



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021008283-2 A2



(22) Data do Depósito: 29/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 14/09/2021

(54) **Título:** MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA QUIMIORREFRATÁRIA EM UM PACIENTE, E MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE SERIA UM RESPONDEDOR ADEQUADO AO USO DE UMA MOLÉCULA BIESPECÍFICA CD123 x CD3 PARA TRATAR UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA

(51) **Int. Cl.:** A61P 31/00; C07D 417/14.

(30) **Prioridade Unionista:** 19/11/2018 US 62/769,078; 25/07/2019 US 62/878,368; 30/10/2018 US 62/752,659.

(71) **Depositante(es):** MACROGENICS, INC.; NANOSTRING TECHNOLOGIES, INC.; NOTTINGHAM TRENT UNIVERSITY.

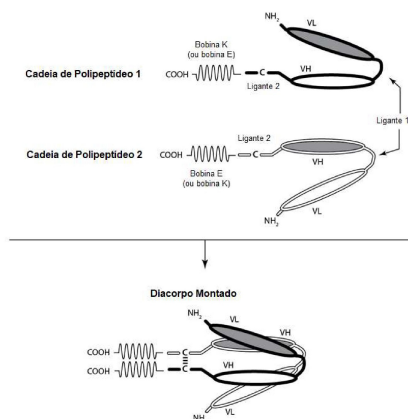
(72) **Inventor(es):** JAN KENNETH DAVIDSON; SARA CHURCH; SERGIO RUTELLA.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019058616 de 29/10/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/092404 de 07/05/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 29/04/2021

(57) **Resumo:** MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA QUIMIORREFRATÁRIA EM UM PACIENTE, E MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE SERIA UM RESPONDEDOR ADEQUADO AO USO DE UMA MOLÉCULA BIESPECÍFICA CD123 x CD3 PARA TRATAR UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA. A presente invenção refere-se a um método de tratamento de uma malignidade hematológica, como leucemia mieloide aguda (AML) ou síndrome mielodisplásica (MDS), incluindo doenças malignas hematológicas que são refrativas a agentes quimioterápicos e/ou hipometilantes. O método diz respeito à administração de uma molécula de ligação biespecífica CD123 x CD3 a um paciente em uma quantidade eficaz para estimular a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente. A presente invenção refere-se adicionalmente à modalidade de tal método em que uma amostra celular do paciente evidencia uma expressão de um ou mais genes-alvo que é aumentada em relação a um nível de linha de base de expressão de tais genes, por exemplo, um nível de linha de base de expressão de tais genes em uma população de referência de indivíduos que sofre de malignidade hematológica ou com relação ao nível de expressão de um gene de referência.



MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA QUIMIORREFRATÁRIA EM UM PACIENTE, E MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE SERIA UM RESPONDEDOR ADEQUADO AO USO DE UMA MOLÉCULA BIESPECÍFICA CD123 x CD3 PARA TRATAR UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA

REFERÊNCIAS CRUZADAS A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica a prioridade sobre os pedidos de patente números de série U.S. 62/878.368 (depositado em 25 de julho de 2019; pendente), 62/769.078 (depositado em 19 de novembro de 2018; pendente) e 62/752.659 (depositado em 30 de outubro de 2018; pendente), cada um dos quais pedidos são incorporados no presente documento por referência em sua totalidade.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[002] Este pedido inclui uma ou mais Listagens de Sequência de acordo com 37 C.F.R. 1.821 et seq., que são reveladas em mídia legível por computador (nome do arquivo: 1301_0161PCT_ST25.txt, criado em 26 de setembro de 2019, e que tem um tamanho de 31.244 bytes), cujo arquivo é incorporado no presente documento por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção refere-se a um método de tratamento de uma malignidade hematológica, como leucemia mieloide aguda (AML) ou síndrome mielodisplásica (MDS), incluindo doenças malignas hematológicas que são refrativas a agentes quimioterápicos e/ou hipometilantes. O método diz respeito à administração de uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** a um paciente em uma quantidade eficaz para estimular a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente. A presente invenção refere-se

adicionalmente à modalidade de tal método em que uma amostra celular do paciente evidencia uma expressão de um ou mais genes-alvo que é aumentada em relação a um nível de linha de base de expressão de tais genes, por exemplo, um nível de linha de base de expressão de tais genes em uma população de referência de indivíduos que sofre de malignidade hematológica ou com relação ao nível de expressão de um gene de referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

I. CD123

[004] CD123 (receptor alfa de interleucina 3, IL-3Ra) é uma molécula de 40 kDa e faz parte do complexo de receptor de interleucina 3 (Stomski, F.C. et al. (1996) "*Human Interleukin-3 (IL-3) Induces Disulfide-Linked IL-3 Receptor Alpha- And Beta-Chain Heterodimerization, Which Is Required For Receptor Activation But Not High-Affinity Binding,*" Mol. Cell. Biol. 16(6):3035-3046). A interleucina 3 (IL-3) conduz a diferenciação precoce de células-tronco multipotentes em células dos progenitores eritroides, mieloides e linfoides. CD123 é expressado em progenitores comprometidos CD34+ (Taussig, D.C. et al. (2005) "*Hematopoietic Stem Cells Express Multiple Myeloid Markers: Implications For The Origin And Targeted Therapy Of Acute Myeloid Leukemia,*" Blood 106:4086-4092), mas não por células-tronco hematopoiéticas normais CD34+/CD38-. O CD123 é expresso por basófilos, mastócitos, células dendríticas plasmocitoides, alguma expressão por monócitos, macrófagos e eosinófilos e baixa ou nenhuma expressão por neutrófilos e megacariócitos. Alguns tecidos não hematopoiéticos (placenta, células de Leydig do testículo, certos elementos das células cerebrais e algumas células endoteliais) expressam CD123; no entanto, a expressão é

principalmente citoplasmática.

[005] O CD123 é relatado como sendo expresso por blastos leucêmicos e células-tronco de leucemia (**LSC**) (Jordan, C.T. et al. (2000) "*The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells,*" *Leukemia* 14:1777-1784; Jin, W. et al. (2009) "*Regulation Of Th17 Cell Differentiation And EAE Induction By MAP3K NIK,*" *Blood* 113:6603-6610). Em populações humanas normais de precursores, o CD123 é expresso por um subconjunto de células progenitoras hematopoiéticas (**HPC**), mas não por células-tronco hematopoiéticas normais (**HSC**). O CD123 também é expresso por células dendríticas plasmocitoides (**pDC**) e basófilos e, em menor extensão, monócitos e eosinófilos (Lopez, A.F. et al. (1989) "*Reciprocal Inhibition Of Binding Between Interleukin 3 And Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor To Human Eosinophils,*" *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)* 86:7022-7026; Sun, Q. et al. (1996) "*Monoclonal Antibody 7G3 Recognizes The N-Terminal Domain Of The Human Interleukin-3 (IL-3) Receptor Alpha Chain And Functions As A Specific IL-3 Receptor Antagonist,*" *Blood* 87:83-92; Muñoz, L. et al. (2001) "*Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies,*" *Haematologica* 86(12):1261-1269; Masten, B.J. et al. (2006) "*Characterization Of Myeloid And Plasmacytoid Dendritic Cells In Human Lung,*" *J. Immunol.* 177:7784-7793; Korpelainen, E.I. et al. (1995) "*Interferon-Gamma Upregulates Interleukin-3 (IL-3) Receptor Expression In Human Endothelial Cells And Synergizes With IL-3 In Stimulating Major Histocompatibility Complex Class II Expression And Cytokine Production,*" *Blood* 86:176-182).

[006] Foi relatado que CD123 está superexpresso

em células malignas em uma ampla gama de doenças hematológicas, incluindo leucemia mieloide aguda (AML) e síndrome mielodisplásica (MDS) (Muñoz, L. et al. (2001) "*Interleukin-3 Receptor Alpha Chain (CD123) Is Widely Expressed In Hematologic Malignancies,*" *Haematologica* 86(12):1261-1269). A superexpressão de CD123 está associada a um prognóstico menos satisfatório em AML (Tettamanti, M.S. et al. (2013) "*Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor,*" *Br. J. Haematol.* 161:389-401).

II. CD3

[007] CD3 é um correceptor de células T composto por quatro cadeias distintas (Wucherpfennig, K.W. Et al. (2010) "*Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling,*" *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(4):a005140; páginas 1-14). Nos mamíferos, o complexo contém uma cadeia CD3 γ , uma cadeia CD3 δ e duas cadeias CD3 ϵ . Essas cadeias se associam a uma molécula conhecida como receptor de células T (**TCR**) para gerar um sinal de ativação nos linfócitos T. Na ausência de CD3, os TCRs não se agrupam adequadamente e são degradados (Thomas, S. et al. (2010) "*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer,*" *Immunology* 129(2):170-177). O CD3 é encontrado ligado às membranas de todas as células T maduras e praticamente em nenhum outro tipo de célula (consulte, Janeway, C.A. et al. (2005) In: *IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE,*" 6^a Ed., Garland Science Publishing, NY, páginas 214-216; Sun, Z. J. et al. (2001) "*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of*

An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer," Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex," Immunity. Fevereiro de 2006; 24 (2):133-139).

III. AML E MDS

[008] Acredita-se que a leucemia mieloide aguda (**AML**) e a síndrome mielodisplásica (**MDS**) surjam e sejam perpetuadas por uma pequena população de células-tronco leucêmicas (**LSCs**), que geralmente estão dormentes (isto é, células que não se dividem rapidamente) e, portanto, resistem às células morte (apoptose) e agentes quimioterápicos convencionais. LSCs são caracterizados por altos níveis de expressão de CD123, que não está presente na população normal de células-tronco hematopoiéticas normal na medula óssea humana normal (Jin, W. et al. (2009) "Regulation Of Th17 Cell Differentiation And EAE Induction By MAP3K NIK," Blood 113:6603-6610; Jordan, C.T. et al. (2000) "The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain Is A Unique Marker For Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells," Leukemia 14:1777-1784). O CD123 é expresso em 45%-95% da AML, 85% da leucemia de células pilosas (**HCL**) e 40% da leucemia linfoblástica B aguda (**B-ALL**). A expressão de CD123 também está associada a várias outras doenças malignas/pré-malignas: células progenitoras de leucemia mieloide crônica (**CML**) (incluindo **CML** em crise blástica); Células Reed Sternberg (**RS**) de Hodgkin; linfoma não-Hodgkin transformado (**NHL**); alguma leucemia linfocítica crônica (**CLL**) (CD11c+); um subconjunto de leucemia linfoblástica T aguda (**T-ALL**) (16%, a maioria imatura, principalmente em adultos), malignidades de células dendríticas plasmocitoides (**pDC**) **DC2** e malignidades de células

da medula da síndrome mielodisplásica CD34+/CD38- (**MDS**).

[009] AML é uma doença clonal caracterizada pela proliferação e acúmulo de células progenitoras mieloides transformadas na medula óssea, o que acaba levando à falência hematopoiética. A incidência de AML aumenta com a idade, e pacientes mais velhos costumam ter resultados de tratamento piores do que pacientes mais jovens (Robak, T. *et al.* (2009) "*Current And Emerging Therapies For Acute Myeloid Leukemia*," Clin. Ther. 2:2349-2370). Infelizmente, no momento, a maioria dos adultos com AML morre de sua doença.

[010] O tratamento da AML concentra-se inicialmente na indução da remissão (terapia de indução). Uma vez que a remissão é alcançada, o tratamento muda para se concentrar em garantir essa remissão (terapia pós-remissão ou consolidação) e, em alguns casos, terapia de manutenção. O paradigma de indução de remissão padrão para AML é a quimioterapia com uma combinação de antraciclina/citarabina, seguida por quimioterapia de consolidação (geralmente com doses mais altas dos mesmos medicamentos que foram usados durante o período de indução) ou transplante de células-tronco humanas, dependendo da capacidade do paciente para tolerar o tratamento intensivo e a probabilidade de cura apenas com quimioterapia (consulte, *por exemplo*, Roboz, G.J. (2012) "*Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia*," Curr. Opin. Oncol. 24:711-719).

[011] Os agentes frequentemente usados na terapia de indução incluem a citarabina e as antraciclinas. A citarabina (também conhecida como **AraC**) mata as células cancerosas (e outras células normais que se dividem rapidamente) ao interferir na síntese de DNA. Os efeitos

colaterais associados ao tratamento com AraC incluem diminuição da resistência à infecção, resultado da diminuição da produção de glóbulos brancos; sangramento, como resultado da diminuição da produção de plaquetas; e anemia, devido a uma redução potencial dos glóbulos vermelhos. Outros efeitos colaterais incluem náuseas e vômitos. As antraciclinas (*por exemplo*, daunorrubicina, doxorrubicina e idarrubicina) têm vários modos de ação, incluindo a inibição da síntese de DNA e RNA, interrupção de estruturas de DNA de ordem superior e produção de radicais de oxigênio livres que danificam células. O efeito adverso mais consequente das antraciclinas é a cardiotoxicidade, que limita consideravelmente a dose administrada para toda a vida e, até certo ponto, sua utilidade.

[012] O transplante de células-tronco foi estabelecido como a forma mais eficaz de terapia antileucêmica em pacientes com AML em remissão inicial ou subsequente (Roboz, G.J. (2012) "*Current Treatment Of Acute Myeloid Leukemia*," *Curr. Opin. Oncol.* 24:711-719). No entanto, infelizmente, apesar do progresso substancial no tratamento da AML recém-diagnosticada, 20% a 40% dos pacientes não atingem a remissão com a quimioterapia de indução padrão, e 50% a 70% dos pacientes que entram na primeira remissão completa devem apresentar recidiva dentro de 3 anos. A estratégia otimizada no momento da recidiva, ou para pacientes com doença resistente, permanece incerta (consulte Tasian, S.K. (2018) "*Acute Myeloid Leukemia Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy: How Far Up The Road Have We Traveled?*," *Ther. Adv. Hematol.* 9(6):135-148; Przespolewski, A. *et al.* (2018) "*Advances In Immunotherapy For Acute Myeloid Leukemia*" *Future*

Oncol. 14(10):963-978; Shimabukuro-Vornhagen, A. et al. (2018) "Cytokine Release Syndrome," J. Immunother. Cancer. 6(1):56 pp. 1-14; Milone, M.C. et al. (2018) "The Pharmacology of T Cell Therapies," Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 8:210-221; Dhodapkar, M.V. et al. (2017) "Hematologic Malignancies: Plasma Cell Disorders," Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. 37:561-568; Kroschinsky, F. et al. (2017) "New Drugs, New Toxicities: Severe Side Effects Of Modern Targeted And Immunotherapy Of Cancer And Their Management," Crit. Care 14;21(1):89). Assim, novas estratégias terapêuticas são necessárias.

IV. MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS

[013] O fornecimento de moléculas não monoespecíficas (por exemplo, anticorpos biespecíficos, diacorpos biespecíficos, anticorpos BiTE® etc.) fornece uma vantagem significativa sobre moléculas monoespecíficas, como anticorpos naturais: a capacidade de coligar e colocalizar células que expressam epítomos diferentes. As moléculas biespecíficas têm, portanto, aplicações abrangentes, incluindo terapia e imunodiagnóstico. A biespecificidade permite grande flexibilidade no projeto e na engenharia do diacorpo em várias aplicações, proporcionando avidéz aprimorada para antígenos multiméricos, a reticulação de antígenos diferentes e direcionamento direcionado a tipos de células específicos que dependem da presença de ambos os antígenos alvo. De particular importância é a coligação de células diferentes, por exemplo, a reticulação de células efetoras, como células T citotóxicas, a células tumorais (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells," Nature 314:628-631, e Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells

By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305).

[014] Para fornecer moléculas com maior capacidade do que anticorpos naturais, uma ampla variedade de formatos de anticorpos biespecíficos recombinantes foram desenvolvidos (consulte, *por exemplo*, Publicação PCT números WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), a maioria dos quais usa peptídeos ligantes para fundir uma outra proteína de ligação (*por exemplo*, um scFv, VL, VH *etc.*) para, ou dentro do núcleo do anticorpo (IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM), ou para fundir múltiplas porções de ligação ao anticorpo (*por exemplo*, dois fragmentos Fab ou scFvs) para um outro. Formatos alternativos usam peptídeos de ligação para fundir uma proteína de ligação (*por exemplo*, um scFv, VL, VH *etc.*) a um domínio de dimerização, como o domínio CH2-CH3, ou a polipeptídeos alternativos (documentos número WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2006/107617, WO 2007/046893) e outros formatos em que os Domínios CL e CH1 são trocados de suas respectivas posições naturais e/ou os Domínios VL e VH foram diversificados (documentos números WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitir que se liguem a mais de um antígeno.

[015] A técnica observou adicionalmente a capacidade de produzir diacorpos que são capazes de se ligar a duas ou mais espécies de epítomos diferentes (consulte, *por exemplo*, Holliger *et al.* (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA) 90:6444-6448. Diacorpos heterodiméricos não mono-específicos estáveis, covalentemente ligados foram descritos (consulte, *por exemplo*, os documentos números WO

2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion," J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551). Esses diacorpos incorporam um ou mais resíduos de cisteína em cada uma das espécies polipeptídicas utilizadas. Por exemplo, a adição de um resíduo de cisteína ao terminal C de tais construtos mostrou permitir a ligação dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas, estabilizando o heterodímero resultante sem interferir com as características de ligação da molécula bivalente. Além disso, moléculas trivalentes que compreendem um domínio semelhante a diacorpo foram descritas (consulte, por exemplo, os documentos números WO 2015/184203; e WO 2015/184207). Os domínios de ligação ao epítipo de diacorpo também podem ser direcionados a um determinante de superfície de qualquer célula efetora imune, como CD3, CD16, CD32 ou CD64, que são expressos em linfócitos T, células assassinas naturais (NK) ou outras células mononucleares. Em muitos estudos, ligação de diacorpo a determinantes de célula efetora, por exemplo, receptores Fcγ (FcγR), também foram constatados para ativar a célula efetora (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein

Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins," Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Normalmente, a ativação da célula efetora é desencadeada pela ligação de um anticorpo ligado ao antígeno a uma célula efetora por meio de uma interação Fc-FcγR; assim, a este respeito, as moléculas de diacorpo podem exibir funcionalidade semelhante a Ig independentemente de compreenderem um Domínio Fc (por exemplo, conforme testado em qualquer ensaio de função efetora conhecido na técnica ou exemplificado aqui (por exemplo, ensaio ADCC)). Através da ligação cruzada de células tumorais e efetoras, o diacorpo não apenas traz a célula efetora para a proximidade da célula tumoral, mas leva à morte eficaz do tumor (consulte por exemplo, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

[016] Várias moléculas biespecíficas direcionadas a CD123 e CD3 capazes de mediar a morte de células redirecionadas de células T de células malignas que expressam CD123 estão em desenvolvimento (consulte, por exemplo, Vey, N., et al. (2017) "Interim Results From A Phase 1 First-In-Human Study Of Flotetuzumab, a CD123 x CD3 Bispecific DART Molecule In AML/MDS," Annals of Oncology, 28(S5)5, mdx373.001; Godwin, C.D., et al. (2017) "Bispecific Anti-CD123 x Anti-CD3 Adaptir™ Molecules APVO436 and APVO437 Have Broad Activity Against Primary Human AML Cells In Vitro" Blood. 130(S1): 2639; Forslund, A., et al. (2016) "Ex Vivo Activity Profile of the CD123xCD3 Duobody® Antibody JNJ-63709178 Against Primary Acute

Myeloid Leukemia Bone Marrow Samples" Blood 128(22):2875.). No entanto, os esforços para empregar moléculas de ligação biespecíficas que são capazes de direcionar uma célula T para a localização de uma malignidade hematológica não foram totalmente bem-sucedidos. Portanto, uma necessidade não atendida permanece para desenvolver novas estratégias para o tratamento de doenças hematológicas com moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3**. A presente invenção aborda diretamente essa necessidade e outras, conforme descrito abaixo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO:

[017] A presente invenção refere-se a um método de tratamento de uma malignidade hematológica, como leucemia mieloide aguda (AML) ou síndrome mielodisplásica (MDS), incluindo doenças malignas hematológicas que são refrativas a agentes quimioterápicos e/ou hipometilantes. O método diz respeito à administração de uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** a um paciente em uma quantidade eficaz para estimular a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente. A presente invenção refere-se adicionalmente à modalidade de tal método em que uma amostra celular do paciente evidencia uma expressão de um ou mais genes-alvo que é aumentada em relação a um nível de linha de base de expressão de tais genes, por exemplo, um nível de linha de base de expressão de tais genes em uma população de referência de indivíduos que sofre de malignidade hematológica ou com relação ao nível de expressão de um gene de referência.

[018] Em detalhes, a invenção fornece um método de tratamento de uma malignidade hematológica quimiorrefratária em um paciente, em que o método compreende

a administração ao paciente de uma dosagem de tratamento de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**, sendo que a dosagem é eficaz para estimular a morte de células da malignidade hematológica no paciente e, assim, tratar a tal malignidade.

[019] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos que compreende adicionalmente a avaliação da expressão de um ou mais genes alvo e/ou de referência em uma amostra celular do paciente, antes e/ou após a administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3**. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que o método compreende a avaliação da expressão de um ou mais alvos e/ou de um ou mais genes de referência antes da administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3**. A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que o método compreende a avaliação da expressão de um ou mais alvos e/ou de um ou mais genes de referência subsequentes à administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[020] A invenção fornece ainda um método para determinar se um paciente seria um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar uma malignidade hematológica, sendo que o tal método compreende:

(a) avaliar a expressão de um ou mais genes-alvo em uma amostra celular do paciente antes da administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3**, em relação à expressão de um ou mais genes-alvo e/ou de referência; e

(b) identificar o paciente como um respondedor adequado para o tratamento com uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** se a expressão dentre o um ou mais genes-alvo estiver aumentada em relação à expressão dentre o um ou mais genes-alvo e/ou de referência.

[021] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos, em que o método avalia: (i) a expressão de uma ou mais genes-alvo; e (ii) um ou mais genes de referência cuja expressão não é caracteristicamente associada à malignidade hematológica.

[022] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que compreende avaliação da expressão de um ou mais genes alvo em relação à expressão de linha de base de um ou mais genes de referência do paciente.

[023] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos que compreende a avaliação da expressão de um ou mais genes alvo de um paciente em relação à expressão de um ou mais genes alvo de um indivíduo que sofre de malignidade hematológica ou de uma população de tais indivíduos. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a expressão de um ou mais genes alvo de tal paciente é maior que o primeiro quartil (*isto é*, maior que os 25% inferiores), maior que o segundo quartil (*isto é*, maior que o 50% inferior), ou maior que o terceiro quartil (*isto é*, maior que 75% inferior) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) de tal indivíduo ou de tal população de indivíduos que sofrem de malignidade hematológica.

[024] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos que compreende a avaliação da expressão de um ou mais genes alvo de um paciente em relação à expressão de um ou mais genes alvo de um indivíduo que havia sido previamente tratado sem sucesso para uma malignidade hematológica usando o métodos e composições da presente invenção (*por exemplo*, um indivíduo que não respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica usando uma molécula biespecífica

CD123 x CD3), ou uma população de tais indivíduos. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a expressão de um ou mais genes alvo de tal paciente é maior que o primeiro quartil (*isto é*, maior que os 25% inferiores), maior que o segundo quartil (*isto é*, maior que o 50% inferior), ou maior que o terceiro quartil (*isto é*, maior que 75% inferior) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) de tal indivíduo ou de tal população de indivíduos tratados sem sucesso. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos, em que a expressão de um ou mais genes alvo de tal paciente tem um fold change de \log_2 vezes de pelo menos cerca de 0,4, pelo menos cerca de 0,5, pelo menos cerca de 0,6 ou superior em relação à expressão os níveis de tal gene alvo (ou genes alvo) de tal indivíduo ou de tal população de indivíduos tratados sem sucesso.

[025] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos que compreende a avaliação da expressão de um ou mais genes alvo de um paciente em relação à expressão de um ou mais genes alvo de um indivíduo que havia sido previamente tratado com sucesso para uma malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção (*por exemplo*, um indivíduo que respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica usando uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**), ou uma população de tais indivíduos. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a expressão de um ou mais genes alvo de tal paciente está dentro do primeiro quartil (*isto é*, dentro dos 25% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo), dentro do segundo quartil (*isto é*, entre os 25% inferiores e 50%), ou dentro do terceiro quartil (*isto é*, entre os 50% inferiores e 75%) dos

níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) de tal indivíduo ou população de indivíduos tratados com sucesso.

[026] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que o nível de expressão relativa de um ou mais genes alvo na população é estabelecido pela média do nível de expressão de gene em amostras celulares obtidas da população de indivíduos.

[027] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que tal paciente exibe um nível de expressão de pelo menos um dentre tais genes alvo:

(a) que é maior do que o primeiro quartil dos níveis de expressão de tal gene-alvo em uma população de indivíduos que sofre da malignidade hematológica; ou

(b) que é maior do que o primeiro quartil dos níveis de expressão de gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) que tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos níveis de expressão do ditoe tal gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) que está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos níveis de expressão de tal gene-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[028] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que tal paciente exibe um nível de expressão

de pelo menos um dentre tais genes alvo:

(a) que é maior do que o segundo quartil dos níveis de expressão de tal gene-alvo em uma população de indivíduos que sofre da malignidade hematológica; ou

(b) que é maior do que o segundo quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) que tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos níveis de expressão do dito tal gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) que está dentro de pelo menos o segundo quartil dos níveis de expressão de tal gene-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[029] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que tal paciente exibe um nível de expressão de pelo menos um dentre tais genes alvo:

(a) que é maior do que o terceiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que sofre da malignidade hematológica; ou

(b) que é maior do que o terceiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) que tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,6 em relação aos níveis de expressão de tal gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[030] A invenção fornece ainda um método de tratamento de uma malignidade hematológica, em que o método compreende:

(a) empregar o método, de acordo com qualquer uma das modalidades acima, para determinar se um paciente seria um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar a malignidade hematológica;

(b) administrar uma dosagem de tratamento da molécula biespecífica **CD123 x CD3** ao paciente se o paciente for determinado como um respondedor adequado a tal tratamento; em que a administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3** estimula a morte de células da malignidade hematológica no paciente.

[031] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos que compreende adicionalmente a avaliação da expressão de um ou mais genes alvo em uma amostra celular obtida do paciente uma ou mais vezes após o início do tratamento.

[032] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a amostra celular é uma medula óssea ou uma amostra de sangue. Particularmente, a modalidade de tais métodos em que a amostra celular é uma amostra de medula óssea.

[033] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos que compreendem ainda detectar o nível de expressão de um ou mais genes alvo em uma amostra da medula

óssea do paciente. A invenção também fornece a modalidade de tais métodos que compreendem ainda detectar o nível de expressão de um ou mais genes de referência.

[034] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos que compreendem detectar o nível de expressão de tal um ou mais genes alvo e/ou tais um ou mais genes de referência na amostra da medula óssea do paciente, particularmente antes da administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[035] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que a avaliação de expressão ou a determinação da possibilidade de o paciente seja um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar uma malignidade hematológica é realizada por meio:

(a) pela determinação dos níveis de expressão de gene para cada gene-alvo em uma ou mais amostras celulares usando uma plataforma de expressão de gene; e

(b) pela comparação dos níveis de expressão de gene-alvo com os níveis de expressão de um ou mais genes de referência.

[036] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que a avaliação de expressão ou a determinação da possibilidade de o paciente seja um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar uma malignidade hematológica é realizada por meio:

(a) da medição dos níveis de RNA bruto para cada gene-alvo em uma ou mais amostras celulares na plataforma de expressão de gene;

em que a plataforma de expressão de gene compreende um conjunto de genes de referência de genes de manutenção; e

(b) pela atribuição de um valor de expressão relativa, para cada um dos níveis de RNA bruto medidos para os genes-alvo usando os níveis de RNA medidos dos genes de referência internos.

[037] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que o um ou mais genes alvo compreende:

(a) um ou mais dentre: CXCL9, CXCL10, CXCL11 e STAT1; e ou

(b) um ou mais dentre: CCL5, CD27, CD274, CD276, CD8A, CMKLR1, CXCL9, CXCR6, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-E, IDO1, LAG3, NKG7, PDCD1LG2, PSMB10, STAT1, e TIGIT; e/ou

(c) um ou mais dentre: AREG, CSF3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20, FOSL1, IER3 (NM_003897.4), IL6 e PTGS2; e/ou

(d) um ou mais dentre: CCL2, CCL3/L1, CCL4, CCL7 e CCL8; e/ou

(e) um ou mais dentre: MAGEA3/A6, MAGEA1, MAGEA12, MAGEA4, MAGEB2, MAGEC1 e MAGEC2; e/ou

(F) um ou mais dentre: APOL6, DTX3L, GBP1, IFI16, IFI27, IFI35, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM2, IRF1, IRF9, ISG15, MX1, OAS1, OAS2, PARP9, PSMB9, STAT2, TMEM140 e TRIM21; e/ou

(G) um ou mais dentre: PSMB8, PSMB9 e PSMB10; e/ou

(h) IL-10; e ou

(i) CD274; e/ou

(J) PDCD1LG2.

[038] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que o um ou mais genes alvo compreendem ainda IFNG (NM_000619.2).

[039] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que o um ou mais genes de referência

compreendem um ou mais dentre: ABCF1, G6PD, NRDE2, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP, e UBB.

[040] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que um escore de assinatura de gene é determinado para o um ou mais genes alvo. Em modalidades específicas da invenção, tal escore de assinatura de gene é determinado a partir dos níveis de RNA bruto de cada gene alvo por um processo que compreende:

(a) medir os níveis de RNA bruto para cada gene-alvo em mais uma amostra celular usando uma plataforma de expressão de gene que compreende um conjunto de genes de referência de genes de manutenção,

(b) normalizar cada um dos níveis de RNA bruto medidos para a média geométrica de tais genes de manutenção e, opcionalmente, normalizar ainda mais cada valor de RNA para um padrão,

(c) transformar em log cada valor de RNA normalizado,

(d) multiplicar cada valor de RNA transformado em log por um fator de peso correspondente para gerar um valor de RNA ponderado, e

(e) adicionar os valores de RNA ponderados e, opcionalmente, adicionar uma constante de fator de ajuste para gerar um escore de assinatura de gene único.

[041] Preferencialmente, a assinatura de gene é determinada usando os genes alvo fornecidos nas **Tabelas 6 e 12A-12G**. Em determinadas modalidades da invenção, os fatores de peso são aqueles fornecidos nas **Tabelas 6 e 12A-12G**. Em determinadas modalidades da invenção, um fator de ajuste é adicionado a cada escore. Em modalidades particulares, os fatores de ajuste são aqueles fornecidos nas **Tabelas 6 e 12B-**

12G.

[042] A invenção, particularmente, fornece a modalidade de tais métodos em que um escore de assinatura de gene é determinado para um ou mais dentre:

- (a) a assinatura de sinalização de gama IFN;
- (b) a assinatura de inflamação de tumor;
- (c) a assinatura de inflamação mieloide;
- (d) a assinatura da quimiocina inflamatória;
- (e) a assinatura de MAGEs;
- (f) a assinatura de sinalização a jusante de IFN;
- (g) a assinatura de imunoproteassoma;
- (h) a assinatura de IL-10;
- (i) a assinatura de PD-L1; e/ou
- (j) a assinatura de PD-L2.

[043] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o primeiro quartil de escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o primeiro quartil de escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre

os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[044] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o segundo quartil para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o segundo quartil para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,5 em relação aos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica

que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o segundo quartil dos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[045] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o terceiro quartil de escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o terceiro quartil de escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,6 em relação aos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do

paciente ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[046] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que:

(a) a assinatura de gene é a assinatura de sinalização de gama IFN e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 2,5 é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**, e/ou

(b) a assinatura de gene é a assinatura de inflamação de tumor e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 5,5 é indicativo de uma resposta do paciente mais favorável ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**; e/ou

(c) a assinatura de gene é a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 4,5 é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[047] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a assinatura de sinalização de gama IFN, a assinatura de inflamação de tumor ou a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o primeiro quartil dos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre de uma malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o primeiro quartil dos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de

expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[048] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a assinatura de sinalização de gama IFN, a assinatura de inflamação de tumor ou a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o segundo quartil de escores da assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o segundo quartil de escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão

de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,5 em relação aos escores para a assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o segundo quartil dos escores da assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[049] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que um paciente que exibe uma assinatura de expressão de gene que é característica de um microambiente de tumor imunologicamente enriquecido e de IFN gama dominante ser indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[050] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que a molécula biespecífica **CD123 x CD3** é um anticorpo biespecífico ou uma molécula biespecífica que compreende um scFv.

[051] A invenção também fornece a modalidade de

tais métodos em que a molécula biespecífica **CD123 x CD3** é JNJ-63709178, XmAb14045 ou APVO436.

[052] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que a molécula biespecífica **CD123 x CD3** é um diacorpo biespecífico covalentemente ligado que tem duas, três ou quatro cadeia de polipeptídeos.

[053] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que a molécula biespecífica **CD123 x CD3** é um diacorpo que compreende:

(a) uma primeira cadeia polipeptídica com a sequência de aminoácidos de **SEQ ID NO:21**; e

(b) uma segunda cadeia polipeptídica com a sequência de aminoácidos de **SEQ ID NO:23**; e

em que a primeira e a segunda cadeias polipeptídicas são covalentemente ligadas uma à outra por uma ligação de dissulfeto.

[054] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que a malignidade hematológica de tal paciente é selecionada a partir do grupo que consiste em: leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crônica (CML), crise blástica de CML, oncogene Abelson associado com CML (translocação Bcr-ABL), síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B), leucemia linfoblástica T aguda (LLA-T), leucemia linfocítica crônica (CLL), síndrome de Richter, transformação de Richter de LLC, leucemia celular pilosa (HCL), neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), linfoma de não Hodgkin (NHL), incluindo linfoma de células do manto (MCL) e um linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitose sistêmica e linfoma de Burkitt.

[055] A invenção fornece ainda as modalidades de tais métodos em que a malignidade hematológica de tal paciente é AML, MDS, BPDCN ou T-ALL.

[056] A invenção também fornece a modalidade de tais métodos em que a malignidade hematológica de tal paciente é refratária à quimioterapia (**CTX**), como ser refratário à quimioterapia citotóxica à base de citarabina/antraciclina ou refratário à quimioterapia com agentes hipometilantes (**HMA**).

[057] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos que compreende ainda determinar o nível de expressão de CD123 de células blásticas (células cancerosas) em comparação com um nível de linha de base correspondente CD123 expresso por células mononucleares de sangue periférico normal (PBMCs).

[058] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que o nível de expressão é determinado medindo-se a expressão da superfície celular de CD123. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a expressão da superfície celular de CD123 é aumentada em pelo menos cerca de 20% em relação a um nível de expressão de linha de base. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que o aumento na expressão de CD123 torna o paciente mais responsivo ao tratamento com a molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[059] A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a dosagem eficaz da molécula biespecífica **CD123 x CD3** é selecionada a partir do grupo que consiste em 30, 100, 300 e 500 ng/kg de peso do paciente/dia.

[060] A invenção fornece ainda a modalidade de todos os métodos descritos acima, em que a dosagem de tratamento é administrada como uma infusão contínua. A invenção

fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a dosagem de tratamento é de 30 ng/kg/dia administrada por infusão contínua por 3 dias seguida por uma dosagem de tratamento de 100 ng/kg/dia administrada por infusão contínua por 4 dias. A invenção fornece ainda a modalidade de tais métodos em que a dosagem de tratamento compreende ainda a administração de 500 ng/kg/dia administrada por infusão contínua.

[061] A invenção fornece ainda a modalidade de todos os métodos descritos acima, em que o paciente é um paciente humano.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[062] **As Figuras 1A-1C** ilustram a estrutura geral de moléculas de diacampo exemplificativas. **A Figura 1A** fornece a estrutura da primeira e segunda cadeias de polipeptídeos de um diacampo biespecífico **CD123 x CD3** de duas cadeias ("**DART-A**" também conhecido como flotetuzumabe) que tem dois domínios de ligação ao epítipo, domínio de Promoção de Heterodímero e um ligante que contém cisteína. **As Figuras 1B-1C** fornecem a estrutura geral de um diacampo biespecífico **CD123 x CD3** que tem dois domínios de ligação ao epítipo composto de três cadeias de polipeptídeos. Duas das cadeias de polipeptídeo possuem um domínio CH2 e CH3, de modo que as cadeias associadas formam todo ou parte de um domínio Fc. As cadeias de polipeptídeos que compreendem o Domínio VL e VH compreendem ainda um domínio de promoção de heterodímero e um ligante. Um resíduo de cisteína pode estar presente em um ligante (**Figuras 1A e 1B**) e/ou no domínio de promoção de heterodímero (**Figura 1C**). Os domínios VL e VH que reconhecem o mesmo epítipo são mostrados com uso do mesmo padrão de sombreado ou preenchimento.

[063] **A Figura 2** ilustra o agrupamento hierárquico não supervisionado das assinaturas 46 IO 360 ou tipos de células gerados a partir da biópsia de medula óssea de linha de base obtida de pacientes que tiveram uma resposta refratária à quimioterapia convencional (*por exemplo*, resposta refratária do paciente a um regime de tratamento com citarabina administrado em conjunto com daunorrubicina (terapia de indução 7+3 (**Ref CTX**)) ou pacientes que tiveram uma resposta refratária a um regime de tratamento com os agentes hipometilantes decitabina e azacitidina (**Ref HMA** e incluindo pacientes com AML secundária) e pacientes que tiveram recidiva (**Recidiva**) tudo antes do tratamento com flotetuzumabe. Também estão indicadas as respostas dos pacientes à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** com flotetuzumabe. Essas respostas foram anotadas como sendo uma resposta antileucêmica (**Antileucêmica (A)**), que incluiu pacientes que exibiam uma resposta completa (**CR**), uma resposta completa com melhora hematológica incompleta (**CRi**), um estado morfológico livre de leucemia (**MLF**), outro benefício antileucêmico (**OB**), ou uma resposta parcial (**PR**), ou como não respondedor (**NR**, que incluiu doença progressiva/falha do tratamento (**PD**) e doença estável (**SD**)). Cada escore de assinatura IO 360 foi redimensionada dentro do escore dessa coorte para uma escala de -3 a +3 para facilitar a comparação entre as assinaturas. As assinaturas de genes imuno Esgotados e imuno Enriquecidos estão encaixotadas nas colunas Aglomerado 2 e Aglomerado 3, respectivamente.

[064] **As Figuras 3A-3O** mostram que os pacientes refratários a quimio e HMA têm diferentes expressões de múltiplas assinaturas de genes. Em particular, os perfis de

expressão de gene de pacientes recidivantes exibem recursos de depleção imune, enquanto os perfis de pacientes refratários a **HMA** (incluindo HMA refratária e AML secundária) exibem recursos de exaustão imunológica e resistência imunológica adaptativa, incluindo regulação positiva de TIGIT, PD-L1 e assinaturas do gene Treg juntamente com uma tendência de aumento das assinaturas do gene associadas com células T CD8 exauridas em comparação com pacientes refratários a **CTX**. **A Figura 3A** é um gráfico de floresta das diferenças de alteração de dobra entre alterações de pacientes com recidiva de todos os refratários (CTX e HMA). A Figura 3B é um gráfico de floresta das diferenças de alteração de dobra entre os pacientes refratários a **HMA** alteram de recidiva; **A Figura 3C** é um gráfico de floresta das diferenças de alteração de dobra entre os pacientes refratários a **HMA** e os pacientes refratários a **CTX**. As assinaturas de gene de Aglomerado 2 imuno Esgotado (C2) e Aglomerado 3 imuno Enriquecido (C3) estão indicadas nas **Figuras 3A** e **3C**. Os escores de assinatura de gene Mieloide (**Figura 3D**), Macrófago (**Figura 3E**), Neutrófilo (**Figura 3F**), célula B (**Figura 3G**), IFN-gama (IFN- γ , **Figura 3H**), PD-L1 (**Figura 3I**), TIGIT (**Figura 3J**), CTLA-4 (**Figura 3K**), Th1 (**Figura 3L**), CTL (**Figura 3M**), célula T CD8 (**Figura 3N**) e Citotoxicidade (**Figura 3O**) são representados graficamente por perfis imuno Desgastado (Depl.), imuno Enriquecido (Enriquecido) e imuno Esgotado (Exh.).

[065] **A Figura 4** mostra a alteração percentual (em relação à linha de base) em blastos de medula óssea de 25 pacientes (pacientes com **recidiva (RL)**, pacientes que eram **refratários a CTX (CTx)** e pacientes que eram **refratários a HMA (HMA)**) após terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123**

x CD3 e sua resposta a tal terapia (**CR**, Resposta Completa; **mCR**, **CR** molecular; **CRI**, Resposta Completa com melhora hematológica incompleta; **MLF**, Estado livre de Leucemia Morfológica; **PR**, Resposta Parcial; **SD**, Doença Estável; **PD**, Doença progressiva/falha de tratamento).

[066] **As Figuras 5A-5C** mostram que a assinatura de sinalização de IFN-gama é aumentada na linha de base em respondentes ao flotetuzumabe e que a assinatura de sinalização de IFN-gama é, portanto, preditiva de uma resposta positiva à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**. **A Figura 5A** é um gráfico de floresta das diferenças de alteração de dobra da linha de base entre pacientes de **OR** e pacientes de **NR** mostrando que a assinatura de sinalização de IFN-gama foi aumentada em amostras de linha de base em pacientes de **OR** (assinaturas de genes imuno Esgotados (**C2**) e imuno Enriquecidos (**C3**) são indicadas). A Assinatura de Inflamação de Tumor e Assinatura a jusante de IFN também aumentaram. **A Figura 5B** mostra a distribuição de escores de assinatura de sinalização de IFN-gama em populações de pacientes NR e OR (**2ª AML; Ref CTX: refratário a CTX; Ref HMA: refratário a HMA, Recidiva: recidiva primária**). **A Figura 5C** mostra curvas ROC que mostram o desempenho preditivo do escore de assinatura de sinalização de IFN-gama com um AUC = 0,819.

[067] **A Figura 6** mostra a expressão de assinaturas de gene associadas a células citotóxicas, ou com células T CD8+, conforme examinadas em RNA de amostras de medula óssea, seja pré-tratamento ("**Base**") ou de amostras de medula óssea após um primeiro ciclo de tratamento com flotetuzumabe ("**Ciclo 1**").

[068] **A Figura 7** mostra a expressão de CD123 em

populações de pacientes que eram refratários à quimioterapia, em recidiva, refratários ao HMA ou em falha de HMA.

[069] **A Figura 8** mostra a correlação entre o nível de expressão de PD-L1 em blastos de AML do paciente na linha de base (BL) e se os pacientes eram progressores precoces ou respondedores à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**. Os dados são expressos como média + distribuição.

