dose resulta em toxicidade neurológica ou sistê-
25 mica limitadora de dose. O uso de imunoterapia mantém a pro-
messa para o tratamento potencial desses tumores porém até
recentemente, poucos demonstraram eficácia clínica. Vários
experimentos clínicos, com pacientes selecionados, envolven-
do vacinação de pacientes com glioma com células dendríticas

(DCs) e peptídeos eluídos em ácido (Ashkenazi e outros, A selective impairment of the IL-2 system in lymphocytes of patients with glioblastomas: increased level of soluble IL-2R and reduced protein tyrosine phosphorylation. Neuroimmunomodulation. 1997; Kolenko e outros, Tumor induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas. J Immunol. 15 de setembro de 1997; 159(6): 3057-67; Liao e outros, Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. Clin Cancer Res. 1º de agosto de 2005; 11(15): 5515-25) or an antigen-specific peptide (Heimberger AB, Archer GE, e outros, Dendritic cells pulsed with a tumor-specific). peptide induce long-lasting immunity and are effective against murine intracerebral melanoma. Neurosurgery. Janeiro de 2002: 50(1): 158-64; discussão 164-6)) demonstraram promessa pelo aumento do tempo de sobrevivência mediana para uma faixa de 20-31 meses. Além disso, em um experimento clínico de fase II recentemente concluído utilizando uma abordagem imunoterapêutica específica de antígeno, tempo para progressão (TTP) em pacientes GBM foi retardado para 15 meses, que está em contraste acentuado com o padrão de cuidado consistindo em radioterapia e temozolomide que tinha um TTP de 7 meses (Stupp e outros, 2005, supra), e a sobrevivência mediana foi de 29 meses (Heimberger e outros, J Transl Méd. 19 de outubro de 2005; 3:38 The natural history of EGFR and EGFRvIII

in glioblastoma patients.)). Cumulativamente, esses experimentos de imunoterapia sugerem que apesar da imunossupressão inerente de pacientes com glioma maligno, respostas imunes eficazes podem ser geradas. Entretanto, há relutância em não
5 tratar pacientes GBM com alguma forma de quimioterapia dado o padrão recentemente estabelecido de cuidado e o prognóstico ruim geral.

Há necessidade contínua na técnica de se desenvolver métodos melhores para tratar tumores em geral e glioblastomas em particular.
10

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

É fornecido um método para tratar um tumor em um sujeito. Uma quantidade eficaz de tratamento de um peptídeo EGFRvIII e uma quantidade eficaz de tratamento de um agente
15 quimioterapêutico que induz linfopenia são administradas ao sujeito.

De acordo com outra modalidade é fornecido um método para tratar um tumor em um sujeito. Uma quantidade eficaz de tratamento de um peptídeo EGFRvIII conjugado com KLH é administrada ao sujeito com o tumor. Fator de estimulação de colônia de macrófago/granulócito (GM-CSF) também é administrado como um adjuvante em uma quantidade eficaz simultaneamente com o peptídeo EGFRvIII. Uma quantidade eficaz de tratamento de um agente de alquilação também é administrada ao
20
25 sujeito.

De acordo ainda com outra modalidade, é fornecido um método para tratar um tumor em um sujeito. Uma quantidade eficaz de tratamento de uma vacina antitumor e uma quantidade

de eficaz de tratamento de temozolomide ou um sal farmacêuticamente aceitável da mesma são administrados ao sujeito.

De acordo ainda com outra modalidade, é fornecido um método para tratar um tumor em um sujeito. Uma quantidade
5 eficaz de tratamento de uma vacina antitumor e uma quantidade eficaz de tratamento de um agente quimioterapêutico que induz linfopenia são administrados ao sujeito.

Essas e outras modalidades que serão evidentes para aqueles versados na técnica após leitura do relatório descritivo fornecem à técnica métodos adicionais para tratar
10 tumores refratários a tratamento.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A administração simultânea de quimioterapia e imunoterapia tem sido considerada uma contra-indicação devido à
15 preocupação de que a linfopenia induzida por quimioterapia would ablate eficácia terapêutica de imunoterapia. temozolomide mostrou ser um quimioterapêutico eficaz para pacientes com gliomas malignos e priva pacientes com glioblastoma (GBM) desse agente para tratar com imunoterapia é controverso.
20 Apesar do dogma convencional, os inventores demonstram que tanto quimioterapia como imunoterapia pode ser fornecido simultaneamente sem negar os efeitos de imunoterapia. Na realidade, linfopenia induzida por temozolomide pode ser sinérgica com uma vacina de peptídeo. Embora os requerentes
25 não desejem ser limitados por uma teoria específica referente ao mecanismo de ação, a sinergia observada pode ser secundária à inibição de Tregs ou a falha em recuperar de

Tregs, que permite aumento das células CD8+ T citotóxicas efectoras. Outros mecanismos também podem estar envolvidos.

“EGFRvIII” ou “mutação do Receptor de Fator de crescimento epidérmico III” é uma forma de mutante conhecida do Receptor de Fator de crescimento epidérmico. Vide, por exemplo, a patente US no. 6.503.503; vide, também as patentes US nos. 6.900.221; 6.673.602; 6.479.286; e 6.129.915. A mutação que causa a produção da proteína vIII é tipicamente caracterizada por uma deleção em quadro específica de tumor e consistente de 801 pares base a partir do domínio extracelular que divide um códon e produz uma glicina nova na junção de fusão.

“Peptídeo de EGFRvIII”, como utilizado aqui se refere a um peptídeo de comprimento apropriado, por exemplo, pelo menos 10 ou 12 aminoácidos, e até 16, 20 ou 30 aminoácidos ou mais, que cobre a junção de emenda mudada da proteína EGFRvIII correspondente. Os exemplos incluem porém não são limitados a: H-LEEKKGNYVVT DHS-OH, ou “PEP-3.” O peptídeo EGFRvIII pode ser a partir de (ou corresponde em sequência a) EGFRvIII de qualquer espécie mamífera, porém é preferivelmente humano. Sequências do tipo selvagem específicas de EGFR são mostradas na SEQ ID NO: 6 a 9.

“Proteína portadora”, como utilizado aqui, se refere a uma proteína que não possui elevada homologia a uma proteína encontrada na espécie que está recebendo uma composição da invenção e elicia uma resposta imune. Uma proteína possui elevada homologia se for pelo menos 75% idêntica, mais preferivelmente pelo menos 85% idêntica ou pelo menos 90% idên-

tica a uma proteína, como determinado por qualquer algoritmo matemático conhecido utilizado para a comparação de duas seqüências de aminoácido (vide, por exemplo, Karlin e Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268; Karlin e Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877; 5 Torellis e Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; e Pearson e Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444-8). Preferivelmente, a percentagem de identidade de duas seqüências de aminoácidos é determinada por buscas de proteína 10 BLAST com o programa XBLAST, marcação=50, comprimento de palavra=3. Os exemplos de proteínas portadoras heterólogas incluem, porém não são limitadas a, KLH, PhoE, mLT, TraT, ou gD a partir de vírus BhV-1. Vide, por exemplo, a patente US no. 6.887.472. Tais proteínas portadoras podem ser conjugadas 15 ou ligadas ao antígeno de tumor diretamente ou por um segmento ligador intermediário como uma cadeia de um ou mais (por exemplo, 2, 4, 6) aminoácidos intermediários (por exemplo, um resíduo CYS intermediário) de acordo com técnicas conhecidas.

20 "KLH" ou "hemocianina de molusco de buraco de fechadura" é uma proteína portadora conhecida com a qual outra proteína pode ser conjugada, de acordo com técnicas conhecidas. Vide, por exemplo, a patente US no. 6.911.204.