[070] A Figura 9 ilustra o aglomerado hierárquico não supervisionado de 48 assinaturas IO 360 ou tipos de células gerados a partir da biópsia de medula óssea de linha de base obtida de pacientes que tiveram uma resposta refratária primária à quimioterapia convencional (**P**) e pacientes que tiveram recidiva (**R**) antes do tratamento com flotetuzumabe. Também estão indicadas as respostas dos pacientes à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** com flotetuzumabe. Essas respostas foram anotadas como sendo uma resposta antileucêmica (**A**, que incluiu pacientes que exibiam uma resposta completa (**CR**), uma resposta completa com melhora hematológica incompleta (**CRi**), um estado morfológico livre de leucemia (**MLF**), outro benefício antileucêmico (**OB**), ou uma resposta parcial (**PR**)), ou como não respondedor (**N**, que incluiu doença progressiva/falha do tratamento (**PD**) e doença estável (**SD**)). Cada escore de assinatura IO 360 foi redimensionada dentro do escore dessa coorte para uma escala de -3 a +3 para facilitar a comparação entre as assinaturas. Está indicada a estratificação em aglomerados imunoinfiltrados e imunodesgastados.

[071] **A Figura 10** é um gráfico de floresta das diferenças de alteração da linha de base de pacientes recidivantes e refratários entre aqueles que exibem uma

resposta antileucêmica (OR) e não respondedores (NR) à terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** com flotetuzumabe, mostrando que numerosos as assinaturas aumentaram nas amostras de linha de base dos respondentes, incluindo: a assinatura de sinalização de IFN-gama, a assinatura a jusante de IFN e a assinatura de inflamação tumoral (cada uma em caixa). As assinaturas de genes que compõem o Módulo dominante de IFN são marcadas com estrela e também aumentam nas amostras de linha de base de respondentes.

[072] **As Figuras 11A-11D** mostram a distribuição de escore de várias assinaturas de genes e o módulo de IFN em pacientes refratários (Refr.) e recidivantes (Rel.), pacientes de OR são indicados com grandes círculos abertos, os pacientes de NR são indicados com pequenos pontos sólidos. As comparações foram realizadas com o teste U de Mann-Whitney para dados pareados. ****P<0,01. A Figura 11A** mostra a distribuição dos escores de assinatura de sinalização de IFN-gama. **A Figura 11B** mostra a distribuição dos escores de assinatura de sinalização a jusante de IFN. **A Figura 11C** mostra a distribuição dos escores de assinatura de inflamação de tumor (TIS). **A Figura 11D** mostra a distribuição dos escores do Módulo Dominante de IFN (módulo de IFN).

[073] **As Figuras 12A-12J** mostram a distribuição de escore dos escores das nove assinaturas de genes que compõem o Módulo Dominante de IFN e a Assinatura de Inflamação do Tumor (TIS) em pacientes que não responderam (NR) e que responderam (pacientes com uma resposta antileucêmica) (OR). **A Figura 12A** mostra os escores de assinatura de sinalização de IFN-gama; **A Figura 12B** mostra os escores de assinatura a jusante de IFN; **A Figura 12C** mostra os escores de assinatura de inflamação

mieloide; **A Figura 12D** - os escores de assinatura de imunoproteassoma; **A Figura 12E** mostra os escores de assinatura de quimiocinas inflamatórias; **A Figura 12F** mostra os escores de assinatura de MAGEs; **A Figura 12G** mostra os escores de assinatura de PD-L1; **A Figura 12H** os escores de assinatura de PD-L2; **A Figura 12I**, os escores de assinatura de IL10; **A Figura 12J**, os escores de assinatura de inflamação de tumor (TIS).

[074] **As Figuras 13A-13K** mostram curvas ROC que mostram o desempenho preditivo dos escores de linha de base para as nove assinaturas de genes que compõem o Módulo dominante de IFN, a Assinatura de inflamação do tumor (TIS) e o Módulo dominante de IFN para o grupo de 30 pacientes refratários/recidivantes. **A Figura 13A** mostra a curva ROC para os escores de assinatura de sinalização de IFN-gama com um AUC = 0,750. **A Figura 13B** mostra a curva ROC para os escores de assinatura de sinalização a jusante de IFN-gama com um AUC = 0,755. **A Figura 13C** mostra a curva ROC para os escores de assinatura de inflamação mieloide com uma AUC = 0,69. **A Figura 13D** mostra a curva ROC para os escores de assinatura do imunoproteassoma com uma AUC = 0,505. **A Figura 13E** mostra a curva ROC para os escores de assinatura de quimiocinas inflamatórias com uma AUC = 0,764. **A Figura 13F** mostra a curva ROC para o escore de assinatura de MAGEs com uma AUC = 0,736. **A Figura 13G** mostra a curva ROC para os escores de assinatura de PD-L1 com um AUC = 0,699. **A Figura 13H** mostra a curva ROC para o escore de assinatura PD-L2 com uma AUC = 0,727). **A Figura 13I** mostra a curva ROC para os escores de assinatura IL10 com um AUC = 0,745). **A Figura 13J** mostra a curva ROC para os escores TIS com um AUC = 0,852. **A Figura 13K** mostra as curvas ROC para os escores do Módulo dominante de IFN com um

AUC = 0,806.

[075] **As Figuras 14A-14D** mostram a distribuição de escore da Inflamação do Tumor (TIS, **Figura 14A**), sinalização de IFN-gama (**Figura 14B**), Maquinário de Processamento de Antígeno (APM, **Figura 14C**) e assinaturas de gene PD-L1 (**Figura 14D**) conforme examinado em RNA de amostras de medula óssea, seja pré-tratamento ("**Pré**") ou de amostras de medula óssea após um primeiro ciclo de tratamento com flotetuzumabe ("**Pós-C1**"), OR os pacientes são indicados com grandes círculos abertos, os pacientes NR são indicados com pequenos pontos sólidos. As comparações foram realizadas com o teste U de Mann-Whitney para dados pareados. Pre = linha de base. C1 = ciclo 1. **P<0,01. ***P<0,001.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO:

[076] A presente invenção refere-se a um método de tratamento de uma malignidade hematológica, como leucemia mieloide aguda (AML) ou síndrome mielodisplásica (MDS), incluindo doenças malignas hematológicas que são refrativas a agentes quimioterápicos e/ou hipometilantes. O método diz respeito à administração de uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** a um paciente em uma quantidade eficaz para estimular a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente. A presente invenção refere-se adicionalmente à modalidade de tal método em que uma amostra celular do paciente evidencia uma expressão de um ou mais genes-alvo que é aumentada em relação a um nível de linha de base de expressão de tais genes, por exemplo, um nível de linha de base de expressão de tais genes em uma população de referência de indivíduos que sofre de malignidade hematológica ou com relação ao nível de expressão de um gene de referência.

[077] Conforme indicado acima, a resistência à quimioterapia e a recaída permanecem fontes significativas de mortalidade para crianças e adultos com leucemia mieloide aguda (AML). Recebendo quimioterapia convencional, espera-se que apenas 26,9% dos pacientes sobrevivam além de 5 anos.

[078] A abordagem terapêutica em pacientes com leucemia mieloide aguda (AML) não mudou substancialmente em mais de 30 anos. A terapia de linha de frente padrão é um regime de dois medicamentos de citarabina administrado em conjunto com daunorrubicina (a chamada terapia de indução 7+3, abreviada no presente documento como "**CTX**"). Os agentes hipometilantes (abreviados no presente documento como "**HMA**") decitabina e azacitidina são comumente administrados a pacientes mais velhos ou àqueles considerados inadequados para o regime **CTX**. No entanto, estimativas da literatura indicam que até 45% dos pacientes são refratários à quimioterapia padrão de primeira linha. A intensificação adicional da quimioterapia citotóxica convencional foi considerada inviável devido à gravidade dos efeitos colaterais agudos e de longo prazo em tecidos normais comumente induzidos por esses medicamentos (Tasian, S.K. (2018) "*Acute Myeloid Leukemia Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy: How Far Up The Road Have We Traveled?*," Ther. Adv. Hematol. 9(6):135-148; Przespolewski, A. et al. (2018) "*Advances In Immunotherapy For Acute Myeloid Leukemia*" Future Oncol. 14(10):963-978; Shimabukuro-Vornhagen, A. et al. (2018) "*Cytokine Release Syndrome*," J. Immunother. Cancer. 6(1):56 páginas 1-14; Milone, M.C. et al. (2018) "*The Pharmacology of T Cell Therapies*," Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 8:210-221; Dhodapkar, M.V. et al. (2017) "*Hematologic Malignancies:*

Plasma Cell Disorders," Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. 37:561-568; Kroschinsky, F. et al. (2017) "New Drugs, New Toxicities: Severe Side Effects Of Modern Targeted And Immunotherapy Of Cancer And Their Management," Crit. Care 14;21(1):89).

[079] Os anticorpos biespecíficos que envolvem as células T estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas podem aumentar a eficácia antileucemia por citotoxicidade direta e por ativação e recrutamento de células imunes no local do tumor (Hoseini, S.S. et al. (2107) "Acute Myeloid Leukemia Targets For Bispecific Antibodies," Blood Cancer Journal 7:e522, doi:10.1038/bcj.2017.2; pp. 1-12. Em particular, o tratamento com flotetuzumabe, uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**, está sendo testado em um estudo de Fase 1/2 de AML recidivante/refratária ("**R/R**"). Apesar do grande potencial da imunoterapia para direcionar seletivamente as células cancerosas que causam malignidades hematológicas (consulte, por exemplo, Koch, J. et al. (2017) "Recombinant Antibodies to Arm Cytotoxic Lymphocytes in Cancer Immunotherapy," Transfus. Med. Hemother. 44:337-350; Lichtenegger, F.S. et al. (2017) "Recent Developments In Immunotherapy Of Acute Myeloid Leukemia," J. Hematol. Oncol. 10:142, pp. 1-20), os esforços para empregar moléculas de ligação biespecíficas que são capazes de direcionar uma célula T para a localização de uma malignidade hematológica não foram totalmente bem-sucedidos.

[080] A constatação de novas estratégias de tratamento, incluindo a imunoterapia, permanece, portanto, uma prioridade. Foi relatado anteriormente que os pacientes com AML com um microambiente tumoral enriquecido imune e IFN-gama

dominante ("**TME**") experimentam uma sobrevida livre de recidiva significativamente mais curta, sugerindo refratariedade à quimioterapia de indução padrão (Vadakekolathu, J. et al. (2017) "*Immune Gene Expression Profiling in Children and Adults with Acute Myeloid Leukemia Identifies Distinct Phenotypic Patterns*," Blood 130:3942A).

[081] Conforme usado no presente documento, o termo "**assinatura de expressão de gene**" deve denotar um padrão de expressão de gene de um grupo de genes que é característico de um tipo de célula particular e/ou processo biológico (consulte, por exemplo, Stenner, F. et al. (2018) "*Cancer Immunotherapy and the Immune Response in Follicular Lymphoma*," Front. Oncol. 8:219 doi: 10.3389/fonc.2018.00219, páginas 1-7; Cesano, A. et al. (2018) "*Bringing The Next Generation Of Immuno-Oncology Biomarkers To The Clinic*," Biomedicines 6(14) doi: 10.3390/biomedicines6010014, páginas 1-11; Shrestha, G. et al. (2016) "*The Value Of Genomics In Dissecting The RAS-Network And In Guiding Therapeutics For RAS-Driven Cancers*," Semin. Cell Dev. Biol. 58:108-117; Gingras, I. et al. (2015) "*CCR 20th Anniversary Commentary: Gene-Expression Signature in Breast Cancer--Where Did It Start and Where Are We Now?*," Clin. Cancer Res. 21(21):4743-4746; Eberhart, C.G. (2011) "*Molecular Diagnostics In Embryonal Brain Tumors*," Brain Pathol. 21(1):96-104; Baylin, S.B. (2009) "*Stem Cells, Cancer, And Epigenetics*," StemBook, ed. THE STEM CELL RESEARCH COMMUNITY, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.50.1, pages 1-14; Asakura, M. et al. (2009) "*Global Gene Expression Profiling In The Failing Myocardium*," Circ. J. 73(9):1568-1576; Shaffer, A.L. et al. (2001) "*Signatures Of The Immune Response*," Immunity 15(3):375-385; Staudt, L.M. et al. (2005) "*The Biology Of Human*

Lymphoid Malignancies Revealed By Gene Expression Profiling," Adv. Immunol. 87:163-208). Uma assinatura de expressão de gene observada e/ou alterações nessa assinatura resultantes de processos biológicos alterados (ou inalterados) podem ser usados para avaliar a presença, natureza e/ou gravidade de uma condição médica patogênica.

[082] Um aspecto central da presente invenção se refere ao reconhecimento de que a presença de microambientes tumorais de AML com dominante de IFN-gama ("**TMEs**"), em contraste com a previsão de resistência à quimioterapia padrão, prevê uma resposta favorável à terapia empregando moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3**, incluindo terapia utilizando a molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**, flotetuzumabe. A invenção deriva em parte do reconhecimento de que certas subpopulações de pacientes com uma malignidade hematológica refratária (*por exemplo*, uma leucemia mieloide aguda) são particularmente suscetíveis ao tratamento com as moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** (*por exemplo*, flotetuzumabe). Os membros dessa subpopulação podem ser prontamente identificados por sua capacidade de exibir uma assinatura de expressão de gene que é característica da presença de um microambiente tumoral enriquecido imunologicamente e com IFN-gama dominante.

I. IDENTIFICAÇÃO DE POPULAÇÕES DE PACIENTES PARTICULARMENTE ADEQUADAS PARA TRATAMENTO COM AS MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO BIESPECÍFICAS CD123 X CD3 DA INVENÇÃO

A. MÉTODOS PARA DETERMINAR "ASSINATURAS DE EXPRESSÃO DE GENE"

[083] Para determinar se um paciente exibe uma assinatura de expressão de gene que é característica da

presença de um microambiente tumoral enriquecido imune e IFN-gama dominante, de modo a ser assim identificado como sendo particularmente suscetível ao tratamento de uma malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção, uma amostra de RNA de uma amostra celular obtida de um paciente é avaliada para determinar se evidencia expressão aumentada de um ou mais genes "**alvo**" cuja expressão se correlaciona com tal assinatura. Tal avaliação pode fazer uso de detecção pré-existente e/ou medições de expressão de gene ou pode incorporar a etapa (ou etapas) de detecção e/ou medição de tal expressão de gene. Conforme usado no presente documento, o termo "**amostra celular**" se refere a uma amostra que contém células ou um extrato de células.

[084] Qualquer amostra celular pode ser empregada como uma fonte de RNA ou proteína para uso na determinação de se um paciente exibe uma assinatura de expressão de gene que é característica da presença de um microambiente de tumor imunoenriquecido e IFN gama dominante. Preferencialmente, no entanto, tais comparações de expressão de gene são conduzidas usando RNA obtido de uma amostra de medula óssea (BM) ou de uma amostra de sangue ou uma amostra de células blásticas (células cancerosas) do paciente ou de uma população de doadores. Quando o RNA é obtido a partir de tais células de uma população de doadores para fornecer um nível de expressão de linha de base, a média dos níveis de expressão empregados pode ser usada (*por exemplo*, uma média geométrica pode ser empregada). Várias populações de referência diferentes podem ser usadas para tais comparações de expressão de gene. Em modalidades particulares, o nível de expressão de pelo menos um gene alvo exibido por um paciente

é comparado ao nível de expressão de tal gene alvo exibido em: uma população de indivíduos que sofrem de uma malignidade hematológica; uma população de indivíduos que sofriam de tal malignidade hematológica no momento em que tal nível de expressão de referência foi determinado e que não respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica (*isto é*, uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica usando uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**); e/ou uma população de indivíduos que sofriam de tal malignidade hematológica no momento em que tal nível de expressão de referência foi determinado e que foram posteriormente tratados com sucesso para uma malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção (*isto é*, uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para uma doença maligna hematológica usando uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**). Quando a população de comparação é uma população de indivíduos que sofrem de uma malignidade hematológica, essa população inclui, de preferência, indivíduos que sofrem da mesma malignidade hematológica que o paciente. Essa população pode incluir indivíduos que tiveram uma recaída após o tratamento anterior com um agente quimioterápico e/ou que eram refratários ao tratamento com um agente quimioterápico (*isto é*, refratário primário). Quando a população de comparação é uma população de indivíduos que responderam com sucesso ou sem sucesso a um tratamento para uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** de malignidade hematológica, essa população inclui preferencialmente indivíduos que sofrem da mesma malignidade hematológica que o paciente.

[085] Conforme usado no presente documento, a

expressão de um gene é considerada "aumentada" se, em relação a uma linha de base ou outro comparador (*por exemplo*, expressão de tal gene em uma população), sua expressão é pelo menos cerca de 10% maior, pelo menos cerca de 20% maior, pelo menos cerca de 30% maior, pelo menos cerca de 40% maior, pelo menos cerca de 50% maior, pelo menos cerca de 60% maior, pelo menos cerca de 70% maior, pelo menos cerca de 80% maior, pelo menos cerca de 90% maior, pelo menos cerca de 1,5 vezes maior, pelo menos cerca de 2 vezes maior, pelo menos cerca de 2,5 vezes maior, pelo menos cerca de 3 vezes maior, pelo menos cerca de 3,5 vezes maior, pelo menos cerca de 4 vezes maior, pelo menos cerca de 4,5 vezes maior, pelo menos cerca de 5 vezes maior, pelo menos cerca de 5,5 vezes maior, pelo menos cerca de 6 vezes maior, pelo menos cerca de 6,5 vezes maior, pelo menos cerca de 7 vezes maior, em pelo menos cerca de 7,5 vezes maior, pelo menos cerca de 8 vezes maior, pelo menos cerca de 8,5 vezes maior, pelo menos cerca de 9 vezes maior, pelo menos cerca de 10 vezes maior. Esses aumentos podem ser descritos alternativamente em termos de "fold changes de \log_2 ". No que diz respeito a aumentos na expressão, um fold change de \log_2 de 0,4 é equivalente a cerca de 30% a mais de expressão, um fold change de \log_2 de 0,5 é equivalente a cerca de 40% maior expressão; um fold change de \log_2 de 0,6 é equivalente a uma expressão cerca de 50% maior; uma mudança \log_2 vezes de 0,7 é equivalente a cerca de 60% a mais de expressão; uma mudança \log_2 vezes de 0,8 é equivalente a uma expressão cerca de 70% maior; um fold change de \log_2 de 0,9 é equivalente a uma expressão cerca de 90% maior; um fold change de \log_2 de 1 é equivalente a um fold change de \log_2 ; um fold change de \log_2 de 1,5 é equivalente a um aumento de 2,8 de fold; um fold

change de \log_2 de 2 é equivalente a um aumento de 4 fold; um fold change de \log_2 de 2,5 é equivalente a um aumento de 5,7 fold; um fold change de \log_2 de 3 é equivalente a um aumento de 8 fold; um fold change de \log_2 de 3,5 é equivalente a um aumento de 11,3 fold; um fold change de \log_2 de 4 é equivalente a um aumento de 16 fold etc. Os fold changes de \log_2 são comumente usadas ao comparar contagens com dados de matriz e também são apropriadas para testes t.

[086] Alternativamente, tais aumentos são descritos em termos de um "**escore de assinatura de gene**" em que a expressão de cada um de um grupo de genes alvo é medida, normalizada para um ou mais genes de manutenção e/ou padrões internos, transformada em log, ponderada e somada para gerar um escore de assinatura de gene único. Métodos para calcular tais escores são conhecidos na técnica e métodos específicos são fornecidos no presente documento (consulte o Exemplo 1 abaixo).

[087] Conforme usado no presente documento, a expressão de uma assinatura de gene (*por exemplo*, uma assinatura de sinalização de IFN-gama) é considerada "aumentada" se o escore da assinatura de gene for pelo menos cerca de 2, ou pelo menos cerca de 2,5, ou pelo menos cerca de 3,0, ou pelo menos pelo menos cerca de 3,5, ou pelo menos cerca de 4, ou pelo menos cerca de 4,5, ou pelo menos cerca de 5, ou é pelo menos cerca de 5, ou pelo menos cerca de 5,5, ou pelo menos cerca de 5,5, ou pelo menos cerca de 6, ou é maior do que cerca de 6,5.

[088] Um escore de assinatura de gene de um paciente também é considerada "aumentada" se for maior que o primeiro quartil dos escores de assinatura de gene (*isto é*,

maior que os 25% inferiores), maior que o segundo quartil de escores de assinatura de gene (*isto é*, maior do que os 50% inferiores), maior do que o terceiro quartil das escores de assinatura de gene (*isto é*, maior do que os 75% inferiores), maior do que 85%, maior do que 90% ou superior a 95% dos escores de assinatura de gene calculadas a partir de os níveis de expressão de tais genes alvo em uma população de indivíduos que sofrem de malignidade hematológica.

[089] Um escore de assinatura de gene de um paciente também é considerada "aumentada" se for maior que o primeiro quartil dos escores de assinatura de gene (*isto é*, maior que os 25% inferiores), maior que o segundo quartil de escores de assinatura de gene (*isto é*, maior do que os 50% inferiores), maior do que o terceiro quartil das escores de assinatura de gene (*isto é*, maior do que os 75% inferiores), maior do que 85%, maior do que 90% ou superior a 95% dos escores de assinatura de gene calculadas a partir de os níveis de expressão de tais genes alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica (*por exemplo*, uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** de malignidade hematológica).

[090] Um escore de assinatura de gene de um paciente também é considerada "aumentada" se tiver um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4, ou pelo menos cerca de 0,5, ou pelo menos cerca de 0,6 ou mais, em relação aos escores de assinatura de gene calculado a partir dos níveis de expressão de tais genes alvo em uma população de indivíduos que não responderam com sucesso a um tratamento para uma

malignidade hematológica (*por exemplo*, uma população de indivíduos que não responderam com sucesso a um tratamento para uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** de malignidade hematológica).

[091] Um escore de assinatura de gene de um paciente também é considerada "aumentada" se estiver dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores de assinatura de gene (*isto é*, dentro dos 25% inferiores), e mais preferencialmente, dentro de pelo menos o segundo quartil (*isto é*, entre os 25% inferiores e 50%), dentro de pelo menos o terceiro quartil (*isto é*, entre os 50% inferiores e 75%), maior do que 85%, maior do que 90% ou maior do que 95% dos escores de assinatura de gene calculado a partir dos níveis de expressão de tais genes alvo em uma população de indivíduos que foram previamente tratados com sucesso para uma malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção (*por exemplo*, uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica usando uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**).

[092] Uma constatação de um escore de assinatura de gene aumentada é indicativa de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento para malignidade hematológica com as moléculas biespecíficas **CD123 x CD3** da presente invenção.

[093] Em uma modalidade, um paciente é identificado como exibindo uma assinatura de expressão de gene que é característica da presença de um microambiente tumoral imunoenriquecido e IFN-gama dominante e, portanto, ser particularmente suscetível ao tratamento de malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção, determinando-se a possibilidade de a expressão de um

gene alvo ser "aumentada" em relação ao nível basal de sua expressão no paciente que é avaliado quando tal paciente era saudável, ou antes de tal paciente receber um diagnóstico de malignidade hematológica, ou em relação à expressão desse gene em um momento durante o curso desse paciente de um regime de tratamento de quimioterapia ou durante o curso desse paciente de um regime de tratamento envolvendo uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**.

[094] Em uma segunda modalidade, um paciente é identificado como exibindo uma assinatura de expressão de gene que é característica da presença de um microambiente tumoral imunoenriquecido e IFN-gama dominante e, portanto, que é particularmente suscetível ao tratamento de malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção, comparando-se o nível de expressão de um ou mais gene alvo (ou genes alvo) com o nível de referência médio ou ponderado de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em uma população de indivíduos que sofrem de uma malignidade hematológica. Um gene alvo cuja expressão é maior do que tal nível de linha de base médio ou ponderado é dito que exibe um nível de expressão "aumentado" e os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso no tratamento de malignidade hematológica em tais pacientes. Por exemplo, os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que é maior do que o primeiro quartil (*isto é*, maior do que os 25% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em uma população de indivíduos que sofrem de malignidade hematológica. Os métodos e composições da presente

invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que é maior do que o segundo quartil (*isto é*, maior do que os 50% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em uma população de indivíduos que sofrem de malignidade hematológica. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que é maior do que o terceiro quartil (*isto é*, maior do que os 75% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em uma população de indivíduos que sofrem de malignidade hematológica. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) maior que 85%, maior que 90% ou maior que 95% dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em uma população de indivíduos que sofrem de malignidade hematológica.

[095] Em uma terceira modalidade, um paciente é identificado como exibindo uma assinatura de expressão de gene que é característica da presença de um microambiente tumoral imunoenriquecido e IFN-gama dominante e, portanto, que é particularmente suscetível ao tratamento de malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção, comparando o nível de expressão de um ou mais gene alvo (ou genes alvo) com o nível de referência médio ou ponderado de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em uma população de indivíduos que foram previamente tratados sem sucesso para uma malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção (*por exemplo*, uma população

de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica usando uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**). Um gene alvo cuja expressão é maior ou igual que tal nível de linha de base médio ou ponderado é dito que exibe um nível de expressão "aumentado" e os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso no tratamento de malignidade hematológica em tais pacientes. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene (s) alvo que é maior do que o primeiro quartil (*isto é*, maior do que os 25% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em tal população de indivíduos tratados sem sucesso. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que é maior do que o segundo quartil (*isto é*, maior do que os 50% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (genes alvo) em tal população de indivíduos tratados sem sucesso. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que é maior do que o terceiro quartil (*isto é*, maior do que os 75% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (genes alvo) em tal população de indivíduos tratados sem sucesso. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) maior que 85%, maior que 90% ou maior que 95% dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em tal população de indivíduos tratados

sem sucesso.

[096] Em uma quarta modalidade, um paciente é identificado como exibindo uma assinatura de expressão de gene que é característica da presença de um microambiente tumoral imunoenriquecido e IFN-gama dominante e, portanto, que é particularmente suscetível ao tratamento de malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção, comparando o nível de expressão de um ou mais gene alvo (ou genes alvo) com o nível de referência médio ou ponderado de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em uma população de indivíduos que foram previamente tratados com sucesso para uma malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção (*por exemplo*, uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica usando uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**). Um gene alvo cuja expressão é maior ou igual que tal nível de linha de base médio ou ponderado é dito que exibe um nível de expressão "aumentado" e os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso no tratamento de malignidade hematológica em tais pacientes. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que está dentro de pelo menos o primeiro quartil (*isto é*, dentro dos 25% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em tal população de indivíduos tratados com sucesso. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que está dentro de pelo menos o segundo quartil (*isto é*, entre os 25% inferiores

e 50%) de os níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em tal população de indivíduos tratados com sucesso. Os métodos e composições da presente invenção são particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que está dentro de pelo menos o terceiro quartil (*isto é*, entre os 50% inferiores e 75%) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em tal população de indivíduos tratados com sucesso. Os métodos e composições da presente invenção são ainda mais particularmente adequados para uso em pacientes que exibem um nível "aumentado" de expressão de gene alvo (ou genes alvo) que está dentro de pelo menos o quarto quartil (*isto é*, acima dos 75% inferiores) dos níveis de expressão de tal gene alvo (ou genes alvo) em tal população de indivíduos previamente tratados.

[097] No entanto, é preferível determinar se a expressão de um gene alvo é "aumentada" comparando-se o nível de sua expressão com o nível de expressão de um ou mais genes que não estão associados à doença ou que não exibem expressão aumentada como consequência de um estado de doença (genes de "**referência**"). Como os genes de referência são frequentemente expressos em níveis diferentes, a média geométrica da expressão dos genes de referência pode ser utilizada para calcular os fatores de escala. Uma média geométrica é obtida multiplicando cada gene por valor de amostra em um conjunto de dados e, em seguida, obtendo a n-ésima raiz (em que n é a contagem dos números no conjunto) do produto resultante. Uma média geométrica é semelhante a uma média aritmética, pois indica a tendência central de um conjunto de números. No entanto, ao contrário de uma média aritmética, a média geométrica é menos

sensível à variação na magnitude dos níveis de contagem entre as sondas. Para comparar assinaturas biológicas em uma coorte de amostras, a média geométrica de um conjunto de genes de "**referência**" pode ser usada para normalizar amostras individuais em um conjunto de dados para que as comparações entre genes biológicos sejam feitas independentemente de diferenças devido à técnica variação, como entrada de massa da amostra e qualidade da amostra.

[098] Os genes de "**referência**" preferidos são expressos constitutivamente no mesmo nível em células normais e malignas. Genes de manutenção (Eisenberg, E. et al. (2003) "*Human Housekeeping Genes Are Compact*," Trends in Genetics. 19(7):362-365; Kon Butte, A.J. et al. (2001) "*Further Defining Housekeeping, Or "Maintenance," Genes Focus On 'A Compendium Of Gene Expression In Normal Human Tissues'*," Physiol. Genomics. 7(2):95-96; Zhu, J. et al. (2008) "*On The Nature Of Human genes de manutenção*," Trends in Genetics 24(10):481-484; Eisenberg, E. et al. (2013) "*Human genes de manutenção, Revisited*," Trends in Genetics. 29(10):569-574), tais como genes necessários para a manutenção de funções celulares básicas são uma classe preferida de genes de referência.

[099] Em uma outra modalidade, uma determinação de se um paciente é particularmente adequado para tratamento com terapia de molécula de ligação de **CD123 x CD3** compreende ainda:

(a) avaliar o nível de expressão de CD123 nas células blásticas do paciente (células cancerosas). Tal nível pode ser comparado ao nível de linha de base correspondente CD123 em relação à expressão de CD123 em células blásticas de tal paciente em um momento antes ou durante o curso de tal paciente

de um regime de tratamento de quimioterapia, ou em relação à expressão de CD123 nas células blásticas de uma população de indivíduos que tiveram recidiva ou são refratários à terapia com HMA. Uma constatação de expressão aumentada de CD123 é ainda indicativo da adequação do paciente para receber terapia de molécula de ligação de **CD123 x CD3** para uma malignidade hematológica. A determinação da expressão de CD123 pode ser realizada avaliando-se a presença de mRNA que codifica CD123, ou avaliando-se a presença de CD123 em um lisado ou extrato celular. Alternativamente, a determinação da expressão de CD123 pode ser realizada avaliando-se a presença de moléculas de CD123 dispostas na superfície celular de células que expressam CD123 (*por exemplo*, células blásticas). Aumento da expressão (*por exemplo*, pelo menos um aumento de 10% na expressão, pelo menos um aumento de 15% na expressão, pelo menos um aumento de 20% na expressão, pelo menos um aumento de 25% na expressão, pelo menos um aumento de 30% na expressão, ou pelo menos um aumento de 40% na expressão) de CD123 conforme determinado é indicativo da adequação do paciente para receber terapia de molécula de ligação de **CD123 x CD3** para uma malignidade hematológica,

e/ou

(b) avaliar o nível de expressão de PD-L1 nas células blásticas do paciente (células cancerosas). Em certas modalidades, o nível de expressão de PD-L1 é avaliado através de uma amostra de células blásticas do paciente de modo que a porcentagem de células blásticas que expressam PD-L1 seja avaliada. Em outras modalidades, o nível de expressão de PD-L1 nas células blásticas do paciente é comparado com o relativo à expressão de PD-L1 nas células blásticas do paciente em um

momento durante o curso do paciente de um regime de tratamento de quimioterapia. Assim, o nível de expressão de PD-L1 nas células do paciente pode ser avaliado antes de qualquer administração de uma molécula de ligação de **CD123 x CD3** e/ou após essa administração. Uma constatação de expressão baixa de PD-L1 é ainda indicativo da adequação do paciente para receber terapia de molécula de ligação de **CD123 x CD3** para uma malignidade hematológica. Uma constatação de alta expressão de PD-L1 é indicativo da adequação do paciente para receber terapia de molécula de ligação de **CD123 x CD3** em combinação com um antagonista do eixo geométrico PD-1/PD-L1 para uma malignidade hematológica. A determinação da expressão de PD-L1 pode ser realizada avaliando-se a presença de mRNA que codifica PD-L1, ou avaliando-se a presença de PD-L1 em um lisado ou extrato celular. Alternativamente, a determinação da expressão de PD-L1 pode ser realizada avaliando-se a presença de moléculas de PD-L1 dispostas na superfície celular de células que expressam PD-L1 (*por exemplo*, PBMCs). Expressão aumentada (*por exemplo*, pelo menos 10% das células blásticas expressam, pelo menos 15% das células blásticas expressam, pelo menos 20% das células blásticas expressam, pelo menos 25% das células blásticas expressam, pelo menos 30% das células blásticas expressam, ou pelo menos 40% das células blásticas expressam) PD-L1 conforme determinado é indicativo da adequação do paciente para receber terapia de molécula de ligação de **CD123 x CD3** em combinação com um antagonista do eixo geométrico PD-1/PD-L1 para uma malignidade hematológica (*consulte, por exemplo*, o documento número WO 2017/214092).

[100] Em uma outra modalidade, os linfócitos T CD8+ são monitorados quanto ao aumento na proporção de

linfócitos T CD8+ no microambiente tumoral durante e/ou após a administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

[101] Em uma outra modalidade, a terapia com molécula de ligação a **CD123 x CD3** da presente invenção pode compreender adicionalmente a administração de uma molécula de ligação a PD-L1 anti-humana, tal como um anticorpo PD-L1 anti-humano, ou um diacorpo que tem um domínio de ligação PD-L1 humano. Moléculas de ligação ao PD-L1 anti-humano que podem ser usadas de acordo com esta modalidade incluem **atezolizumabe**, **avelumabe** e **durvalumabe** (consulte, por exemplo, Patentes números US 9.873.740; 8.779.108). A sequência de aminoácidos das cadeias pesadas e leves completas do atezolizumabe (WHO Drug Information, 2015, Recommended INN: Lista 74, 29(3):387), durvalumabe (WHO Drug Information, 2015, Recommended INN: Lista 74, 29(3):393-394) e avelumabe (WHO Drug Information, 2016, Recommended INN: Lista 74, 30(1):100-101) são conhecidos na técnica.

[102] Em uma outra modalidade alternativa, a terapia com molécula de ligação a **CD123 x CD3** da presente invenção pode compreender adicionalmente a administração de uma molécula de ligação a PD-1 anti-humana, tal como um anticorpo PD-1 anti-humano, ou um diacorpo que tem um domínio de ligação PD-1 humano. As moléculas de ligação a PD-1 anti-humano que podem ser utilizadas de acordo com essa modalidade incluem: O **nivolumabe** (também conhecido como 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, e comercializado como OPDIVO® por Bristol-Myers Squibb), **pembrolizumabe** (anteriormente conhecido como lambrolizumabe, também conhecido como MK-3475, SCH-900475 e comercializado como KEYTRUDA® pela Merck), **EH12.2H7** (comercialmente disponível na BioLegend), **pidilizumabe** (CAS

Reg. No: 1036730-42-3 também conhecido como CT-011, CureTech), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), e DART-I (revelado no documento número WO 2017/019846), (consulte também, *por exemplo*, as Patentes números US 5.952.136; 7.488.802; 7.521.051; 8.008.449; 8.088.905; 8.354.509; 8.552.154; 8.779.105; 8.900.587; 9.084.776; Publicações de patente PCT números WO 2004/056875; WO 2006/121168; WO 2008/156712; WO 2012/135408; WO 2012/145493; WO 2013/014668; WO 2014/179664; WO 2014/194302; WO 2015/112800; WO 2017/019846 e WO 2017/214092).

1. GENES "ALVO" EXEMPLIFICATIVOS

[103] O IFN-gama estimula a expressão de gene de mais de 200 genes, que incluem genes de resposta primária, como IRFs, receptor Fc-gama (FCGR), GBPs (proteínas de ligação ao guanilato), o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e moléculas de classe II, proteínas envolvidas na apresentação de antígenos, proteínas antivirais, como PKR e proteínas OAS *etc.* (Boehm, U. *et al.* (1997) "*Cellular Responses To Interferon- γ* ," *Annu. Rev. Immunol.* 15:749-795; Schroder, K. *et al.* (2003) "*Interferon-Gamma: An Overview Of Signals, Mechanisms And Functions*," *J. Leukoc. Biol.* 75(2):163-189).

[104] **A Tabela 1** revela genes alvo exemplificativos e um número de acesso GenBank® representativo e não limitante para cada gene (consulte, Der, S.D. *et al.* (1988) "*Identification Of Genes Differentially Regulated By Interferon α , β , or γ Using Oligonucleotide Arrays*," *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)* 95:15623-15628; Schneider, W.M. *et al.* (2014) "*Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses*," *Annu. Rev. Immunol.* 32: 513-545), e aqueles revelados em Schroder, K. *et al.* (2003) ("*Interferon-Gamma: An*

Overview Of Signals, Mechanisms And Functions," J. Leukoc. Biol. 75(2):163-189), cujos documentos são incorporados no presente documento por referência.

Tabela 1			
Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank	Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank
Autoantígeno 52-kD SS-A/Ro	M62800	Autoantígeno Lupus p70 (Ku)	J04611
9-27	J04164	MAC-1 (Receptor Complementar CR3)	X98172
Proteína de dedo de ácido	U09825	MACH-1	X98172
ADAR	X79448	Mad1	AF123318
AF-1p	Z29064	MCP-1/JE (CCL2)	X14768
Colágeno alfa-1 tipo XVI	M92642	MHC Classe I	M20022
Argininosuccinato sintetase	AY034076.1	MHC Classe I	X58536
β -2 microglobulina	J00105	MHC Classe I	M21533
B7.2	L25259.1	MHC Classe II α 1	NP002113
BAK	X84213	MHC Classe II α 2	NP064440
Bcl-2 componente de ligação 3 (bbc3)	U82987	MHC Classe II β 1	M33907
BST-2	D28137	MHC Classe II β 2	NM001300790
BTG1	X61123	Tiolase 3-cetoacil-CoA mitocondrial	D16481
C2	X04481	Mitocondrial SSB	M94556
C4	V00502	Quinase de linhagem mista 2	X90846
Catepsina B	M14221	NF-IL6-beta	M83667

Tabela 1			
Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank	Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank
Catepsina D	M11233	NRAMP1	D50402
Catepsina H	X16832	p21	L25610
Catepsina L	M86553	p27	AB003177
c-myc	V00568	p48/ISGF3 γ	M876503
Componente complementar C1r	J04080	p202	NP001135451
DAP var 1	NM001291963	PA28 α	AF078829
DAP var 2	NM004394	PA28 β	AF079558
dsRNA adenosina desaminase	U10439	Fosfolipídeo escramblase	AF008445
DMA	X76775	PKR	M35663
DMB	X76776	PLOD2	U84573
DSS1	U41515	Gene responsivo PMA (APR)	D90070
Subunidade eIF-2B α	X95648	PML-1	M79462
Fas/Apo-1	X83492	PML-2	M79463
Fra-1	X16707	Proteína semelhante ao fator de alongamento Pol II	Z47087
Fc γ R1	X14356	Poli (ADP-ribose) polimerase	J03473
GBP-1	NM002053	PPP3CA	L14778
GBP-2	M55542	Proteína rica em PQ	Z50194
gp67phox (CD33)	M23197	PR264	X75755
gp91phox	M66390	PRAME	U65011
GTPase (rhoC)	L25081	proteína fosfatase 5	X89416

Tabela 1			
Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank	Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank
GTP-ciclo-hidroxilase I	BC025415	Proteína semelhante a próton-ATPase	D89052
Cadeia pesada HLA classe-I (HLA-A26)	D32129	RANTES	M21121
Hou	U32849	RAP46/Bag-1	Z35491
Clone humano 17q21 LF113	U18009	RbAp48	X74262
Alelo HLA-B humano nulo	D49824	RIG-G	U52513
ICAM-1	M24283	RING4	X57522
IFI 16	M63838	RTEF-1	U63824
Proteína de 17/15 kDa induzida por IFN	M13755	SAP-1	M85164
Fosfoproteína nuclear IFN-induzida	L22342	Proteína-esqueleto Pbp1	U83463
Gene IFN- γ -induzível, I-5111	L07633	Citocromo somático c	M22877
IFP35	U72882	Fator de splicing SF3a120	X85237
IL12	AF180562	SRP9	U20998
IL15RA	U31628	STAT1 (84 kDa)	M97936
iNOS	AF049656	STAT1 (91 kDa)	M97935
Interleucina BSF-2	X04602	TAP-1	L21205
IP-30	J03909	TAP-2	D42066
IRF-1	X14454	Tapasina	AF009510
ISG-54K	M14660	Tis11d	U07802

Tabela 1			
Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank	Descrição de Gene	Número de Adesão ao GenBank
L-3-hidroxiacil-CoA des-hidrogenase	X96752	TNF- α	NM_000591
LIM proteína MLP	U49837	IgM reorganizado de forma improdutiva	M21388
LMP2	X66401	VCAM-1	X53051
LMP7	Z14982	VEGF-C/VRP	U43142

[105] Conforme fornecido no presente documento, uma assinatura de expressão de gene altamente preferida para determinar se um paciente tinha um microambiente de tumor imunologicamente enriquecido e IFN-gama dominante é chamada, no presente documento, como uma "**Assinatura** de Sinalização de Interferon(**IFN**) **Gama**." Os genes da Assinatura de Sinalização de IFN-Gama são: CXCL9, CXCL10, CXCL11 e STAT1 (**Tabela 6**). A Assinatura de Sinalização de IFN-Gama pode compreender ainda IFNG (consulte, *por exemplo*, número de acesso da sequência representativa do NCBI: NM_000619.2). O aumento da expressão da assinatura de sinalização de IFN-gama está particularmente correlacionado com a adequação de um paciente para terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**.

[106] Genes alvo adequados adicionais podem ser adicionados. Esses genes alvo adicionais podem ser facilmente identificados como sendo genes regulados a jusante de IFN-gama usando o banco de dados INTERFEROME (Samarajiwala, S.A. *et al.* (2009) "*INTERFEROME: The Database Of Interferon Regulated Genes*," *Nucleic Acids Research* 37: D852-D857).

Particularmente, os genes adicionais preferidos são PDCD1 (também chamado, no presente documento, pelo nome comum PDL1), PDCD1LG2 (também chamado, no presente documento, pelo nome comum PDL2), IL10, CTLA4 (**Tabela 13**), e/ou um ou mais dos genes desses presente nas seguintes assinaturas de genes: "**Assinatura a jusante de Interferon (IFN)**" (cujos genes estão listados na **Tabela 12B**); a "**Assinatura de Inflamação Mieloide**" (cujos genes estão listados na **Tabela 12C**); a "**Assinatura de Quimiocinas Inflamatórias**" (cujos genes estão listados na **Tabela 12D**) a "**Assinatura de MAGES**" (cujos genes estão listados na **Tabela 12E**) e/ou a "**Assinatura de imunoproteassoma**" (cujos genes estão listados na **Tabela 12F**), fornecido nos Exemplos abaixo.

[107] Em particular, a expressão de vários genes e assinaturas pode ser avaliada no agregado como um "módulo" para avaliar a adequação de um paciente para terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**. Um módulo particularmente preferido, que pode ser usado para determinar se um paciente exibe um microambiente de tumor dominante com IFN infiltrado imunologicamente (imunoenriquecido), é chamado no presente documento como um "**módulo dominante de IFN**". Os genes alvo associados ao Módulo dominante IFN incluem: PDL1, PDL2, IL10, CTLA4 e os genes presentes em cada uma das seguintes assinaturas de expressão de gene: a assinatura de sinalização de IFN-gama, a assinatura a jusante de interferon, a assinatura de inflamação mieloide, a assinatura de quimiocinas inflamatórias, a assinatura MAGES e a assinatura imunoproteassoma (**Tabela 10**).

[108] O Módulo dominante de IFN é dito ser "aumentado" se o escore do módulo for pelo menos cerca de 24,

pelo menos cerca de 25, pelo menos cerca de 26, pelo menos cerca de 27, pelo menos cerca de 28, pelo menos cerca de 29, pelo menos cerca de 30, pelo menos cerca de 31, pelo menos cerca de 32, pelo menos cerca de 33 ou pelo menos cerca de 35.

[109] O escore do Módulo dominante de IFN de um paciente também é considerada "aumentada" se for maior do que o primeiro quartil dos escores de Módulo dominante de IFN (*isto é*, maior do que os 25% inferiores), maior do que o segundo quartil dos escores do Módulo dominante de IFN (*isto é*, maior do que os 50% inferiores), maior do que o terceiro quartil dos escores de Módulo dominante do IFN (*isto é*, maior do que os 75% inferiores), maior do que 85%, maior do que 90% ou maior do que 95% dos escores do Módulo Dominante de IFN calculados a partir dos níveis de expressão de tais genes alvo em uma população de indivíduos que sofrem de malignidade hematológica.

[110] O escore de módulo dominante de IFN de um paciente também é considerado "aumentado" se for maior do que o primeiro quartil dos escores de Módulo dominante de IFN (*isto é*, maior do que os 25% inferiores), maior do que o segundo quartil dos escores de Módulo dominante de IFN (*isto é*, maior do que os 50% inferiores), maior do que o terceiro quartil dos escores do Módulo dominante de IFN (*isto é*, maior do que os 75% inferiores), maior do que 85%, maior do que 90% ou maior do que 95% dos escores de Módulo Dominante de IFN calculados a partir dos níveis de expressão de tais genes alvo em uma população de indivíduos que não responderam com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica (*por exemplo*, uma população de indivíduos que não responderam com sucesso a um tratamento para uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** de

malignidade hematológica).

[111] O escore de módulo dominante de IFN de um paciente também é considerada "aumentada" se estiver dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores de módulo dominante de IFN (*isto é*, dentro dos 25% inferiores), e mais preferencialmente, dentro de pelo menos o segundo quartil (*isto é*, entre os 25% inferiores e 50%), dentro de pelo menos o terceiro quartil (*isto é*, entre os 50% inferiores e 75%), maior do que 85%, maior do que 90% ou maior do que 95% dos escores de módulo dominante de IFN calculado a partir dos níveis de expressão de tais genes alvo em uma população de indivíduos que foram previamente tratados com sucesso para uma malignidade hematológica usando os métodos e composições da presente invenção (*por exemplo*, uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para uma malignidade hematológica usando uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**).

[112] As assinaturas de gene associadas ao Módulo dominante IFN (CD274, PDCD1LG2, IL10, CTLA4, assinatura de sinalização de IFN-gama, assinatura a jusante de interferon, assinatura de inflamação mieloide, assinatura de quimiocinas inflamatórias, assinatura de MAGES e assinatura de imunoproteassoma) podem ser avaliadas individualmente para avaliar um paciente adequação para terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**.

[113] Conforme fornecido ainda no presente documento, outro conjunto de genes alvo altamente preferidos que podem ser usados para determinar se um paciente exibe uma assinatura de expressão de gene associada à resposta imunológica adaptativa suprimida dentro de tumores (também chamado no presente documento de uma "**Assinatura de Inflamação**

de Tumor, ou simplesmente de "**TIS**") inclui os genes: CCL5, CD27, CD274 , CD276, CD8A, CMKLR1, CXCL9, CXCR6, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-E, IDO1, LAG3, NKG7, PDCD1LG2, PSMB10, STAT1, e/ou TIGIT (**Tabela 12A**). O aumento da expressão da assinatura de inflamação de tumor está particularmente correlacionado com a adequação de um paciente para terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**.

2. GENES DE "REFERÊNCIA" EXEMPLIFICATIVOS

[114] Os genes de manutenção que são expressos constitutivamente no mesmo nível em células normais e malignas compreendem uma classe preferida de genes de referência. Os genes de manutenção incluem genes envolvidos na **expressão de gene geral** (como genes que codificam fatores de transcrição, repressores, fatores de splicing de RNA, fatores de translação, tRNA sintetases, proteínas de ligação de RNA, proteínas ribossômicas, proteínas ribossômicas mitocondriais, RNA polimerases, fatores de processamento de proteínas, proteínas de choque térmico, histonas, reguladores do ciclo celular, apoptose, oncogenes, reparo/replicação de DNA *etc.*), **metabolismo** (como genes que codificam enzimas de: metabolismo de carboidratos, ciclo do ácido cítrico, metabolismo de lipídeos, metabolismo de aminoácidos, NADH desidrogenases, citocromo C oxidase, ATPases, enzimas lisossomais, proteínas de proteassoma, ribonucleases, tiorredutases *etc.*), integridade estrutural celular (como genes que codificam proteínas do citoesqueleto, proteínas envolvidas na síntese de organelas, proteínas mitocondriais *etc.*) e **proteínas de superfície celular** (como genes que codificam proteínas de adesão celular, canais iônicos e transportadores, receptores, HLA/imunoglobulina/proteínas de reconhecimento de células

MRPL9, MRPL1, MRPL10, MRPL11, MRPL12, MRPL13, MRPL14, MRPL15, MRPL16, MRPL17, MRPL18, MRPL19, MRPL2, MRPL20, MRPL21, MRPL22, MRPL23, MRPL24, MRPL27, MRPL28, MRPL3, MRPL30, MRPL32, MRPL33, MRPL35, MRPL36, MRPL37, MRPL38, MRPL4, MRPL40, MRPL41, MRPL42, MRPL43, MRPL44, MRPL45, MRPL46, MRPL47, MRPL48, MRPL49, MRPL50, MRPL51, MRPL52, MRPL53, MRPL54, MRPL55, MRPL9, MRPS10, MRPS11, MRPS12, MRPS14, MRPS15, MRPS16, MRPS17, MRPS18A, MRPS18B, MRPS18C, MRPS2, MRPS21, MRPS22, MRPS23, MRPS24, MRPS25, MRPS26, MRPS27, MRPS28, MRPS30, MRPS31, MRPS33, MRPS34, MRPS35, MRPS5, MRPS6, MRPS7, MRPS9 *etc.*);

- **RNA polimerases** (*por exemplo, POLR1C, POLR1D, POLR1E, POLR2A, POLR2B, POLR2C, POLR2D, POLR2E, POLR2F, POLR2G, POLR2H, POLR2I, POLR2J, POLR2K, POLR2L, POLR3C, POLR3E, POLR3GL, POLR3K etc.*);

- **proteínas de processamento de proteínas** (*por exemplo, PPID, PPIE, PPIF, PPIG, PPIH, CANX, CAPN1, CAPN7, CAPNS1, NACA, NACA2, PFDN2, PFDN4, PFDN5, PFDN6, SNX2, SNX3, SNX4, SNX5, SNX6, SNX9, SNX12, SNX13, SNX17, SNX18, SNX19, SNX25, SSR1, SSR2, SSR3, SUMO1, SUMO3 etc.*);

- **proteínas de choque térmico** (*por exemplo, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPA14, HSBP1 etc.*);

- **histonas** (*por exemplo, HIST1H2BC, H1FX, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H2AFZ etc.*);

- **proteínas de ciclo celular** (*por exemplo, ARHGAP35, ARHGAP5, ARHGDIA, ARHGEF10L, ARHGEF11, ARHGEF40, ARHGEF7, RAB10, RAB11A, RAB11B, RAB14, RAB18, RAB1A, RAB1B, RAB21, RAB22A, RAB2A, RAB2B380, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB40C, RAB4A, RAB5A, RAB5B, RAB5C, RAB6A, RAB7A, RAB9A, RABEP1, RABEPK, RABGEF1, RABGGTA, RABGGTB, CENPB, CTBP1, CCNB1IP1, CCNDBP1, CCNG1, CCNH, CCNK402, CCNL1, CCNL2, CCNY, PPP1CA, PPP1CC,*

PPP1R10, PPP1R11, PPP1R15B, PPP1R37, PPP1R7, PPP1R8, PPP2CA, PPP2CB552, PPP2R1A, PPP2R2A, PPP2R2D, PPP2R3C, PPP2R4, PPP2R5A, PPP2R5B, PPP2R5C, PPP2R5D, PPP2R5E, PPP4C, PPP4R1, PPP4R2, PPP5C, PPP6C, PPP6R2, PPP6R3, RAD1, RAD17, RAD23B, RAD50, RAD51C, IST1 *etc.*);

- **proteínas de apoptose** (*por exemplo, DAD1, DAP3, DAXX etc.*);

- **proteínas oncogênicas** (*por exemplo, ARAF, MAZ, MYC etc.*);

- **Proteínas de reparo/replicação de DNA** (*por exemplo, MCM3AP, XRCC5, XRCC6 etc.*);

- **proteínas de metabolismo** (*por exemplo, PRKAG1, PRKAA1, PRKAB1, PRKACA, PRKAG1, PRKAR1A, PRKRIP1 etc.*);

- **proteínas de metabolismo de carboidratos** (*por exemplo, ALDOA, B3GALT6, B4GALT3, B4GALT5, B4GALT7, GSK3A, GSK3B, TPI1, PGK1, PGAM5, ENOPH1, LDHA, TALDO1, TSTA3*);

- **proteínas de ciclo de ácido cítrico** (*por exemplo, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD etc.*);

- **proteínas de metabolismo de lipídio** (*por exemplo, HADHA etc.*);

- **proteínas de metabolismo de aminoácido** (*por exemplo, COMT etc.*);

- **NADH des-hidrogenase** (*por exemplo, NDUFA2, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA7, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB10, NDUFB11, NDUFB8, NDUFB9, NDUFC1, NDUFC2, NDUFC2, NDUFS5, NDUFV2, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2 etc.*);

- **citocromo C oxidases** (*por exemplo, COX4I1, COX5B, COX6B1, COX6C, COX7A2, COX7A2L, COX7C, COX8, COX8A, COX11, COX14, COX15, COX16, COX19617, COX20, CYC1, UQCC, UQCR10, UQCR11, UQCRB, UQCRC1, UQCRC2, UQCRHL591, UQCRQ, ATPase, ATP2C1, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5D, ATP5F1, ATP5G2, ATP5G3, ATP5H, ATP5J, ATP5J2, ATP5J2, ATP5L, ATP5O, ATP5S, ATP5SL, ATP6AP1, ATP6V0A2, ATP6V0B, ATP6V0C, ATP6V0D1, ATP6V0E1, ATP6V1C1, ATP6V1D, ATP6V1E1, ATP6V1F, ATP6V1G1, ATP6V1H, ATPAF2, ATPIF1 etc.*);

- **proteínas lisossomais** (*por exemplo, CTSD, CSTB, LAMP1, LAMP2, M6PR etc.*);

- **proteínas proteassomais** (*por exemplo, PSMA1, PSMA2, PSMA3, PSMA4, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB3, PSMB4, PSMB5, PSMB6, PSMB7, PSMC2, PSMC3, PSMC4, PSMC5, PSMC6, PSMD1, PSMD10, PSMD11, PSMD12, PSMD13, PSMD14, PSMD2, PSMD3, PSMD4, PSMD5, PSMD6, PSMD7, PSMD8, PSMD9, PSME2, PSME3, PSMF1, PSMG2, PSMG3, PSMG4591, UBA1, UBA2, UBA3, UBA5, UBA52, UBAC2, UBALD1, UBAP1, UBAP2L, UBB, UBC, UBE2A, UBE2B, UBE2D2, UBE2D3, UBE2D4, UBE2E1, UBE2E2, UBE2E3, UBE2F, UBE2G2, UBE2H, UBE2I, UBE2J1, UBE2J2, UBE2K, UBE2L3, UBE2M, UBE2N, UBE2NL989, UBE2Q1, UBE2R2, UBE2V1, UBE2V2, UBE2W, UBE2Z, UBE3A, UBE3B, UBE3C, UBE4A, UBE4B, USP10, USP14, USP16, USP19, USP22, USP25, USP27X073, USP33, USP38, USP39, USP4, USP47, USP5, USP7, USP8, USP9X590 etc.*);

- **ribonucleases** (*por exemplo, RNH etc.*);

- **tioredutases** (*por exemplo, TXN2, TXNDC11, TXNDC12, TXNDC15, TXNDC17, TXNDC9, TXNL1, TXNL4A, TXNL4B, TXNRD1, Cytoskeletal, ANXA6, ANXA7, ARPC1A, ARPC2, ARPC5L, CAPZA2, CAPZB, RHOB, RHOT1, RHOT2, TUBB, WDR1 etc.*);

- **proteínas envolvidas na síntese de organelas** (*por*

exemplo, BLOC1S1, BLOC1S2, BLOC1S3, BLOC1S4, BLOC1S6, AP1G1, AP1M1, AP2A1, AP2A2, AP2M1, AP2S1, AP3B1, AP3D1, AP3M1, AP3S1, AP3S2, AP4B1, AP5M1, ANXA6, ANXA7, AP1B1, CLTA, CLTB, CLTC *etc.*);

- **proteínas mitocondriais** (*por exemplo*, MTX2 *etc.*);

- **proteínas de superfície celular** (*por exemplo*, AP2S1, CD81, GPAA1, LGALS9, MGAT2, MGAT4B, VAMP3 *etc.*);

- **proteínas de adesão celular** (*por exemplo*, CTNNA1, CTNNB1, CTNNBIP1, CTNNBL1, CTNND1458 *etc.*);

- **canais iônicos e proteínas transportadoras** (*por exemplo*, ABCB10, ABCB7, ABCD3, ABCE1, ABCF1, ABCF2, ABCF3, CALM1, MFSD11, MFSD12, MFSD3, MFSD5, SLC15A4, SLC20A1, SLC25A11, SLC25A26, SLC25A28, SLC25A3, SLC25A32, SLC25A38, SLC25A39, SLC25A44, SLC25A46, SLC25A5, SLC27A4, SLC30A1, SLC30A5, SLC30A9, SLC35A2, SLC35A4, SLC35B1, SLC35B2, SLC35C2, SLC35E1, SLC35E3, SLC35F5, SLC38A2, SLC39A1, SLC39A3, SLC39A7, SLC41A3, SLC46A3, SLC48A1, Receptores, ACVR1, ACVR1B, CD23 *etc.*);

- **HLA/imunoglobulina/proteínas de reconhecimento de células** (*por exemplo*, BAT1, BSG, MIF, TAPBP *etc.*);

- **quinases/proteínas de sinalização** (*por exemplo*, ADRBK1, AGPAT1, ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARL2, CSF1, CSK, DCT, EFNA3, FKBP1A, GDI1, GNAS1, GNAI2, HAX1, ILK, MAPKAPK2, MAP2K2, MAP3K11, PITPNM, RAC1, RAP1B, RAGA, STK19, STK24, STK25, YWHAB, YWHAH, YWHAQ, YWHAZ *etc.*);

- **fatores de crescimento** (*por exemplo*, AIF1, HDGF, HGS, LTBP4, VEGFB, ZFP36L1, fator de necrose de tecido, CD40, caseína quinase, CSNK1E, CSNK2B *etc.*); e

- **proteínas diversas** (*por exemplo*, ALAS1, ARHGEF2,

ARMET, AES, BECN1, BUD31, CKB, CPNE1, ENSA, FTH1, GDI2, GUK1, HPRT, IFITM1, JTB, MMPL2, NME2, NONO, P4HB, PRDX1, PTMA, RPA2, SULT1A3, SYNGR2, TTC1, C11orf13, C14orf2, C21orf33, SPAG7, SRM, TEGT, DAZAP2, MEA1 etc.).

[115] Genes de manutenção preferidos incluem aqueles listados na **Tabela 2**. A **Tabela 2** também fornece um número de acesso NCBI representativo e não limitativo para cada gene. Qualquer combinação ou subcombinação de tais genes (e/ou variantes de emenda do mesmo) pode ser empregada.

Tabela 2			
Símbolo Oficial	Número de adesão de NCBI	ID de Gene	Nome completo
ABCF1	NM_001090.2	23	Cassete de ligação a ATP de <i>Homo sapiens</i> , subfamília F (GCN20), membro 1 (ABCF1), variante 2 do transcrito, mRNA
ACTB	NM_001101.2	60	Actina de <i>Homo sapiens</i> , beta (ACTB), mRNA
ALAS1	NM_000688.4	211	<i>Homo sapiens</i> aminolevulinato, delta-, sintase 1 (ALAS1), variante 1 do transcrito, mRNA
B2M	NM_004048.2	567	<i>Homo sapiens</i> beta-2-microglobulina (B2M), mRNA
CLTC	NM_004859.2	1213	Clatrina de <i>Homo sapiens</i> , polipeptídeo pesado (Hc) (CLTC), mRNA
EEF1G	NM_001404.4	1937	Fator de alongamento de translação eucariótico 1 gama de <i>Homo sapiens</i> (EEF1G), mRNA
G6PD	NM_000402.2	2539	Glicose-6-fosfato desidrogenase de <i>Homo sapiens</i> (G6PD), gene nuclear que codifica a proteína mitocondrial, mRNA
GAPDH	NM_002046.3	2597	Gliceraldeído-3-fosfato des-

Tabela 2			
Símbolo Oficial	Número de adesão de NCBI	ID de Gene	Nome completo
			hidrogenase de <i>Homo sapiens</i> (GAPDH), mRNA
GUSB	NM_000181.1	2990	Glucuronidase de <i>Homo sapiens</i> , beta (GUSB), mRNA
HPRT1	NM_000194.1	3251	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1 de <i>Homo sapiens</i> (síndrome de Lesch-Nyhan) (HPRT1), mRNA
LDHA	NM_005566.1	3939	Lactato desidrogenase A de <i>Homo sapiens</i> (LDHA), mRNA
NRDE2	NM_017970.3	55051	Necessário para interferência de RNA, domínio que contém
OAZ1	NM_004152.3	4946	Ornitina descarboxilase antizima 1 de <i>Homo sapiens</i> (OAZ1), variante 1 do transcrito, mRNA
PGK1	NM_000291.2	5230	Fosfoglicerato quinase 1 de <i>Homo sapiens</i> (PGK1), mRNA
POLR1B	NM_019014.3	84172	Polipeptídeo B de polimerase (RNA) I de <i>Homo sapiens</i> , 128kDa (POLR1B), mRNA
POLR2A	NM_000937.2	5430	Polipeptídeo A de <i>Homo sapiens</i> polimerase (RNA) II (dirigido por DNA), 220 kDa (POLR2A), mRNA
PPIA	NM_021130.4	5478	Peptidilprolil isomerase A de <i>Homo sapiens</i> (PPIA), variante transcrita 1, mRNA
RPL19	NM_000981.3	6143	Proteína ribossomal L19 de <i>Homo sapiens</i> (RPL19), mRNA
RPLP0	NM_001002.3	6175	Proteína ribossômica de <i>Homo sapiens</i> , grande, P0 (RPLP0), variante 1 do transcrito, mRNA
SDHA	NM_004168.1	6389	Complexo de succinato

Tabela 2			
Símbolo Oficial	Número de adesão de NCBI	ID de Gene	Nome completo
			desidrogenase de <i>Homo sapiens</i> , subunidade A, flavoproteína (Fp) (SDHA), gene nuclear que codifica a proteína mitocondrial, mRNA
STK11IP	NM_052902.3	114790	Proteína de interação de serina/treonina quinase 11
TBC1D10B	NM_015527.3	26000	Família de domínio TBC1, membro 10B
TBP	NM_003194.3	6908	Proteína de ligação TATA-box de <i>Homo sapiens</i> (TBP), variante 1 de transcrito, mRNA
TBP	NM_001172085.1	6908	Proteína de ligação TATA-box de <i>Homo sapiens</i> (TBP), variante 2 de transcrito, mRNA
TUBB	NM_178014.2	203068	Tubulina de <i>Homo sapiens</i> , beta (TUBB), mRNA
UBB	NM_018955.3	7314	Ubiquitina B

[116] Os seguintes genes de referência são particularmente preferidos ABCF1, G6PD, NRDE2, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP e UBB).

3. MÉTODOS EXEMPLIFICATIVOS PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE GENES ALVO E DE REFERÊNCIA

[117] Para revelar o nível de expressão de gene alvo (ou genes alvo) em relação à linha de base ou gene de referência (ou genes de referência), a quantidade de mRNA em uma amostra celular correspondente a cada gene alvo avaliado é determinada e normalizada para a expressão de mRNA correspondente à linha de base ou gene de referência (ou genes

de referência). Qualquer método adequado pode ser empregado para realizar tal análise. Um método preferido emprega o sistema de análise nCOUNTER® (NanoString Technologies, Inc.). No sistema de análise nCOUNTER®, o RNA de uma amostra é incubado na presença de conjuntos de sondas Reporter e sondas de captura específicas do gene sob condições suficientes para permitir que o RNA da amostra hibridize com as sondas. Cada Sonda Reporter carrega um código de barras fluorescente e cada Sonda Capture contém uma porção de biotina capaz de imobilizar o complexo hibridizado em um suporte sólido para coleta de dados. Após a hibridização, o excesso de sonda é removido e o suporte é examinado por um microscópio de fluorescência automatizado. Os códigos de barras são contados para cada molécula alvo. A análise de dados é preferencialmente conduzida usando o Software de Análise nSolver® 4.0 (NanoString Technologies, Inc.). Os dados apresentados no Exemplo 1 foram obtidos usando kits PanCancer IO 360™ Gene Expression Panel (NanoString Technologies, Inc.) que contém um conjunto de sondas para 770 genes diferentes (750 genes cobrem as vias principais na interface do tumor, microambiente de tumor e resposta imunológica e 20 genes de referência interna que podem ser usados para normalização de dados (**Tabela 5**). Os escores de assinatura do gene são calculados da seguinte forma:

- As contagens de dados brutos para cada gene são normalizadas para a média geométrica dos genes de manutenção (HK) selecionados (*por exemplo*, ABCF1, NRDE2, G6PD, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP, UBB) para cada amostra.

- Os dados normalizados HK são então normalizados para os padrões do painel IO 360, de preferência, para aqueles executados nos mesmos cartuchos que as amostras de teste.

- Cada contagem normalizada de genes é então transformada em log.

- Uma vez normalizado e transformado em log, cada gene é multiplicado por um valor de peso.

- Cada uma dessas contagens ponderadas é somada para gerar um único escore. Um fator de ajuste, que é uma constante, é adicionado ao escore final calculado (por exemplo, + 7). O fator de ajuste pode ser derivado do escore mais baixo observado (de TCGA e/ou análise de linha celular), para que a faixa de escore seja acima de 0.

[118] Na **Table 3**, os genes são categorizados da seguinte forma: **Coluna 1**: Nome do Gene; **Coluna 2**: Gene de Referência Interna; **Coluna 3**: Tipo de Célula (B: Células B; CD8: Células T CD8; Cito: Células Citotóxicas; CD45: Células de expressão CD45; CD56d: Células NK CD56^{dim}; DC: células dendríticas; células CD8 esgotado; M: macrófago; MC: Mastócitos; N: Neutrófilos; NK: Células NK; T: Células T; Th1: Células Th1; Treg: Células Treg); **Coluna 4**: Liberação de antígenos cancerígenos; **Coluna 5**: Apresentação do antígeno do câncer; **Coluna 6**: Preparação e ativação de células T; **Coluna 7**: Localização de células imunológicas para tumores; **Coluna 8**: Fatores estromais; **Coluna 9**: Reconhecimento de células cancerosas por células T; **Coluna 10**: Extermínio de células cancerosas; **Coluna 11**: Atividade de célula mieloide; **Coluna 12**: Atividade de célula NK; **Coluna 13**: Ciclo celular e proliferação; **Coluna 14**: Fatores intrínsecos de Tumor; **Coluna 15**: imunometabolismo; **Coluna 16**: Via de sinalização comum. Os genes associados a vias e tipos de células adicionais que constituem assinaturas de expressão de genes particulares e métodos para calcular escores de assinatura de expressão de

genes são fornecidos nos Exemplos abaixo.

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	A2M	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	ABCF 1	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	ACVR 1C	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	ADAM 12	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	ADGR E1	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	ADM	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7	ADOR A2A	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	AKT1	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9	ALDO A	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
10	ALDO C	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11	ANGP T1	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
12	ANGP T2:	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
13	ANGP TL4:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14	ANLN	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
15	APC	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
16	APH1 B	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	API5	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	APLN R	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
19	APOE	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
20	APOL 6	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
21	AQP9	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
22	AREG	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
23	ARG1	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
24	ARG2 :	-		-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
25	ARID 1A:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
26	ARNT 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
27	ATF3 :	-		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
28	ATM	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
29	AXIN 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
30	AXL	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
31	B2M:	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	BAD	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
33	BAMB I	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
34	BATF 3:	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
35	BAX	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
36	BBC3 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
37	BBS1 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
38	BCAT 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
39	BCL2 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
40	BCL2 L1:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
41	BCL6 B:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
42	BID	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
43	BIRC 3:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
44	BIRC 5:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
45	BLK	-	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	BLM	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
47	BMP2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
48	BNIP 3:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
49	BNIP 3L:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
50	BRCA 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
51	BRCA 2:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
52	BRD3 :	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
53	BRD4 :	-		+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
54	BRIP 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
55	BTLA	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
56	C1QA :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
57	C1QB :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
58	C2:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
59	C5:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
60	C5AR 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
61	C7:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
62	CASP 1:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
63	CASP 3:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
64	CASP 8:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
65	CASP 9:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
66	CBLC	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
67	CCL1 3:	-	DC	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
68	CCL1 4:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	CCL1 8:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	CCL1 9:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
71	CCL2 :	-		-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
72	CCL2 0:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
73	CCL2 1:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
74	CCL2 2:	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
75	CCL3 /L1	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
76	CCL4 :	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
77	CCL5 :	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
78	CCL7 :	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	CCL8 :	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
80	CCNA 1:	-		+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
81	CCNB 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
82	CCND 1:	-		+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
83	CCND 2:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
84	CCND 3:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
85	CCNE 1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
86	CCNO	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
87	CCR2 :	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
88	CCR4 :	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	CCR5 :	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
90	CD14 :	-		-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
91	CD16 3:	-	M	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
92	CD19 :	-	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	CD1C :	-		-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
94	CD2: :	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
95	CD20 9:	-	DC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	CD24 4:	-	eCD 8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	CD24 7:	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
98	CD27 :	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
99	CD27 4:	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
100	CD27 6:	-		-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
101	CD28 :	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
102	CD30 0A:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
103	CD36 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
104	CD38 :	-		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	CD3D :	-	T	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
106	CD3E :	-	T	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
107	CD3G :	-	T	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
108	CD4: :	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
109	CD40 :	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
110	CD40 LG:	-		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	CD44 :	-		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
112	CD45 RA:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
113	CD45 RB:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
114	CD45 RO:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	CD47 :	-		-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
116	CD48 :	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
117	CD5: :	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
118	CD58 :	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	CD6: :	-	T	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	CD68 :	-	M	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
121	CD69 :	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
122	CD7: :	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	CD70 :	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
124	CD74 :	-		-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
125	CD79 A:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126	CD79 B:	-		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
127	CD80 :	-		-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
128	CD84 :	-	M	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
129	CD86 :	-		-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
130	CD8A :	-	CD8	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
131	CD8B :	-	CD8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
132	CD96 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
133	CDC2 0:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
134	CDC2 5C:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
135	CDH1 :	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
136	CDH1 1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
137	CDH2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
138	CDH5 :	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
139	CDK2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
140	CDK6 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
141	CDKN 1A:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
142	CDKN 1C:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
143	CDKN 2A:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
144	CDKN 2B:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
145	CEAC AM3:	-	N	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
146	CEBP B	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
147	CENP F	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
148	CEP5 5	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
149	CES3 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
150	CHUK	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
151	CLEC 14A:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	CLEC 4E:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
153	CLEC 5A:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
154	CLEC 7A:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
155	CLEC L1:	-		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156	CMKL R1:	-		-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
157	CNTF R	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
158	COL1 1A1:	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
159	COL1 1A2:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
160	COL1 7A1:	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
161	COL4 A5:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
162	COL5 A1	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
163	COL6 A3:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
164	COMP	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
165	CPA3 :	-	MC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
166	CRAB P2:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
167	CSF1 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
168	CSF1 R:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
169	CSF2 :	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
170	CSF2 RB:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
171	CSF3 :	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
172	CSF3 R:	-	N	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
173	CST2 :	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
174	CTAG 1B:	-		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
175	CTLA 4:	-		-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
176	CTNN B1:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
177	CTSS	-		-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
178	CTSW	-	Cit o	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
179	CX3C L1:	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
180	CX3C R1:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
181	CXCL 1:	-		-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
182	CXCL 10:	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
183	CXCL 11:	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
184	CXCL 12:	-		-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
185	CXCL	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	13:															
186	CXCL 14:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
187	CXCL 16:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
188	CXCL 2:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
189	CXCL 3:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
190	CXCL 5:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
191	CXCL 6:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
192	CXCL 8:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
193	CXCL 9:	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
194	CXCR 2:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
195	CXCR 3:	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
196	CXCR 4:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
197	CXCR 6:	-		-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
198	CXor f36:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
199	CYBB	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
200	DAB2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
201	DDB2 :	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
202	DEFB 134:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
203	DEPT OR	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
204	DKK1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
205	DLL1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
206	DLL4 :	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
207	DNAJ C14:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
208	DNMT 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
209	DPP4 :	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
210	DTX3 L:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
211	DTX4 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
212	DUSP 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
213	DUSP 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
214	DUSP 5:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
215	E2F3 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
216	EDN1 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
217	EGF	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
218	EGFR	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
219	EGR1 :	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
220	EIF2 AK2:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
221	EIF2 B4:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
222	EIF4 EBP1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
223	EIF5 AL1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
224	ELOB	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
225	ENO1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
226	ENTP D1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
227	EOMES	-	eCD 8	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
228	EPCAM	-		-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
229	EPM2 AIP1 :	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
230	ERBB 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
231	ERCC 3:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
232	ERO1 A	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
233	ESR1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
234	EXO1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
235	EZH2 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
236	F2RL 1:	-		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
237	FADD	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
238	FAM1 24B:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
239	FAM3 0A:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
240	FANCA	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
241	FAP	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
242	FAS	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
243	FASLG	-		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
244	FBP1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
245	FCAR	-	N	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
246	FCGR 1A:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
247	FCGR 2A:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
248	FCGR 2B:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
249	FCGR 3A/B	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
250	FCGR T	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
251	FCN1 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
252	FCRL 2:	-	B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
253	FGF1 3:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
254	FGF1 8:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
255	FGF9 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
256	FGFR 1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
257	FLNB	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
258	FLT1 :	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
259	FOSL 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
260	FOXP 3:	-	Tre g	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
261	FPR1 :	-	N	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
262	FPR3 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
263	FSTL 3:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
264	FUT4 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
265	FYN	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
266	FZD8 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
267	FZD9 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
268	G6PD :	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
269	GAS1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
270	GBP1 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
271	GBP2 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
272	GBP4 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
273	GHR	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
274	GIMA P4:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
275	GIMA P6:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
276	GLI1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
277	GLS	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
278	GLUD 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
279	GLUL	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
280	GMIP	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
281	GNG4 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
282	GPLY :	-	Cit o	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
283	GOT1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
284	GOT2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
285	GPC4 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
286	GPR160:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
287	GPSM3:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
288	GUSB	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
289	GZMA	-	Cit o	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
290	GZMB	-	Cit o	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
291	GZMH	-	Cit o	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
292	GZMK	-		-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
293	GZMM	-		-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
294	H2AFX:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
295	HAVCR2:	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
296	HCK	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
297	HDAC11:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
298	HDAC3:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
299	HDAC4:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
300	HDAC5:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
301	HDC	-	MC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
302	HELLS	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
303	HERC6:	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
304	HES1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
305	HEY1	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
306	HIF1A:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
307	HK1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
308	HK2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
309	HLA-A	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
310	HLA-B	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
311	HLA-C	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
312	HLA-DMA	-		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
313	HLA-DMB	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
314	HLA-DOA	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
315	HLA-DOB	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
316	HLA-DPA1:	-		-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
317	HLA-DPB1:	-		-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
318	HLA-DQA1:	-		-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
319	HLA-DQA2:	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
320	HLA-DQB1:	-		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
321	HLA-DRA	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
322	HLA-DRB1:	-		-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
323	HLA-DRB5:	-		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
324	HLA-E	-		-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
325	HLA-F	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
326	HMGA 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
327	HMGB 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
328	HNF1 A:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
329	HRAS	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
330	HSD1 1B1:	-	DC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
331	ICAM 1:	-		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
332	ICAM 2:	-		-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
333	ICAM 3:	-		-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
334	ICAM 5:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
335	ICOS	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
336	ICOS LG	-		-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
337	ID4:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
338	IDO1 :	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
339	IER3 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
340	IFI1 6:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
341	IFI2 7:	-		-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
342	IFI3 5:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
343	IFI6 :	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
344	IFIH 1:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
345	IFIT	-		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	1:															
346	IFIT 2:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
347	IFIT 3:	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
348	IFIT M1:	-		-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
349	IFIT M2:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
350	IFNA 1:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
351	IFNA R1:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
352	IFNG	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
353	IFNG R1:	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
354	IFNG R2:	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
355	IGF2 R:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
356	IHH	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
357	IKBK B	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
358	IKBK G	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
359	IL10 :	-		+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
360	IL10 RA:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
361	IL11 :	-		-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
362	IL11 RA:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
363	IL12 RB2:	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
364	IL15 :	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
365	IL16	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	:															
366	IL17 A:	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
367	IL18 :	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
368	IL18 R1:	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
369	IL1A :	-		-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
370	IL1B :	-		-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
371	IL1R 2:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
372	IL1R N:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
373	IL2:	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
374	IL21 R:	-	CD5 6d	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
375	IL22 RA1:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
376	IL24 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
377	IL2R A:	-		-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
378	IL2R B:	-		-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
379	IL2R G:	-		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
380	IL32 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
381	IL33 :	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
382	IL34 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
383	IL4:	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
384	IL6:	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
385	IL6R :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
386	IL7R :	-		-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
387	INHB A	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
388	IRF1 :	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
389	IRF2 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
390	IRF3 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
391	IRF4 :	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
392	IRF5 :	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
393	IRF7 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
394	IRF8 :	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
395	IRF9 :	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
396	ISG1 5:	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
397	ITGA 1:	-		-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
398	ITGA 2:	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
399	ITGA 4:	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
400	ITGA 6:	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
401	ITGA E	-		-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
402	ITGA L	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
403	ITGA M	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
404	ITGA V	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
405	ITGA X	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
406	ITGB 2:	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
407	ITGB 3:	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
408	ITGB 8:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
409	ITPK 1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
410	JAG1 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
411	JAG2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
412	JAK1 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
413	JAK2 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
414	JAK3 :	-		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
415	KAT2 B:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
416	KDR	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
417	KIF2 C:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
418	KIR2 DL3:	-	CD5 6d	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
419	KIR3 DL1:	-	CD5 6d	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
420	KIR3 DL2	-	CD5 6d	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
421	KIT	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
422	KLRB 1:	-	Cit o	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
423	KLRD 1:	-	Cit o	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
424	KLRK 1:	-	Cit o	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
425	KRAS	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
426	LAG3 :	-	eCD 8	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
427	LAIR 1:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
428	LAMA 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
429	LAMB 3:	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
430	LAMC 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
431	LCK	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
432	LDHA	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
433	LDHB	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
434	LGAL S9:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
435	LIF	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
436	LILR A1:	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
437	LILR A3:	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
438	LILR A5:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
439	LILR B2:	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
440	LILR B4:	-		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
441	LOXL 2:	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
442	LRRC 32:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
443	LTB	-		-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
444	LTBP 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
445	LY9:	-		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
446	LY96 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
447	LYZ	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
448	MAGE A1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
449	MAGE A12:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
450	MAGE A3/A 6	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
451	MAGE A4:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
452	MAGE B2:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
453	MAGE C1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
454	MAGE C2:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
455	MAML 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
456	MAP3 K12:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
457	MAP3 K5:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
458	MAP3 K7:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
459	MAP3 K8:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
460	MAPK 10:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
461	MARC O	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
462	MB21 D1:	-		-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
463	MELK	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
464	MET	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
465	MFGE 8:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
466	MFNG	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
467	MGMT	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
468	MICA	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
469	MICB	-		-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
470	MKI6 7:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
471	MLAN A	-		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
472	MLH1 :	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
473	MMP1 :	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
474	MMP7 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
475	MMP9 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
476	MMRN 2:	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
477	MRC1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
478	MRE1 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
479	MRPL 19:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
480	MS4A 1	-	B	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
481	MS4A 2:	-	MC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
482	MS4A 4A:	-	M	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
483	MS4A 6A:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
484	MSH2 :	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
485	MSH6 :	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
486	MTOR	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
487	MX1:	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
488	MXI1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
489	MYC	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
490	MYCT 1:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
491	MYD8 8:	-		-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
492	NBN	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
493	NCAM 1:	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
494	NCR1 :	-	NK	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
495	NDUF A4L2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
496	NECT IN1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
497	NECT IN2:	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
498	NEIL 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
499	NF1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
500	NFAM 1:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
501	NFAT C2:	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
502	NFIL 3:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
503	NFKB 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
504	NFKB 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
505	NFKB IA	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
506	NFKB IE	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
507	NGFR	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
508	NID2 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
509	NKG7	-	Cit	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	:		o													
510	NLRC 5:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
511	NLRP 3:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
512	NOD2 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
513	NOS2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
514	NOTC H1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
515	NOTC H2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
516	NRAS	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
517	NRDE 2:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
518	NT5E :	-		-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-
519	OAS1 :	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
520	OAS2	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
521	OAS3 :	-		-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
522	OASL	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
523	OAZ1 :	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
524	OLFM L2B:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
525	OLR1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
526	OTOA	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
527	P2RY 13:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
528	P4HA 1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
529	P4HA 2:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
530	PALM D	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
531	PARP 12:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
532	PARP 4:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
533	PARP 9:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
534	PC	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
535	PCK2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
536	PDCD 1:	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
537	PDCD 1LG2 :	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
538	PDGF A	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
539	PDGF B	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
540	PDGF RB	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
541	PDK1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
542	PDZK 1IP1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
543	PECA M1:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
544	PF4:	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
545	PFKF B3:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
546	PFKM	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
547	PGPE P1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
548	PIAS 4:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
549	PIK3	-		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	CA:															
550	PIK3 CD	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
551	PIK3 CG:	-		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
552	PIK3 R1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
553	PIK3 R2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
554	PIK3 R5:	-		+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
555	PKM	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
556	PLA1 A:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
557	PLA2 G2A:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
558	PLOD 2:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
559	PMS2 :	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
560	PNOC	-	B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
561	POLD 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
562	POLR 2A:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
563	PPAR G	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
564	PPAR GC1B :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
565	PRF1 :	-	Cit o	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
566	PRKA A2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
567	PRKA CB	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
568	PRKC A	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
569	PRKX	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
570	PRLR	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
571	PROM 1:	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
572	PRR5 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
573	PSMB 10:	-		-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
574	PSMB 5:	-		-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
575	PSMB 8:	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
576	PSMB 9:	-		-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
577	PSMC 4:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
578	PTCD 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
579	PTEN	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
580	PTGE R4:	-	eCD 8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
581	PTGS 2:	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
582	PTPN 11:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
583	PTPR C	-	CD4 5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
584	PUM1 :	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
585	PVR	-		-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
586	PVRI G	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
587	RAD5 0:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
588	RAD5 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
589	RAD5 1C:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
590	RASAL1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
591	RASGRF1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
592	RBL1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
593	RBL2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
594	RELA	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
595	RELB	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
596	RELN	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
597	REN	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
598	RICTOR	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
599	RIPK1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
600	RIPK2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
601	RIPK3:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
602	RNLS	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
603	ROBO4:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
604	ROCK1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
605	ROR2:	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
606	RORC	-		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
607	RPL23:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
608	RPL7A:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
609	RPS6KB1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
610	RPTOR	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
611	RRM2:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
612	RSAD 2:	-		-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
613	RUNX 3:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
614	S100 A12:	-	N	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
615	S100 A8:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
616	S100 A9:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
617	SAMD 9:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
618	SAMS N1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
619	SBNO 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
620	SDHA	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
621	SELE	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
622	SELL	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
623	SELP	-		-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
624	SERP INA1 :	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
625	SERP INB5 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
626	SERP INH1 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
627	SF3A 1:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
628	SFRP 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
629	SFRP 4:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
630	SFXN 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
631	SGK1	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	:															
632	SH2D 1A:	-	T	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
633	SHC2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
634	SIGL EC1:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
635	SIGL EC5:	-	N	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
636	SIGL EC8:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
637	SIRP A	-		-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
638	SIRP B2:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
639	SLAM F7:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
640	SLC1 1A1:	-		-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
641	SLC1 6A1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
642	SLC1 A5:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
643	SLC2 A1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
644	SLC7 A5:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
645	SMAD 5:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
646	SMAP 1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
647	SNAI 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
648	SNCA	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
649	SOCS 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
650	SOX1 0:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
651	SOX1 1:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
652	SOX2 :	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
653	SPIB	-	B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
654	SPP1 :	-		-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
655	SPRY 4:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
656	SREB F1:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
657	SRP5 4:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
658	STAT 1:	-		-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
659	STAT 2:	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
660	STAT 3:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
661	STAT 4:	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
662	STC1 :	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
663	STK1 1IP:	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
664	SYK	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
665	TAF3 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
666	TAP1 :	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
667	TAP2 :	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
668	TAPB P	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
669	TAPB PL	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
670	TBC1 D10B	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
671	TBP	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
672	TBX2 1:	-	Th1	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
673	TBXA S1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
674	TCF3 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
675	TCL1 A:	-	B	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
676	TDO2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
677	TFRC	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
678	TGFB 1:	-		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
679	TGFB 2:	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
680	TGFB 3:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
681	TGFB R1:	-		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
682	TGFB R2:	-		-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
683	THBD	-		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
684	THBS 1:	-		-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
685	THY1 :	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
686	TICA M1:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
687	TIE1 :	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
688	TIGI T	-		-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
689	TLK2 :	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
690	TLR1 :	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
691	TLR2	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	:															
692	TLR3 :	-		-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
693	TLR4 :	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
694	TLR5 :	-		-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
695	TLR7 :	-		-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
696	TLR8 :	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
697	TLR9 :	-		-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
698	TMEM 140:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
699	TMEM 173:	-		-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
700	TMUB 2	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
701	TNF	-		-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
702	TNFA IP3:	-		-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
703	TNFA IP6:	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
704	TNFR SF10 B:	-		+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
705	TNFR SF10 C:	-		+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
706	TNFR SF10 D:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
707	TNFR SF11 A:	-		-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
708	TNFR SF11 B:	-		-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
709	TNFR SF14 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
710	TNFR SF17 : -	B		-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
711	TNFR SF18 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
712	TNFR SF1A : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
713	TNFR SF1B : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
714	TNFR SF25 : -			-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
715	TNFR SF4 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
716	TNFR SF8 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
717	TNFR SF9 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
718	TNFS F10 : -			+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
719	TNFS F12 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
720	TNFS F13 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
721	TNFS F13B : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
722	TNFS F18 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
723	TNFS F4 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
724	TNFS F8 : -			-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
725	TNFS : -			-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	F9:															
726	TNKS	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
727	TP53:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
728	TPI1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
729	TPM1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
730	TPSA B1/B 2	-		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
731	TRAF 1:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
732	TRAT 1:	-	T	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
733	TREM 1:	-		-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
734	TREM 2:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
735	TRIM 21:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
736	TSLP	-		-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
737	TTC3 0A:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
738	TWF1:	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
739	TWIS T1:	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
740	TWIS T2:	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
741	TYMP	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
742	TYMS	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
743	UBA7:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
744	UBB	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
745	UBE2 C:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
746	UBE2 T:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
747	ULBP 2:	-		-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
748	VCAM 1:	-		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
749	VCAN	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
750	VEGF A	-		-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
751	VEGF B	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
752	VEGF C	-		-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
753	VHL	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
754	VSIR	-		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
755	VTCN 1:	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
756	WDR7 6:	-		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
757	WNT1 0A:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
758	WNT1 1:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
759	WNT2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
760	WNT2 B:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
761	WNT3 A:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
762	WNT4 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
763	WNT5 A:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
764	WNT5 B:	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
765	WNT7 B:	-		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
766	XCL1	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3																
#	Número da coluna															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	/2															
767	ZAP7 0:	-		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
768	ZC3H 12A:	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
769	ZEB1 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
770	ZEB2 :	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

B. ANÁLISE DE "ASSINATURA DE EXPRESSÃO DE GENES"

[119] A análise da expressão de gene de amostras de células da medula óssea (BM) na linha de base estratifica os pacientes refratários à quimioterapia, refratários a HMA (incluindo AML secundária) e pacientes com recidiva em 3 grupos dentro de um contínuo imunológico: pacientes que exibem uma assinatura de expressão de gene imunodesgastado, pacientes que exibem uma assinatura de expressão de gene imune-esgotado e pacientes que exibem uma assinatura de expressão de gene imune-enriquecido.