"Adjuvante" como utilizado aqui, se refere a qualquer 25 de uma classe diversa de compostos que aumentam a eficácia terapêutica de uma vacina que é administrada simultaneamente com o adjuvante. Em algumas modalidades o adjuvante é um fator de crescimento hematopoiético como GM-CSF. Exemplos co-

muns de adjuvantes incluem, porém não são limitados a, fosfato, óxido, hidróxido de alumínio, emulsão de óleo em água ou água em óleo baseado em, por exemplo, um óleo mineral, como Bayol Fo ou Marcol 52TM ou um óleo vegetal como acetato de vitamina E, saponinas, BCG, *M. vaccae*, toxóide de tétano, toxóide de difteria, *Bordetella pertussis*, interleucina 2, interleucina 12, interleucina 4, interleucina 7, Adjuvante de Freund completo, Adjuvante de Freund incompleto, e um adjuvante não específico. Vide, por exemplo, a patente US no. 6.699.483.

"Fatores de crescimento hematopoiéticos" ou "HGFs" são conhecidos. Vide, por exemplo, a patente US no. 6.863.885. Em geral, HGFs são citocinas de glicoproteína que regulam a proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas. Os fatores de crescimento hematopoiético destinados a serem utilizados na presente invenção podem ser selecionados do grupo G-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócito), SCF (fator de célula-tronco), GM-CSF (fator de estimulação de colônia de macrófago de granulócito), IL-1 (interleucina-1), IL-3, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, LIF (fator inibidor de leucemia), FGF-beta (fator de crescimento de fibroblasto beta), FLT3, ou uma combinação dos mesmos. Esses fatores de crescimento podem ser adquiridos (por exemplo, R&D Systems, Minneapolis, MN) ou feitos seguindo procedimentos expostos na técnica genericamente e em publicações descrevendo os fatores. Adicionalmente, o fator de crescimento hematopoiético pode ser uma forma modificada do fator ou uma proteína de fusão de fatores de crescimento he-

matopoiético selecionados do grupo GCSF, SCF, GM-CSF, IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, LIF, FGF-beta, e FLTS. HGFs incluem fatores de crescimento modificados (por exemplo, mu-teínas) e proteínas de fusão, que podem ser feitas de acordo
5 com métodos conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, (Sam-brook e outros, Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). Fatores de crescimento heamotopoiético que es-timulam função de macrófago como GM-CSF são particularmente
10 preferidos. Esses podem ser utilizados como adjuvantes.

"Radioterapia de feixe externo" pode ser realizada por fornecimento de um feixe de raios-x de energia elevada ao local do tumor do paciente. O feixe é gerado fora do pa-ciente e é alvejado no sítio do tumor. Nenhuma fonte radioa-
15 tiva é colocada dentro do corpo do paciente. Isso pode ser utilizado em combinação com qualquer outra etapa de trata-mento, de acordo com a invenção.

"Tratar" como utilizado aqui, se refere a qualquer tipo de tratamento ou prevenção que transmite um benefício a
20 um sujeito afligido com uma doença ou em risco de desenvol-ver a doença, incluindo melhora na condição do sujeito (por exemplo, em um ou mais sintomas), retardo no avanço da doen-ça, retardo no início de sintomas ou diminuição do avanço dos sintomas, etc. Como tal, o termo "tratamento" também in-
25 clui tratamento profilático do sujeito para evitar o início de sintomas.

Como utilizado aqui, "tratamento" e "prevenção" não pretendem envolver cura ou total remoção de sintomas. Em vez

disso, esses se referem a qualquer tipo de tratamento que transmite benefício para um paciente afligido com uma doença, incluindo melhora na condição do paciente (Por exemplo, em um ou mais sintomas), retardo no avanço da doença, etc.

5 "Quantidade eficaz de tratamento", como utilizado aqui, significa uma quantidade do anticorpo suficiente para produzir um efeito desejável sobre um paciente infligido com câncer como glioblastoma, incluindo melhora na condição do paciente (por exemplo, em um ou mais sintomas), retardo no
10 avanço da doença, etc.

Sujeitos necessitando de tratamento pelos métodos descritos aqui incluem sujeitos afligidos com glioblastoma ou astrocitoma, bem como sujeitos afligidos com outros tumores sólidos ou cânceres como de pulmão, cólon, mama, cérebro, fígado, próstata, baço, músculo, ovário, pâncreas, cabeça e pescoço, pele (incluindo melanoma), etc. Sujeitos necessitando de tratamento particularmente incluem sujeitos
15 afligidos com um tumor, como um tumor de cérebro, que expressa EGFRvIII. O tumor pode ser um tumor primário, um tumor metastático, ou um tumor recorrente. Sujeitos a serem
20 tratados pelos métodos da invenção incluem, particularmente, sujeitos afligidos com um tumor expressando EGFRvIII, incluindo gliomas, fibrosarcomas, osteosarcomas, melanoma, tumor Wilms, carcinoma de cólon, carcinomas mamário e de pulmão, e
25 carcinomas escamosos. Sujeitos a serem tratados pela presente invenção incluem, mais particularmente, sujeitos afligidos com tumores ou cânceres de cérebro, como glioblastoma,

cálcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanol amina, etc.

As composições e métodos da invenção podem incluir a administração de um ou mais coadjuvantes. Coadjuvantes apropriados incluem, porém não são limitados a: 1) sais de alumínio (alum), como hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio, etc.; (2) formulações de emulsão de óleo em água (com ou sem outros agentes imunoestimuladores específicos como peptídeos de muramila (vide abaixo) ou componentes de parede de célula bacteriana), como por exemplo (a) MF59 (PCT publicação no. WO 90/14837), contendo 5% de Squalene, 0,5% Tween 80 e 0,5% Span 85 formulado em partículas de sub-micron, (b) SAF, contendo 10% de Squalene, 0,4% Tween 80, 5% polímero bloqueado plurônico L121, e thr-MDP (vide abaixo) microfluidizado em uma emulsão de sub-micron ou submetido a vórtice para gerar uma emulsão de tamanho de partícula maior, e (c) sistema adjuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) contendo 2% Squalene, 0,2% Tween 80, e um ou mais componentes de parede de célula bacteriana a partir do grupo que consiste em monofosforilídeo A (MPL), dimicolato de trealose (TDM), e esqueleto de parede de célula (CWS), preferivelmente MPL+CWS (Detox™) (para uma discussão adicional de emulsões de óleo em água de sub-micron apropriadas para uso na presente invenção, vide a publicação PCT número WO 99/30739, publicada em 24 de junho de 1999); (3) adjuvantes de saponina, como Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) pode ser utilizado ou partícula gerada a partir dos mesmos como ISCOMs (complexos i-

particularmente glioblastoma multiforme, e astrocitoma cístico.

A presente invenção diz respeito principalmente ao tratamento de sujeitos humanos, incluindo sujeitos do sexo
5 masculino e feminino e sujeitos neonatais, crianças pequenas, juvenis, adolescentes, adultos e geriátricos, porém a invenção pode ser também realizada em sujeitos animais, particularmente sujeitos mamíferos como camundongos, ratos, cães, gatos, animais domésticos e cavalos para fins veterinários, e para fins de desenvolvimento de droga e classificação de droga.
10

As composições farmacêuticas da invenção podem ser preparadas de acordo com técnicas conhecidas. Tipicamente, os agentes ativos são incluídos em um veículo farmacêuticamente aceitável. Uma variedade de veículos aquosos pode ser
15 utilizada, por exemplo, água, água tamponada, solução salina a 0,9%, glicina a 0,3%, ácido hialurônico e similares. Essas composições podem ser esterilizadas por técnicas de esterilização bem conhecidas, convencionais, ou podem ser filtradas estéreis. As soluções aquosas resultantes podem ser embaladas para uso como se encontram, ou liofilizadas, o preparado liofilizado sendo combinação com uma solução estéril antes da administração. As composições podem conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis como necessário
20 para se aproximar a condições fisiológicas, como agentes de tamponamento, agentes de ajuste de tonicidade, agentes umectantes e similares, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de
25

munoestimuladores); (4) Adjuvante de Freund completo (CF A) e Adjuvante de Freund Incompleta (IF A); (5) citocinas, como interleucinas (IL-1, IL-2, etc.), fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF), fator de necrose de tumor (TNF), etc.; (6) mutantes detoxificados de uma toxina de ribosilação ADP bacteriana como toxina de cólera (CT), toxina de pertussis (PT), ou uma toxina instável a calor *E. coli* (LT), particularmente LT-K63 (onde lisina é substituída para o aminoácido do tipo selvagem na posição 63) LT-R72 (onde arginina é substituída para o aminoácido do tipo selvagem na posição 72), CT-SI09 (onde serina é substituída para o aminoácido do tipo selvagem na posição 109), adjuvantes derivadas a partir da família CpG de moléculas, dinucleotídeos de CpG e oligonucleotídeos sintéticos que compreendem motivos CpG (vide, por exemplo, Krieg e outros, *Nature*, 374:546 (1995) e Davis e outros, *J. Immunol.*, 160:870-876 (1998)) e PT-K9/GI29 (onde lisina é substituída para o aminoácido do tipo selvagem na posição 9 e glicina substituída na posição 129) (vide, por exemplo, PCT publicação nos. WO93/13202 e WO92/19265); (7) outras substâncias que atuam como agentes imunoestimuladores para aumentar a eficácia da composição. Vide, por exemplo, patente US no. 6.534.064; e (8) outros ligandos para receptores semelhantes a Toll além de adjuvantes RIBI e CpG, como flagellin bacteriana (um adjuvante eficaz para células CD4⁺ T; vide *J. Immunol.* 169: 3914-9 (outubro de 2002)).

Os agentes ativos podem ser administrados por qualquer procedimento medicamente apropriado, por exemplo, admi-

nistração intravenosa ou intra-arterial normal, injeção no fluido cerebrospinal). Em certos casos, administração intradérmica, intracavidade, intratecal ou direta no tumor ou em uma artéria que abastece o tumor é vantajosa. Onde o tumor ou uma porção do mesmo foi anteriormente removida cirurgicamente os agentes de tratamento podem ser administrados podem ser administrados no sítio do tumor (e particularmente em uma cavidade encerrada ou "cavidade de ressecção" no sítio do tumor) por injeção direta ou através de um reservatório pré-implantado.

A dosagem dos agentes ativos dependerá, entre outras coisas, a condição do sujeito, a categoria específica ou tipo de câncer sendo tratado, a via de administração, a natureza do agente terapêutico empregado, e a sensibilidade do tumor ao agente terapêutico específico.

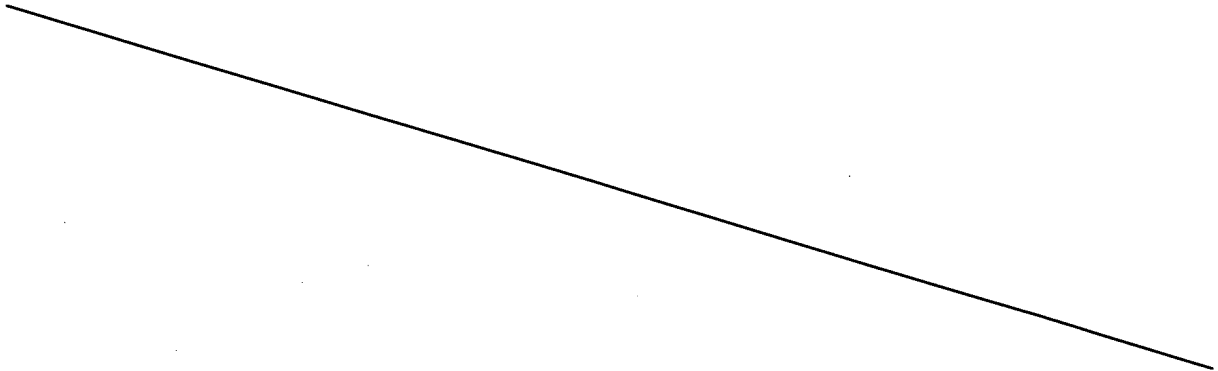
Em geral, a dose do antígeno ou vacina do tumor, como EGFRvIII, incluindo qualquer proteína portadora ou peptídeo conjugado com a mesma, será de 10, 100, ou 500 µg até 2 ou 3 mg por sujeito, para cada dose. Doses podem ser ministradas em uma ocasião única, opcionalmente incluindo doses de acompanhamento ou "reforço" (por exemplo, uma, duas ou três doses de acompanhamento ou "reforço" ministradas em intervalos a partir de uma a três semanas). Observe que doses podem ser divididas como administração em sítios de injeção diferentes, para reduzir efeitos colaterais como respostas locais, se desejado. Onde as formulações contêm tanto antígeno de tumor ligado (ou "conjugado") com a proteína portadora e antígeno de tumor livre da proteína portadora, a do-

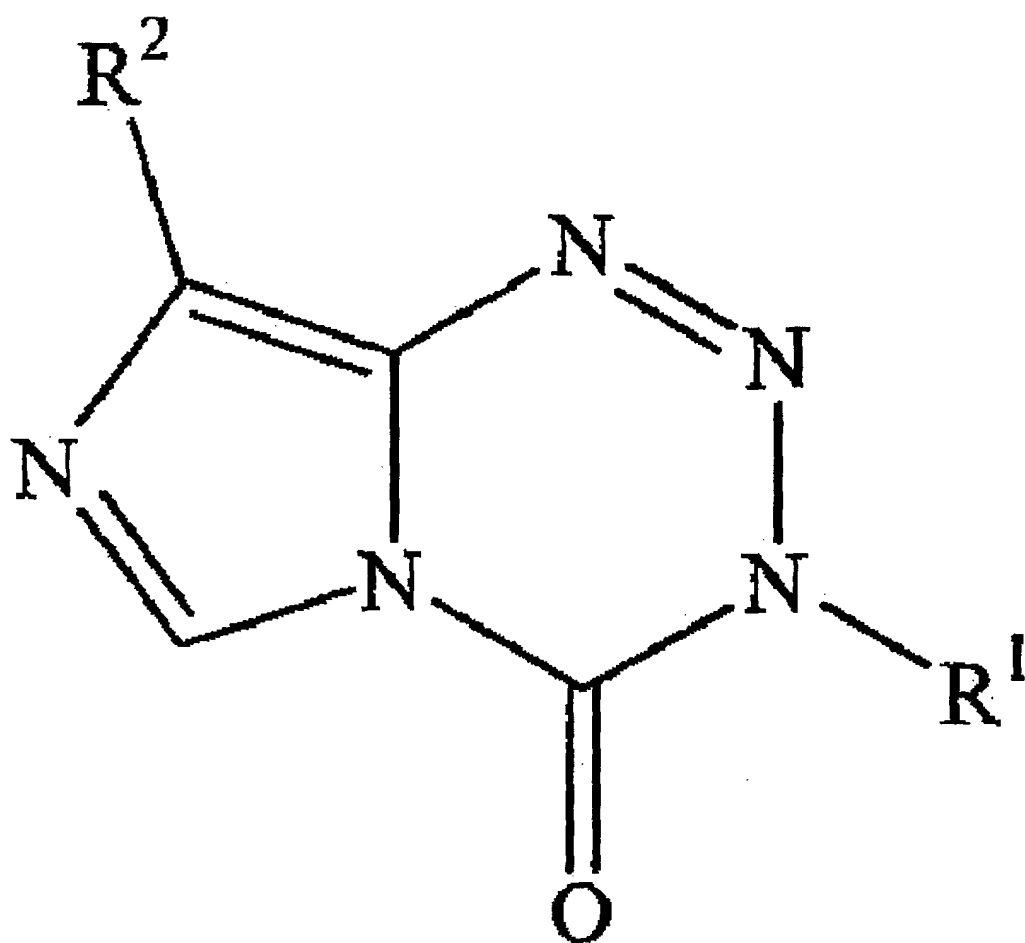
sagem calculada pode incluir tanto a quantidade de antígeno de tumor tanto ligado como livre e proteína portadora.