[120] Conforme descrito em mais detalhes abaixo, os pacientes com doença refratária primária (refratária a ≥ 2 tentativas de indução, primeira CR de < 6 meses ou falha após ≥ 4 ciclos de agentes hipometilantes, HMA) exibem a assinatura de expressão de gene de um imunoinfiltrado microambiente de tumor, conforme observado por seus níveis de quimiocinas inflamatórias aproximadamente 33% mais elevados (em relação aos níveis observados em pacientes com recidiva ($3,27 \pm 0,22$ vs $2,46 \pm 0,07$, $p=0,026$)).

[121] Dentro desse grupo, os pacientes

refratários à quimioterapia e os pacientes refratários ao HMA estratificam ainda mais em uma primeira subpopulação que exhibe assinaturas de gene de um microambiente de tumor com exaustão imunológica (consulte, **a Figura 2**, assinaturas em caixas indicadas para o Aglomerado 2) e uma segunda subpopulação que exhibe assinaturas de gene de um microambiente de tumor imunoenriquecido, incluindo o interferon gama (também chamado no presente documento de "IFN-gama") Assinatura de sinalização (consulte, **a Figura 2**, assinaturas em caixas indicadas para o Aglomerado 3). Os pacientes refratários a HMA apresentam características de exaustão imunológica e resistência imunológica adaptativa, incluindo um aumento de aproximadamente 44% na expressão de TIGIT ($5,55 \pm 0,34$ vs $3,85 \pm 0,24$, $p=0,006$), um aumento de aproximadamente 48% na expressão de PD-L1 PD-L1 ($3,55 \pm 0,18$ vs $2,4 \pm 0,29$, $p=0,009$) e um aumento de aproximadamente 32% na expressão específica de células Treg ($4,87 \pm 0,23$ vs $3,69 \pm 0,19$, $p=0,0009$) em relação a pacientes refratários à quimioterapia. Os pacientes refratários ao HMA também apresentam uma tendência de células T CD8 cada vez mais esgotadas (conforme medido por sua expressão de CD244, EOMES, LAG3 e PTGER4) em comparação com os pacientes refratários à quimioterapia.

[122] Focando apenas em pacientes refratários à quimioterapia (*isto é*, refratários a ≥ 2 tentativas de indução, primeiro CR de < 6 meses) e pacientes com AML recidivante (*isto é*, pacientes refratários a HMA não foram incluídos), análise adicional de um conjunto mais amplo de genes (realizada ao agregar as escores de três módulos de assinatura, conforme descrito abaixo) amostras estratificadas de pacientes com AML recidivantes e refratários na linha de base em dois subtipos

imunes, chamados no presente documento de subtipos "**imunoinfiltrados**" e "**imunodesgastados**".

II. MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO BIESPECÍFICAS CD123 X CD3
EXEMPLIFICATIVAS

A. JNJ-63709178

[123] JNJ-63709178 é um anticorpo biespecífico IgG4 humanizado com função Fc silenciada. O anticorpo foi produzido usando a tecnologia Genmab DuoBody® e é capaz de se ligar tanto ao CD123 nas células tumorais quanto ao CD3 nas células T. JNJ-63709178 é capaz de recrutar células T para células tumorais que expressam CD123 e induzir a morte dessas células tumorais in vitro (MOLM-13, OCI-AML5 e KG-1; EC50 = 0,51-0,91 nM). JNJ-63709178 é revelado no documento número WO 2016/036937, Gaudet, F. et al. (2016) "*Development of a **CD123 x CD3** Bispecific Antibody (JNJ-63709178) for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML),*" Blood 128:2824; e Forslund, A. et al. (2016) "*Ex Vivo Activity Profile of the **CD123 x CD3** Duobody® Antibody JNJ-63709178 Against Primary Acute Myeloid Leukemia Bone Marrow Samples,*" Blood 128:2875, cujos documentos são incorporados no presente documento por referência). As sequências de aminoácidos das cadeias leve e pesada de JNJ-63709178 e/ou anticorpos relacionados: 13RB179, 13RB180, 13RB181, 13RB182, 13RB183, 13RB186, 13RB187, 13RB188, 13RB189, CD3B19, 7959, 3978, 7955, 9958, 8747, 8876, 4435 e 5466 são revelados no documento número WO 2016/036937.

B. XMAB14045

[124] XmAb14045 (também conhecido como vibecotamabe) é um anticorpo direcionado ao tumor que contém um domínio de ligação de CD123 e um domínio de ligação de células T citotóxicas (CD3). Um domínio Fc biespecífico de

XmAb serve como esqueleto para esses dois domínios de ligação ao antígeno e confere meia-vida de circulação longa, estabilidade e facilidade de fabricação em XmAb14045. O envolvimento de CD3 por XmAb14045 ativa células T para a morte altamente potente e direcionada de células tumorais que expressam CD123 (Publicação de Patente número US 2017/0349660; Chu, S.Y. et al. (2014) "*Immunotherapy with Long-Lived Anti-CD123 x CD3 Bispecific Antibodies Stimulates Potent T Cell-Mediated Killing of Human AML Cell Lines and of CD123+ Cells in Monkeys: A Potential Therapy for Acute Myelogenous Leukemia,*" Blood 124(21):2316, cujos documentos são incorporados no presente documento por referência). As sequências de aminoácidos das cadeias pesadas e leves de XmAb14045 e moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** semelhantes são reveladas na Publicação de Patente número US 2017/0349660 e em Informações de Medicamentos da OMS, DCI proposta: Lista 120, 2018, 32(4):658-660.

C. APVO436

[125] APVO436 é uma molécula de ligação biespecífica ADAPTIR™ **CD123 x CD3** que possui uma porção scFv anti-CD123 e uma porção scFv anti-CD3. Cada uma das porções scFv está ligada a um Domínio Fc que foi modificado para abolir a função efetora ADCC/CDC. APVO436 é revelado para ligar CD123 humano e células que expressam CD3 com valores de EC₅₀ na faixa de nM baixa e para demonstrar atividade alvo-específica potente contra linhas de células tumorais que expressam CD123 em baixas razões efetoras para alvo. APVO436 é revelado como sendo capaz de induzir potentemente a ativação e proliferação de células T endógenas acompanhadas pela depleção de células que expressam CD123 em experiências com amostras de indivíduos de AML

primárias e amostras de doadores normais. APVO436 (consulte, Comeau, M.R. et al. (2018) "APVO436, a Bispecific anti-CD123 x anti-CD3 ADAPTIR™ Molecule for Redirected T-cell Cytotoxicity, Induces Potent T-cell Activation, Proliferation and Cytotoxicity with Limited Cytokine Release," AACR Annual Meeting April 2018, Abstract 1786; Godwin, C.D. et al. (2017) "Bispecific Anti-CD123 x Anti-CD3 ADAPTIR™ Molecules APVO436 and APVO437 Have Broad Activity Against Primary Human AML Cells In Vitro," Encontro Anual da Sociedade Americana de Hematologia, Dezembro de 2017, Blood 130:2639; Comeau, M.R. et al. (2017) "Bispecific anti-CD123 x anti-CD3 ADAPTIR™ Molecules for Redirected T-cell Cytotoxicity in Hematological Malignancies," Encontro anual AACR, Abril de 2017, Abstract 597). As sequências de aminoácidos das cadeias leve e pesada de moléculas de ligação biespecíficas APVO436 **CD123 x CD3** são reveladas no documento número WO 2018/057802A1.

D. DART-A

[126] **DART-A** (também conhecido como flotetuzumabe, número CAS: 1664355-28-5) é a molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** preferida da presente invenção. O **DART-A** é um diacorpo biespecífico otimizado para sequência capaz de se ligar simultânea e especificamente a um epítipo de CD123 e a um epítipo de CD3 (um diacorpo biespecífico "**CD123 x CD3**") (Publicação de Patente US Número US 2016-0200827, em PCT Publ. Número WO 2015/026892, em Al-Hussaini, M. et al. (2016) "Targeting CD123 In Acute Myeloid Leukemia Using A T-Cell-Directed Dual-Affinity Retargeting Platform," Blood 127:122-131, in Vey, N. et al. (2017) "A Phase 1, First-in-Human Study of MGD006/S80880 (**CD123 x CD3**) in AML/MDS," Encontro anual ASCO 2017, 2-6 de junho de 2017,

Chicago, IL: Abstract TPS7070, cada um dos quais documentos é incorporado no presente documento por referência em sua totalidade). Verificou-se que o **DART-A** exibe atividade funcional aprimorada em relação a outros diacorpos biespecíficos **CD123 x CD3** não otimizados para sequência de composição semelhante e, portanto, é denominado um diacorpo biespecífico **CD123 x CD3** "otimizado para sequência". O pedido PCT número PCT/US2017/050471 descreve os regimes de dosagem preferidos para a administração de **DART-A** a pacientes e é incorporado no presente documento por referência na sua totalidade.

[127] O **DART-A** compreende uma primeira cadeia polipeptídica e uma segunda cadeia polipeptídica (**Figura 1**). A primeira cadeia polipeptídica do diacorpo biespecífico compreenderá, na direção do terminal N para o terminal C, um terminal N, um Domínio Variável de Cadeia Leve (Domínio VL) de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD3 (VL_{CD3}), um péptido ligante interveniente (Ligante 1), um Domínio Variável de Cadeia Pesada (Domínio VH) de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD123 (VH_{CD123}) e um terminal C.

[128] Uma sequência preferida para um domínio VL_{CD3} é **SEQ ID NO:1**:

```
QAVVTQEPSL   TVSPGGTVTL   TCRSSTGAVT   TSNYANWVQQ   KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT   PARFSGSLLG   GKAALTITGA   QAEDEADYYC   ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG
```

[129] O domínio de ligação ao antígeno de VL_{CD3} compreende:

CDR_{L1} (**SEQ ID NO:2**): RSSTGAVTTSNYAN

CDR_{L2} (**SEQ ID NO:3**): GTNKRAP

CDR_{L3} (**SEQ ID NO:4**): ALWYSNLWV.

[130] Uma sequência preferida para tal Ligante 1 é **SEQ ID NO: 5**: GGGSGGGG. Uma sequência preferida para um domínio VH_{CD123} é **SEQ ID NO:6**:

EVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMKWVRQA PGQGLEWIGD
IIPSNQATFY NQKFKGRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSH
LLRASWFAYW GQGLTVTVSS

[131] O domínio de ligação ao antígeno de VH_{CD123} compreende:

CDR_{H1} (**SEQ ID NO:7**): DYYMK

CDR_{H2} (**SEQ ID NO:8**): DIIPSNQATFYNQKFKG

CDR_{H3} (**SEQ ID NO:9**): SHLLRASWFAY.

[132] A segunda cadeia polipeptídica compreenderá, na direção do terminal N para o terminal C, um terminal N, um domínio VL de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD123 (VL_{CD123}), um peptídeo ligante interveniente (*por exemplo*, Ligante 1), um domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD3 (VH_{CD3}) e um terminal C. Uma sequência preferida para um domínio VL_{CD123} é **SEQ ID NO:10**:

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL EIK

[133] O domínio de ligação ao antígeno de VL_{CD123} compreende:

CDR_{L1} (**SEQ ID NO:11**): KSSQSLLNSGNQKNYLT

CDR_{L2} (**SEQ ID NO:12**): WASTRES

CDR_{L3} (**SEQ ID NO:13**): QNDYSYPYT.

[134] Uma sequência preferida para um domínio VH_{CD3} é **SEQ ID NO:14**:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR

HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

[135] O domínio de ligação ao antígeno de VH_{CD3} compreende:

CDR_{H1} (**SEQ ID NO:15**): TYAMN

CDR_{H2} (**SEQ ID NO:16**): RIRSKYNNYATYYADSVKD

CDR_{H3} (**SEQ ID NO:17**): HGNFGNSYVSWFAY.

[136] Os diacórpors biespecíficos de **CD123 x CD3** otimizados para sequência da presente invenção são projetados de modo que tais primeiro e segundo polipeptídeos se liguem covalentemente um ao outro através de resíduos de cisteína ao longo de seu comprimento. Tais resíduos de cisteína podem ser introduzidos no ligante intermediário (*por exemplo*, Ligante 1) que separa os domínios VL e VH dos polipeptídeos. Alternativamente, e mais preferencialmente, um segundo peptídeo (Ligante 2) é introduzido em cada cadeia polipeptídica, por exemplo, em uma posição de terminal N para o domínio VL ou terminal C para o domínio VH de tal cadeia polipeptídica. Uma sequência preferida para tal Ligante 2 é **SEQ ID NO: 18: GGCGGG**.

[137] A formação de heterodímeros pode ser conduzida por engenharia adicional de tais cadeias polipeptídicas para conter bobinas polipeptídicas de carga oposta. Assim, em uma modalidade preferencial, uma das cadeias polipeptídicas será projetada para conter um domínio de "bobina E" (**SEQ ID NO:19: EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK**) cujos resíduos formarão uma carga negativa em pH 7, enquanto a outra das duas cadeias polipeptídicas será projetada para conter um domínio "bonina K" (**SEQ ID NO:20: KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE**) cujos resíduos formarão uma carga positiva em pH 7. A presença de tais domínios carregados promove a associação entre o primeiro

e o segundo polipeptídeos e, assim, promove a heterodimerização.

[138] É irrelevante qual bobina é fornecida para a primeira ou segunda cadeias polipeptídicas. No entanto, um diacampo biespecífico de **CD123 x CD3** otimizado para sequência preferencial da presente invenção ("**DART-A**") tem uma primeira cadeia polipeptídica com a sequência (**SEQ ID NO:21**):

```
QAVVTQEPSL   TVSPGGTVTL   TCRSSTGAVT   TSNYANWVQQ   KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT   PARFSGSLLG   GKAALTITGA   QAEDEADYYC   ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG   GGGSGGGGEV   QLVQSGAELK   KPGASVKVSC   KASGYTFTDY
YMKWVRQAPG   QGLEWIGDII   PSNGATFYNQ   KFKGRVTITV   DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA   VYYCARSHLL   RASWFAYWGQ   GTLVTVSSGG   CGGGEVAALE
KEVAALEKEV   AALEKEVAAL   EK
```

[139] Cadeia **DART-A** 1 é composta de: **SEQ ID NO:1** – **SEQ ID NO:5** – **SEQ ID NO:6** – **SEQ ID NO:18** – **SEQ ID NO:19**. Um polinucleotídeo que codifica a primeira cadeia de polipeptídeo de **DART-A** é **SEQ ID NO:22**:

```
caggctgtgg   tgactcagga   gccttcactg   accgtgtccc   caggcggaac
tgtgaccctg   acatgcagat   ccagcacagg   cgcagtgacc   acatctaact
acgccaattg   ggtgcagcag   aagccaggac   aggcaccaag   gggcctgatc
gggggtacaa   acaaaagggc   tccttgacc   cctgcacggc   tttctggaag
tctgctgggc   ggaaaggccg   ctctgactat   taccggggca   caggccgagg
acgaagccga   ttactattgt   gctctgtggt   atagcaatct   gtgggtgttc
gggggtggca   caaaactgac   tgtgctggga   gggggtggat   ccggcggcgg
aggcgagggtg   cagctggtgc   agtccggggc   tgagctgaag   aaaccgggag
cttccgtgaa   ggtgtcttgc   aaagccagtg   gctacacctt   cacagactac
tatatgaagt   gggtcaggca   ggctccagga   cagggactgg   aatggatcgg
cgatatcatt   ccttccaacg   gggccacttt   ctacaatcag   aagtttaaag
gcagggtgac   tattaccgtg   gacaaatcaa   caagcactgc   ttatatggag
ctgagctccc   tgcgctctga   agatacagcc   gtgtactatt   gtgctcggtc
```

acacctgctg agagccagct ggtttgctta ttggggacag ggcaccctgg
 tgacagtgtc ttccggagga tgtggcggtg gagaagtggc cgcactggag
 aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc gctgcacttg aaaaggaggt
 cgcagccctg gagaaa

[140] A segunda cadeia de polipeptídeos de **DART-A** tem a sequência (**SEQ ID NO:23**):

DFVMTQSPDS LAVSLGERVT MSCKSSQSLL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
 KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGS GTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY
 PYTFGQGTKL EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF
 STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKDR FTISRDDSKN
 SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG
 GKVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[141] Cadeia **DART-A 2** é composta de: **SEQ ID NO:10** – **SEQ ID NO:5** – **SEQ ID NO:14** – **SEQ ID NO:18** – **SEQ ID NO:20**. Um polinucleotídeo que codifica a segunda cadeia de polipeptídeo de **DART-A** é **SEQ ID NO:24**:

gacttcgtga tgacacagtc tctgatagt ctggccgtga gtctggggga
 gcgggtgact atgtcttgca agagctccca gtcactgctg aacagcggaa
 atcagaaaaa ctatctgacc tggtagcagg agaagccagg ccagccccct
 aaactgctga tctattgggc ttccaccagg gaatctggcg tgcccagacag
 attcagcggc agcggcagcg gcacagattt taccctgaca atttctagtc
 tgcaggccga ggacgtggct gtgtactatt gtcagaatga ttacagctat
 ccctacactt tcggccaggg gaccaagctg gaaattaaag gaggcggatc
 cggcggcggga ggcgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttgggcc
 agcctggagg gtccttgaga ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc
 agcacatacg ctatgaattg ggtccgcccag gctccaggga aggggctgga
 gtgggttggga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca acctactatg
 ccgactctgt gaaggataga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac
 tcaactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggccgtgta
 ttactgtgtg agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tcttgggttg

cttattgggg acaggggaca ctggtgactg tgtcttccgg aggatgtggc
 ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa
 ggtcgcccga cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag

[142] O **DART-A** tem a capacidade de se ligar simultaneamente a CD123 e CD3 conforme agrupados por células humanas e de macaco cinomolgo. Verificou-se que o fornecimento de **DART-A** causa a ativação de células T, medeia a redução de blastos, conduz a expansão de células T, induz a ativação de células T e causa a morte redirecionada de células cancerosas alvo (Tabela 4).

Tabela 4			
Constantes de dissociação de equilíbrio (K_D) para a ligação de DART-A a CD3 e CD123 humano e de macaco Cinomolgo			
Antígenos	k_a (\pm SD) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (\pm SD) (s^{-1})	K_D (\pm SD) (nM)
CD3 ϵ/δ humano	5,7 (\pm 0,6) x 10 ⁵	5,0 (\pm 0,9) x 10 ⁻³	9,0 \pm 2,3
CD3 ϵ/δ Cinomolgo	5,5 (\pm 0,5) x 10 ⁵	5,0 (\pm 0,9) x 10 ⁻³	9,2 \pm 2,3
CD123-His Humano	1,6 (\pm 0,4) x 10 ⁶	1,9 (\pm 0,4) x 10 ⁻⁴	0,13 \pm 0,01
CD123-His Cinomolgo	1,5 (\pm 0,3) x 10 ⁶	4,0 (\pm 0,7) x 10 ⁻⁴	0,27 \pm 0,02

[143] Mais particularmente, o **DART-A** exibe uma potente capacidade de morte redirecionada com concentrações necessárias para atingir 50% da atividade máxima (EC_{50} s) na faixa de sub-ng/ml, independentemente da especificidade de ligação do epítipo CD3 em linhas de células alvo com alta expressão de CD123 (Kasumi 3 (EC_{50} = 0,01 ng/ml)) expressão de CD123 média (Molm13 (EC_{50} = 0,18 ng/ml) e THP-1 (EC_{50} = 0,24 ng/ml)) e expressão de CD123 média baixa ou baixa (TF-1 (EC_{50} = 0,46 ng/ml) e RS4-11 (EC_{50} = 0,5 ng/ml)). Da mesma forma, a morte redirecionada por **DART-A** também foi observada com várias

linhas de células alvo com células T de diferentes doadores e nenhuma atividade de morte redirecionada foi observada em linhas de células que não expressam CD123. Os resultados são resumidos na **Tabela 5**.

Tabela 5			
Linha de célula alvo	Expressão de superfície CD123 (Locais de ligação de anticorpo)	EC₅₀ de diacorpos biespecíficos CD123 x CD3 com sequência otimizada (ng / ml) E:T = 10:1	Extermínio % Max
Kasumi-3	118.620	0,01	94
Molm13:	27.311	0,18	43
THP-1:	58.316	0,24	40
TF-1:	14.163	0,46	46
RS4-11:	957	0,5	60
A498:	Negativo	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade
HT29	Negativo	Nenhuma atividade	Nenhuma atividade

[144] Além disso, quando células T humanas e células tumorais (Molm13 ou RS4-11) foram combinadas e injetadas subcutaneamente em camundongos knockout NOD/SCID gama (NSG), os tumores MOLM13 foram significativamente inibidos em 0,16, 0,5, 0,2, 0,1, 0,02, e níveis de dose de 0,004 mg/kg. Uma dose de 0,004 mg/kg e superior foi ativa no modelo MOLM13. As doses mais baixas de **DART-A** associadas à inibição do crescimento do tumor no modelo MOLM13 em comparação com o modelo RS4-11 são consistentes com os dados in vitro que demonstram que as células MOLM13 têm um nível mais alto de expressão de CD123 do que as células RS4-11, que se

correlacionam com maior sensibilidade à citotoxicidade mediada por **DART-A** in vitro em células MOLM13.

[145] O **DART-A** é ativo contra amostras primárias de AML (mononucleócitos da medula óssea (BMNC) e mononucleócitos do sangue periférico (PBMC)) de pacientes com AML. A incubação de amostras de medula óssea primária de AML com **DART-A** resultou na depleção da população de células leucêmicas ao longo do tempo, acompanhada por uma expansão concomitante das células T residuais (CD4 e CD8) e a indução de marcadores de ativação de células T (CD25 e Ki-67). Foi observada regulação positiva dos níveis de granzima B e perforina em células T CD8 e CD4. A incubação de amostras de medula óssea de AML primária com **DART-A** resultou na depleção da população de células leucêmicas ao longo do tempo em comparação com o controle não tratado ou o DART de controle. Quando as células T foram contadas (coloração de CD8 e CD4) e a ativação (coloração de CD25) foram testadas, as células T expandiram e foram ativadas na amostra **DART-A** em comparação com as amostras DART não tratadas ou de controle. O **DART-A** também foi capaz de mediar o esgotamento de células pDCs em PBMCs humanos e de macaco cinomolgo, com pDCs de macaco cinomolgo sendo esgotados tão cedo quanto 4 dias após a infusão com tão pouco quanto 10 ng/kg de **DART-A**. Nenhuma elevação nos níveis de citocinas de interferon gama, TNF alfa, IL6, IL5, IL4 e IL2 foi observada em animais tratados com **DART-A**. Esses dados indicam que a morte de células alvo mediada por **DART-A** foi mediada por uma granzima B e uma via de perforina.

[146] Nenhuma atividade foi observada contra alvos negativos para CD123 (células U937) ou com DART de controle, indicando que a ativação de células T observada era

estritamente dependente do engajamento de células alvo e que o engajamento monovalente de CD3 por **DART-A** era insuficiente para desencadear a ativação de células T.

[147] Em suma, o **DART-A** é uma molécula baseada em anticorpo que envolve a subunidade CD3 ϵ do TCR para redirecionar os linfócitos T contra as células que expressam CD123, um antígeno regulado positivamente em várias malignidades hematológicas. O **DART-A** se liga a antígenos humanos e de macaco cinomolgo com afinidades semelhantes e redireciona as células T de ambas as espécies para matar as células CD123+. Os macacos infundidos 4 ou 7 dias por semana com doses crescentes semanais de **DART-A** mostraram depleção das células CD123+ circulantes 72h após o início do tratamento que persistiu ao longo das 4 semanas de tratamento, independentemente dos esquemas de dosagem. Uma diminuição nas células T circulantes também ocorreu, mas se recuperou ao valor de linha de base antes da infusão subsequente em macacos no esquema de dosagem de 4 dias, consistente com a mobilização mediada pelo **DART-A**. A administração de **DART-A** aumentou as células T circulantes PD1+, mas não TIM-3+; além disso, a análise *ex vivo* de células T de macacos tratados exibiu lise de células alvo redirecionada inalterada, indicando que não houve exaustão. A toxicidade foi limitada a uma liberação transitória mínima de citocinas após a primeira infusão de **DART-A**, mas não após as administrações subsequentes, mesmo quando a dose foi aumentada, e uma diminuição reversível mínima na massa de glóbulos vermelhos com redução concomitante nos progenitores de medula óssea CD123+.

E. MOLÉCULAS DE DIACORPO BIESPECÍFICAS ADICIONAIS

[148] Uma versão alternativa de **DART-A** que

compreende uma região Fc e que tem a estrutura geral mostrada na Figura 1B é descrita em US 2016-0200827. Os polipeptídeos preferidos que contêm os domínios CH2 e CH3 de um domínio Fc têm a sequência (**SEQ ID NO:25**) (Domínio Fc "Knob-Bearing"):

```
APEAAGGPSV   FLFPPKPKDT   LMISRTPEVT   CVVVDVSHED   PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK   PREEQYNSTY   RVVSVLTVLH   QDWLNGKEYK   CKVSNKALPA
PIEKTISKAK   GQPREPQVYT   LPPSREEMTK   NQVSLWCLVK   GFYPSDIAVE
WESNGQPENN   YKTTTPVLDS   DGSFFLYSKL   TVDKSRWQQG   NVFSCSVMHE
ALHNNHYTQKS LSLSPGX
```

em que **X** é K ou é ausente

e a sequência (**SEQ ID NO:26**) (Domínio Fc "Hole-Bearing"):

```
APEAAGGPSV   FLFPPKPKDT   LMISRTPEVT   CVVVDVSHED   PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK   PREEQYNSTY   RVVSVLTVLH   QDWLNGKEYK   CKVSNKALPA
PIEKTISKAK   GQPREPQVYT   LPPSREEMTK   NQVSLSCAVK   GFYPSDIAVE
WESNGQPENN   YKTTTPVLDS   DGSFFLVSKL   TVDKSRWQQG   NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGX,
```

em que **X** é K ou é ausente.

[149] O primeiro polipeptídeo de um construto DART-A com Fc exemplificativo compreende, na direção do terminal N para o terminal C, um terminal N, um domínio VL de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD123 (VL_{CD123}), um ligante intermediário peptídeo (Ligante 1), um domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD3 (VH_{CD3}), um Ligante 2, um Domínio de bobina E, um Ligante 5, Peptídeo 1, um polipeptídeo que contém os domínios CH2 e CH3 de um Domínio Fc e um terminal C. Um ligante 5 preferido tem a sequência: GGG. Um peptídeo 1 preferido tem a sequência: DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:29**). Dessa forma, o primeiro polipeptídeo de uma DART-A com construção Fc Versão 1 é composto de: **SEQ ID NO:10 – SEQ**

ID NO:5 – SEQ ID NO:14 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:19 – GGG – SEQ ID NO:29 – SEQ ID NO:25 (em que **X** é **K**).

[150] Uma sequência preferida do primeiro polipeptídeo de tal DART-A com construção Fc Versão 1 tem a sequência (**SEQ ID NO:27**):

DFVMTQSPDS	LAVSLGERVT	MSCKSSQSL	NSGNQKNYLT	WYQQKPGQPP
KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQAEDVA	VYYCQNDYSY
PYTFGQGTKL	EIKGGGSGGG	GEVQLVESGG	GLVQPGGSLR	LSCAASGFTF
STYAMNWVRQ	APGKGLEWVG	RIRSKYNNYA	TYYADSVKDR	FTISRDDSKN
SLYLQMNSLK	TEDTAVYYCV	RHGNFNGNSYV	SWFAYWGQGT	LVTVSSGGCG
GGEVAALEKE	VAALEKEVAA	LEKEVAALEK	GGGDKTHTCP	PCPAPEAAGG
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA
KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS
KAKGQPREPQ	VYTLPPSREE	MTKNQVSLWC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP
ENNYKTTTPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT
QKSLSLSPGK				

[151] A segunda cadeia de tal construto DART-A com Fc versão 1 compreenderá, na direção do terminal N para o terminal C, um terminal N, um domínio VL de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD3 (VL_{CD3}), um peptídeo ligante interveniente (Ligante 1), um domínio VH de um anticorpo monoclonal capaz de se ligar a CD123 (VH_{CD123}), um Ligante 2, um Domínio de bobina K e um terminal C. Dessa forma, o segundo polipeptídeo de tal DART-A com construção Fc Versão 1 é composto de: **SEQ ID NO:1 – SEQ ID NO:5 – SEQ ID NO:6 – SEQ ID NO:18 – SEQ ID NO:20**. Tal polipeptídeo tem a sequência (**SEQ ID NO:28**):

QAVVTQEPSL	TVSPGGTVTL	TCRSSTGAVT	TSNYANWVQQ	KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT	PARFSGSLLG	GKAALTITGA	QAEDEADYYC	ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG	GGGSGGGGEV	QLVQSGAELK	KPGASVKVSC	KASGYTFTDY

YMKWVRQAPG QGLEWIGDII PSNGATFYNQ KFKGRVTITV DKSTSTAYME
 LSSLRSEDTA VYYCARSHLL RASWFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK
 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

[152] A terceira cadeia polipeptídica de tal DART-A com Fc versão 1 compreenderá os Domínios CH2 e CH3 de um Domínio Fc de IgG. Um polipeptídeo preferido que é composto de Peptídeo 1 (DKTHTCPPCP; **SEQ ID NO:29**) e os domínios CH2 e CH3 de um domínio Fc (**SEQ ID NO:26**, em que **X** é K) e tem a sequência de **SEQ ID NO:30**:

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

[153] Diacorpos biespecíficos **CD123 x CD3** adicionais que compreendem domínios de ligação anti-CD3 otimizados alternativos são fornecidos nos Pedidos números US: 62/631.043 (depositado em 15 de fevereiro de 2018); e 62/738.632 (depositado em 28 de setembro de 2018) (todos incorporados no presente documento).

III. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

[154] As composições da invenção incluem composições de fármacos a granel úteis na fabricação de composições farmacêuticas (*por exemplo*, composições impuras ou não estéreis) e composições farmacêuticas (*isto é*, composições que são adequadas para administração a um indivíduo ou paciente) que podem ser usadas na preparação de formas de dosagem unitária. Tais composições compreendem uma quantidade profilaticamente ou terapêuticamente eficaz de uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** e um veículo farmacêuticamente

aceitável.

[155] As formulações farmacêuticas preferidas compreendem uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** e um estabilizador aquoso e, opcionalmente, um veículo farmacêuticamente aceitável.

[156] Conforme usado no presente documento, o termo "**veículo farmacêuticamente aceitável**" se destina a se referir a um diluente, adjuvante (por exemplo, adjuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente ou veículo que é aprovado por uma agência reguladora ou listado na Farmacopeia dos EUA ou em outra farmacopeia geralmente reconhecida como sendo adequada para entrega em animais e, mais particularmente, em humanos. Esses veículos farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, como água e óleos, incluindo os de petróleo, animal, vegetal ou de origem sintética, como óleo de amendoim, óleo de soja, óleo mineral, óleo de gergelim e semelhantes. Água é um veículo preferido quando a composição farmacêutica é administrada intravenosamente. Soluções salinas e soluções aquosas de dextrose e glicerol também podem ser empregadas como veículos líquidos, particularmente para soluções injetáveis. Excipientes farmacêuticos adequados incluem amido, glicose, lactose, sacarose, gelatina, malte, arroz, farinha, giz, gel de sílica, estearato de sódio, monoestearato de glicerol, talco, cloreto de sódio, leite desnatado em pó, glicerol, propileno, glicol, água, etanol e similares. A composição, se desejado, também pode conter quantidades menores de agentes umectantes e emulsificantes ou agentes tamponantes de pH. Essas composições podem assumir a forma de soluções, suspensões, emulsões, comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, formulações de liberação sustentada e

similares.

[157] Geralmente, os ingredientes das composições da invenção são fornecidos separadamente ou misturados em forma de dosagem unitária, por exemplo, como uma formulação líquida, como um pó liofilizado seco ou concentrado sem água em um recipiente hermeticamente fechado, como um frasco, uma ampola ou sachê indicando a quantidade de agente ativo. Quando a composição é para ser administrada por infusão, pode ser dispensada com um frasco de infusão que contém água ou soro fisiológico estéril de grau farmacêutico. Quando a composição é administrada por injeção, uma ampola de água estéril para injeção ou soro fisiológico pode ser fornecido para que os ingredientes possam ser misturados antes da administração.

[158] A invenção também fornece um pacote ou kit farmacêutico que compreende um ou mais recipientes que contêm uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** sozinha ou com um estabilizador e/ou um veículo farmacêuticamente aceitável. Adicionalmente, um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para o tratamento de uma doença também podem ser incluídos no pacote ou kit farmacêutico. A invenção também fornece um pacote ou kit farmacêutico que compreende um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente associado a tal recipiente (ou recipientes) pode estar um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regulamenta a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação da agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

IV. KITS

[159] A presente invenção fornece kits que compreendem uma molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**, material de instrução (por exemplo, relacionado ao armazenamento, dosagem, indicações, efeitos colaterais, contraindicações *etc.*) e, opcionalmente, um estabilizador e/ou veículo que pode ser usado nos métodos acima. Em tais kits, a molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** é preferencialmente embalada em um recipiente hermeticamente fechado, como uma ampola, um frasco, um sachê *etc.* que de preferência indica a quantidade da molécula contida na mesma. O recipiente pode ser formado de qualquer material farmacologicamente aceitável, como vidro, resina, plástico *etc.* A molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** de tal kit é preferencialmente fornecida como uma solução líquida, um pó liofilizado esterilizado seco ou um concentrado livre de água em um recipiente hermeticamente fechado que pode ser reconstituído, *por exemplo*, com água ou solução salina até a concentração apropriada para administração a um sujeito. Esse líquido ou material liofilizado deve ser armazenado entre 2 e 8 °C em sua embalagem original e o material deve ser administrado em 12 horas, de preferência em 6 horas, em 5 horas, em 3 horas ou em 1 hora após a reconstituição. O kit pode ainda compreender um ou mais outros agentes profiláticos e/ou terapêuticos úteis para o tratamento do câncer, em um ou mais recipientes; e/ou o kit pode compreender ainda um ou mais anticorpos citotóxicos que se ligam a um ou mais antígenos de câncer associados ao câncer. Em certas modalidades, o outro agente profilático ou terapêutico é um quimioterápico. Em outras modalidades, o agente profilático ou terapêutico é um

terapêutico biológico ou hormonal. O kit pode compreender ainda instruções para uso ou outras informações impressas.

[160] Adicionalmente, um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para o tratamento de uma doença também podem ser incluídos no pacote ou kit farmacêutico. A invenção também fornece um pacote ou kit farmacêutico que compreende um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas da invenção. Opcionalmente associado a tal recipiente (ou recipientes) pode estar um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regulamenta a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação da agência de fabricação, uso ou venda para administração humana.

V. MÉTODOS DE ADMINISTRAÇÃO

[161] As formulações farmacêuticas da molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** da presente invenção podem ser fornecidas para o tratamento, profilaxia e melhoria de um ou mais sintomas associados a uma doença, distúrbio ou infecção por administração a um sujeito de uma quantidade eficaz de uma molécula da invenção, ou uma composição farmacêutica que compreende uma proteína de fusão ou uma molécula conjugada da invenção. Em um aspecto preferido, tais composições são substancialmente purificadas (*isto é*, substancialmente livres de substâncias que limitam seu efeito ou produzem efeitos colaterais indesejados). Em uma modalidade específica, o indivíduo é um animal, de preferência um mamífero, como não primata (*por exemplo*, bovino, equino, felino, canino, roedor *etc.*) ou um primata (*por exemplo*, macaco, tal como, um macaco Cinomolgo, humano *etc.*). Em uma modalidade preferida, o sujeito

ou paciente é um humano.

[162] Os métodos de administração de uma formulação farmacêutica de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** da invenção incluem, mas sem limitação, administração parenteral (*por exemplo*, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea). Em uma modalidade específica, as moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** são administradas por via intravenosa. As composições podem ser administradas por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão, e podem ser administradas em conjunto com outros agentes biologicamente ativos.

[163] Administração por infusão é, de preferência, realizada com uso de uma bomba de infusão. "**Bombas de infusão**" são dispositivos médicos que entrega fluidos em um corpo de paciente de uma maneira controlada, especialmente em uma taxa definida e por um período de tempo prolongado. As bombas de infusão podem ser acionadas mecanicamente, mas são mais preferencialmente acionadas eletricamente. Algumas bombas de infusão são bombas de infusão "**estacionárias**", e são projetadas para serem usadas em uma cabeceira de paciente. Outras, chamadas de bombas de infusão "**ambulatórias**", são projetadas para serem portáteis ou utilizáveis junto ao corpo. Uma bomba de "**seringa**" é uma bomba de infusão em que o fluido a ser entregue é mantido no reservatório da câmara (*por exemplo*, uma seringa), e um pistão móvel é usado para controlar o volume da câmara e, dessa forma, a entrega do fluido. Em uma bomba de infusão "**elastomérica**", o fluido é mantido em um reservatório de balão extensível e a pressão das paredes elásticas do balão conduz a distribuição de fluido. Em uma

bomba de infusão "**peristáltica**", um conjunto de roletes pressiona uma extensão de tubo flexível, empurrando o fluido para a frente. Em uma bomba de infusão "**multicanal**", os fluidos podem ser fornecidos a partir de vários reservatórios em taxas múltiplas. Uma "**bomba inteligente**" é uma bomba de infusão equipada com um sistema de distribuição de fluido controlado por computador de modo a ser capaz de alertar em resposta a um risco de interação adversa de medicamento ou quando os parâmetros da bomba foram definidos além dos limites especificados. Exemplos de bombas de infusão são bem conhecidos e são fornecidos, por exemplo, em [Anônimo] 2002 "*General-Purpose Infusion Pumps*," *Health Devices* 31(10):353-387; e nas Patentes números US 10.029.051, 10.029.047, 10.029.045, 10.022.495, 10.022.494, 10.016.559, 10.006.454, 10.004.846, 9.993.600, 9.981.082, 9.974.901, 9.968.729, 9.931.463, 9.927.943 *etc.*

[164] É preferido que as formulações farmacêuticas da molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** da invenção sejam administradas por infusão facilitada por uma ou mais bombas ambulatoriais, de modo que o paciente seja ambulatorial durante o regime terapêutico. É preferido que as formulações farmacêuticas da molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** da invenção sejam administradas por infusão contínua. Em uma modalidade preferida, um regime de infusão contínua de 7 dias compreende uma dosagem de tratamento de cerca de 30 ng/kg de peso do paciente/dia por 3 dias seguida por uma dosagem de tratamento de cerca de 100 ng/kg/dia por 4 dias (por exemplo, uma dosagem de tratamento de 30 ng/kg de peso do paciente/dia por 3 dias seguida por uma dosagem de tratamento de 100 ng/kg/dia por 4 dias; *etc.*). Em modalidades

particularmente preferidas, tal regime de infusão contínua de 7 dias é seguido por um regime de infusão contínua de 21 dias em que uma dosagem de tratamento de 500 ng/kg/dia é administrada durante os dias 1-4 de cada semana de tal regime de 21 dias e durante os dias 5-7 de cada semana nenhuma dosagem de tratamento é administrada. Alternativamente, tal regime de infusão contínua de 7 dias é seguido por um regime de infusão contínua de 21 dias em que uma dosagem de tratamento de 500 ng/kg/dia é administrada todos os dias durante 21 dias.

[165] Em qualquer um dos cursos de tratamento descritos acima, a proporção de linfócitos T CD8+ no microambiente de tumor pode ser monitorada adicionalmente. Tal monitoramento pode ocorrer antes da administração da molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**, durante o curso da terapia com molécula de ligação **CD123 x CD3** e/ou após a conclusão de um ciclo de terapia com molécula de ligação **CD123 x CD3**.

VI. USOS DAS COMPOSIÇÕES DA INVENÇÃO

[166] As moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** da invenção podem ser usadas para tratar qualquer doença ou condição associada ou caracterizada pela expressão de CD123. Em particular, as moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** da invenção podem ser usadas para tratar malignidades hematológicas. As moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** da invenção são particularmente adequadas para uso no tratamento de malignidades hematológicas, incluindo malignidades hematológicas quimio-refratárias. Conforme usado no presente documento, uma malignidade hematológica quimio-refratária é uma malignidade hematológica que é refratária a duas ou mais tentativas de indução, uma primeira CR de menos de 6 meses ou uma falha após

dois ou mais ciclos de tratamento com um agente hipometilante).

[167] Assim, sem limitação, tais moléculas podem ser empregadas no diagnóstico ou tratamento de leucemia mieloide aguda (**AML**) (incluindo AML quimio-refratária primária), leucemia mieloide crônica (**CML**), incluindo crise blástica de CML e oncogene de Abelson associado à CML (**Translocação Bcr-ABL**), síndrome mielodisplásica (**MDS**), leucemia linfoblástica B aguda (**B-ALL**), leucemia linfoblástica T aguda (**T-ALL**), leucemia linfocítica crônica (**CLL**), incluindo síndrome de Richter ou transformação da chamada de Richter, cabeluda leucemia celular (**HCL**), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (**BPDCN**), linfoma não-Hodgkin (**NHL**), incluindo linfoma de células do manto (**MCL**) e linfoma linfocítico pequeno (**SLL**), linfoma de Hodgkin, mastocitose sistêmica e linfoma de Burkitt. As moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** da invenção podem ser utilizadas adicionalmente na fabricação de medicamentos para o tratamento das afecções descritas acima.

[168] As moléculas de ligação biespecíficas **CD123 x CD3** da invenção são particularmente adequadas para uso no tratamento de leucemia mieloide aguda (**AML**, incluindo leucemia mieloide aguda quimio-refratária primária), síndrome mielodisplásica hematológica (**MDS**), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (**BPDCN**), linfoma não-Hodgkin (**NHL**) ou leucemia linfoblástica T aguda (**T-ALL**).

VII. MODALIDADES PARTICULARES DA INVENÇÃO

[169] Tendo agora descrito de forma geral a invenção, a mesma será mais facilmente compreendida por meio de referência às seguintes modalidades numeradas ("**E1**" - "**E60**"), que são fornecidas apenas a título de ilustração e não

se destinam a ser limitantes da presente invenção, a menos que especificado:

E1. Um método de tratamento de uma malignidade hematológica quimiorrefratária em um paciente, sendo que o dito método compreende a administração ao dito paciente de uma dosagem de tratamento de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**, sendo que a dita dosagem é eficaz para estimular a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente e, assim, tratar a dita malignidade.

E2. O método, de acordo com a **E1**, sendo que o dito método compreende, adicionalmente, a avaliação de expressão de um ou mais genes-alvo e/ou de referência em uma amostra celular do dito paciente, antes e/ou após a dita administração da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E3. O método, de acordo com a **E2**, em que o dito método compreende a avaliação da expressão do dito um ou mais alvos e/ou do dito um ou mais genes de referência antes da dita administração da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E4. O método, de acordo com a **E2**, em que o dito método compreende a avaliação da expressão de um ou mais alvos e/ou um ou mais genes de referência subsequentes à dita administração da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E5. Um método para determinar se um paciente seria um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar uma malignidade hematológica, sendo que o dito método compreende:

(a) avaliar a expressão de um ou mais genes-alvo em uma amostra celular do dito paciente antes da administração da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**, em relação à expressão de um ou mais genes-alvo e/ou de referência; e

(b) identificar o paciente como um respondedor adequado para o tratamento com uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** se a expressão dentre o dito um ou mais genes-alvo estiver aumentada em relação à dita expressão dentre o dito um ou mais genes-alvo e/ou de referência.

E6. O método, de acordo com qualquer uma das **E2-E6**, em que o dito método avalia:

(i) a expressão de um ou mais genes-alvo; e
(ii) um ou mais genes de referência cuja expressão não está caracteristicamente associada à dita malignidade hematológica.

E7. O método, de acordo com qualquer uma das **E2-E6**, sendo que o dito método compreende a avaliação da expressão dentre o dito um ou mais genes-alvo em relação à expressão de linha de base do dito um ou mais genes de referência do dito paciente.

E8. O método, de acordo com qualquer uma das **E2-E7**, em que o dito método compreende a avaliação da expressão dos ditos um ou mais genes alvo do dito paciente em relação à expressão dos ditos um ou mais genes alvo de um indivíduo que sofre da dita malignidade hematológica, ou de uma população de tais indivíduos.

E9. O método, de acordo com qualquer uma das **E2-E7**, em que o dito método compreende a avaliação da expressão dos ditos um ou mais genes alvo do dito paciente em relação à expressão dos ditos um ou mais genes alvo de um indivíduo que não respondeu com sucesso ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar a dita malignidade hematológica, ou de uma população de tais indivíduos.

E10. O método, de acordo com qualquer uma das **E2-E7**,

em que o dito método compreende a avaliação da expressão dos ditos um ou mais genes alvo do dito paciente em relação à expressão dos ditos um ou mais genes alvo de um indivíduo que respondeu com sucesso ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar a dita malignidade hematológica, ou de uma população de tais indivíduos.

E11. MÉTODO, de acordo com qualquer um dos **E7-E10**, em que o nível de expressão relativa do dito um ou mais genes-alvo na dita população é estabelecido promediando-se o nível de expressão do gene em amostras celulares obtidas a partir da dita população de indivíduos.

E12. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E11**, em que o dito paciente exibe um nível de expressão de pelo menos um dentre os ditos genes alvo:

(a) que é maior do que o primeiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) que é maior do que o primeiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) que tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) que está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a

dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E13. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E11**, em que o dito paciente exibe um nível de expressão de pelo menos um dentre os ditos genes alvo:

(a) que é maior do que o segundo quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) que é maior do que o segundo quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) que tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,5 em relação aos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) que está dentro de pelo menos o segundo quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E14. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E11**, em que o dito paciente exibe um nível de expressão de pelo menos um dentre os ditos genes alvo:

(a) que é maior do que o terceiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) que é maior do que o terceiro quartil dos níveis

de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) que tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,6 em relação aos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E15. Um método de tratamento de uma malignidade hematológica, sendo que o dito método compreende:

(a) empregar o método, de acordo em qualquer um dos **E6-E14**, para determinar se um paciente seria um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar a dita malignidade hematológica;

(b) administrar uma dosagem de tratamento da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** ao dito paciente se o dito paciente for determinado como um respondedor adequado a tal tratamento,

em que a dita administração da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** estimula a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente.

E16. O método de **E15**, em que o dito método compreende adicionalmente avaliar a expressão do dito um ou mais genes alvo do dito paciente uma ou mais vezes após a iniciação do dito tratamento.

E17. Um método para tratar uma malignidade hematológica que compreende:

(a) administrar uma dosagem de tratamento eficaz de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**;

(b) determinar a expressão de um ou mais genes alvo em uma amostra celular obtida do dito paciente em um ou mais pontos de tempo após a administração da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** em relação a um nível de linha de base correspondente de expressão obtido antes da administração da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**;

(c) determinar se a expressão dos ditos um ou mais genes alvo é aumentada em relação ao dito nível de linha de base correspondente de expressão, em que uma determinação de tal expressão aumentada do gene identifica o dito paciente como um respondedor adequado para o tratamento com uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; e

(d) administrar uma dosagem de tratamento eficaz ajustada ou adicional da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** a qualquer um desses pacientes respondedores adequados, em que a dita administração da molécula biespecífica **CD123 x CD3** estimula a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente.

E18. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E17**, em que a dita amostra celular é uma amostra de sangue.

E19. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E17**, em que a dita amostra celular é uma amostra de medula óssea.

E20. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E17**, que compreende detectar o nível de expressão do dito um ou mais genes alvo e/ou o dito um ou mais genes de referência na amostra da medula óssea do paciente.

E21. O método, de acordo com qualquer uma das **E2-E20**, em que a dita avaliação de expressão ou a dita determinação da possibilidade de que o dito paciente seja um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123**

x CD3 para tratar uma malignidade hematológica é realizada por meio:

(a) da determinação dos níveis de expressão gênica para cada gene-alvo em uma ou mais amostras celulares usando uma plataforma de expressão gênica; e

(b) da comparação dos ditos níveis de expressão do gene-alvo com os níveis de expressão de um ou mais genes de referência.

E22. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E21**, em que a dita avaliação de expressão ou a dita determinação da possibilidade de que o dito paciente seja um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica **CD123 x CD3** para tratar uma malignidade hematológica é realizada por meio:

(a) da medição dos níveis de RNA bruto para cada gene-alvo em uma ou mais amostras celulares usando uma plataforma de expressão gênica, em que a plataforma de expressão gênica compreende um conjunto de genes de referência de genes de manutenção, e

(b) da atribuição de um valor de expressão relativa, para cada um dos níveis de RNA bruto medidos para os genes-alvo usando os níveis de RNA medidos dos genes de referência internos.

E23. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E22**, que o dito um ou mais genes-alvo compreendem:

(a) um ou mais dentre: CXCL9, CXCL10, CXCL11, e STAT1; e/ou

(b) um ou mais dentre: CCL5, CD27, CD274, CD276, CD8A, CMKLR1, CXCL9, CXCR6, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-E, IDO1, LAG3, NKG7, PDCD1LG2, PSMB10, STAT1, e TIGIT; e/ou

(c) um ou mais dentre: AREG, CSF3, CXCL1, CXCL2,

CXCL3, CCL20, FOSL1, IER3 (NM_003897.4), IL6 e PTGS2; e/ou

(d) um ou mais dentre: CCL2, CCL3/L1, CCL4, CCL7 e CCL8; e/ou

(e) um ou mais dentre: MAGEA3/A6, MAGEA1, MAGEA12, MAGEA4, MAGEB2, MAGEC1 e MAGEC2; e/ou

(F) um ou mais dentre: APOL6, DTX3L, GBP1, IFI16, IFI27, IFI35, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM2, IRF1, IRF9, ISG15, MX1, OAS1, OAS2, PARP9, PSMB9, STAT2, TMEM140 e TRIM21; e/ou

(G) um ou mais dentre: PSMB8, PSMB9 e PSMB10; e/ou

(h) IL-10; e ou

(i) CD274; e/ou

(J) PDCD1LG2.

E24. O método, de acordo com **E23**, em que o dito um ou mais genes alvo compreende ainda IFNG.

E25. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E24**, em que o um ou mais genes de referência compreendem um ou mais dentre: ABCF1, G6PD, NRDE2, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP, e UBB.

E26. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E25**, em que um escore de assinatura de gene é determinado para o dito um ou mais genes-alvo.

E27. O método, de acordo com o **E26**, em que o dito escore de assinatura de gene é determinado por um processo que compreende:

(a) medir os níveis de RNA bruto para cada gene-alvo em mais uma amostra celular usando uma plataforma de expressão gênica que compreende um conjunto de genes de referência de genes de manutenção,

(b) normalizar cada um dos níveis de RNA bruto

medidos para a média geométrica dos ditos genes de manutenção e, opcionalmente, normalizar ainda mais cada valor de RNA para um padrão,

(c) transformar em log cada valor de RNA normalizado,

(d) multiplicar cada valor de RNA transformado em log por um fator de peso correspondente para gerar um valor de RNA ponderado, e

(e) adicionar os valores de RNA ponderados e, opcionalmente, adicionar uma constante de fator de ajuste para gerar um escore de assinatura de gene único.

E28. O método, de acordo com o **E26** ou **E27**, em que o dito escore de assinatura de gene é determinado usando o gene-alvo (ou genes-alvo), os pesos de escore e, opcionalmente, os fatores de ajuste fornecidos nas **Tabelas 6 e 12A-12G**.

E29. O método, de acordo com qualquer um dos **E26-E28**, em que o dito escore de assinatura de gene é um escore de assinatura de gene determinado para um ou mais dentre:

(a) a assinatura de sinalização de gama IFN;

(b) a assinatura de inflamação de tumor;

(c) a assinatura de inflamação mieloide;

(d) a assinatura da quimiocina inflamatória;

(e) a assinatura de MAGEs;

(f) a assinatura de sinalização a jusante de IFN;

(g) a assinatura de imunoproteassoma;

(h) a assinatura de IL-10;

(i) a assinatura de CD274; e/ou

(j) a assinatura de PDCD1LG2.

E30. O método, de acordo com qualquer um dos **E26-E29**, em que a uma assinatura de gene do paciente indica que:

(a) é maior do que o primeiro quartil de escores

para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o primeiro quartil de escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E31. O método, de acordo com qualquer um dos **E26-E29**, em que a uma assinatura de gene do paciente indica que:

(a) é maior do que o segundo quartil para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão

de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o segundo quartil para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,5 em relação aos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o segundo quartil dos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E32. O método, de acordo com qualquer um dos **E26-E29**, em que assinatura de gene do paciente indica que:

(a) é maior do que o terceiro quartil de escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade

hematológica; ou

(b) é maior do que o terceiro quartil de escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,6 em relação aos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E33. O método, de acordo com qualquer um dos **E28-E29**, em que:

(a) a dita assinatura de gene é a assinatura de sinalização de gama IFN e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 2,5 ser indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**, e/ou

(b) a dita assinatura de gene é a assinatura de inflamação de tumor e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 5,5 ser indicativo de uma resposta do paciente mais favorável ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**; e/ou

(c) a dita assinatura de gene é a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene

do paciente de pelo menos cerca de 4,5 ser indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E34. O método, de acordo com qualquer um dos **E28-E29**, em que a dita assinatura de gene é a assinatura de sinalização de gama IFN, a assinatura de inflamação de tumor ou a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o primeiro quartil de escores da dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o primeiro quartil de escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um

tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E35. O método, de acordo com qualquer um dos **E28-E29**, em que a dita assinatura de gene é a assinatura de sinalização de gama IFN, a assinatura de inflamação de tumor ou a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o segundo quartil de escores da dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o segundo quartil de escores da dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,5 em relação aos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(d) está dentro de pelo menos o segundo quartil dos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos

níveis de expressão de um ou mais dos ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E36. O método, de acordo com qualquer um dos **E28-E29**, em que a dita assinatura de gene é a assinatura de sinalização de gama IFN, a assinatura de inflamação de tumor ou a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene de paciente que:

(a) é maior do que o terceiro quartil de escores da dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o terceiro quartil de escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) tem um fold change de \log_2 de pelo menos cerca de 0,6 em relação aos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do

paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E37. O método, de acordo com a **E29**, em que um escore de módulo dominante de IFN é determinada, e em que um escore de Módulo dominante de IFN do paciente de pelo menos cerca de 25 é indicativa de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E38. O método, de acordo com a **E29**, em que um escore de módulo dominante de IFN é determinada, e em que um escore de módulo dominante de IFN de paciente:

(a) é maior do que o primeiro quartil de escores da dita módulo Dominante de IFN calculado a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o primeiro quartil de escores para Módulo Dominante de IFN calculado a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores para o dito módulo Dominante de IFN calculado a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E39. O método, de acordo com a **E29**, em que um escore de módulo dominante de IFN é determinada, e em que um escore de módulo dominante de IFN de paciente:

(a) é maior do que o segundo quartil de escores do dito Módulo Dominante de IFN calculado a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o segundo quartil de escores para Módulo Dominante de IFN calculado a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**; ou

(c) está dentro de pelo menos o segundo quartil dos escores para o dito Módulo Dominante de IFN calculado a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica **CD123 x CD3**,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E40. O método, de acordo com qualquer um dos **E26-E39**, em que um paciente que exhibe uma assinatura de expressão gênica que é característica de um microambiente de tumor imunologicamente enriquecido e de IFN gama dominante ser indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E41. O método, de acordo com qualquer um dos **E1-E40**,

em que a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** é um anticorpo biespecífico ou molécula biespecífica que compreende um scFv.

E42. O método, de acordo com o **E41**, em que a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** é JNJ-63709178, XmAb14045 ou APVO436.

E43. O método, de acordo com qualquer um dos **E1-E40**, em que a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** é um diacorpo biespecífico covalentemente ligado que tem duas, três ou quatro cadeias de polipeptídeos.

E44. O método, de acordo com o **E43**, em que a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** é um diacorpo que compreende:

(a) uma primeira cadeia polipeptídica com a sequência de aminoácidos de **SEQ ID NO:21**; e

(b) uma segunda cadeia polipeptídica com a sequência de aminoácidos de **SEQ ID NO:23**; e

em que a primeira e a dita segunda cadeias polipeptídicas são covalentemente ligadas uma à outra por uma ligação de dissulfeto.

E45. O método, de acordo com qualquer um dos **E1-E44**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é selecionada a partir do grupo que consiste em: leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crônica (CML), crise blástica de CML, oncogene Abelson associado com CML (translocação Bcr-ABL), síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B), leucemia linfoblástica T aguda (LLA-T), leucemia linfocítica crônica (CLL), síndrome de Richter, transformação de Richter de LLC, leucemia celular pilosa (HCL), neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), linfoma de não Hodgkin (NHL), incluindo linfoma de células do manto (MCL) e um linfoma linfocítico

pequeno (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitose sistêmica e linfoma de Burkitt.

E46. O método, de acordo com o **E45**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é AML.

E47. O método, de acordo com o **E45**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é MDS.

E48. O método, de acordo com o **E45**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é BPDCN.

E49. O método, de acordo com o **E45**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é T-ALL.

E50 O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E49**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é refratária à quimioterapia.

E51. O método, de acordo com o **E1** ou **E50**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é refratária à quimioterapia citotóxica à base de citarabina/antraciclina.

E52. O método, de acordo com o **E1** ou **E50**, em que a dita malignidade hematológica do dito paciente é refratária à quimioterapia com agente hipometilante.

E53. O método, de acordo com qualquer um dos **E2-E52**, que compreende ainda determinar a expressão de nível de CD123 de células blásticas (células cancerosas) como comparado ao nível de linha de base correspondente CD123 expresso por PBMCs normais.

E54. O método, de acordo com o **E56**, em que o dito nível de expressão é medido por expressão de superfície celular de CD123.

E55. O método, de acordo com o **E54**, em que a dita expressão de superfície de CD123 é aumentada por pelo menos cerca de 20% em relação a um nível de linha de base de

expressão.

E56. O método, de acordo com a **E55**, em que o dito aumento na expressão de CD123 torna o paciente mais responsivo ao tratamento com a dita molécula biespecífica **CD123 x CD3**.

E57. O método, de acordo com qualquer uma das **E1-E4**, ou **E6-E56**, em que a dita dosagem de tratamento da dita molécula biespecífica **CD123 x CD3** inclui pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em 30, 100, 300 e 500 ng/kg de peso do paciente/dia.

E58. O método, de acordo com o **E57**, em que a dita dosagem de tratamento inclui uma dose de 30 ng/kg/dia.

E59. O método, de acordo com o **E57**, em que a dita dosagem de tratamento inclui uma dose de 100 ng/kg de peso do paciente/dia.

E60. O método, de acordo com o **E57**, em que a dita dosagem de tratamento inclui uma dose de 300 ng/kg de peso do paciente/dia.

E61. O método, de acordo com o **E57**, em que a dita dosagem de tratamento inclui uma dose de 500 ng/kg de peso do paciente/dia.

E62. O método, de acordo com qualquer um dos **E1-E4**, ou **E6-E561**, em que a dita dosagem de tratamento é administrada por infusão contínua.

E63. O método, de acordo com qualquer um dos **E1-E62**, em que o dito paciente é um paciente humano.

EXEMPLOS

[170] Tendo agora descrito genericamente a invenção, a mesma será mais facilmente compreendida por referência aos seguintes exemplos, os quais são fornecidos a título de ilustração e não se destinam a ser limitantes da

presente invenção, a menos que especificado.

EXEMPLO 1

ASSINATURAS DE EXPRESSÃO DE GENE DE POPULAÇÕES DE PACIENTES PARTICULARMENTE ADEQUADAS PARA TRATAMENTO COM UMA MOLÉCULA DE LIGAÇÃO BIESPECÍFICA CD123 X CD3 DA INVENÇÃO

[171] Para demonstrar uma correlação entre os padrões de expressão dos genes de pacientes com malignidade hematológica, particularmente AML, e o resultado favorável da terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**, o RNA foi isolado de 78 amostras de medula óssea ("BM") obtidas de pacientes com consentimento individual do paciente (36 no início do estudo, 27 após um primeiro ciclo de tratamento e 15 após um segundo ciclo de tratamento) de 40 pacientes com AML recidivante ou refratária inscritos em um ensaio clínico de fase 1/2 de flotetuzumabe (NCT#02152956, um exemplo de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**). A expressão do gene foi avaliada usando o sistema nCounter™ (NanoString Technologies, Inc), que permite a quantificação direta de mRNA multiplexado de transcritos de baixa abundância em uma única reação com alta sensibilidade e linearidade (Vadakekolathu, J., et al. (2017) "Immune gene Expression Profiling In Children And Adults With Acute Myeloid Leukemia Identifies Distinct Phenotypic Patterns," Blood 130:3942-3942; Payton, J.E., et al. (2009). "High throughput digital quantification of mRNA abundance in primary human acute myeloid leukemia samples," J Clin Invest 119:1714-1726). Amostras de linha de base de medula óssea de 36 pacientes foram incluídas na análise, dos quais 35 pacientes foram tratados com uma dose ≥ 500 ng/kg/dia. O ensaio NanoString PanCancer IO 360™ (NanoString Technologies, Inc.) comparou os perfis de expressão de 750 genes que cobrem as principais vias

na interface do tumor, microambiente tumoral e resposta imune, incluindo os níveis de 14 tipos de células imunes e 32 assinaturas imuno-oncológicas. O ensaio NanoString PanCancer IO 360™ também comparou os perfis de expressão de genes de controle e de referência interna para normalização de dados conforme fornecido abaixo.

[172] O perfil de expressão incluiu assinaturas de gene das seguintes vias ou células: Proliferação, perda de JAKSTAT, células endoteliais, B7-H3, perda de APM, atividade glicolítica, mastócitos, citotoxicidade, células citotóxicas, células T CD8, células linfoides, células T, células Treg, CTLA4, TIS, células Th1, TIGIT, células NK CD56^{dim}, células NK, apoptose, hipoxia, ARG1, IL-10, IFN-gama, macrófagos, células mieloides, neutrófilos, PD-L2, estroma, células dendríticas (DC), MAGEs, IDO1, células B, PD-1, NOS2, quimiocinas inflamatórias, PD-L1, CD45, células T CD8 esgotadas, imunoproteassoma, APM, genes regulados a jusante IFN, genes inflamatórios mieloides, genes MHC2, TGF beta, perda de MMR.

[173] Todas as análises de assinatura de gene IO 360 foram realizadas com uso do sistema nCounter™ (NanoString Technologies, Inc.) com o módulo IO 360 Report essencialmente conforme descrito abaixo).

[174] Os genes de assinatura de sinalização de interferon (IFN) gama (incluindo um número de acesso de NCBI representativo e não limitante para cada gene) e fatores de peso são mostrados na **Tabela 6** abaixo.

Tabela 6: Os genes de assinatura de sinalização interferon (IFN) gama

Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Peso
IFN-gama	STAT1	NM_007315.2	0,261104
IFN-gama	CXCL9	NM_002416.1	0,188978
IFN-gama	CXCL10	NM_001565.3	0,308838
IFN-gama	CXCL11	NM_005409.4	0,24108

[175] Para calcular o escore de assinatura de Sinalização de IFN-Gama, as seguintes etapas são realizadas:

- As contagens de dados brutos para cada gene são normalizadas para a média geométrica de 10 genes de manutenção (HK) (ABCF1, NRDE2, G6PD, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP, UBB) para cada amostra.

- Os dados normalizados HK são então normalizados para os padrões do painel IO 360, nesse caso, aqueles executados nos mesmos cartuchos que as amostras de coorte.

- Cada contagem normalizada de genes é então transformada em log.

- Uma vez normalizado e transformado em log, cada gene é multiplicado pelo peso na **Tabela 6**.

- Cada uma dessas contagens ponderadas é somada para gerar um único escore. Um fator de ajuste, que é uma constante, é adicionado ao escore final calculado, para a assinatura de sinalização de IFN-gama, o fator de ajuste é 6,457026. O fator de ajuste foi derivado do escore mais baixo observado (de TCGA e análise de linha celular), para que a faixa de escore seja acima de 0.

[176] Geralmente, a faixa possível de escores de

assinatura de sinalização IFN-gama é de 0 a 10. Para essa primeira coorte, a faixa é de 1 a 5. O escore é calculado para cada amostra de linha de base (dia da tela -14).

[177] Os genes e o fator de peso para assinaturas adicionais examinadas são fornecidos abaixo.

[178] Várias análises foram realizadas comparando os escores de assinatura de sinalização de IFN-gama (e todos os escores de assinatura IO 360) para essa coorte, conforme detalhado abaixo. As diferenças de fold change entre diferentes grupos de pacientes são fornecidas como gráficos de floresta em que o tamanho da caixa representa a significância e cada linha representa os intervalos de confiança (consulte, *por exemplo*, **as Figuras 3A-3C**, e **a Figura 5A**). A distribuição de escores de assinatura de sinalização de IFN-gama entre grupos de pacientes são fornecidas como gráficos de caixa (consulte, *por exemplo*, **A Figura 5B**).

[179] A expressão de linha de base dos genes perfilados foi correlacionada com se o paciente teve uma resposta refratária à quimioterapia convencional (*isto é*, resposta refratária do paciente a um regime de tratamento com citarabina administrada em conjunto com daunorrubicina (*por exemplo*, terapia de indução 7+3, (abreviado como **Ref CTX** ou refratário ao **CTX**)) ou resposta refratária do paciente a um regime de tratamento com os agentes hipometilantes (*por exemplo*, decitabina e azacitidina, (abreviado como **Ref HMA** ou refratário ao **HMA**)) ou à recidiva do paciente (Recidiva). Pacientes com AML secundária (*isto é*, AML evoluindo de mielodisplasia ou como produto de quimioterapia anterior) estão incluídos no grupo refratário a HMA para essas análises. Os dados também foram correlacionados às respostas dos

pacientes à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** com flotetuzumabe. **A Figura 4** fornece um gráfico em cascata de 25 pacientes avaliáveis/tratados na dose-alvo. Essas respostas foram pontuadas como sendo uma resposta objetiva (**OR**) ou como não respondendo (**NR**). Além de pacientes que exibem uma resposta completa, (**CR**), **OR** incluiu todos os pacientes que exibiram uma resposta molecular completa (**mCR**), uma resposta completa com melhora hematológica incompleta (**CRi**), um estado livre de leucemia morfológica (**MLF**), e um resposta parcial (**PR**). Além dos pacientes que não responderam, o **NR** incluiu todos os pacientes que exibiram doença progressiva/falha do tratamento (**PD**) e doença estável (**SD**).

[180] **A Figura 2** fornece um agrupamento hierárquico não supervisionado das 46 assinaturas IO 360 ou tipos de células gerados a partir dos resultados. Os resultados mostram os níveis de linha de base de expressão das 36 amostras de medula óssea (cada uma em uma coluna separada) em relação à assinatura do gene avaliada (cada uma em uma linha separada). Cada escore de assinatura IO 360 foi redimensionada dentro do escore dessa coorte para uma escala de -3 a +3 para facilitar a comparação entre as assinaturas.

[181] A análise da expressão de gene das amostras de BM na linha de base estratifica os pacientes com AML em 3 grupos dentro de um contínuo imunológico: imunodesgastado, imunoexaurido e imunoenriquecido (**Figura 2**), pacientes com doença refratária primária (**recidiva**; refratário a ≥ 2 indução tentativas, primeira **CR** de < 6 meses, ou falha após ≥ 4 ciclos de agentes hipometilantes, **HMA**) mostraram prevalentemente um fenótipo de microambiente de tumor infiltrado imunologicamente (**TME**), que incluiu escores mais altos de quimiocinas

inflamatórias em comparação com pacientes com recidiva ($3,27 \pm 0,22$ vs $2,46 \pm 0,07$, $p=0,026$). Dentro desse grupo, os pacientes refratários à quimioterapia e refratários ao **HMA** se estratificam posteriormente em fenótipos imunoenriquecidos e imunoesgotados, respectivamente. As assinaturas de gene associadas a fenótipos imunodesgastados e imunoenriquecidos estão listadas na **Tabela 7** abaixo e indicadas nos gráficos de floresta mostrados nas **Figuras 3A, 3B e 4A**.

Tabela 7: Lista de assinaturas de gene	
Aglomerado Imune-esgotado 2(C2)	
Citotoxicidade	TH1
Células Citotóxicas	TIGIT
Células T CD8+	NK/NK ^{dim}
Linfoide	Apoptose
Células T	Hipóxia
Treg	ARG1
CTLA4	CD8 esgotado
TIS	imunoproteassoma
Aglomerado Imune-enriquecido 3 (C3)	
IL10	Células B
IFN-gama	PD1
Macrófagos	NOS2
Mieloide	Quimiocinas Inflamatórias
Neutrófilos	PDL1
PDL2	APM
Estroma	A jusante IFN
DC	Inflamação Mieloide
MAGES	MHC2
IDO1	

[182] Os gráficos de floresta das diferenças de mudança de linha de base em um número de assinaturas de gene entre todos os pacientes refratários e recidivantes (**Figura 3A**) entre pacientes refratários e recidivantes **HMA** (**Figura 3B**), entre pacientes refratários a **HMA** e refratários a **CTX** (**Figura 3C**) indicam que os pacientes Refratários a HMA exibem um fenótipo mais senescente. Especificamente, os pacientes refratários a **HMA** exibiram recursos de exaustão imunológica e resistência imunológica adaptativa, incluindo regulação positiva de TIGIT ($5,55 \pm 0,34$ vs $3,85 \pm 0,24$, $p=0,006$), PD-L1 ($3,55 \pm 0,18$ vs $2,4 \pm 0,29$, $p=0,009$) e células Treg ($4,87 \pm 0,23$ vs $3,69 \pm 0,19$, $p=0,0009$) juntamente com uma tendência de células T CD8 cada vez mais esgotadas (CD244, EOMES, LAG3 e PTGER4) em comparação com pacientes refratários a **CTX** (**Figuras 3A-3C**). Representados nas **Figuras 3D-3O** estão vários escores de assinatura de gene associadas aos perfis imunoenriquecidos (aglomerado 2, **Figura 3D-3I**) ou imunoesgotado (aglomerado 3, **Figura 3J-3O**). Os escores de assinatura de gene Mieloide (**Figura 3D**), Macrófago (**Figura 3E**), Neutrófilo (**Figura 3F**), célula B (**Figura 3G**), IFN-gama (**Figura 3H**), PD-L1 (**Figura 3I**), TIGIT (**Figura 3J**), CTLA-4 (**Figura 3K**), Th1 (**Figura 3L**), CTL (**Figura 3M**), célula T CD8 (**Figura 3N**) e Citotoxicidade (**Figura 3O**) são representados graficamente por cada aglomerado imuno Desgastado (Depl.), imuno Enriquecido (Enriquecido) e imuno Esgotado (Exh.) e os valores de p (Kruskal-Wallis) são relatados.

[183] A análise comparativa do escore de assinatura de sinalização de IFN-gama foi feita entre os pacientes de **OR** (incluindo todos os pacientes que exibiram **CR**, Resposta completa; **mCR**, **CR** molecular; **CRi**, Resposta completa

com melhora hematológica incompleta; **MLF**, estado livre de leucemia morfológica; ou **PR**, Resposta parcial)) e pacientes **NR** (incluindo todos os pacientes que apresentam **SD**, Doença Estável; ou **PD**, Doença Progressiva/Falha de Tratamento). **A Figura 4** mostra a mudança (em relação à linha de base) em células blásticas presentes em amostras de medula óssea de 25 pacientes (categorizados como sendo pacientes com recidiva (**RL**) ou pacientes que eram quimio-refratários (**CTX**) ou refratários a HMA (**HMA**)) como uma medida de sua resposta à molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** flotetuzumabe na dose alvo de 500 ng/kg/dia. A taxa de resposta objetiva (**OR**) à terapia para pacientes refratários primários foi de 50% (7/14). A taxa de resposta completa (**CR**) para pacientes refratários primários foi de 35,7% (5/14).

[184] **A Figura 5A** apresenta um gráfico de floresta das diferenças de fold change da linha de base entre pacientes de **OR** e pacientes de **NR** (incluindo **PD**, **SD**, **TF**, **NE**) mostrando que a expressão da assinatura de sinalização de IFN-gama foi aumentada em amostras de linha de base em pacientes de **OR** (box na **Figura 5A**, mostrando alteração de **NR**). Além disso, as assinaturas a jusante de TIS e de IFN foram substancialmente aumentadas em pacientes de **OR**. **A Figura 5B** mostra que a distribuição de escores assinatura de sinalização de IFN-gama é aumentado em pacientes de **OR**. Em particular, os que responderam ao flotetuzumabe mostraram escores de assinatura de sinalização de IFN-gama significativamente mais altas no início do estudo em comparação com os que não responderam ($3,31 \pm 0,32$ vs $2,27 \pm 0,11$, $p=0,0005$). A sensibilidade e especificidade do escore de assinatura de sinalização de IFN-gama foram medidas para prever a capacidade

de diagnóstico de resposta. O bootstrap em todas as amostras é realizado usando diferentes pontos de corte para a faixa de dados nessa coorte. Os intervalos de confiança (ICs) dos limites ou os valores de sensibilidade e especificidade são calculados com reamostragem de bootstrap e métodos de média. Em todos os CIs de bootstrap, os pacientes são reamostrados e a curva modificada é construída antes que a estatística de interesse seja calculada. Como no teste de comparação de bootstrap, a reamostragem é feita de maneira estratificada por padrão. As curvas de característica de operação do receptor (abreviada no presente documento como ROC) que mostram o desempenho preditivo da escore de assinatura de sinalização de IFN-gama com uma área sob a curva (**AUC**) = 0,819 são representadas graficamente na **Figura 5C**. Esse gráfico mostra as Taxas de Positivo Verdadeiro (TPRs) e Taxas de Falso Positivo (FPRs) que são alcançadas usando o ponto de corte de escore ideal para essa coorte para chamar uma amostra de alta ou baixa para escore de assinatura de sinalização de IFN-gama. Uma assinatura sem poder preditivo terá uma curva ROC ao longo da diagonal, e uma assinatura perfeitamente preditiva terá uma curva que atinge o canto superior esquerdo. A área sombreada ao redor da linha indica intervalos de confiança. Esses dados também são consistentes com a maior frequência de respondedores em pacientes refratários primários, que geralmente exibiam uma assinatura de sinalização de INF-gama mais alta, em comparação com pacientes com recidiva. Conseqüentemente, as escores de assinatura de sinalização de IFN-gama mostram forte correlação com a resposta do paciente à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** (AUC para pacientes tratados com flotetuzumabe = 0,919; **Figura 5C**). As comparações de

assinaturas imunes na linha de base e taxas de resposta entre os aglomerados estão resumidas na **Tabela 8** (aglomerado Imune-empobrecido (aglomerado 1) e imunoinfiltrado (aglomerados 2-3)) e **Tabela 9** (imunoexaurido (aglomerado 2) e imuno-enriquecido (aglomerado 3)).

Tabela 8: Aglomerado imunodesgastado e imunoinfiltrado		
	imunodesgastado (n=17)	imunoinfiltrado (n=21)
Atividade antileucêmica	5,9% (1/16) 1 CRi	33,3% (6/18) 3 CR, 2 OB, 1 PR
Nenhuma resposta	14	12
N.A.*	1	3
Risco citogênico ELN (no momento de diagnóstico inicial)	Favorável (n=2) Intermediário (n=3) Adverso (n=8) N.A. (n=4)	Favorável (n=5) Intermediário (n=9) Adverso (n=5) N.A. (n=2)

* Dados de resposta disponíveis em 35/38 pacientes

Tabela 9: imunoexaurido e imunoenriquecido		
	imunoenriquecido (n=5)	imunoexaurido (n=16)
Atividade antileucêmica	40,0% (2/5) 1 CR, 1 OB	25% (4/16) 2 CR, 1 OB, 1 PR
Nenhuma resposta	3	10
N.A.*	-	2
Tratamento de HMA anterior	40% (2/5)	62,5% (10/16)
Risco citogênico ELN (no momento de diagnóstico inicial)	Favorável (n=1) Intermediário (n=0) Adverso (n=4)	Favorável (n=4) Intermediário (n=9) Adverso (n=1) N.A. (n=2)

* Dados de resposta disponíveis em 35/38 pacientes

[185] As assinaturas de expressão de gene de um

painel de genes associados à estimulação de células citotóxicas, ou com células T CD8+, foram examinadas em RNA de amostras de medula óssea pré-tratamento ("Base") e de amostras de medula óssea após um primeiro ciclo de tratamento com flotetuzumabe ("Ciclo 1"). Os resultados dessa investigação são mostrados na **Figura 6**. Os resultados demonstram que o tratamento com flotetuzumabe foi capaz de estimular as células do sistema imunológico no microambiente de tumor. Além disso, a comparação das amostras de BM pós-ciclo 1 com as amostras de linha de base mostrou que o tratamento com flotetuzumabe levou a um aumento do infiltrado de células imunes e dos escores de ativação imune, conforme refletido por uma assinatura de inflamação tumoral mais elevada; ($6,49 \pm 0,20$ vs $5,93 \pm 0,12$, $p=0,015$) juntamente com escores de imunoproteassoma aprimorado ($5,72 \pm 0,07$ vs $5,23 \pm 0,10$, $p=0,0002$) e assinatura de sinalização de IFN-gama ($3,38 \pm 0,23$ vs $2,53 \pm 0,14$, $p=0,0015$). A ativação do gene do microambiente de tumor induzida por flotetuzumabe (TME) foi, portanto, indicativa de uma assinatura imunoenriquecida em vez de uma assinatura de imunoexgotada.

[186] Conforme mostrado na **Figura 7**, a população responsiva ao flotetuzumabe - e em particular aqueles pacientes previamente refratários à quimioterapia - exibiu maior expressão de CD123.

[187] Amostras blásticas de AML coletadas durante a triagem foram analisadas quanto à expressão de PD-L1 por citometria de fluxo. Conforme mostrado na **Figura 8**, os pacientes que progrediram precocemente (<15 dias) no tratamento com flotetuzumabe tiveram níveis de linha de base mais elevados de PD-L1 em células AML do que outros pacientes e tiveram evidência de resposta (SD, OB, PR, CR). Os resultados

desta investigação indicam que a expressão de PD-L1 está associada com diminuição da atividade *in vivo* e suporta o uso combinatório de um antagonista de PD-1/PD-L1 em combinação com uma terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** (consulte, *por exemplo*, o documento número WO 2017/214092).

[188] Juntos, esses dados indicam que a assinatura de sinalização de IFN-gama na linha de base se correlaciona com a resposta à terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**. A maioria dos pacientes com evidência de atividade antileucêmica para terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** (6/7; 86%) tem alta infiltração imune na medula óssea, com a população mais sensível sendo a imunoenriquecida. Além disso, os pacientes tratados anteriormente com HMA mostraram um microambiente de tumor imunoenriquecido, mas exausto (*por exemplo*, medula óssea), com expressão de ponto de verificação aumentada, sugerindo benefício potencial da terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** em combinação com bloqueio de ponto de verificação imune. Sem estar limitado por qualquer teoria particular, a terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** pode revigorar um microambiente de tumor imunoesgotado, conforme observado pela atividade antileucêmica de 25% nessa população. Em particular, o tratamento com a molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**, **DART-A**, foi visto para aumentar a ativação imune, processamento/apresentação de antígeno e escores de assinaturas de sinalização de IFN-gama.

EXEMPLO 2

ASSINATURAS DE EXPRESSÃO DE GENE DE POPULAÇÕES DE PACIENTES RECIDIVANTES E REFRATÁRIOS À QUIMIOTERAPIA

[189] Uma análise adicional foi realizada para

explorar ainda mais a correlação entre a maior expressão de assinaturas de gene, incluindo, mas sem limitação a assinatura de sinalização de IFN-gama, TIS, e assinatura a jusante de interferon, em casos de AML imunoinfiltrados, e o benefício do tratamento com agentes de imunoterapia biespecíficos direcionados a **CD123 x CD3**, como flotetuzumabe. Essa análise focou nas assinaturas de gene e combinações de assinaturas (obtidas usando o ensaio NanoString PanCancer IO 360™ essencialmente como descrito abaixo) de 30 quimioterapia refratária (refratária a ≥ 2 tentativas de indução, primeira resposta completa de < 6 meses) ou AML recidivante pacientes inscritos no ensaio clínico CP-MGD006-01 (NCT#02152956). Essa análise excluiu amostras de pacientes refratários ao HMA e incluiu amostras adicionais de pacientes com recidiva e refratários à quimioterapia não analisados anteriormente.

[190] Essa análise estratificou amostras de BM de pacientes com AML refratária e recidivante na linha de base em dois subtipos imunes, que serão denominados no presente documento como imunoinfiltrados e imunodesgastados (**Figura 9**) pela agregação dos escores de três módulos de assinatura: IFN-dominante, adaptativo e mieloide. As assinaturas genéticas associadas aos três módulos de assinatura estão listadas na **Tabela 10** abaixo. A escore do módulo é a soma das escores de assinatura de gene individual em cada amostra (cada escore de assinatura de gene foi calculada conforme fornecido acima).

Tabela 10: Lista de Assinaturas Genéticas em Módulos		
Módulo Dominante de IFN		
Inflamação Mieloide	Quimiocinas Inflamatórias	MAGES
IL10†	Sinalização de IFN-	A jusante IFN

Tabela 10: Lista de Assinaturas Genéticas em Módulos		
	gama	
PDL1†	imunoproteassoma	PDL2†
Adaptativo		
Células B	CD8 esgotado	Citotoxicidade
Células Citotóxicas	TBX21 (aka TH1)	Células T
Células NK	Células T CD8+	TIGIT
Linfoide	TIS	FoxP3†
CTLA4†	PD1†	
Módulo Mieloide		
Mieloide	Macrófagos	Neutrófilos
DC		

† assinaturas de gene único

[191] **A Figura 9** fornece um agrupamento hierárquico não supervisionado (distância Euclidiana, ligação completa) de assinaturas de atividade imunológica e biológica no microambiente da medula óssea (BM) de pacientes com AML recidivante/refratária antes de receber imunoterapia com flotetuzumabe no ensaio clínico CP-MGD006-01 (NCT#02152956). Os respondentes eram indivíduos que exibiam uma resposta antileucêmica definida como remissão completa (CR), CR com recuperação hematológica incompleta (CRi), CR com recuperação hematológica parcial (CRh), remissão parcial (PR) ou "outro benefício" (OB; >30% de redução em blastos BM). Os que não responderam eram indivíduos com falha no tratamento (TF), doença estável (SD) ou doença progressiva (PD). A refratariedade da quimioterapia foi definida como ≥ 2 tentativas de indução ou 1ª CR com duração inicial da CR <6

meses. Cada escore de assinatura IO 360 foi redimensionada dentro do escore dessa coorte para uma escala de -3 a +3 para facilitar a comparação entre as assinaturas.