Em geral, a dose do adjuvante como GM-CSF será também de 10 ou 20 µg até 500 µg, ou 1 a 2 mg por sujeito, administrado no mesmo programa ou programa diferente a partir da dose do antígeno de tumor. Quando administrado no mesmo programa o adjuvante pode ser administrado no mesmo veículo que o antígeno de tumor. Quando não combinado no mesmo veículo, a dose de adjuvante necessita somente ser administrada suficientemente próxima em tempo à dose do antígeno de tumor para aumentar a eficácia do mesmo (por exemplo, em uma ou duas horas; no mesmo dia, etc.).

Agentes de alquilação úteis para realizar a presente invenção incluem, (porém não são limitados a), 1,3-bis (2-cloroetil)-1-nitrosouréia (BCNU) e derivados de tetrazina, particularmente derivados de [3H]imidazo[5,1-d] 1,2,3,5-tetrazina-4ona, como temozolomide e análogos dos mesmos (incluindo sais farmaceuticamente aceitáveis e pró-medicamentos dos mesmos). Tais compostos são conhecidos. Vide, por exemplo, as patentes US nos. 6.096.724; 6.844.434; e 5.260.291. Os exemplos de agentes de alquilação úteis para realizar a presente invenção incluem agentes de alquilação de [3H]imidazo[5,1-d] -1,2,3,5-tetrazina-4-ona, particularmente aqueles da fórmula geral:

25





Onde R^1 representa um átomo de hidrogênio, ou um grupo de alquila, alquênica ou alquínica de cadeia reta ou ramificada contendo até 6 átomos de carbono, cada tal grupo sendo não substituído ou substituído por de um a três substituintes selecionados entre átomos de halogênio (isto é, bromo, iodo ou, preferivelmente, cloro ou flúor), grupos alcóxi, (por exemplo metóxi), alquiltio, alquil sulfinila e alquil sulfoxila de cadeia reta ou ramificada contendo até 4 átomos de carbono, e grupos fenila opcionalmente substituídos, ou R^1 representa um grupo de cicloalquila, e R^2 representa um grupo de carbamoila que pode carregar o átomo de nitrogênio um ou dois grupos selecionados entre grupos de alquila e alquênica de cadeia reta e ramificada, cada um contendo até 4 á-

tomos de carbono, e grupos de cicloalquila, por exemplo, grupo de metil carbamoíla ou dimetil carbamoíla. Quando o símbolo R^1 representa um grupo de alquila, alquenila ou alquinila substituído por dois ou três átomos de halogênio, os átomos de halogênio acima mencionados podem ser iguais ou diferentes. Quando o símbolo R^1 representa um grupo de alquila, alquenila ou alquinila substituído por um, dois ou três grupos de fenila opcionalmente substituídos os substituintes opcionais no(s) radical(is) de fenila podem ser selecionados, por exemplo, entre grupos alcóxi e alquila contendo até 4 átomos de carbono (por exemplo, grupo(s) metóxi e/ou metila)) e o grupo nitro; o símbolo R^1 pode representar, por exemplo, um grupo benzila ou p-metóxi benzila. Grupos de cicloalquila compreendidos nas definições de símbolos R^1 e R^2 contêm 3 a 8, preferivelmente 6, átomos de carbono. Os compostos podem ser fornecidos como sais ou pró-medicamentos, particularmente sais de metal alcalino quando R^1 é H. Vide, por exemplo, a patente US no. 5.260.291.

Temozolomide, em forma de dosagem oral como cápsulas de 5 mg, 20 mg, 100 mg e 250 mg, é comercialmente disponível como TEMODAR™ a partir da Schering Corporation, Kenilworth NJ 07033, EUA.

5 Agentes de alquilação podem ser preparados em formulações farmaceuticamente aceitáveis no modo similar como descrito acima, na formulação igual ou diferente que contém a vacina de tumor, por exemplo, peptídeo EGFRvIII.

10 Em uma modalidade preferida, o agente de alquilação é administrado em um ciclo de doses diárias por 3, 4, 5, 6 ou

7 dias consecutivos. Uma dose diária apropriada pode ser de 50, 100 ou 150 mg/m²/dose, até 200, 250 ou 300 mg/m²/dose. Esse ciclo pode ser repetido, por exemplo, a cada duas, três, quatro ou cinco semanas, por até um total de 6, 8 ou 10 ciclos. A primeira dose no primeiro ciclo de agente de alquilação pode ser administrada em qualquer ponto apropriado em tempo. Em algumas modalidades a primeira dose do agente de alquilação é administrada até duas ou quatro semanas antes da administração do anticorpo terapêutico; em algumas modalidades a primeira dose de agente de alquilação é administrada pelo menos duas, quatro ou seis semanas após a administração do anticorpo terapêutico. Programas adicionais de administração podem ser incluídos onde tratamentos terapêuticos adicionais como radioterapia de feixe externo também são aplicados ao sujeito.

Opcionalmente, o sujeito também pode receber radioterapia de feixe externo. Por exemplo, radioterapia de feixe externo pode ser utilizada para tumores de cérebro como glioblastoma. Radioterapia de feixe externo é conhecida e pode ser realizada de acordo com técnicas conhecidas. O feixe pode ser gerado por qualquer meio apropriado, incluindo aceleradores lineares médicos e unidades de feixe externo Cobalt 60. A fonte de radiação pode ser montada em uma ponte que gira em torno do paciente de modo que uma área alvo dentro do paciente seja irradiada a partir de direções diferentes. Antes da irradiação o tratamento é tipicamente planejado em um computador utilizando algoritmos que simulam os feixes de radiação e permitem que o pessoal médico projete a terapia

de feixe. Inúmeras variações de terapia de feixe externo que podem ser utilizadas para realizar a presente invenção serão prontamente evidentes para aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, patentes US nos. 6.882.702; 6.879.659; 5 6.865.253; 6.863.704; 6.826.254; 6.792.074; 6.714.620; e 5.528.650.

A terapia de feixe externo é preferivelmente administrada em uma série de sessões de acordo com técnicas conhecidas, com as sessões iniciando preferivelmente duas a quatro 10 semanas após administração do anticorpo terapêutico. Por exemplo, a radioterapia de feixe externo pode ser administrada 3, 4, 5, 6 ou 7 dias por semana, durante um período de quatro, cinco, seis ou sete semanas, em uma dose diária de 0,5 ou 1 Gy, até 2 ou 3 Gy, até a dose desejada total (por 15 exemplo, 30 ou 40 Gy, até 50 ou 60 Gy) ser administrada.

A dose fornecida pode ser em uma área incluindo uma margem de tecido normal (por exemplo, ~1, 2 ou 3 cm de margem em todas as direções) em torno do tumor, ou onde o tumor ou uma porção do mesmo foi previamente cirurgicamente removido, 20 em torno do sítio do tumor.

Onde a radioterapia de feixe externo é empregada, o paciente pode receber um programa adicional de administração de agente quimioterapêutico, diferente daquele descrito acima, em uma dose de um certo modo mais baixa, durante o curso 25 da radioterapia. Por exemplo, o paciente pode receber doses diárias de agente quimioterapêutico, por exemplo, agente de alquilação em uma quantidade de 25 ou 50 mg/m²/dose até 100

ou 125 mg/m²/dose diariamente durante o curso da terapia de feixe externo.