[192] Amostras de BM de 92% dos pacientes com evidência de resposta antileucêmica (11 de 12) à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3** com flotetuzumabe, apresentaram TME imunoinfiltrado em relação aos não respondedores (**Figura 9**).

[193] **A Figura 10** apresenta um gráfico de floresta das diferenças de alteração de dobra da linha de base entre respondentes (CR, CRi, CRh, PR e OB) e não respondedores (PD, SD, TF) a partir da análise dos 30 pacientes com AML refratários à quimioterapia ou recidiva. Consistente com a análise fornecida no Exemplo 1 acima, a expressão de assinatura de sinalização de IFN-gama, assinatura a jusante de IFN e assinatura de inflamação de tumor (box na **Figura 10**) foram aumentadas nas amostras de linha de base em respondentes vs não respondedores. Além disso, a maioria das assinaturas de genes que compõem o Módulo dominante de IFN foram aumentadas nas amostras de linha de base em respondentes versus não respondedores (com estrela na **Figura 10**).

[194] A distribuição dos escores de assinatura de sinalização de IFN-gama (**Figura 11A**), da assinatura a jusante de IFN (**Figura 11B**), da assinatura de inflamação de tumor (TIS, **Figura 11C**) e do módulo dominante de IFN (**A Figura 11D**) entre pacientes refratários e recidivantes são plotados nas **Figuras 11A-11D**. A distribuição dos escores é aumentada em pacientes refratários. A distribuição dos escores das nove assinaturas de gene que compõem o Módulo Dominante de IFN e a Assinatura de Inflamação de Tumor em não respondedores (NR) e

respondedores (OR) são plotados nas **Figuras 12A-12J**: a Assinatura de sinalização de IFN-gama (**Figura 12A**); a assinatura a jusante de IFN (**Figura 12B**); a assinatura de inflamação mieloide (**Figura 12C**); a assinatura do imunoproteassoma (**Figura 12D**); a assinatura das quimiocinas inflamatórias (**Figura 12E**); a assinatura de MAGEs (**Figura 12F**); a assinatura de PD-L1 (**Figura 12G**); a assinatura PD-L2 e (**Figura 12H**); a assinatura IL10 (**Figura 12I**); a assinatura de inflamação do tumor (TIS, **Figura 12J**). A distribuição dos escores para essas assinaturas de gene aumenta nos pacientes que respondem. Em particular, conforme mostrado na **Tabela 11**, os respondentes mostraram escores significativamente mais altos de Assinatura de Sinalização de IFN-gama, Assinatura a jusante de IFN, TIS e Módulo Dominante de IFN em comparação com os que não responderam. As comparações foram realizadas com o teste U de Mann Whitney para determinações desemparelhadas.

Tabela 11: Escores de Assinatura (meio±SD, teste U de Mann Whitney)			
Assinatura	Escore responsivo	Escore não responsivo	valor de p
Sinalização de IFN-gama	3,38±1,02	2,49±0,82	0,0218
A jusante IFN	4,99±0,63	4,41±0,54	0,0193
TIS	6,31±0,42	5,55±0,57	0,0010
Módulo Dominante de IFN	33,37±4,95	27,84±4,74	0,0043

[195] A sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo) e especificidade (taxa de falso positivo) dos escores para as nove assinaturas de genes que compõem o Módulo

Dominante de IFN, o TIS e o Módulo Dominante de IFN para esse grupo de pacientes foram medidas para prever a capacidade de diagnóstico de resposta (ROC AUC) essencialmente como descrito acima. As curvas ROC que mostram o desempenho preditivo são apresentadas nas **Figuras 13A-13K**: a assinatura de sinalização de IFN-gama (**Figura 13A**, AUC = 0,750); a assinatura a jusante de IFN (**Figura 13B**, AUC = 0,755); a assinatura de inflamação mieloide (**Figura 13C**, AUC = 0,69); a assinatura de imunoproteossoma (**Figura 13D**, AUC = 0,505); a assinatura de quimiocinas inflamatórias (**Figura 13E**, AUC = 0,764); a assinatura de MAGEs (**Figura 13F**, AUC = 0,736); a assinatura PD-L1 (**Figura 13G**, AUC = 0,699); a assinatura PD-L2 (**Figura 13H**, AUC = 0,727); a assinatura de IL10 (**Figura 13I**, AUC = 0,745); o TIS (**Figura 13J**, AUC = 0,852) e módulo dominante de IFN (**Figura 13K**, AUC = 0,806).

[196] Amostras de BM em tratamento (disponíveis em 19 pacientes no final do ciclo 1) exibiram apresentação de antígeno aumentada e ativação imune em relação às amostras de linha de base (as comparações foram realizadas com o teste U de Mann Whitney para determinações não emparelhadas), conforme refletido por escores TIS mais altas ($6,47 \pm 0,22$ versus $5,93 \pm 0,15$, $p=0,0006$, **Figura 14A**), escores de assinatura do maquinário de processamento de Antígeno (APM) ($5,67 \pm 0,16$ versus $5,31 \pm 0,12$, $p=0,002$, **Figura 14C**), escores de assinatura de sinalização de IFN-Gamma ($3,58 \pm 0,27$ versus $2,81 \pm 0,24$, $p=0,0004$, **Figura 14B**) e escore de assinatura PD-L1 ($3,43 \pm 0,28$ versus $2,73 \pm 0,21$, $p=0,0062$; **Figura 14D**). Os resultados substanciam um benefício clínico para pacientes com AML com TME imunoinfiltrado e apoiam um efeito imunomodulador local da terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**.

[197] Conforme observado acima, foi relatado que pacientes com AML com microambiente de tumor imunologicamente enriquecido e IFN-gama dominante ("**TME**") experimentam sobrevida livre de recidiva significativamente mais curta, sugerindo refratariedade à quimioterapia de indução padrão (Vadakekolathu, J. et al. (2017) "*T Immune Gene Expression Profiling in Children and Adults with Acute Myeloid Leukemia Identifies Distinct Phenotypic Patterns*," Blood 130:3942A). Esses dados indicam que as escores da assinatura de sinalização de IFN-gama, assinatura a jusante IFN e as escores do módulo dominante IFN na linha de base estão fortemente correlacionadas com a refratariedade à quimioterapia padrão e com a resposta à terapia com molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**. Além disso, dentro dos indivíduos altamente pré-tratados avaliados aqui (uma média de 4 linhas anteriores de terapia), a maioria das assinaturas de genes que compõem o Módulo Dominante de IFN e a Assinatura de Inflamação de Tumor (TIS) mostraram se correlacionar com a resposta à Terapia de molécula de ligação biespecífica **CD123 x CD3**. Cada uma desses escores foi significativamente maior em pacientes com AML refratária à quimioterapia em comparação com AML recidivante no momento do tratamento e em indivíduos com evidência de atividade antileucêmica em comparação com os que não responderam. A forte correlação é refletida pelas curvas ROC e valores AUC.

ASSINATURAS DE GENE

[198] As contagens de genes IO 360 foram geradas usando o sistema nCounter® (NanoString Technologies, Inc.) essencialmente da seguinte forma: O RNA (~100 ng por amostra) foi purificado a partir de aspirados de medula óssea e foi incubado com relatório e mistura de sondas de captura para

hibridização. As contagens de transcrição foram analisadas no sistema de análise nCounter FLEX usando a configuração de alta resolução. Arquivos de saída de contagem de código de repórter (RCC) são usados para calcular escores de assinatura de gene usando combinações lineares predefinidas (médias ponderadas) de conjuntos de genes biologicamente relevantes essencialmente conforme descrito anteriormente, conforme detalhado no presente documento.

[199] A assinatura de sinalização de IFN-gama é descrita em detalhes acima. As assinaturas de abundância do tipo de célula imune foram definidas em Danaher, P., et al., 2017, "*Gene Expression Markers of Tumor Infiltrating Leukocytes*," *J Immunother Cancer* **5**, 18); A assinatura de inflamação de tumor é conforme descrito em Danaher, P., et al., 2018 ("*Pan-cancer Adaptive Immune Resistance as Defined by the Tumor Inflammation Signature (TIS): Results From The Cancer Genome Atlas (TCGA)*," *J Immunother Cancer*. **6** (1): 63) (consulte também GEP inflamado por células T descrito em Ayers. M., et al. 2017, "*IFN- γ -Related mRNA Profile Predicts Clinical Response to PD-1 blockade*" *J Clin Invest*. **127**(8):2930-2940, e WO 2016/094377), ou outras assinaturas são definidas em Danaher, P., et al., (2018, "*Development of Gene Expression Signatures Characterizing The Tumor-Immune Interaction*," *J Clin Oncol* **36**, 205-205). Para facilidade de referência, os genes e os fatores de peso para as assinaturas de gene selecionadas usadas nesses estudos são fornecidos abaixo.

[200] Os genes de assinatura de inflamação de tumor (TIS) (incluindo um número de acesso NCBI representativo e não limitante para cada gene) e fatores de peso (consulte, por exemplo, o documento número WO 2016/094377) são mostrados

na **Tabela 12A** abaixo.

Tabela 12A: Os Genes de Assinatura de Inflamação de Tumor			
Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Peso
TIS	CCL5	NM_002985.2	0,008346
TIS	CD27	NM_001242.4	0,072293
TIS	CD274	NM_014143.3	0,042853
TIS	CD276	NM_001024736.1	-0,0239
TIS	CD8A	NM_001768.5	0,031021
TIS	CMKLR1	NM_004072.1	0,151253
TIS	CXCL9	NM_002416.1	0,074135
TIS	CXCR6	NM_006564.1	0,004313
TIS	HLA-DQA1	NM_002122.3	0,020091
TIS	HLA-DRB1	NM_002124.2	0,058806
TIS	HLA-E	NM_005516.6	0,07175
TIS	IDO1	NM_002164.3	0,060679
TIS	LAG3	NM_002286.5	0,123895
TIS	NKG7	NM_005601.4	0,075524
TIS	PDCD1LG2	NM_025239.3	0,003734
TIS	PSMB10	NM_002801.2	0,032999
TIS	STAT1	NM_007315.2	0,250229
TIS	TIGIT	NM_173799.2	0,084767

[201] Os genes de assinatura a jusante de interferon (IFN) (incluindo um número de acesso de NCBI representativo e não limitante para cada gene) e fatores de peso são mostrados na **Tabela 12B** abaixo. O fator de ajuste para essa assinatura é: 5,342598.

Tabela 12B: Os Genes de Assinatura de Sinalização a Jusante IFN

Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Peso
A jusante IFN	APOL6	NM_030641.4	0,03201
A jusante IFN	DTX3L	NM_138287.3	0,04691
A jusante IFN	GBP1	NM_002053.1	0,0289
A jusante IFN	IFI16	NM_005531.1	0,02585
A jusante IFN	IFI27	NM_005532.5	0,02647
A jusante IFN	IFI35	NM_005533.3	0,05262
A jusante IFN	IFI6	NM_002038.4	0,03267
A jusante IFN	IFIH1	NM_022168.2	0,04021
A jusante IFN	IFIT1	NM_001548.5	0,03788
A jusante IFN	IFIT2	NM_001547.4	0,03232
A jusante IFN	IFIT3	NM_001549.6	0,0649
A jusante IFN	IFITM1	NM_003641.3	0,03325
A jusante IFN	IFITM2	NM_006435.2	0,02516
A jusante IFN	IRF1	NM_002198.1	0,03867
A jusante IFN	IRF9	NM_006084.5	0,06769
A jusante IFN	ISG15	NM_005101.4	0,03628
A jusante IFN	MX1	NM_002462.2	0,04467
A jusante IFN	OAS1	NM_016816.4	0,04457
A jusante IFN	OAS2	NM_002535.3	0,05578
A jusante IFN	PARP9	NM_001146104.2	0,05361
A jusante IFN	PSMB9	NM_002800.5	0,03815
A jusante IFN	STAT2	NM_005419.2	0,05018
A jusante IFN	TMEM140	NM_018295.5	0,03651
A jusante IFN	TRIM21	NM_003141.4	0,05474

[202] Os genes de assinatura de quimiocina inflamatória (quimiocinas de inflamação) (incluindo um número

de acesso NCBI representativo e não limitante para cada gene) e os fatores de peso são mostrados na **Tabela 12C** abaixo. O fator de ajuste para essa assinatura é: 6,0968.

Tabela 12C: Os Genes de Assinatura de Quimiocinas Inflamatórias			
Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Peso
Quimiocinas inflamatórias	CCL2	NM_002982.4	0,19758
Quimiocinas inflamatórias	CCL3/L1	NM_021006.5	0,2053
Quimiocinas inflamatórias	CCL4	NM_002984.2	0,23028
Quimiocinas inflamatórias	CCL7	NM_006273.2	0,15535
Quimiocinas inflamatórias	CCL8	NM_005623.2	0,21149

[203] Os genes de assinatura de MAGE (incluindo um número de acesso NCBI representativo e não limitante para cada gene) e fatores de peso são mostrados na **Tabela 12D** abaixo. O fator de ajuste para essa assinatura é: 3,965625.

Tabela 12D: Os Genes de Assinatura de MAGES			
Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Peso
MAGEs	MAGEA3/A6	NM_005362.4	0,30294
MAGEs	MAGEA1	NM_004988.5	0,11248
MAGEs	MAGEA12	NM_001166387.4	0,13496
MAGEs	MAGEA4	NM_001011549.1	0,0776
MAGEs	MAGEB2	NM_002364.5	0,11849
MAGEs	MAGEC1	NM_005462.5	0,12123
MAGEs	MAGEC2	NM_016249.4	0,12907

[204] Os genes de assinatura de inflamação mieloide (inflamação mieloide) (incluindo um número de acesso NCBI representativo e não limitante para cada gene) e fatores de peso são mostrados na **Tabela 12E** abaixo. O fator de ajuste para essa assinatura é: 5,41931.

Tabela 12E: Os Genes de Assinatura de Inflamação Mieloide			
Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Peso
Inflamação Mieloide	AREG	NM_001657.4	0,06421
Inflamação Mieloide	CSF3	NM_172219.3	0,09023
Inflamação Mieloide	CXCL1	NM_001511.1	0,09222
Inflamação Mieloide	CXCL2	NM_002089.4	0,15153
Inflamação Mieloide	CXCL3	NM_002090.3	0,15227
Inflamação Mieloide	CCL20	NM_004591.3	0,06003
Inflamação Mieloide	FOSL1	NM_005438.5	0,0893
Mieloide Inflamatório	IER3	NM_003897.4	0,13202
Inflamação Mieloide	IL6	NM_000600.5	0,09792
Mieloide Inflamatório	PTGS2	NM_000963.4	0,07027

[205] Os genes de assinatura do imunoproteassoma (incluindo um número de acesso NCBI representativo e não limitante para cada gene) e os fatores de peso são mostrados na **Tabela 12F** abaixo. O fator de ajuste para essa assinatura é: 6,096812.

Tabela 12F: Os Genes de Assinatura de imunoproteassoma			
Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Peso
imunoproteassoma	PSMB8	NM_004159.4	0,39749
imunoproteassoma	PSMB9	NM_002800.4	0,31826
imunoproteassoma	PSMB10	NM_002801.2	0,28426

[206] Os genes de assinatura de gene único (incluindo um número de acesso NCBI representativo e não limitante para cada gene) e fatores de ajuste são mostrados na **Tabela 12G** abaixo.

Tabela 12G: Assinaturas de gene único			
Assinatura	Gene	Número de adesão de NCBI	Fator de Ajuste
IL10	IL10	NM_000572.3	9,6097
PDL1	CD274	NM_014143.3	8,0352
PDL2	PDCD1LG2	NM_025239.3	8,2984
CTLA4	CTLA4	NM_005214.5	8,4925
PD1	PDCD1	NM_005018.3	10,2306

[207] Os escores de assinaturas são calculadas essencialmente como descrito acima, exceto que uma vez normalizado e log transformado, cada gene é multiplicado pelo peso fornecido nas **Tabelas 12A-12F** e o fator de ajuste indicado é adicionado. Para assinaturas de gene único (por exemplo, PDL1) nenhum peso é usado, os valores de expressão de gene normalizados log2 são adicionados aos fatores de ajuste são fornecidos na **Tabela 12G**.

Todas as publicações e patentes mencionadas neste relatório

descritivo são no presente documento incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação individual ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente indicado para ser incorporado por referência em sua totalidade. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades específicas da mesma, será entendido que a mesma tem capacidade de modificações adicionais e este pedido se destina a cobrir quaisquer variações, usos ou adaptações da invenção seguindo, em geral, os princípios do invenção e incluindo tais desvios da presente divulgação como abrangido da prática conhecida ou habitual dentro da técnica à qual a invenção pertence e como podem ser aplicados às características essenciais no presente documento estabelecidas anteriormente.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA QUIMIORREFRATÁRIA EM UM PACIENTE, sendo que o dito método é caracterizado por compreender a administração ao dito paciente de uma dosagem de tratamento de uma molécula biespecífica CD123 x CD3, sendo que a dita dosagem é eficaz para estimular a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente e, assim, tratar a dita malignidade.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, sendo que o dito método é caracterizado por compreender, adicionalmente, a avaliação de expressão de um ou mais genes-alvo e/ou de referência em uma amostra celular do dito paciente, antes e/ou após a dita administração da dita molécula biespecífica CD123 x CD3.

3. MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE SERIA UM RESPONDEDOR ADEQUADO AO USO DE UMA MOLÉCULA BIESPECÍFICA CD123 x CD3 PARA TRATAR UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA, sendo que o dito método é caracterizado por compreender:

(a) avaliar a expressão de um ou mais genes-alvo em uma amostra celular do dito paciente antes da administração da dita molécula biespecífica CD123 x CD3, em relação à expressão de um ou mais genes-alvo e/ou de referência; e

(b) identificar o paciente como um respondedor adequado para o tratamento com uma molécula biespecífica CD123 x CD3 se a expressão dentre o dito um ou mais genes-alvo estiver aumentada em relação à dita expressão dentre o dito um ou mais genes-alvo e/ou de referência.

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 3, sendo que o dito método é caracterizado

por avaliar:

(i) a expressão de um ou mais genes-alvo; e
(ii) um ou mais genes de referência cuja expressão não está caracteristicamente associada à dita malignidade hematológica.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 3, sendo que o dito método é caracterizado por compreender a avaliação da expressão dentre o dito um ou mais genes-alvo em relação à expressão de linha de base do dito um ou mais genes de referência do dito paciente.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, sendo que o dito método é caracterizado por compreender a avaliação da expressão do dito um ou mais genes-alvo do dito paciente em relação à expressão dentre o dito um ou mais genes-alvo de:

(a) um indivíduo que sofre a partir da dita malignidade hematológica ou de uma população de tais indivíduos; ou

(b) um indivíduo que não respondeu com sucesso ao uso de uma molécula biespecífica CD123 x CD3 para tratar a dita malignidade hematológica ou de uma população de tais indivíduos; ou

(c) um indivíduo que respondeu com sucesso ao uso de uma molécula biespecífica CD123 x CD3 para tratar a dita malignidade hematológica ou de uma população de tais indivíduos.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 6, caracterizado pelo nível de expressão relativa do dito um ou mais genes-alvo na dita população ser estabelecido promediando-se o nível de expressão do gene em

amostras celulares obtidas a partir da dita população de indivíduos.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7, caracterizado pelo dito paciente exibir um nível de expressão de pelo menos um dentre os ditos genes-alvo:

(a) que é maior do que o primeiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) que é maior do que o primeiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica CD123 x CD3; ou

(c) que tem um *fold change* de \log_2 de pelo menos cerca de 0,4 em relação aos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica CD123 x CD3; ou

(d) que está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos níveis de expressão do dito gene-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica CD123 x CD3.

9. MÉTODO DE TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA, sendo que o dito método é caracterizado por compreender:

(a) empregar o método, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 3 a 8, para determinar se um paciente seria um respondedor adequado ao uso de uma molécula

biespecífica CD123 x CD3 para tratar a dita malignidade hematológica;

(b) administrar uma dosagem de tratamento da dita molécula biespecífica CD123 x CD3 ao dito paciente se o dito paciente for determinado como um respondedor adequado a tal tratamento,

em que a dita administração da dita molécula biespecífica CD123 x CD3 estimula a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente.

10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 9, caracterizado pela dita amostra celular ser uma amostra de medula óssea.

11. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 10, caracterizado pela dita avaliação de expressão ou pela dita determinação da possibilidade de que o dito paciente seja um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica CD123 x CD3 para tratar uma malignidade hematológica ser realizada por meio:

(a) da determinação dos níveis de expressão gênica para cada gene-alvo em uma ou mais amostras celulares usando uma plataforma de expressão gênica; e

(b) da comparação dos ditos níveis de expressão do gene-alvo com os níveis de expressão de um ou mais genes de referência.

12. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 11, caracterizado pela dita avaliação de expressão ou pela dita determinação da possibilidade de que o dito paciente seja um respondedor adequado ao uso de uma molécula biespecífica CD123 x CD3 para tratar uma malignidade hematológica ser realizada por meio:

(a) da medição dos níveis de RNA bruto para cada gene-alvo em uma ou mais amostras celulares usando uma plataforma de expressão gênica, em que a plataforma de expressão gênica compreende um conjunto de genes de referência de genes de manutenção, e

(b) da atribuição de um valor de expressão relativa, para cada um dos níveis de RNA bruto medidos para os genes-alvo usando os níveis de RNA medidos dos genes de referência internos.

13. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 12, caracterizado pelo dito um ou mais genes-alvo compreenderem:

(a) um ou mais dentre: CXCL9, CXCL10, CXCL11 e STAT1; e/ou

(b) um ou mais dentre: CCL5, CD27, CD274, CD276, CD8A, CMKLR1, CXCL9, CXCR6, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-E, IDO1, LAG3, NKG7, PDCD1LG2, PSMB10, STAT1 e TIGIT; e/ou

(c) um ou mais dentre: AREG, CSF3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20, FOSL1, IER3 (NM_003897.4), IL6 e PTGS2; e/ou

(d) um ou mais dentre: CCL2, CCL3/L1, CCL4, CCL7 e CCL8; e/ou

(e) um ou mais dentre: MAGEA3/A6, MAGEA1, MAGEA12, MAGEA4, MAGEB2, MAGEC1 e MAGEC2; e/ou

(f) um ou mais dentre: APOL6, DTX3L, GBP1, IFI16, IFI27, IFI35, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM2, IRF1, IRF9, ISG15, MX1, OAS1, OAS2, PARP9, PSMB9, STAT2, TMEM140 e TRIM21; e/ou

(g) um ou mais dentre: PSMB8, PSMB9 e PSMB10; e/ou

(h) IL-10; e/ou

(i) CD274; e/ou

(j) PDCD1LG2.

14. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 13, caracterizado pelo dito um ou mais genes de referência compreenderem um ou mais dentre: ABCF1, G6PD, NRDE2, OAZ1, POLR2A, SDHA, STK11IP, TBC1D10B, TBP e UBB.

15. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 14, caracterizado pelo escore de assinatura de gene ser determinada para o dito um ou mais genes-alvo.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo dito escore de assinatura de gene ser determinado por um processo que compreende:

(a) medir os níveis de RNA bruto para cada gene-alvo em mais uma amostra celular usando uma plataforma de expressão gênica que compreende um conjunto de genes de referência de genes de manutenção,

(b) normalizar cada um dos níveis de RNA bruto medidos para a média geométrica dos ditos genes de manutenção e, opcionalmente, normalizar ainda mais cada valor de RNA para um padrão,

(c) transformar em log cada valor de RNA normalizado,

(d) multiplicar cada valor de RNA transformado em log por um fator de peso correspondente para gerar um valor de RNA ponderado, e

(e) adicionar os valores de RNA ponderados e, opcionalmente, adicionar uma constante de fator de ajuste para gerar um escore de assinatura de gene único.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15 ou 16, caracterizado pelo dito escore de assinatura de gene ser determinado usando o gene-alvo (ou genes-alvo), os pesos de pontuação e, opcionalmente, os fatores de ajuste fornecidos

nas Tabelas 6 e 12A-12G.

18. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, caracterizado pelo dito escore de assinatura de gene ser um escore de assinatura de gene determinado para um ou mais dentre:

- (a) a assinatura de sinalização de gama IFN;
- (b) a assinatura de inflamação de tumor;
- (c) a assinatura de inflamação mieloide;
- (d) a assinatura da quimiocina inflamatória;
- (e) a assinatura de MAGEs;
- (f) a assinatura de sinalização a jusante de IFN;
- (g) a assinatura de imunoproteassoma;
- (h) a assinatura de IL-10;
- (i) a assinatura de PD-L1; e/ou
- (j) a assinatura de PD-L2.

19. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, caracterizado pela uma assinatura de gene do paciente indicar que:

(a) é maior do que o primeiro quartil de escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que sofre da dita malignidade hematológica; ou

(b) é maior do que o primeiro quartil de escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica CD123 x CD3; ou

(c) tem um *fold change* de \log_2 de pelo menos cerca

de 0,4 em relação aos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dentre os ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que não respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica CD123 x CD3; ou

(d) está dentro de pelo menos o primeiro quartil dos escores para a dita assinatura de gene calculada a partir dos níveis de expressão de um ou mais dos ditos genes-alvo em uma população de indivíduos que respondeu com sucesso a um tratamento para a dita malignidade hematológica que usou uma molécula biespecífica CD123 x CD3,

é indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica CD123 x CD3.

20. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 18, caracterizado:

(a) pela dita assinatura de gene ser a assinatura de sinalização de gama IFN e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 2,5 ser indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica CD123 x CD3, e/ou

(b) pela dita assinatura de gene ser a assinatura de inflamação de tumor e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 5,5 ser indicativo de uma resposta do paciente mais favorável ao tratamento com a dita molécula biespecífica CD123 x CD3; e/ou

(c) pela dita assinatura de gene ser a assinatura de sinalização a jusante de IFN e um escore de assinatura de gene do paciente de pelo menos cerca de 4,5 ser indicativo de uma

resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica CD123 x CD3.

21. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, caracterizado pela dita assinatura de gene ser a assinatura de sinalização de gama IFN, a assinatura de inflamação de tumor ou a assinatura de sinalização a jusante de IFN.

22. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 21, caracterizado pelo paciente que exibir uma assinatura de expressão gênica que é característica de um microambiente de tumor imunologicamente enriquecido e de IFN gama dominante ser indicativo de uma resposta mais favorável do paciente ao tratamento com a dita molécula biespecífica CD123 x CD3.

23. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pela dita molécula biespecífica CD123 x CD3 ser um anticorpo biespecífico ou pela molécula biespecífica compreender um scFv.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pela dita molécula biespecífica CD123 x CD3 ser JNJ-63709178, XmAb14045 ou APVO436.

25. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pela dita molécula biespecífica CD123 x CD3 ser um diacorpo biespecífico ligado covalentemente que compreende:

(a) uma primeira cadeia polipeptídica com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; e

(b) uma segunda cadeia polipeptídica com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; e

em que a primeira e a dita segunda cadeias

polipeptídicas são covalentemente ligadas uma à outra por uma ligação de dissulfeto.

26. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pela dita malignidade hematológica do dito paciente ser selecionada a partir do grupo que consiste em: leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crônica (CML), crise blástica de CML, oncogene Abelson associado com CML (translocação Bcr-ABL), síndrome mielodisplásica (MDS), leucemia linfoblástica B aguda (LLA-B), leucemia linfoblástica T aguda (LLA-T), leucemia linfocítica crônica (CLL), síndrome de Richter, transformação de Richter de LLC, leucemia celular pilosa (HCL), neoplasma de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), linfoma de não Hodgkin (NHL), incluindo linfoma de células do manto (MCL) e um linfoma linfocítico pequeno (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitose sistêmica e linfoma de Burkitt

27. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pela dita malignidade hematológica do dito paciente ser AML.

28. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 27, caracterizado pela dita malignidade hematológica do dito paciente ser refratária à quimioterapia.

29. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 ou 6 a 38, caracterizado pela dita dosagem de tratamento da dita molécula biespecífica CD123 x CD3 incluir pelo menos uma dose selecionada a partir do grupo que consiste em 30, 100, 300 e 500 ng/kg de peso do paciente/dia.

30. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2 ou 4 a 29, caracterizado pela dita dosagem de tratamento ser administrada por infusão contínua.

31. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizado pelo dito paciente ser um paciente humano.

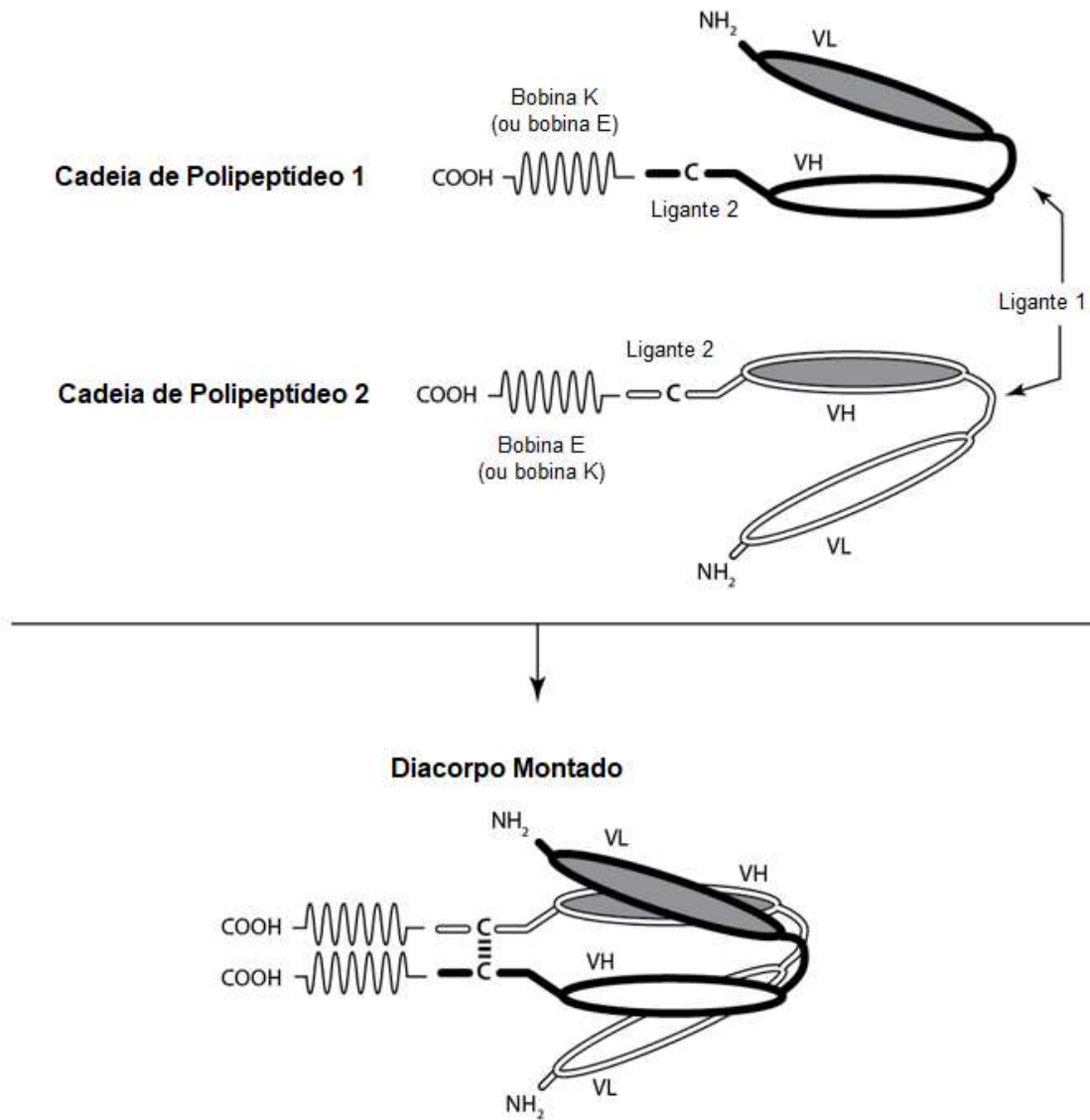


Figura 1A

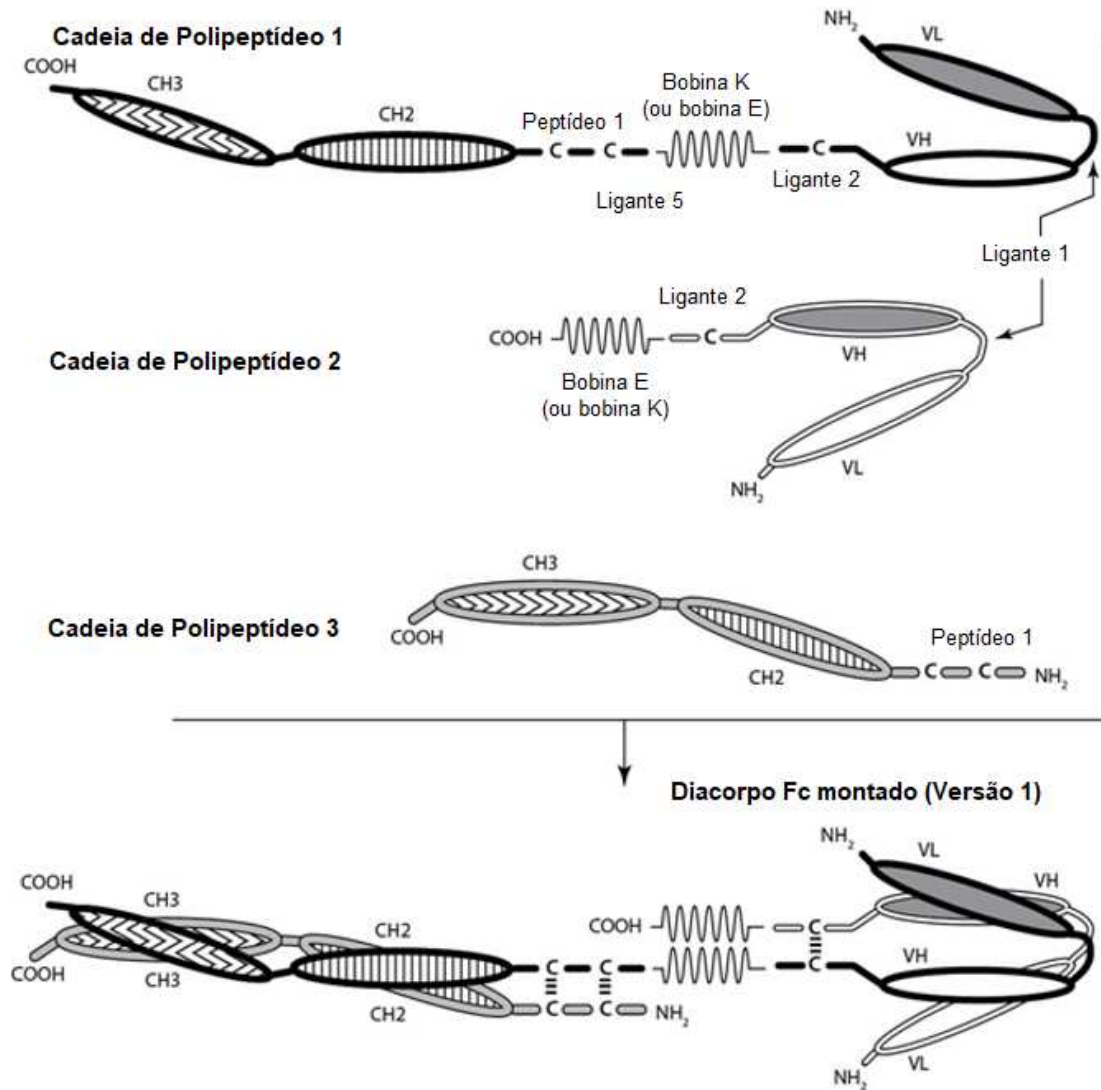


Figura 1B

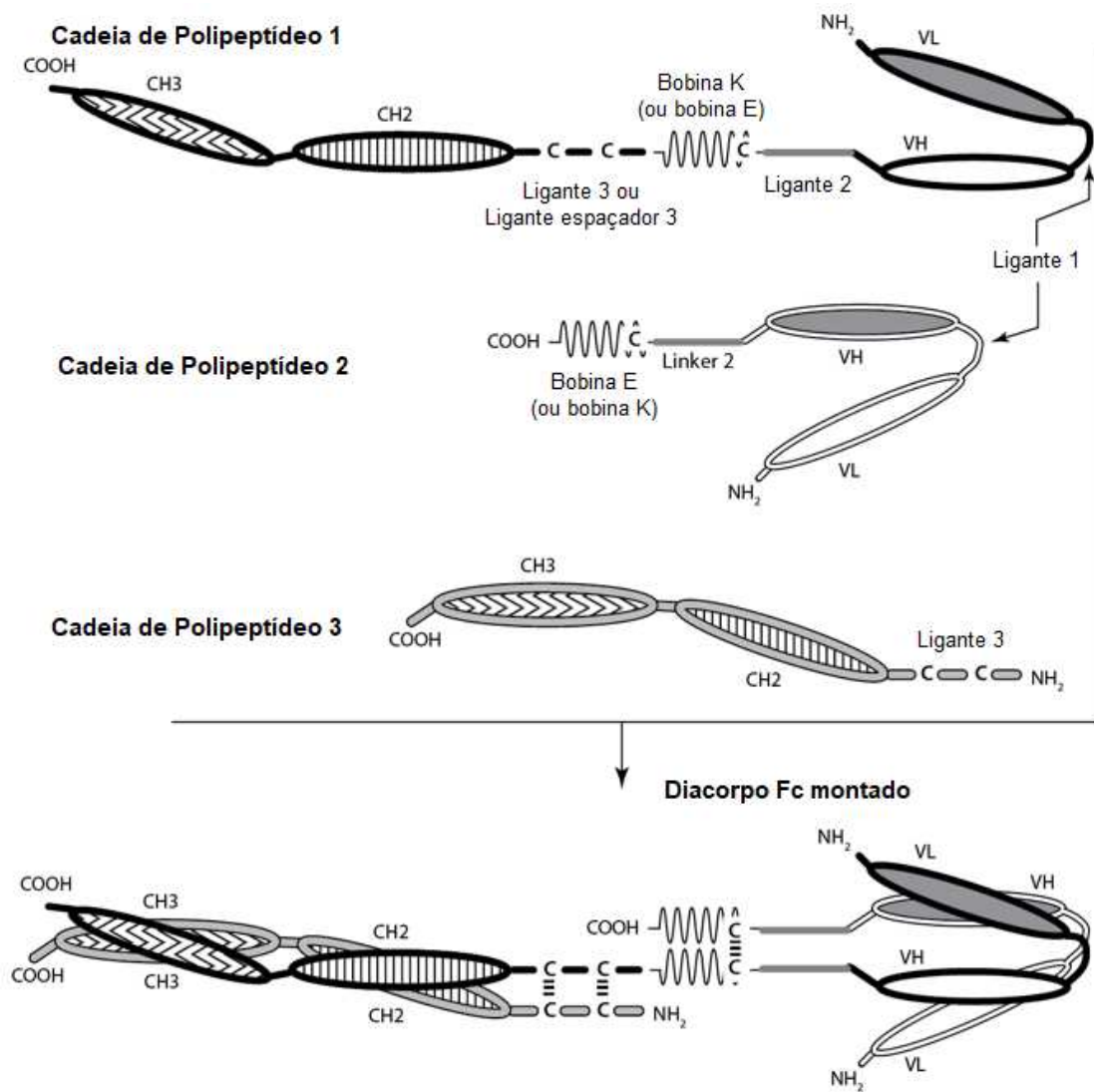
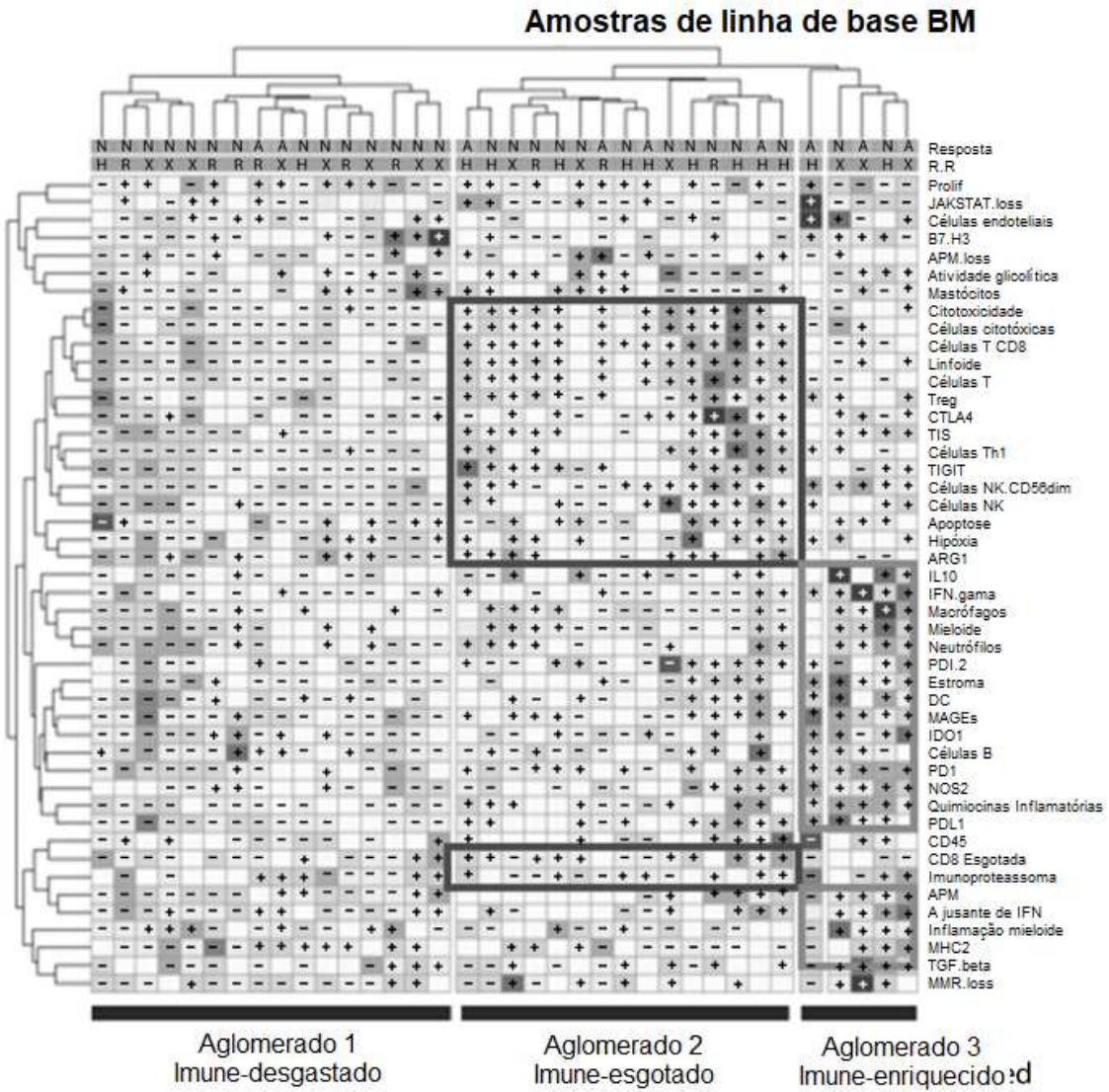