Os exemplos de antígenos de tumor que podem ser utilizados como vacinas antitumor incluem, porém não são limitados a, cinase 4 dependente de ciclina; β -catenina; Caspase-8; MAGE-1; MAGE-3; Tirosinase; Idiotipo Ig de superfície; Receptor Her-2/neu; MUC-1; HPV E6 e E7; Idiotipo CD5 CAMPATH-1, CD20; glicoproteína de superfície de célula CEA, mucin-1; carboidrato de superfície de célula Lewis^x; CA-125; 10 receptor de fator de crescimento epidérmico; p185HER2; IL-2R; FAP-a; Tenascina; e metaloproteinases. EGFRvIII é exemplar de antígenos específicos de tumor. Células que expressam esses antígenos podem ser utilizadas como vacinas. Preferivelmente, as células são mortas antes da administração. 15 As células podem ser fracionadas de modo que uma fração enriquecida para o antígeno de tumor seja utilizada como uma vacina. Esses antígenos são simplesmente exemplares e não pretendem ser abrangentes dos muitos antígenos úteis conhecidos na técnica ou que podem ser utilizados.

20 Múltiplos sistemas de modelo pré-clínico demonstraram que o esgotamento de subconjuntos de células imunes pode abrogar a eficácia de vários tipos de abordagens imunoterapêuticas (Heimberger e outros, 2003) indicando que quimioterapia administrada durante os estágios efetores de imunoterapia 25 pia pode ser prejudicial à eficácia. Entretanto, isso não impede a utilização desses agentes juntos quando apropriadamente regulados para minimizar os efeitos cima mencionados. Além disso, embora os requerentes não desejem ser limitados

por nenhuma teoria específica referente ao mecanismo de ação, a depleção de certas células efectoras, como Tregs, pode ser um resultado altamente desejável de quimioterapia fornecendo maior eficácia imunoterapêutica ou pode promover um perfil de citocina desejável para controle adequado do tumor.

A revelação acima descreve genericamente a presente invenção. Todas as referências reveladas aqui são expressamente incorporadas a título de referência. Uma compreensão mais completa pode ser obtida por referência aos seguintes exemplos específicos que são fornecidos aqui para fins de ilustração somente, e não pretendem limitar o escopo da invenção.

EXEMPLO 1

Para testar a hipótese de que quimioterapia e imunoterapia podem ser administradas simultaneamente, tratou-se um paciente com um GBM recentemente diagnosticado utilizando o padrão de cuidado, temozolomide, enquanto também administra uma vacina de peptídeo alvejando a variante de fator de crescimento epidérmico III (EGFRvIII) (Heimberger e outros, 2006). A amplificação do gene de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), que resulta em superexpressão do EGFR, um receptor de cinase tirosina de transmembrana (Eks-trand e outros, 1991) é associada ao gene EGFR mutante, EGFRvIII (Wikstrand e outros, 1997). Trabalho anterior mostrou que a amplificação de EGFRvIII é evidente em todos os GBMs expressando EGFRvIII (Heimberger e outros, 2005) e GBMs sem

o EGFR amplificado não são positivos para proteína EGFRvIII (Aldape e outros, 2004).

Em maio de 2005, um homem caucasiano com 51 anos de idade foi avaliado após queixas de um histórico de três se-
5 manas de dores de cabeça matutinas persistentes sem náusea associada. Uma imagem de ressonância magnética (MR) revelou uma lesão de aumento irregular, multi-lobular medindo 6,6 x 5,3 x 4,3 no aspecto anterior do lobo temporal direito. A fissura de Sylvius foi arqueada para cima e havia 6 mm de
10 deslocamento de linha média. O paciente foi submetido a uma ressecção total grossa, com histologia demonstrando um glioblastoma bifásico e sarcoma maligno. Esses componentes foram confirmados por imunoistoquímica positiva no componente de glioblastoma com proteína astrocítica glial-fibrilar (GFAP)
15 e produção abundante de reticulina no componente de sarcoma. Uma mancha de tricromo confirmou a natureza bifásica do tumor. Coloração de imunoistoquímica de anticorpo EGFRvIII e EGFR-528 foi positiva (Heimberger e outros, 2005) com a coloração EGFRvIII demonstrando forte reatividade difusa, en-
20 quanto a coloração EGFR-528 era mais focal. PTEN foi fortemente positivo e reatividade p53 estava presente em mais de 30% de núcleos de tumor. O gene de reparo de DNA metiltransferase (MGMT) de metilguanina-DNA foi metilado (Hegi e outros, 2005).

25 Pós-operatoriamente o paciente foi submetido à radioterapia de feixe externo convencional de 6000 cGy em 30 frações. Temozolomide simultâneo a 75 mg/m² foi administrado durante radioterapia (Stupp e outros, 2005). Uma imagem MR

feita ao término da radioterapia estava inalterada e não demonstrou evidência de avanço. O paciente foi submetido então a uma leucaferese para obter células suficientes para fins de monitoração imunológica. O paciente recebeu três injeções
 5 intradérmicas (i.d.) de PEPvIII-3 (LEEKKGNVVTDHC), conjugado com hemocianina de molusco de buraco de fechadura (KLH) em uma razão de 1:1 (peso/peso) (PEPvIII-KLH) (500 µg/imunização) com fator de estimulação de colônia de macrófago-granulócito (GM-CSF) (142 µg/imunização) a cada duas
 10 semanas durante um intervalo de 6 semanas (a fase de indução). Posteriormente, foi submetido a uma segunda leucaferese para fins de monitoração imunológica. Nesse ponto, o paciente começou ciclos de manutenção de temozolomide de 150 mg/m² no dia 1-5. Iniciando no dia 19 de cada ciclo, contagens completas de sangue foram monitoradas em dias alternados até que houve evidência de recuperação do nadir de contagem de Leucócito. Na recuperação nadir, o paciente recebeu
 15 a vacina i.d., normalmente no 23º dia (faixa = 19 - 25) de seu ciclo de 28 dias.

20 EXEMPLO 2

Teste de hipersensibilidade do tipo retardado (DTH) a antígenos de recall comuns e os componentes da vacina foram avaliados antes do início das vacinas, após a 3ª vacina e mensalmente durante seu ciclo de manutenção no 26º dia. Antes
 25 do início da vacina e após o término de radiação e temozolomide simultâneo o paciente era somente reativo a Cândida e não teve reação DTH aos componentes da vacina, PEPvIII ou KLH. Entretanto, após a 3ª vacinação, o paciente se tornou

responsivo ao componente KLH da vacina. Após a 10^a vacinação, e enquanto recebe temozolomide simultânea, ele se tornou reativo ao componente PEPvIII da vacina. Para comparação, dos pacientes que receberam a vacina sem temozolomide
5 ciclado (n=22), menos de 15% se tornou reativo ao componente PEPvIII. Após o acompanhamento mais recente e administração da 14^a vacinação, o paciente foi acentuadamente endurecido (16 x 15 mm) no sítio DTH PEPvIII. Isso indicaria que temozolomide não influenciou negativamente o desenvolvimento de
10 respostas de DTH nesse paciente específico.

EXEMPLO 3

Para determinar se respostas humorais específicas de PEPvIII foram induzidas, soro foi obtido a partir do paciente mensalmente e foi armazenado a -20°C antes da análise em
15 um ensaio PEPvIII-Dynabead®. PEPvIII ou o domínio extracelular de EGFRvIII (EGFRvIII-ECD) foi covalentemente ligado a microesferas magnéticas que foram utilizadas para capturar anticorpos específicos a partir do soro do paciente (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras de soro são inicialmente diluídas
20 1:10 com solução salina tamponada com fosfato (PBS) + 0,5% albumina de soro bovino (BSA) e ensaiadas em triplicata. Para determinar especificidade, um conjunto adicional de amostras foi pré-incubado por 15 minutos com 500 ng do peptídeo
25 PEPvIII para bloquear qualquer anti-PEPvIII que seria capturado pelas Dynabeads conjugadas com PEPvIII. Padrões de anticorpo anti-PEPvIII quimérico de humano-camundongo (81-0,11ng/ml) são feito com cada ensaio juntamente com contro-

les positivo (amostra de paciente ACT4) e negativos (soro de doador normal). O citômetro de fluxo foi padronizado com microcontas PE-FACS e Dynabeads PEPvIII não reagido. Antes da administração da vacina, não houve resposta humoral detectável ao EGFRvIII. Após a vacinação, houve um aumento significativo em respostas IgG a EGFRvIII a uma intensidade fluorescente média (MFI) de 13 e as respostas humorais foram mantidas apesar de administração de temozolomide.

EXEMPLO 4

Para determinar se respostas citotóxicas CD8⁺ foram induzidas a PEPvIII, as células mononucleares de sangue periférico do paciente (PBMCs) de cada leucaferese e PBMCs mensais foram estimuladas com toxóide de tétano (QYIKANSKFIGITE) (SEQ ID NO: 5) (10 µg/ml) (controle positivo), PEP-1 (HDTVYCVKGNKELE) (SEQ ID NO: 4) (10 µg/mL), (controle negativo), PEPvIII (10 µg/mL) (componente de vacina), ou KLH (10 µg/ml) (componente de vacina). Um controle negativo incluiu células não estimuladas. Os controles de isotipo correspondentes foram utilizados para cada condição, incluindo secreção γ -interferon (IFN). Todas as cavidades foram incubadas por 6 h a 37°C com Golgiplug/TM (Pharmingen, San Diego, CA), um inibidor de transporte de proteína que bloqueia o processo de transporte intracelular. Após incubação, as células foram lavadas e bloqueadas para ligação não específica utilizando anticorpo anti-CD16 purificado (Pharmingen) e soro de coelho (Pharmingen). As células foram coloridas para marcadores de superfície (CD3, CD4, CD8) por incubação com o isotiocianato de fluoresceína apropriado e

anticorpo primário rotulado de fluorescência rotulado com aloficocianina ou controle de isotipo (Pharmingen). As células foram então fixadas com Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, San Jose, CA) e então incubadas com anticorpo rotulado com fiocoeritrina contra γ -IFN ou o controle de isotipo. Após coloração, as células foram lavadas e um mínimo de 1×10^5 eventos gated, vivos foram avaliados por citometria de fluxo em um citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando software Cellquest (BD Immunocytometry systems, San Jose, CA).

Antes de receber a vacina o paciente teve resposta mínima nos controles não estimulados e com o controle negativo PEP-1. Após receber a vacina, e durante administração do temozolomide, houve um aumento em células CD8+ T que produzem γ -IFN específico de PEPvIII.

Exemplo 5

Para caracterizar a resposta das várias populações de células T durante um ciclo de temozolomide (5/21 programa) e vacina simultaneamente administrada (19° dia nesse exemplo), os requerentes obtiveram sangue periférico nos dias 0, 3, 5, 12, 19, 23, 25 e 26. Por citometria de análise de fluxo, investigaram a percentagem dos subconjuntos de célula CD8+ T e células T reguladoras CD4+CD25+DoxP3+ durante um ciclo de imunoterapia. Todos os anticorpos monoclonais conjugados com fluorescência (mAb) (PerCP-Cy5.5-CD3, FITC-CD8, APC-CD4 e PE-CD25) foram adquiridos da BD Biosciences exceto o mAb rotulado FITC de FoxP3 foi feito por eBioscience. A coloração intracelular e superficial de células de sangue periférico foi executada de acordo com os procedimentos pa-

drão fornecidos pelo fabricante. Os resultados foram analisados por citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando software Cellquest Pro (BD Biosciences). Em contraste com o declínio do subconjunto de células CD8⁺ T, a população Treg começou a
 5 aumentar após a administração de temozolomide por 3 dias e atingiu seu pico (0,9% de células CD4⁺ T total) no 12º dia. O Tregs começou então a cair até o 23º dia enquanto os números de célula CD8⁺ T começaram a se recuperar. Ao término do curso, as populações tanto de célula CD8⁺ T como Treg se re-
 10 cuperaram a níveis de pré-tratamento. A vacinação resultou em um reforço de células T citotóxicas CD8⁺ durante um período de Tregs relativamente diminuídos.

Exemplo 6

Durante os últimos 15 meses, o paciente foi submetido
 15 a exame físico completo e imageamento de MR do cérebro em intervalos de dois meses. Seu exame permaneceu estável e imageamento de MR falhou em demonstrar qualquer evidência de recorrência. Ele trabalha tempo integral sem impairment e tem um status de desempenho Karnofsky (KPS) de 100% e marca-
 20 ção de exame de estado mini-mental de 30/30. Seu exame neurológico é totalmente normal.

Esse relatório sugere que a administração simultânea de quimioterapia com imunoterapia pode ser possível se a cronometragem dos tratamentos for cuidadosamente monitorada.
 25 No caso relatado, há várias descobertas que indicam que a co-administração do temozolomide não afetou a eficácia da vacina PEPvIII-KLH. Primeiramente, o paciente não tem avanço em 15 meses de acompanhamento. Esse foi o TTP mediano para

pacientes (n=22) que receberam somente terapia de vacinação. Desse modo, a eficácia clínica não parece ter sido afetada em comparação com pacientes que não receberam a temozolomide simultaneamente administrada. O paciente desenvolveu respos-
5 tas de DTH ao componente de PEPvIII da vacina, mesmo enquan-
to recebe temozolomide, ao passo que somente 15% dos pacien-
tes que recebem a vacina somente desenvolveram esses tipos
de respostas. Além disso, a área de reatividade de DTH de
PEPvIII continuou a aumentar com vacinações subseqüentes. Em
10 terceiro lugar, as respostas específicas de IgG a PEPvIII
foram induzidas após a 3ª vacinação e foram mantidas enquan-
to recebe a temozolomide simultânea. Em quarto lugar, as cé-
lulas T que produzem CD3+CD8+ γ -IFN não parecem ser diminuí-
das durante os ciclos de temozolomide simultaneamente admi-
15 nistrada porém parecem aumentadas durante a temozolomide si-
multaneamente administrada. Finalmente, seguimos as popula-
ções de célula CD8+ T e Treg durante um único ciclo de tra-
tamento e verificamos que parece haver uma janela de capaci-
dade de resposta de efector T (célula T CD8 δ) com uma diminu-
20 ição relativa de Tregs. Desse modo, a administração simultâ-
nea de temozolomide e vacina não parece diminuir as respos-
tas imunes induzidas, no modo no qual descrevemos.