Figura 1C



A = CR, Cri, MLF, OB, PR
 NR = PD, SD

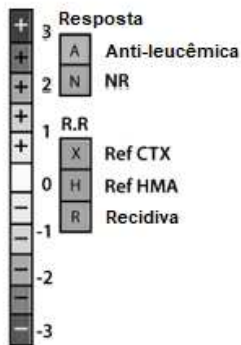


Figura 2

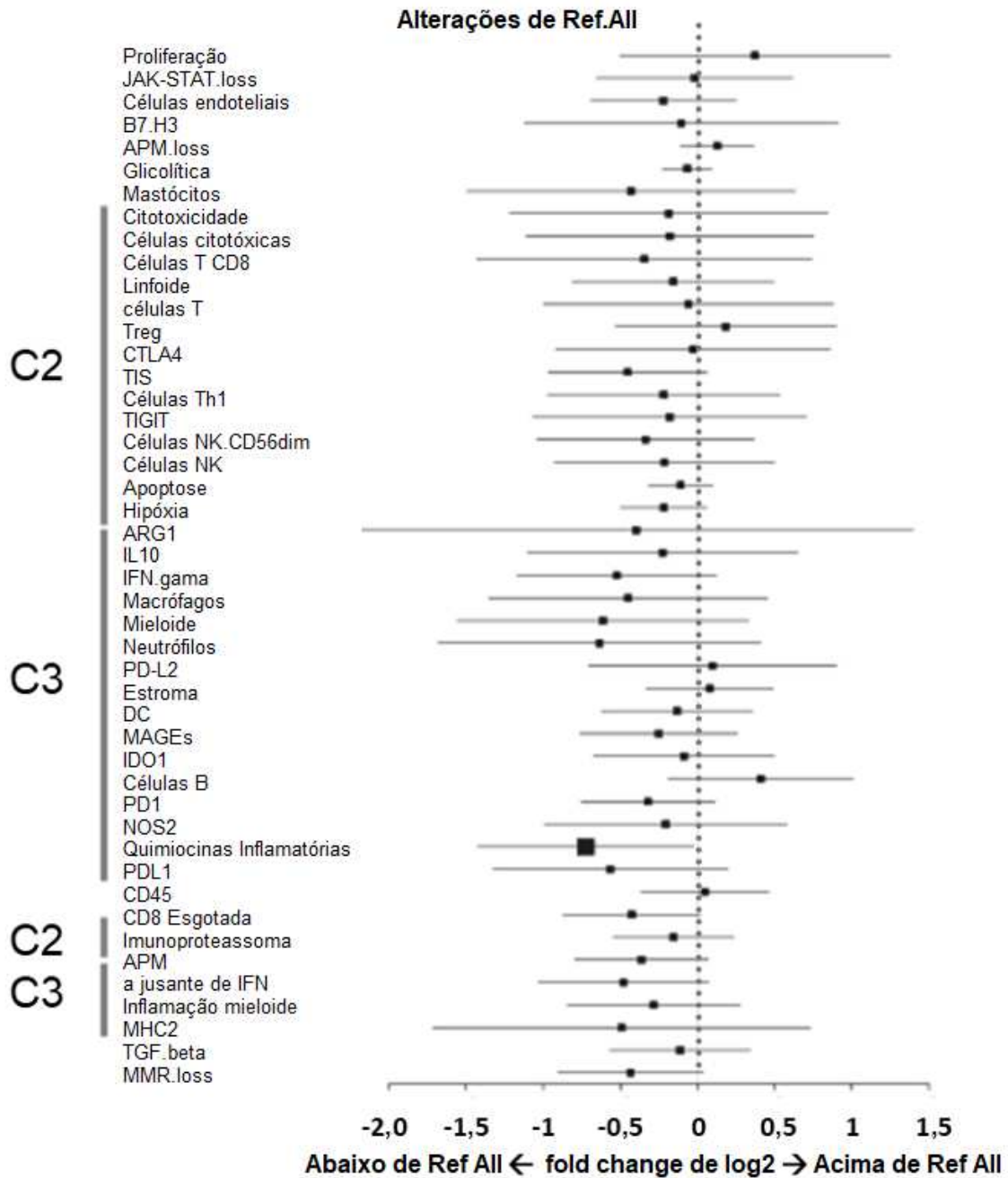


Figura 3A

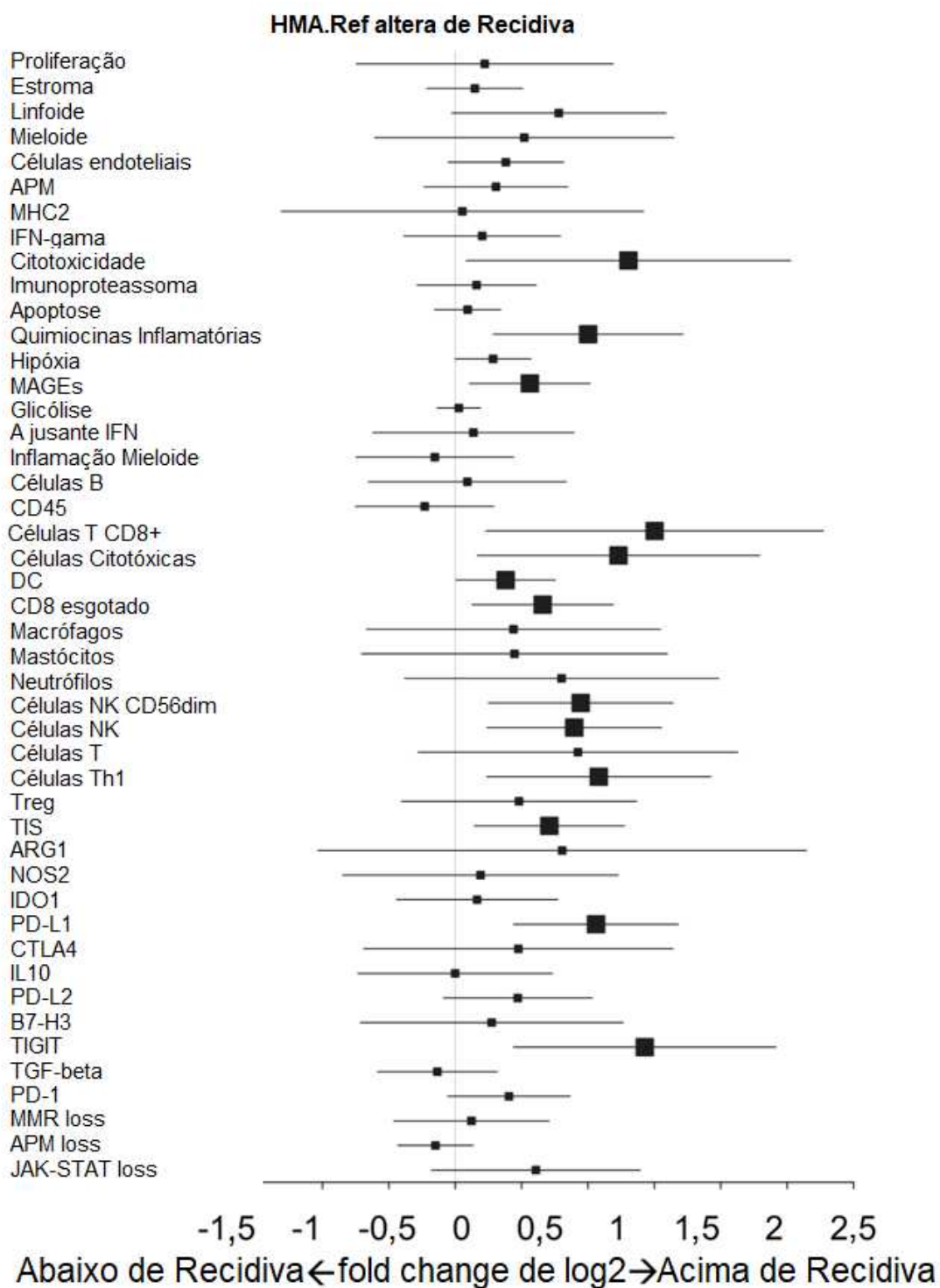


Figura 3B

HMA vs CTx Refratário

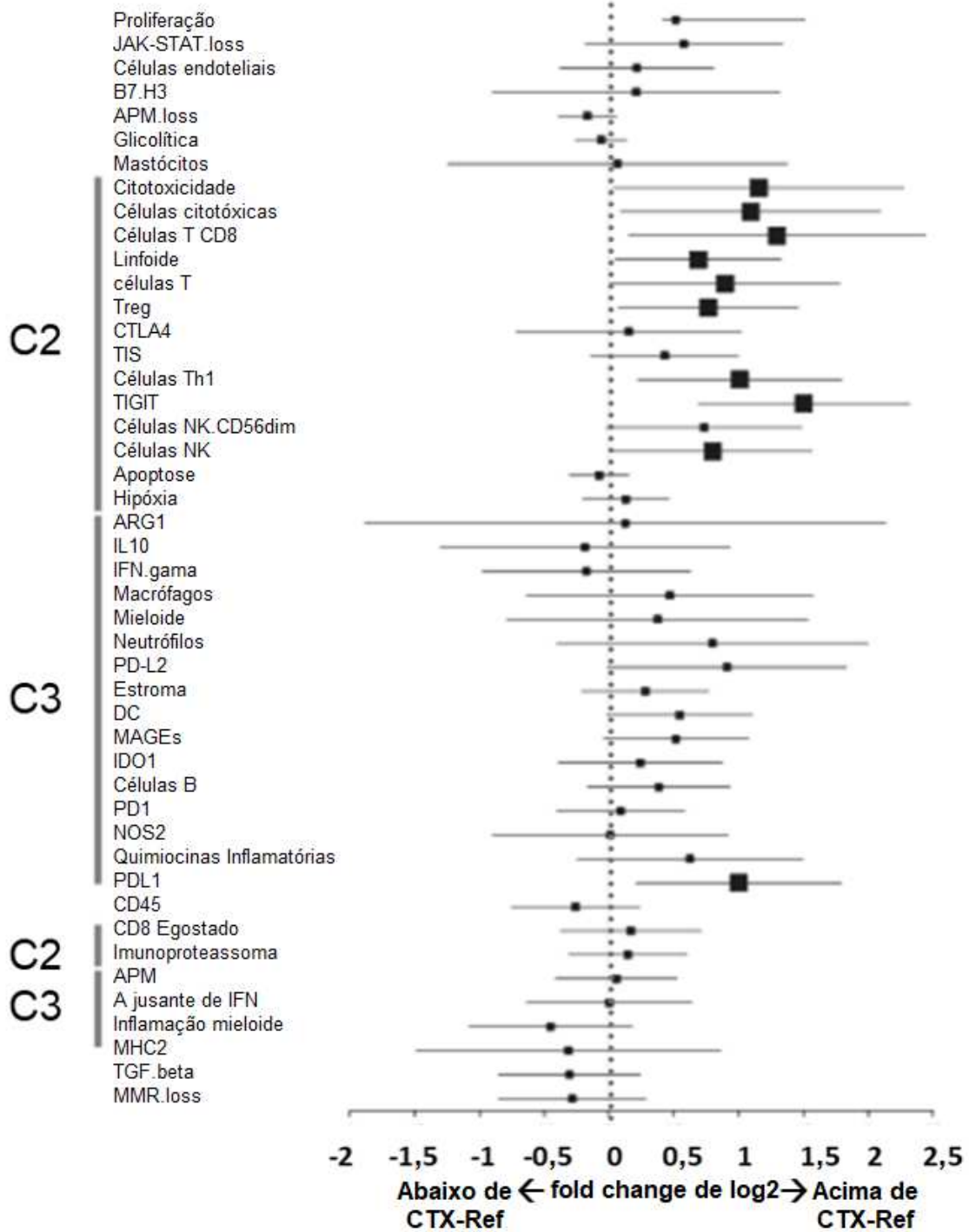


Figura 3C

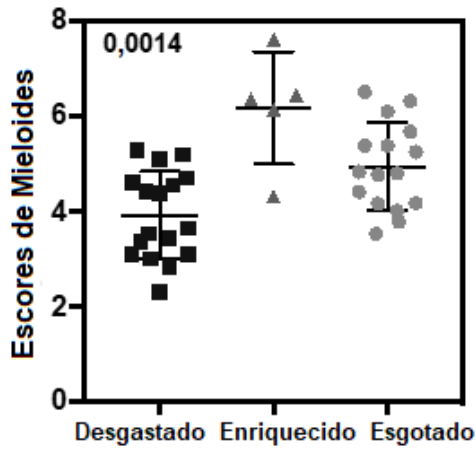


Figura 3D

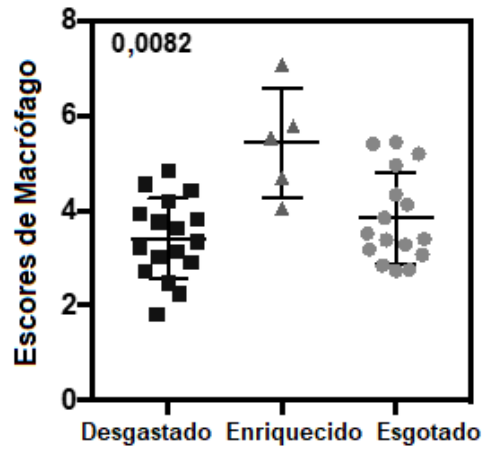


Figura 3E

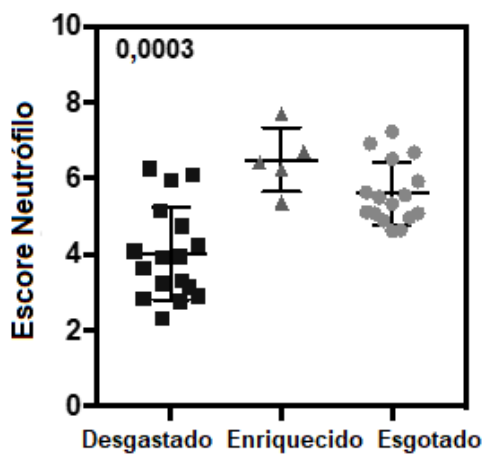


Figura 3F

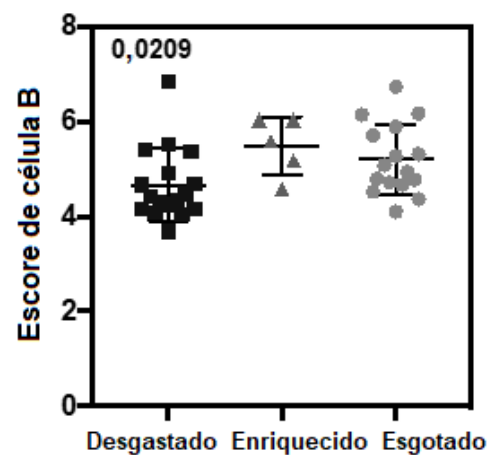


Figura 3G

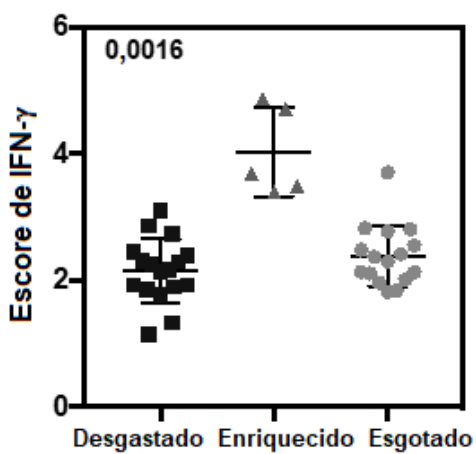


Figura 3H

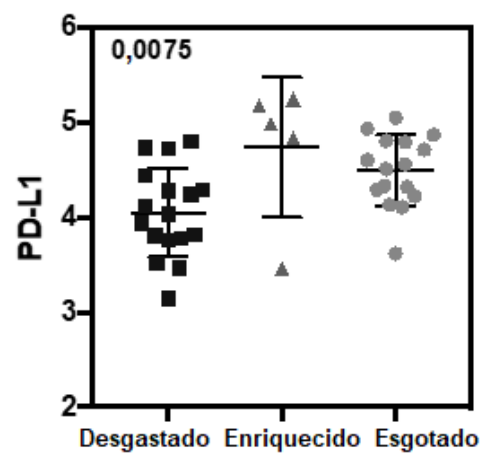


Figura 3I

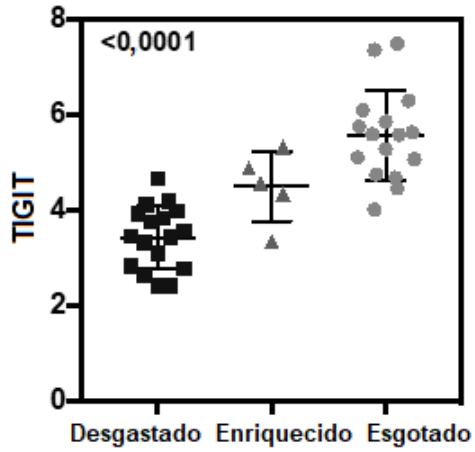


Figura 3J

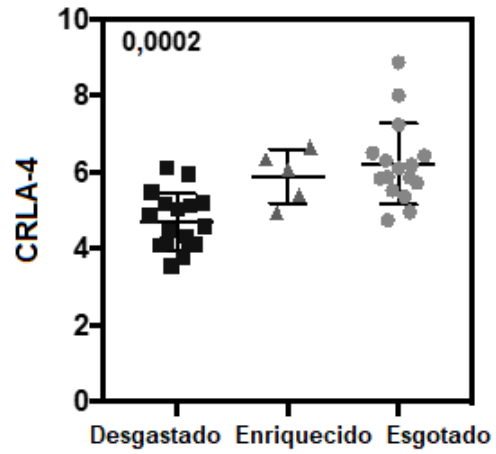


Figura 3K

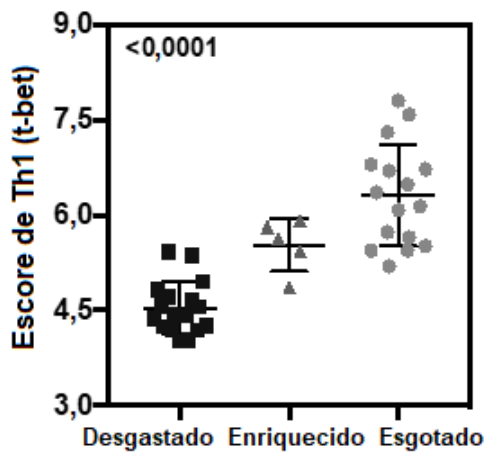


Figura 3L

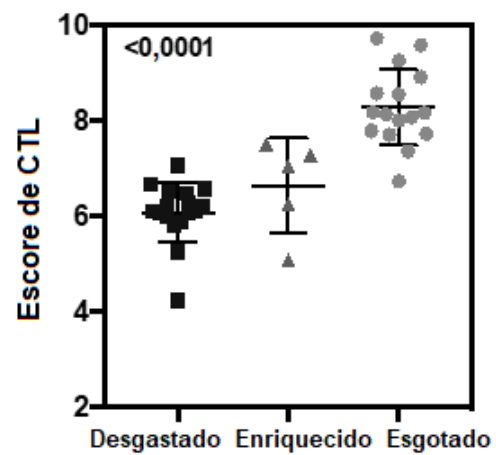


Figura 3M

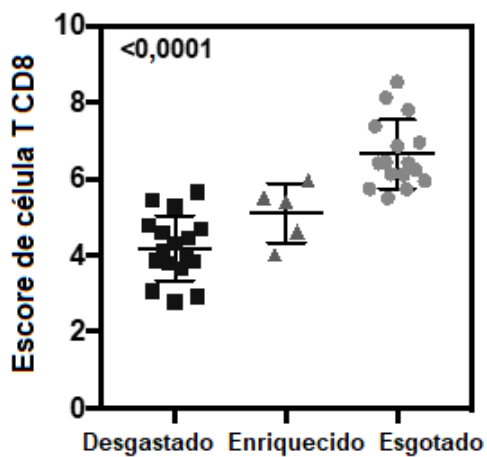


Figura 3N

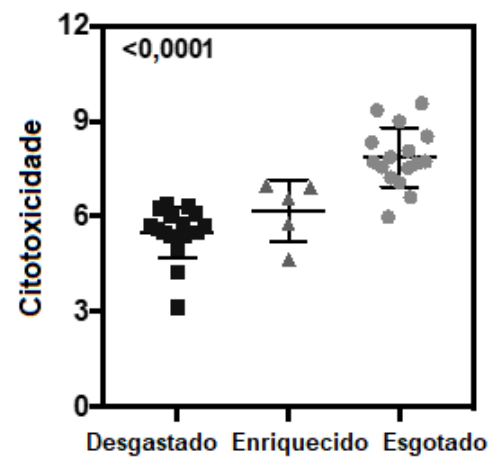


Figura 3O

A assinatura de sinalização IFN-gama é aumentada em amostras de linha de base em indivíduos de OR

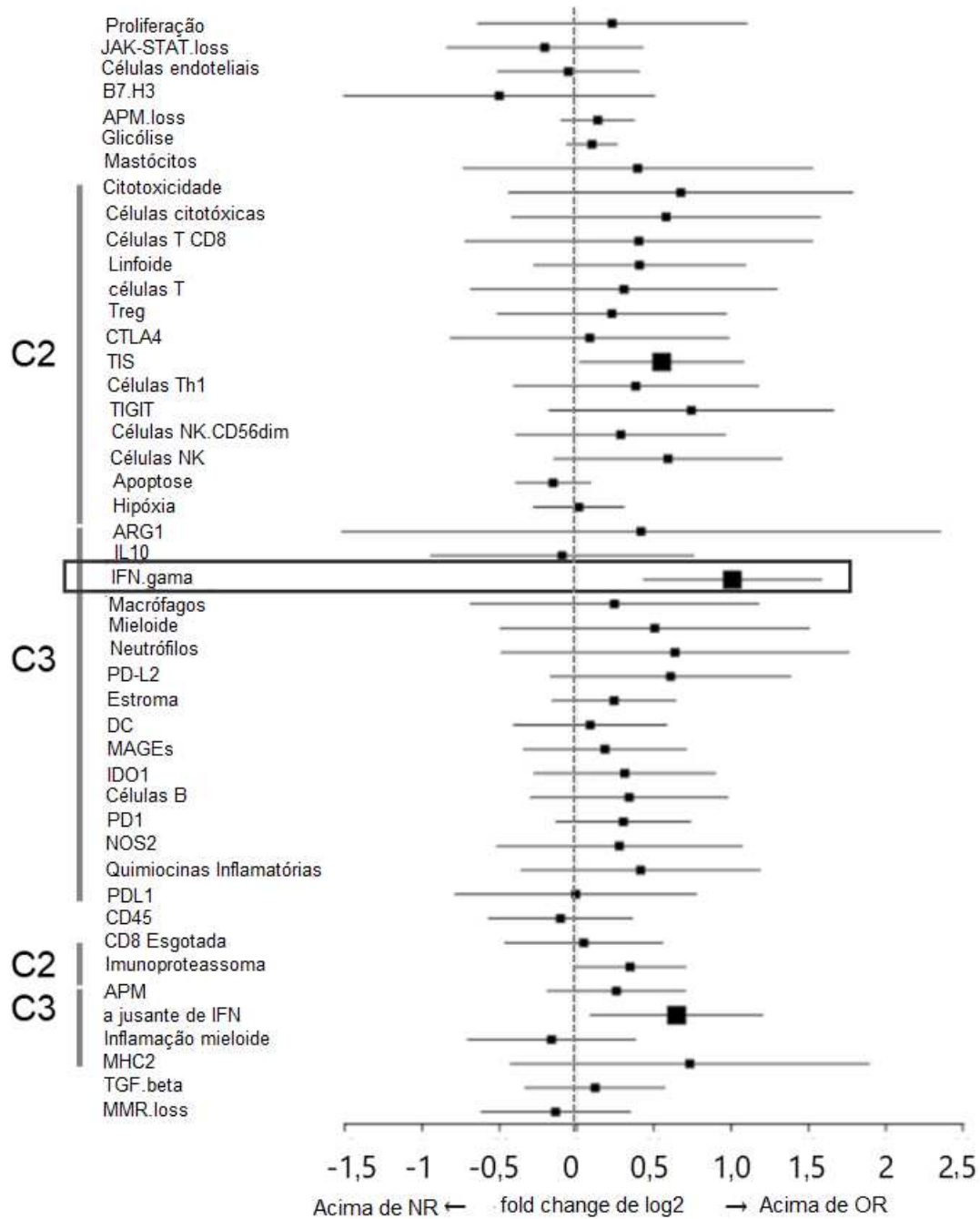


Figura 5A

Sinalização gama interferon é aumentada em amostras de linha de base em pacientes ORR