O uso de linfodepleção para aumentar as respostas i-
munológicas foi descrito em sistemas de modelo murino (Be-
25 renson e outros, 1975; Cheever e outros, 1980; North, 1982)
como em pacientes humanos com câncer (Dudley e outros, 2002;
Dudley e outros, 2005). Múltiplos mecanismos foram propostos
como sendo responsáveis por essas respostas antitumor aumen-

tadas. Linfodepleção pode remover competição na superfície de células que apresentam antígeno (Kedl e outros, 2000), aumentar a disponibilidade de citocinas como IL-7 e IL-15, que aumentam a atividade de células T (Gattinoni e outros, 2005) e esgotar Tregs inibidor imune (Anthony e outros, 2005). A quimioterapia poderia também aumentar potencialmente a capacidade de resposta imunológica pelo aumento de iniciação imune e apresentação (Nowak e outros, 2002), aumento de expressão de antígeno (Aquino e outros, 1998), e aumento de alvos para erradicação imune (Ciusani e outros, 2002). Quando uma vacinação é administrada durante o nadir de temozolomide, os requerentes levantaram a hipótese de que pode haver uma resposta efetora aumentada. Aquelas respostas efetoras podem ser secundárias a um retardo na recuperação de Tregs desse modo permitindo maior expansão clonotípica do que teria sido de outro modo vista sem temozolomide. Isso foi certamente observado durante um ciclo de quimioimunoterapia monitorado nesse paciente específico. O retardo de recuperação de Tregs em relação às células T efetoras não é surpreendente dados os papéis fisiológicos normais de respostas de células imunes. Para montar uma resposta imune, efetores T necessitariam se tornar ativados, proliferar e mediar sua resposta. Se isso permaneceu não verificado por mecanismos homeostáticos como Tregs, então a proliferação de célula T incrementaria sem diminuição. Portanto, o retardo de resposta Treg permitiria respostas imunes eficazes porém regulação/modulação descendente eventual dessa resposta.

Em conclusão, o relatório desse caso sugere que a co-administração de quimioterapia e imunoterapia não pode ser prejudicial.

Referências

5 A revelação de cada referência citada é expressamente incorporada aqui.

Hatano, M., J. Eguchi e outros (2005). "EphA2 as a glioma-associated antigen: a novel target for glioma vaccines." *Neoplasia* 7(8): 717-22.

10 Liu, G., J.S. Yu, e outros (2004). "AIM-2: a novel tumor antigen is expressed and presented by human glioma cells." *J Immunother* 27(3): 220-6.

15 Liu, M., B. Dai, e outros (2006). "FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells." *Can Res* 66(7): 3593-3602.

Xie, D., Y.X. Zeng, e outros (2006). "Expression of cytoplasmic and nuclear survivin in primary and secondary human glioblastoma." *Br J Cancer* 94(1): 108-114.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Sampson, John
Bigner, Darell
Heimberger, Amy
Mitchell, Duane

<120> IMUNOTERAPIA E QUIMIOTERAPIA SIMULTÂNEAS

<130> 000250.00039

<150> 60/732741

<151> 2005-11-02

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Ser
1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Cys
1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

His Asp Thr Val Tyr Cys Val Lys Gly Asn Lys Glu Leu Glu
1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
1 5 10

<210> 6

<211> 1210

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65 70 75 80
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp

405 410 415
 Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
 420 425 430
 His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
 435 440 445
 Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
 450 455 460
 Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
 465 470 475 480
 Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
 485 490 495
 Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
 500 505 510
 Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
 515 520 525
 Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
 530 535 540
 Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
 545 550 555 560
 Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
 565 570 575
 Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
 580 585 590
 Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
 595 600 605
 Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
 610 615 620
 Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
 625 630 635 640
 Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
 645 650 655
 Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
 660 665 670
 Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
 675 680 685
 Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
 690 695 700
 Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
 705 710 715 720
 Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
 725 730 735
 Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
 740 745 750
 Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
 755 760 765
 Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
 770 775 780
 Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
 785 790 795 800
 Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
 805 810 815
 Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
 820 825 830
 Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
 835 840 845
 Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
 850 855 860
 Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880
 Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu

		915					920					925			
Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr
	930					935					940				
Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met	Ile	Asp	Ala	Asp	Ser	Arg	Pro	Lys
945					950					955					960
Phe	Arg	Glu	Leu	Ile	Ile	Glu	Phe	Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln
				965					970					975	
Arg	Tyr	Leu	Val	Ile	Gln	Gly	Asp	Glu	Arg	Met	His	Leu	Pro	Ser	Pro
			980					985					990		
Thr	Asp	Ser	Asn	Phe	Tyr	Arg	Ala	Leu	Met	Asp	Glu	Glu	Asp	Met	Asp
		995					1000					1005			
Asp	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Glu	Tyr	Leu	Ile	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe
	1010					1015				1020					
Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala
1025					1030					1035					1040
Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Thr	Val	Ala	Cys	Ile	Asp	Arg	Asn	Gly	Leu	Gln
				1045					1050					1055	
Ser	Cys	Pro	Ile	Lys	Glu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asp
			1060					1065					1070		
Pro	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Asp	Ser	Ile	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	Pro
	1075					1080						1085			
Val	Pro	Glu	Tyr	Ile	Asn	Gln	Ser	Val	Pro	Lys	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser
	1090					1095					1100				
Val	Gln	Asn	Pro	Val	Tyr	His	Asn	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Ser
1105					1110					1115					1120
Arg	Asp	Pro	His	Tyr	Gln	Asp	Pro	His	Ser	Thr	Ala	Val	Gly	Asn	Pro
				1125					1130					1135	
Glu	Tyr	Leu	Asn	Thr	Val	Gln	Pro	Thr	Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Phe	Asp
			1140					1145					1150		
Ser	Pro	Ala	His	Trp	Ala	Gln	Lys	Gly	Ser	His	Gln	Ile	Ser	Leu	Asp
		1155					1160					1165			
Asn	Pro	Asp	Tyr	Gln	Gln	Asp	Phe	Phe	Pro	Lys	Glu	Ala	Lys	Pro	Asn
	1170					1175					1180				
Gly	Ile	Phe	Lys	Gly	Ser	Thr	Ala	Glu	Asn	Ala	Glu	Tyr	Leu	Arg	Val
1185					1190					1195					1200
Ala	Pro	Gln	Ser	Ser	Glu	Phe	Ile	Gly	Ala						
				1205					1210						

```
<210> 7
<211> 628
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 7															
Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Cys	Gln
			20					25					30		
Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	His	Phe
		35					40					45			
Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Asn
	50					55					60				
Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys
65					70					75					80
Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val
				85					90					95	
Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met	Tyr
			100					105					110		
Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn
		115					120					125			
Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu
	130					135					140				
His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu

145					150					155				160
Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn Met
				165					170					175
Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp Pro
			180					185					190	
Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys Gln
		195					200					205		
Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys Arg
	210					215					220			
Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly Cys
225					230					235				240
Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg Asp
				245					250					255
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn Pro
			260					265					270	
Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe Gly
	275						280					285		
Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp His
	290					295					300			
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu Glu
305					310					315				320
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys Val
				325					330					335
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile Asn
			340					345					350	
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly Asp
	355					360						365		
Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His Thr
	370					375					380			
Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys Glu
385					390					395				400
Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr Asp
			405						410					415
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr	Lys Gln
			420					425					430	
His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	Ser Leu
	435					440						445		
Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ile Ser
	450					455					460			
Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	Lys	Lys Leu
465					470					475				480
Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	Arg	Gly Glu
				485					490					495
Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	Cys	Ser Pro
			500					505					510	
Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	Cys	Arg Asn
		515					520					525		
Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	Leu	Glu Gly
	530					535					540			
Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	Cys	His Pro
545					550					555				560
Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Arg	Gly Pro
				565					570					575
Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Cys Val
			580					585					590	
Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Val Trp
		595					600					605		
Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	Pro	Asn Cys
	610					615					620			
Thr	Tyr	Gly	Ser											
625														

<211> 405
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	1
1				5					10						15	
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Cys	Gln	
			20					25					30			
Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	His	Phe	
		35					40					45				
Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Gly	Asn	
	50					55					60					
Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys	
65					70					75					80	
Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr	Val	
				85					90					95		
Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met	Tyr	
			100					105					110			
Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala	Asn	
		115					120					125				
Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile	Leu	
		130				135						140				
His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val	Glu	
145					150					155					160	
Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn	Met	
				165				170						175		
Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp	Pro	
			180					185						190		
Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys	Gln	
		195					200					205				
Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys	Arg	
		210				215						220				
Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly	Cys	
225					230					235					240	
Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg	Asp	
				245					250					255		
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn	Pro	
			260					265						270		
Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gly	
		275					280					285				
Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp	His	
		290				295						300				
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu	Glu	
305					310					315					320	
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys	Val	
				325					330					335		
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asn	
			340					345						350		
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Asp	
		355					360					365				
Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe	Thr	His	Thr	
		370				375					380					
Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu	
385					390					395					400	
Ile	Thr	Gly	Leu	Ser												
				405												

<210> 9
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met	Arg	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15
Ala	Leu	Cys	Pro	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Cys
		20						25					30	Gln
Gly	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Asp	His
		35					40					45		Phe
Leu	Ser	Leu	Gln	Arg	Met	Phe	Asn	Asn	Cys	Glu	Val	Val	Leu	Gly
	50					55					60			Asn
Leu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Val	Gln	Arg	Asn	Tyr	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu
65					70					75				Lys
Thr	Ile	Gln	Glu	Val	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Asn	Thr
				85					90					Val
Glu	Arg	Ile	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln	Ile	Ile	Arg	Gly	Asn	Met
			100					105					110	Tyr
Tyr	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ser	Asn	Tyr	Asp	Ala
		115					120						125	Asn
Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Met	Arg	Asn	Leu	Gln	Glu	Ile
	130					135					140			Leu
His	Gly	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Asn	Asn	Pro	Ala	Leu	Cys	Asn	Val
145					150					155				Glu
Ser	Ile	Gln	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Phe	Leu	Ser	Asn
				165					170					Met
Ser	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	His	Leu	Gly	Ser	Cys	Gln	Lys	Cys	Asp
			180					185					190	Pro
Ser	Cys	Pro	Asn	Gly	Ser	Cys	Trp	Gly	Ala	Gly	Glu	Glu	Asn	Cys
		195					200					205		Gln
Lys	Leu	Thr	Lys	Ile	Ile	Cys	Ala	Gln	Gln	Cys	Ser	Gly	Arg	Cys
	210					215					220			Arg
Gly	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp	Cys	Cys	His	Asn	Gln	Cys	Ala	Ala	Gly
225					230					235				Cys
Thr	Gly	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp	Cys	Leu	Val	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg
				245					250					Asp
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr	Asn
			260					265					270	Pro
Thr	Thr	Tyr	Gln	Met	Asp	Val	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Phe
		275					280					285		Gly
Ala	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val	Val	Thr	Asp
	290					295					300			His
Gly	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser	Tyr	Glu	Met	Glu
305					310					315				Glu
Asp	Gly	Val	Arg	Lys	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys
				325					330					Val
Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile
			340					345					350	Asn
Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly
		355					360					365		Asp
Leu	His	Ile												

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um peptídeo EGFRvIII e um agente quimioterapêutico que induz linfopenia, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento de um
5 tumor em um indivíduo.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente quimioterapêutico é um agente de alquilação.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1,
10 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo EGFRvIII é conjugado com hemocianina de molusco *Keyhole Limpet* (KLH).

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por compreender ainda GM-CSF como um adjuvante simultaneamente com o peptídeo EGFRvIII.

15 5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo EGFRvIII tem a sequência H-LEEKKGNYVVT DHS-OH (SEQ ID NO: 1).

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo EGFRvIII tem a sequência LEU-GLU-GLU-LYS-LYS-GLY-ASN-TYR-VAL-VAL-THR-ASP-HIS
20 (SEQ ID NO: 2).

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo EGFRvIII tem a sequência LEU-GLU-GLU-LYS-LYS-GLY-ASN-TYR-VAL-VAL-THR-ASP-HIS-
25 CYS (SEQ ID NO: 3) e em que KLH é conjugado com o resíduo CYS.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo EGFRvIII é conjugado com o KLH com um reticulador heterobifuncional.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que o reticulador heterobifuncional é sulfosuccinimidil 6-[3' (2-piridilditio)-propionamido] hexanoato.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de alquilação é temozolomida ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. **10**

11. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um glioma maligno.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um astrocitoma.

15 13. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente quimioterapêutico é um análogo de purina.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente quimioterapêutico é fludarabina e/ou 2-clorodeoxi adenosina. **20**

15. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de pulmão.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de mama.

25 17. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um câncer de cabeça e pescoço.

18. Uso de um peptídeo EGFRvIII, o peptídeo EGFRvIII conjugado com KLH; GM-CSF como adjuvante simultaneamente com o peptídeo EGFRvIII; e um agente de alquilação, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento de um tumor em um indivíduo.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um glioma maligno.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um astrocitoma.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de pulmão.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de mama.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de alquilação é temozolomida ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um câncer de cabeça e pescoço.

25. Uso de uma vacina antitumor e temozolomida ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento de um tumor em um indivíduo.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a vacina antitumor compreende um antígeno isolado.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a vacina antitumor compreende células de tumor exterminadas.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que a vacina antitumor compreende uma fração de células de tumor.

29. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a vacina antitumor compreende um antígeno selecionado do grupo que consiste em quinase 4
10 dependente de ciclina; β -catenina; Caspase-8; MAGE-1; MAGE-3; Tirosinase; Idiótipo Ig de superfície; Receptor Her-2/neu; MUC-1; HPV E6 e E7; Idiótipo CD5 CAMPATH-1, CD20; glicoproteína de superfície de célula CEA, mucina-1; carboi-
drato de superfície de célula Lewis^x; CA-125; receptor de
15 fator de crescimento epidérmico; p185HER2; IL-2R; FAP- α ; Tenascina; EphA2, FoxM1B, AIM-2, survivina, e uma metaloproteínase.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que GM-CSF é administrado como
20 adjuvante simultaneamente com peptídeo EGFRvIII.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um glioma maligno.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um astrocitoma.

25 33. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de pulmão.

34. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de mama.

35. Uso, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de cabeça e pescoço.

36. Uso de uma vacina antitumor e um agente quimioterapêutico que induz linfopenia, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento de um tumor em um indivíduo.

37. Uso, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente quimioterapêutico é um agente de alquilação.

38. Uso, de acordo com a reivindicação 37, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de alquilação é temozolomida ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

39. Uso, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um glioma maligno.

40. Uso, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um astrocitoma.

41. Uso, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de pulmão.

42. Uso, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o tumor é um tumor de mama.

43. Uso, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a vacina antitumor compreende um antígeno selecionado do grupo que consiste em quinase 4 dependente de ciclina; β -catenina; Caspase-8; MAGE-1; MAGE-3; Tirosinase; Idiótipo Ig de superfície; Receptor Her-2/neu; MUC-1; HPV E6 e E7; Idiótipo CD5 CAMPATH-1, CD20; glicoproteína de superfície de célula CEA, mucina-1; carboi-

drato de superfície de célula Lewis^x; CA-125; receptor de fator de crescimento epidérmico; p185HER2; IL-2R; FAP- α ; Tenascina; EphA2, FoxM1B, AIM-2, survivina, e uma metaloproteínase.

RESUMO

"USO DE PEPTÍDEO EGFRvIII E VACINA ANTITUMOR EM COMBINAÇÃO COM OUTROS COMPONENTES PARA O TRATAMENTO DE TUMOR"

A administração simultânea de quimioterapia e imunoterapia foi considerada uma contra-indicação devido à preocupação de que a linfopenia induzida removeria a eficácia terapêutica de imunoterapia. Temozolomida foi mostrado como sendo um quimioterapêutico eficaz para pacientes com gliomas malignos e privar pacientes com glioblastoma (GBM) desse agente para tratar com imunoterapia é controverso. Apesar do dogma convencional, foi demonstrado que tanto quimioterapia como imunoterapia podem ser fornecidas simultaneamente sem negar os efeitos de imunoterapia, na realidade, a linfopenia induzida por temozolomida pode ser sinergista com uma vacina de peptídeo.