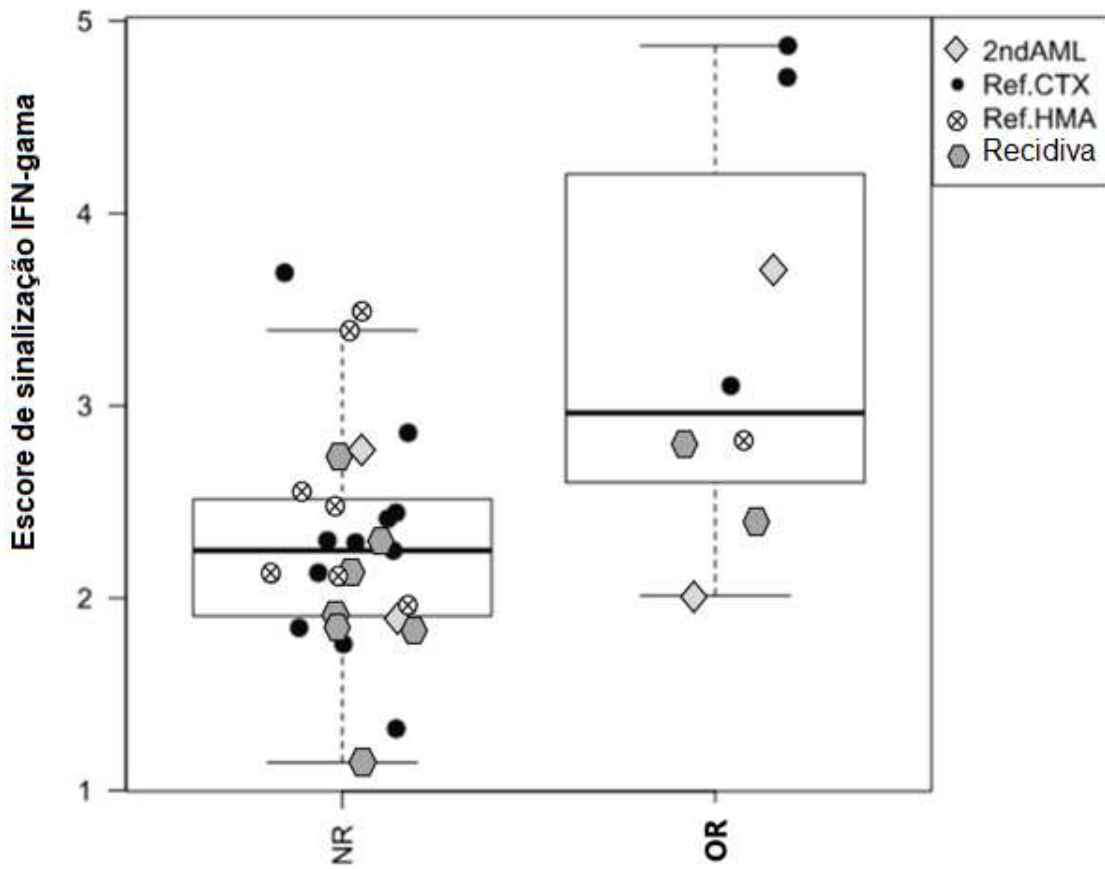


Figura 5B

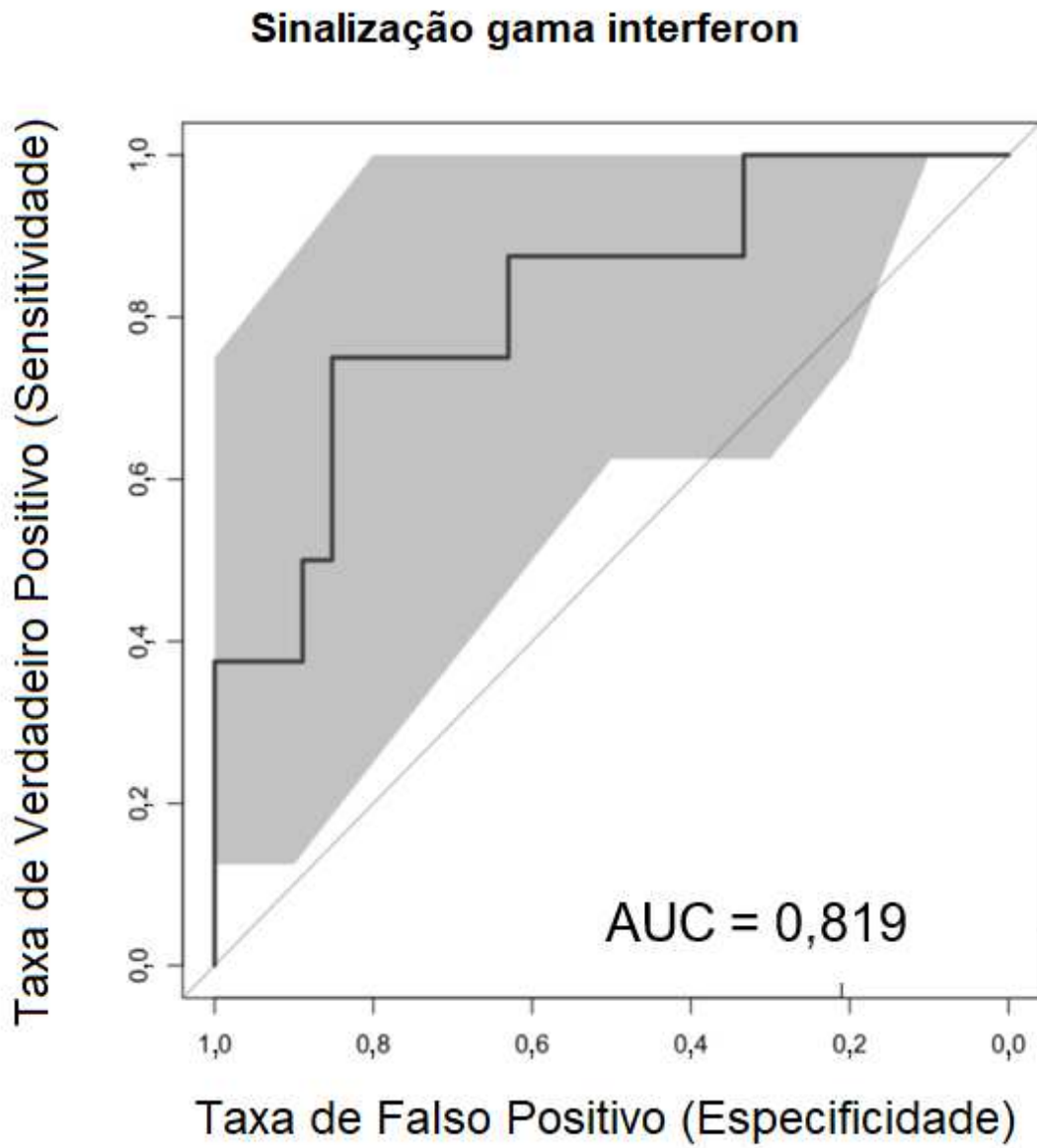


Figura 5C

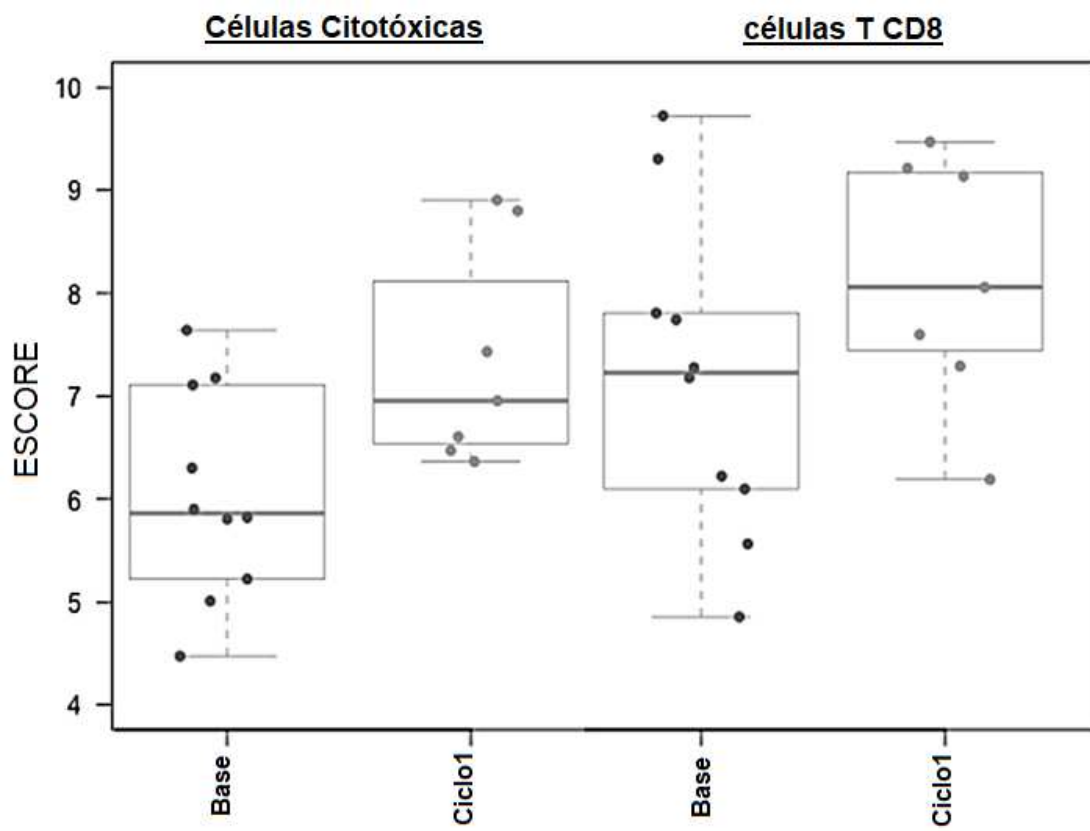


Figura 6

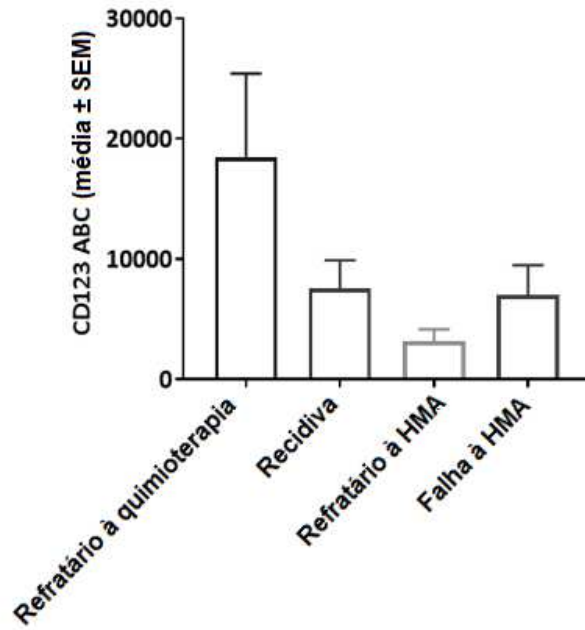


Figura 7

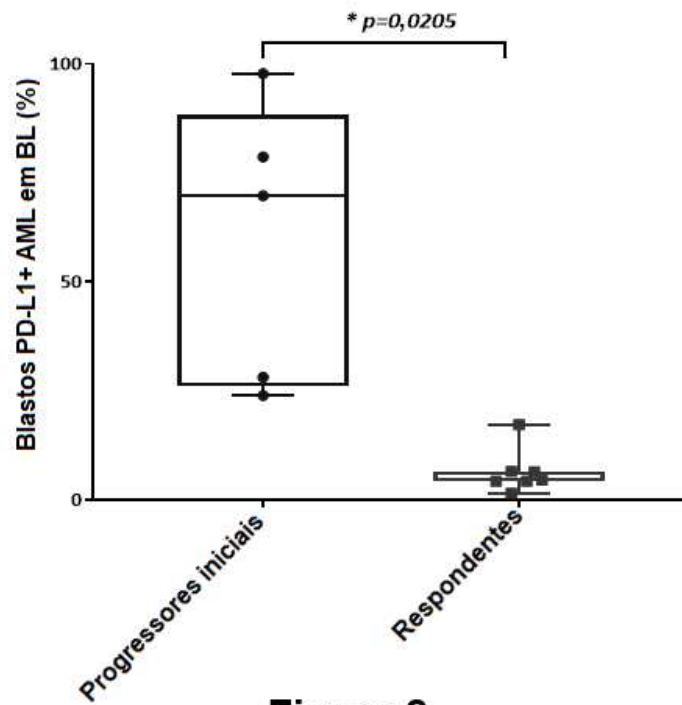


Figura 8

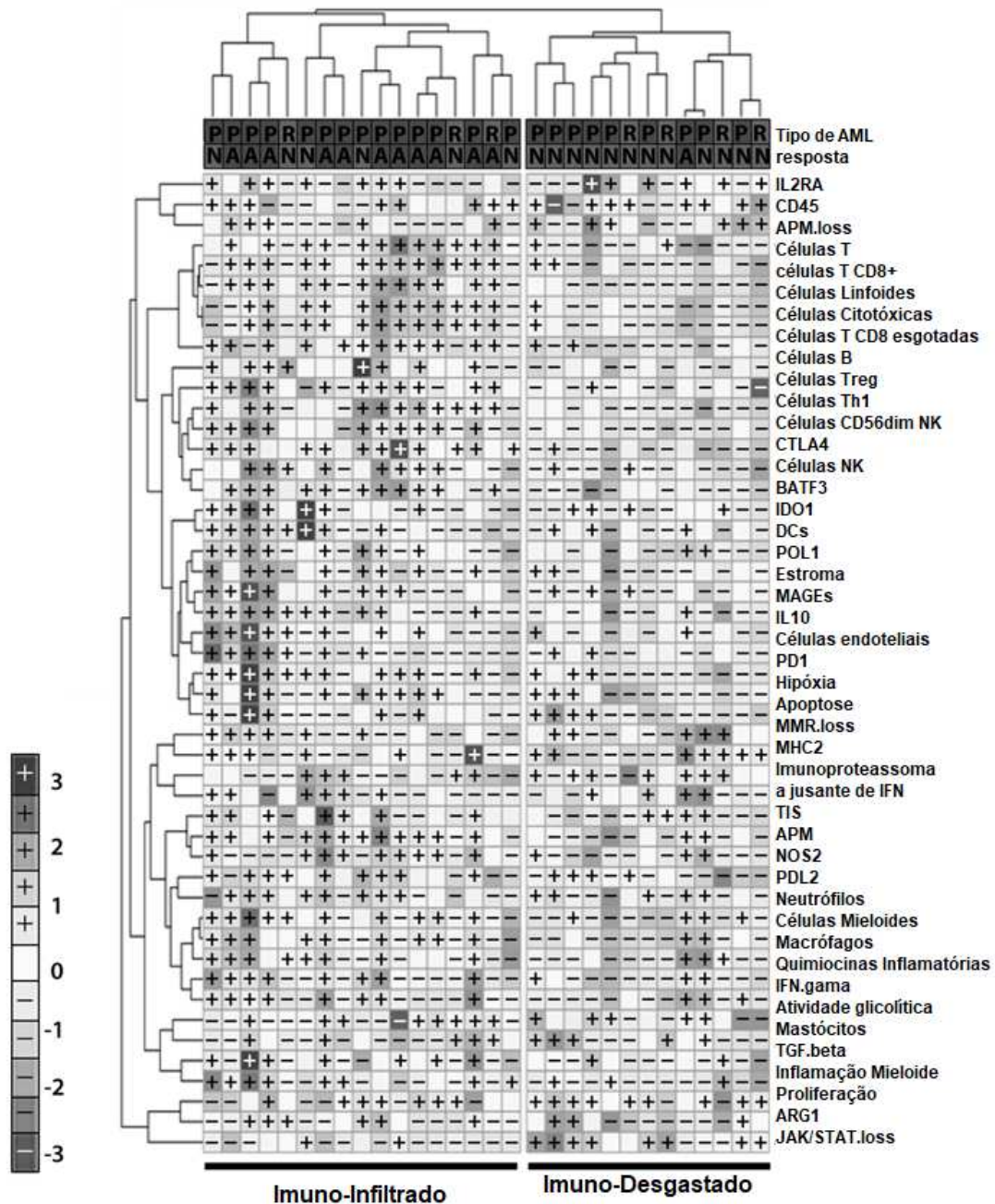


Figura 9

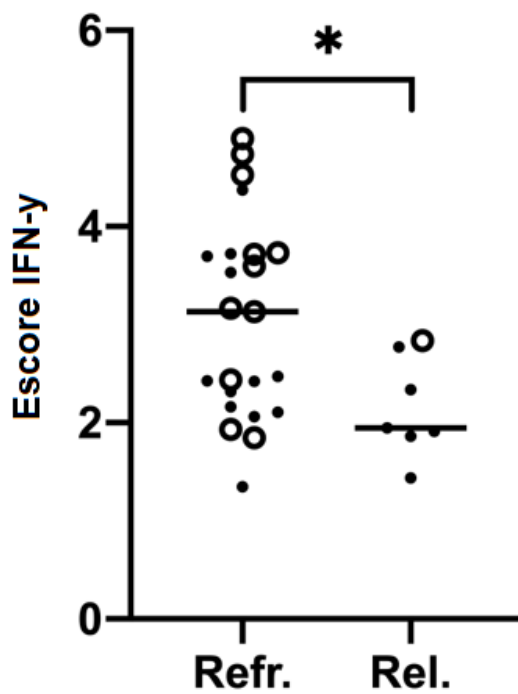


Figura 11A

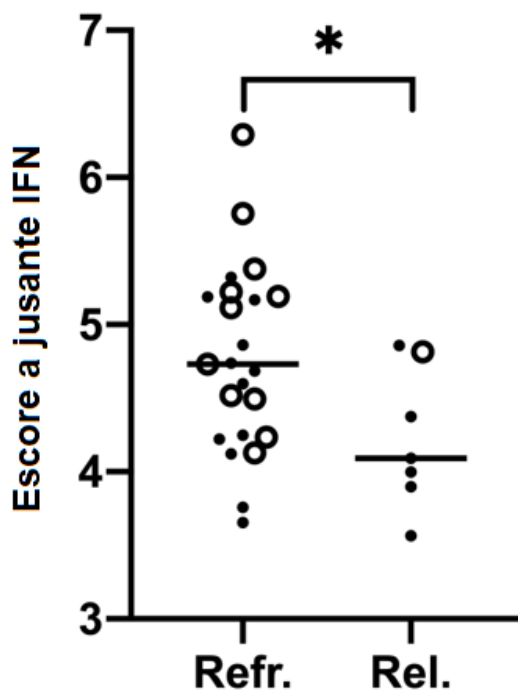


Figura 11B

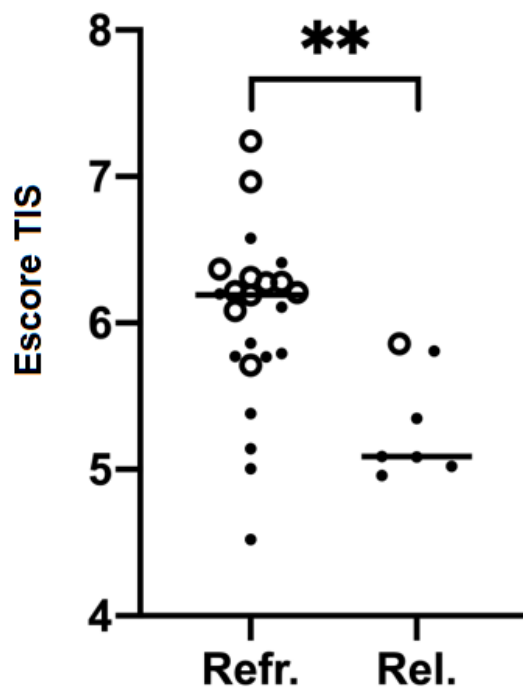


Figura 11C

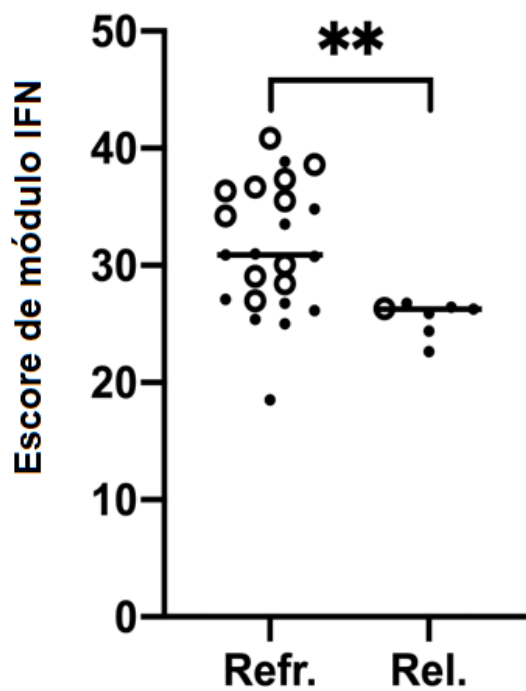


Figura 11D

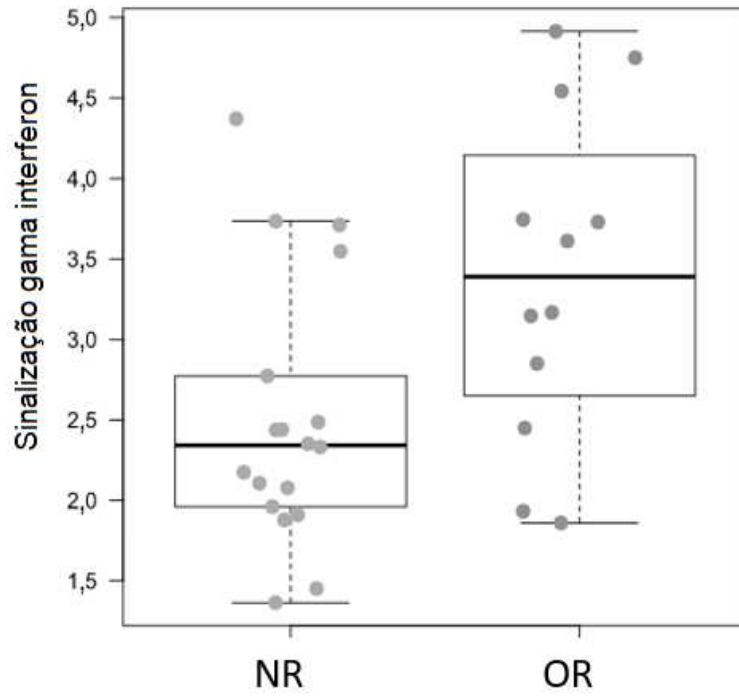


Figura 12A

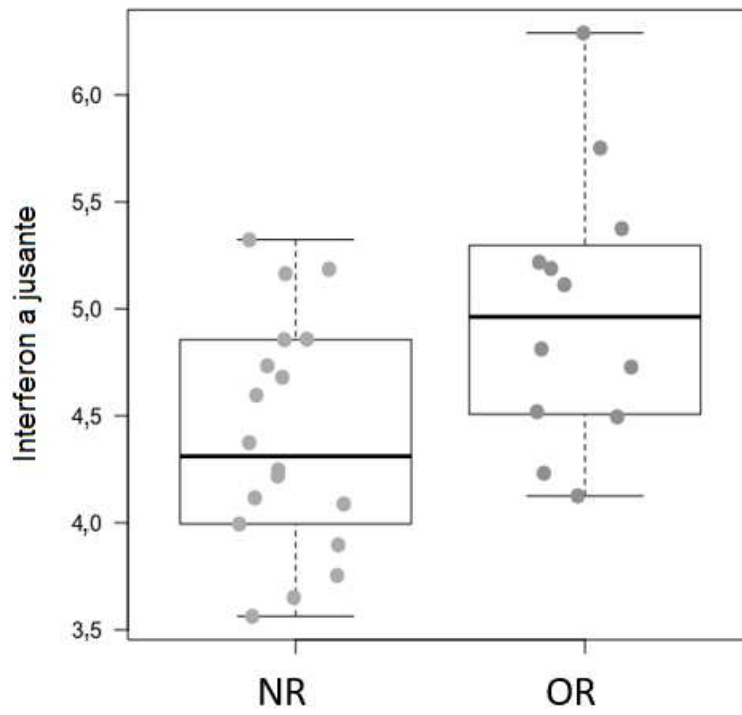


Figura 12B

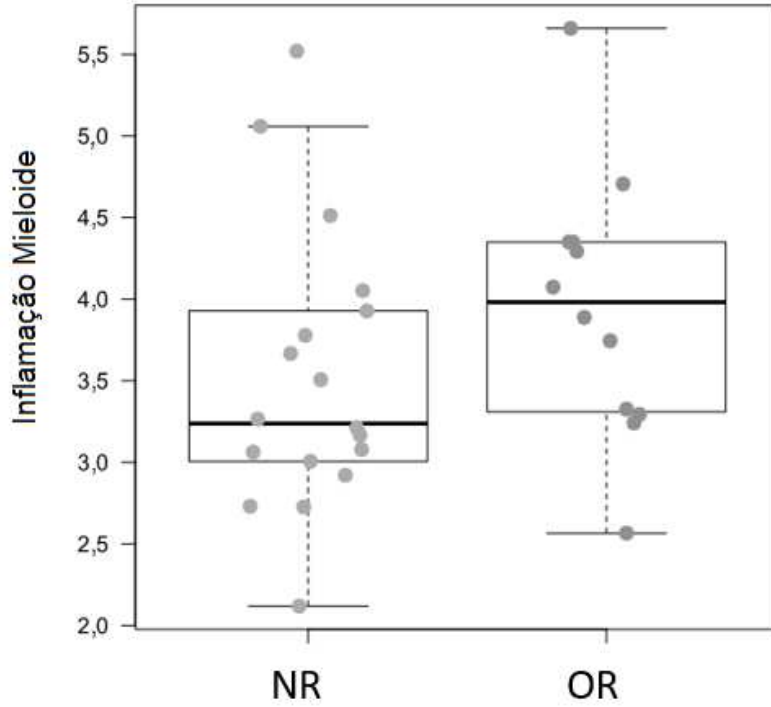


Figura 12C

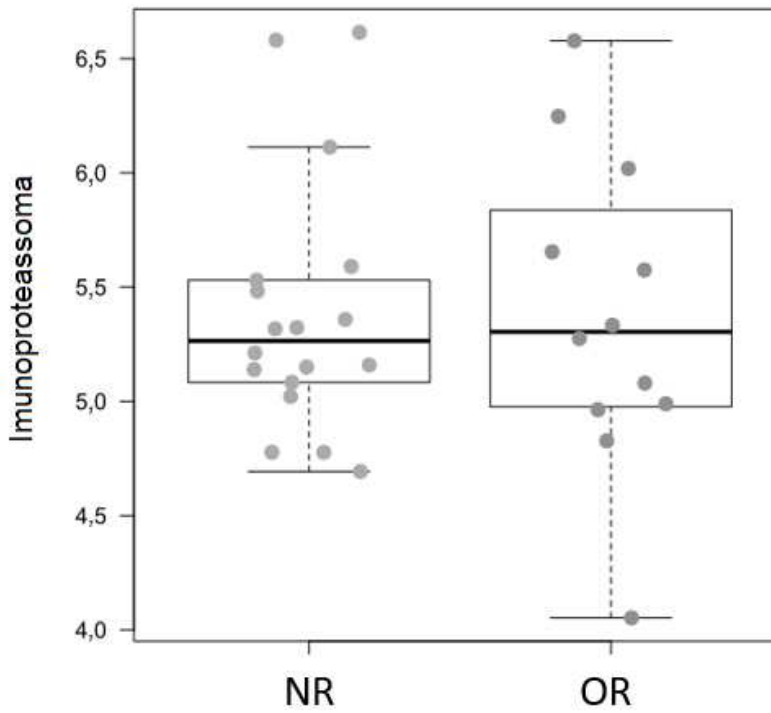


Figura 12D

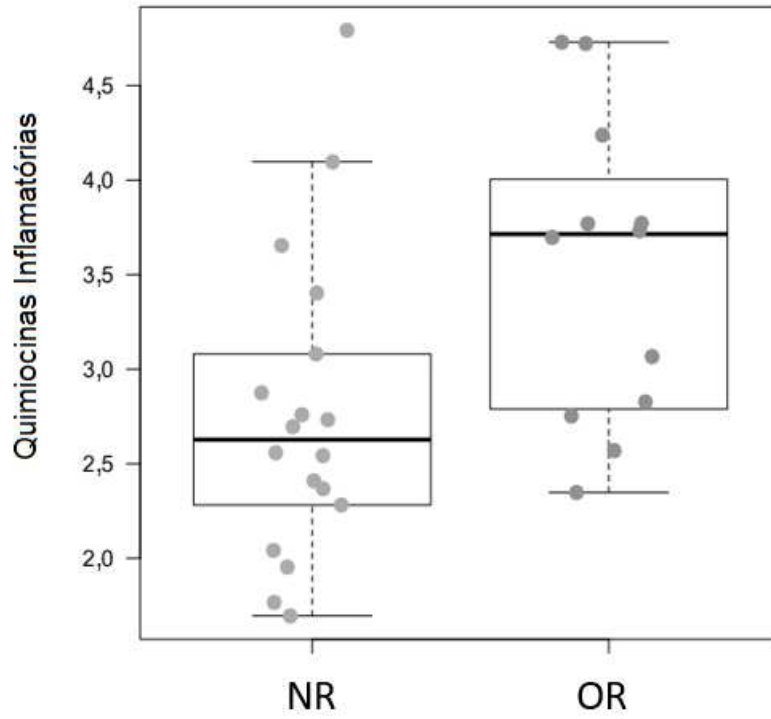


Figura 12E

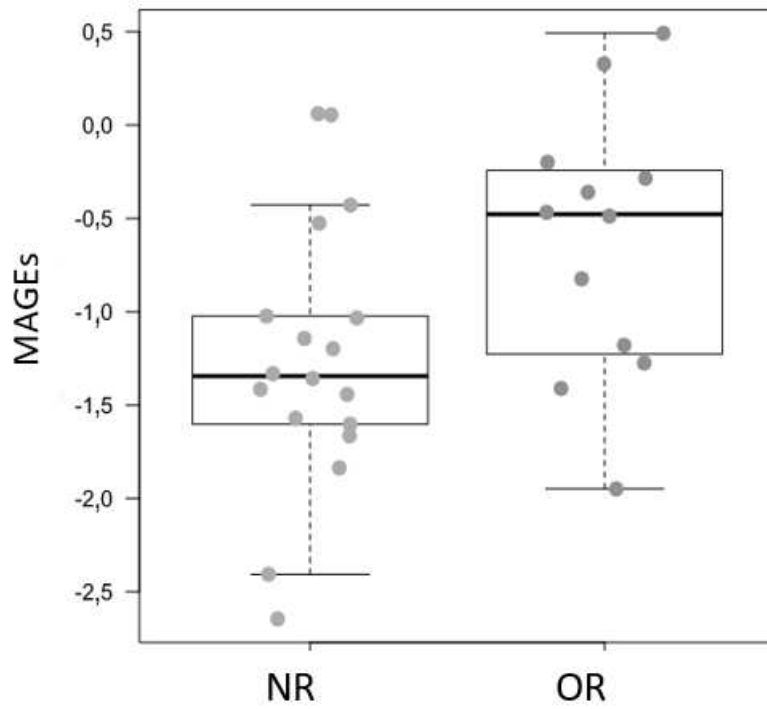


Figura 12F

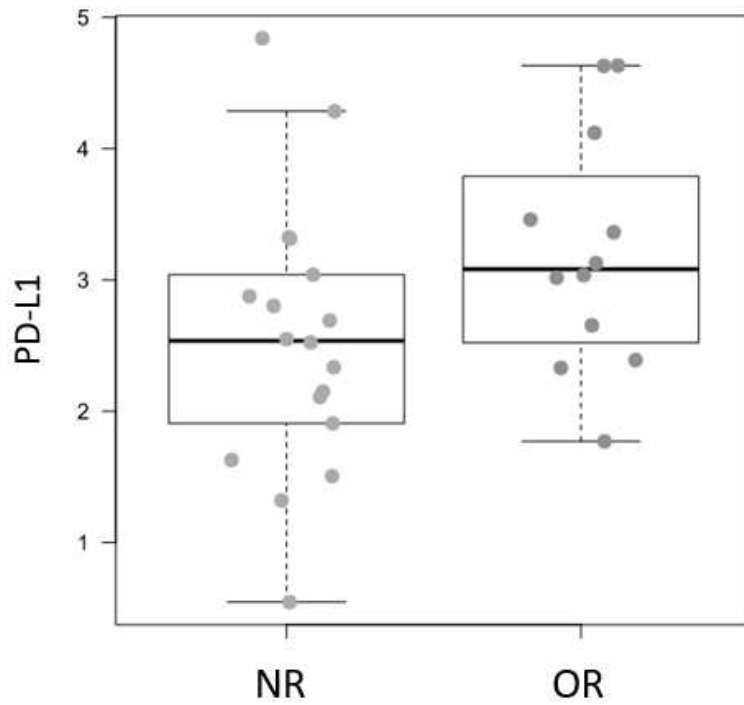


Figura 12G

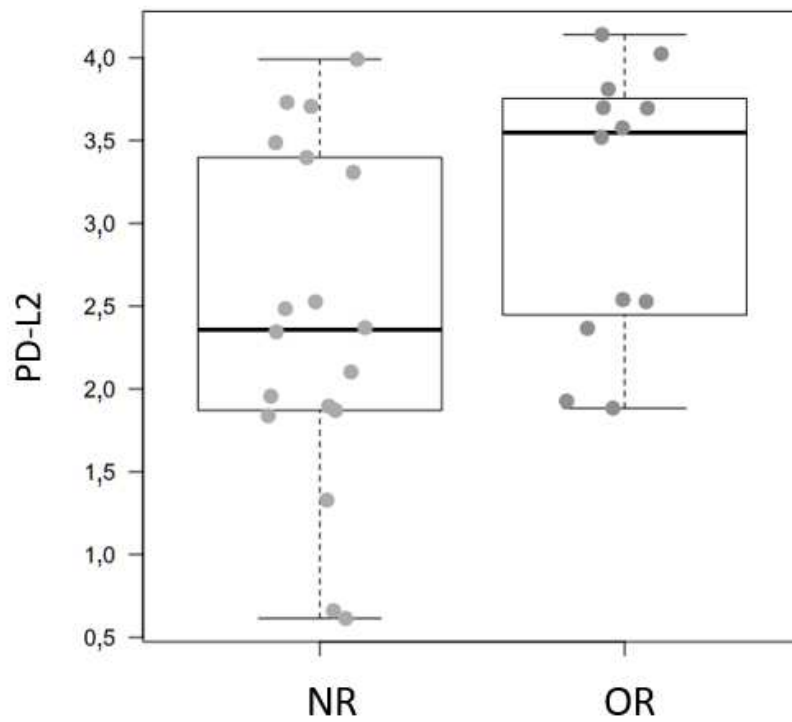


Figura 12H

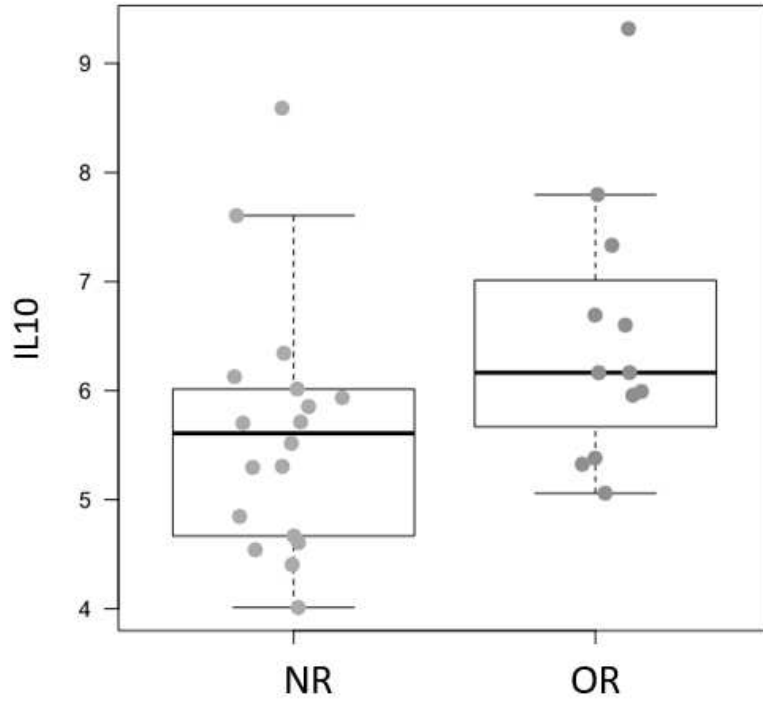


Figura 12I

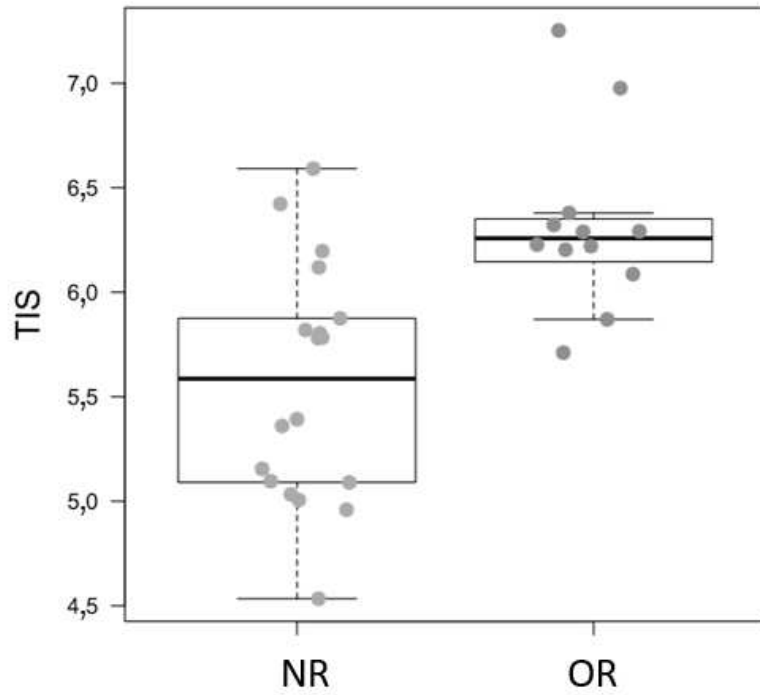


Figura 12J

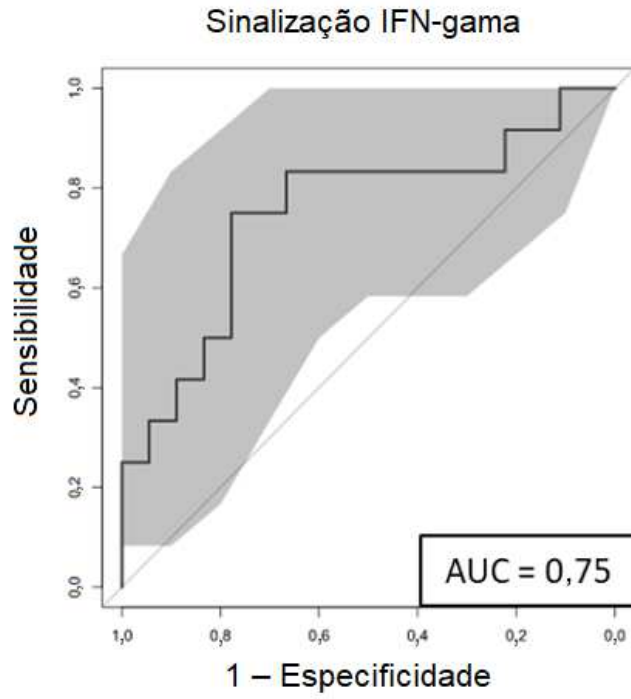


Figura 13A

A jusante IFN

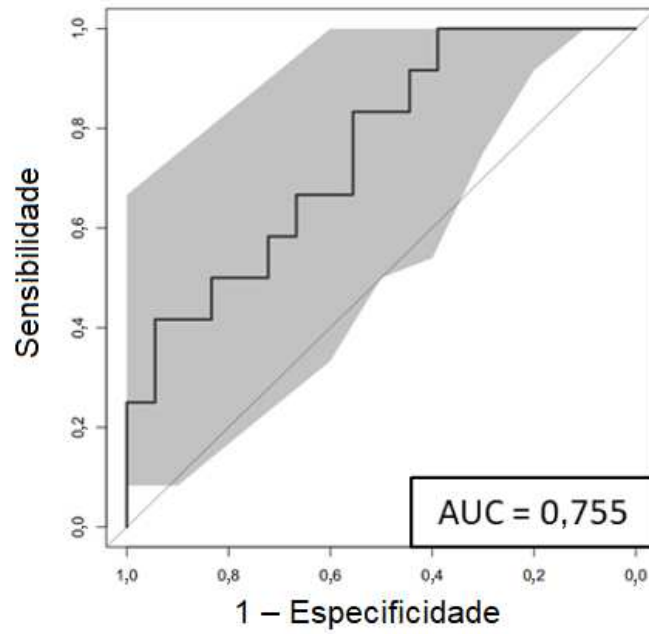


Figura 13B

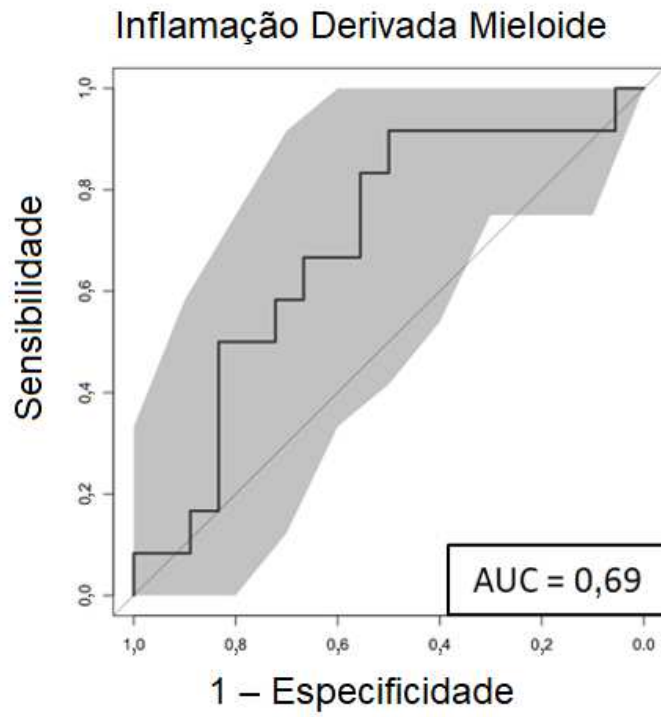


Figura 13C
Imunoproteassoma

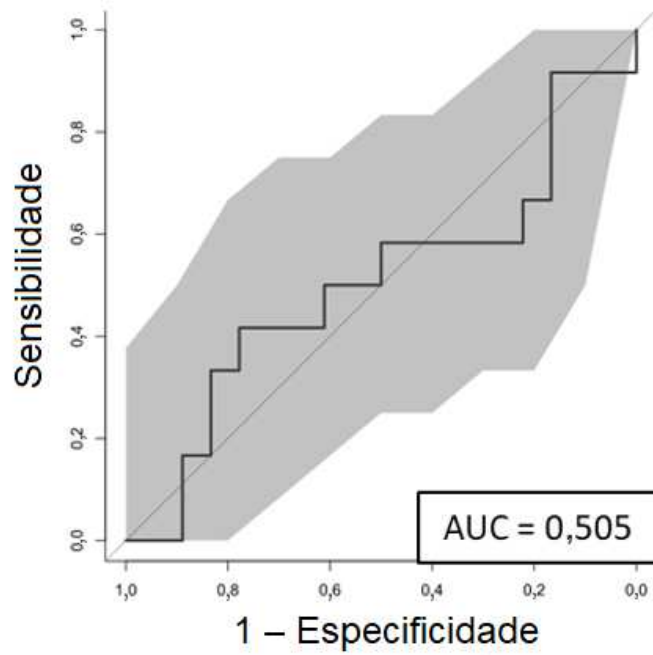


Figura 13D

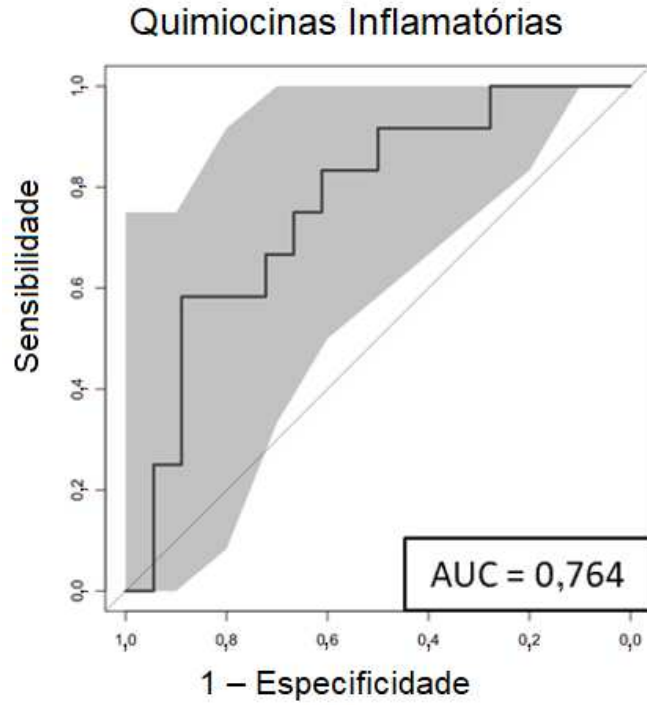


Figura 13E

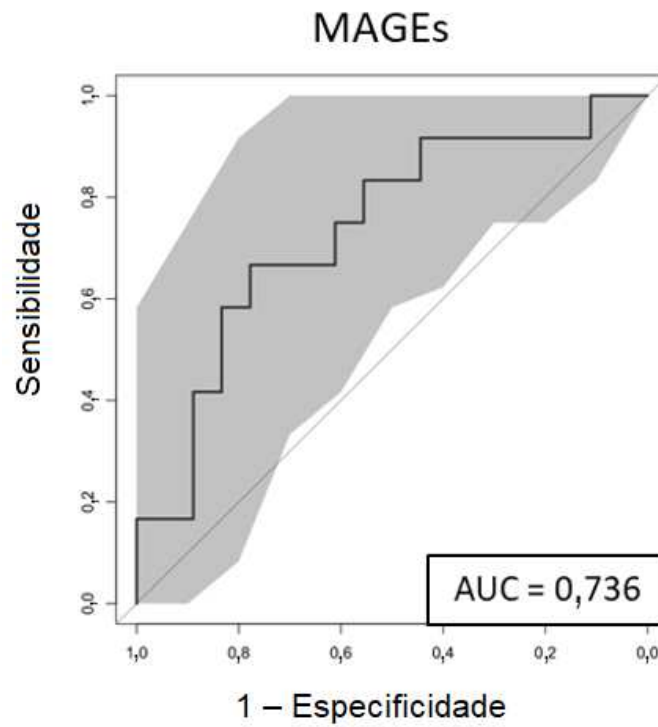


Figura 13F

PD-L1

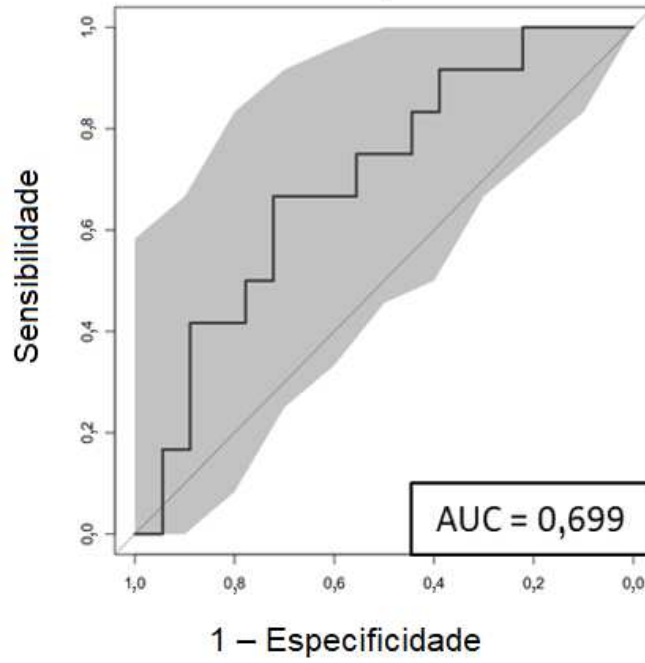


Figura 13G

PD-L2

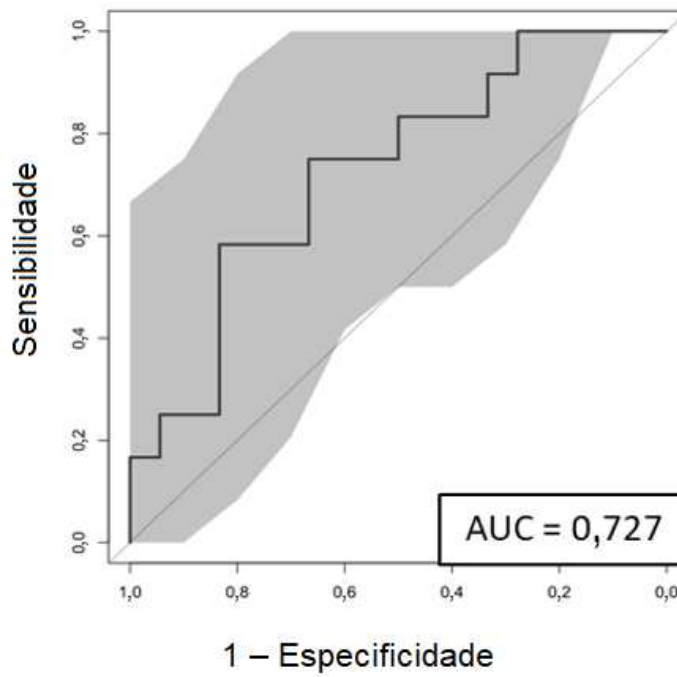


Figura 13H

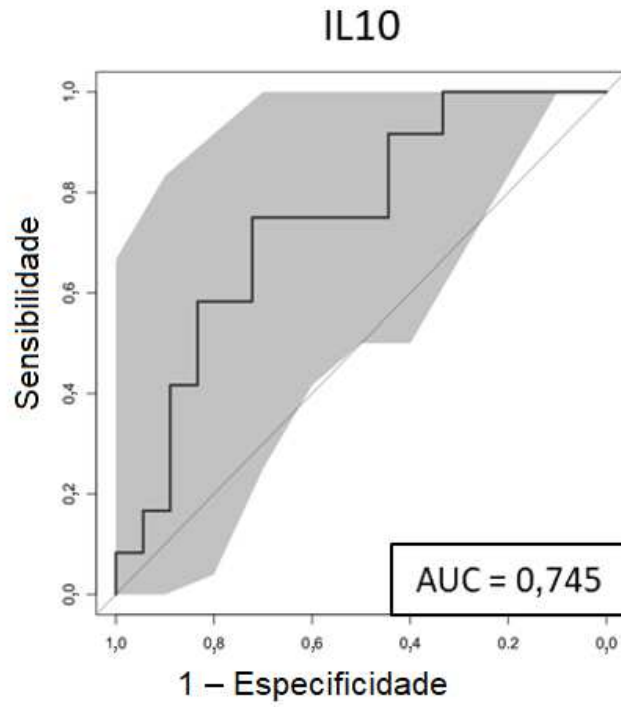


Figura 13I

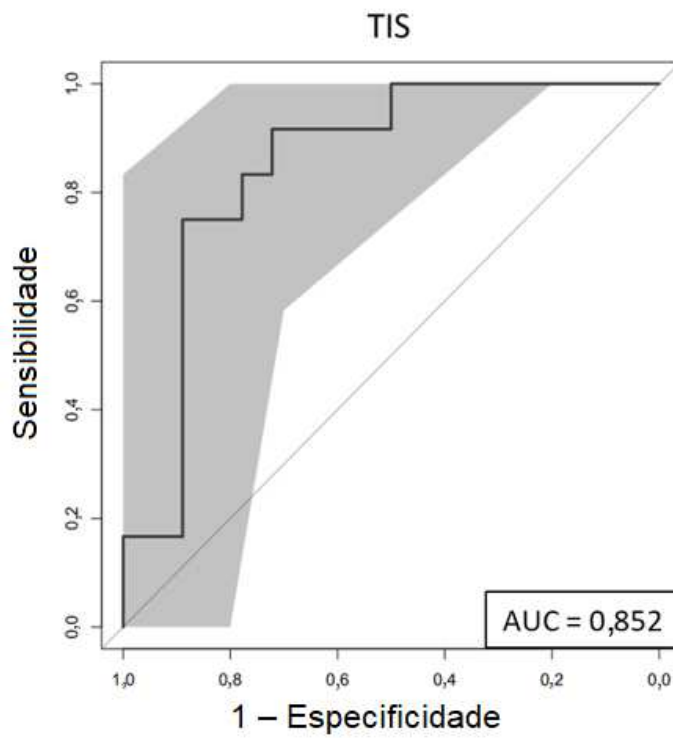


Figura 13J

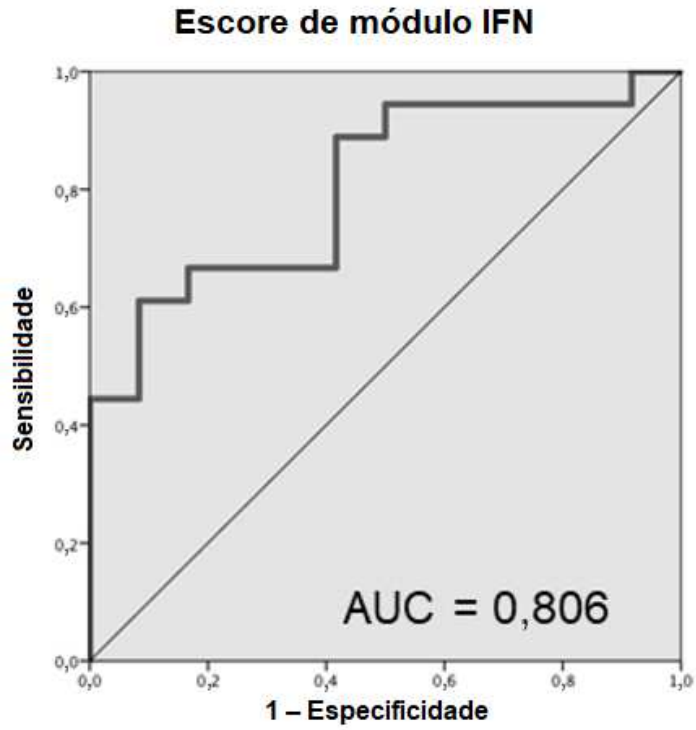


Figura 13K

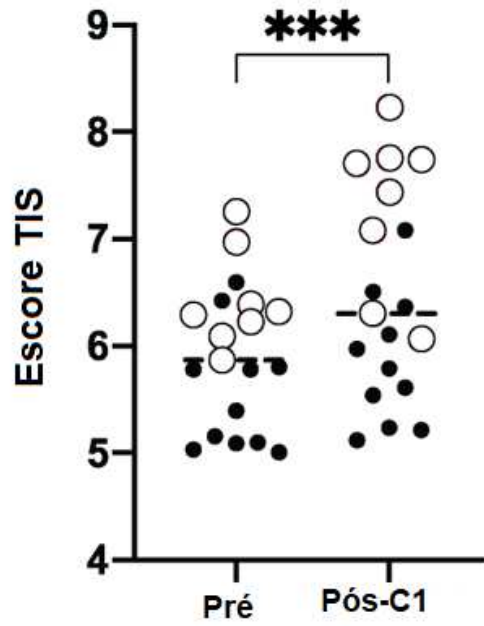


Figura 14A

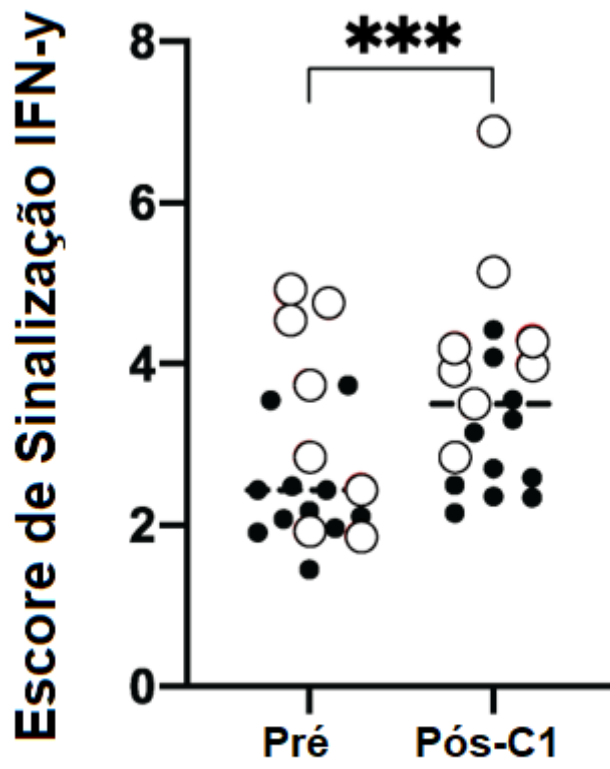


Figura 14B

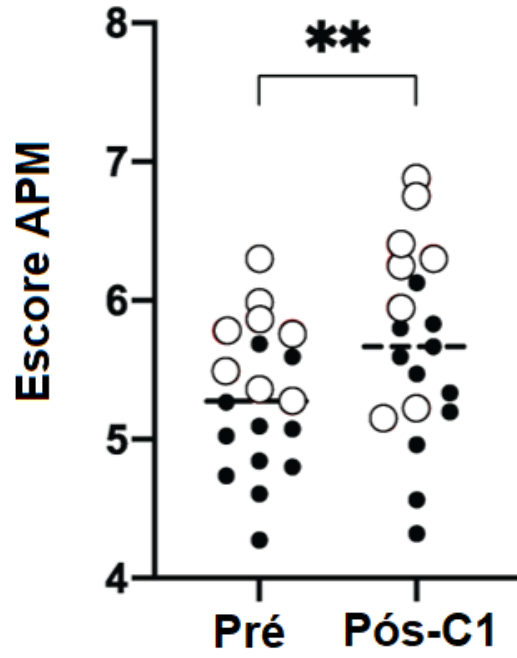


Figura 14C

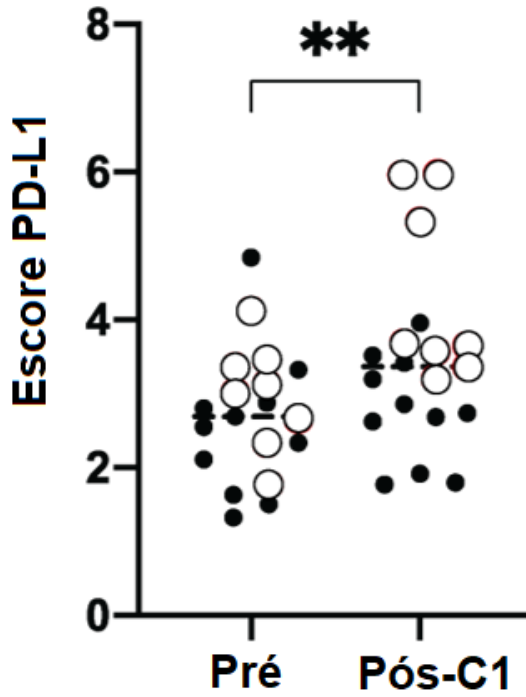


Figura 14D

RESUMO

MÉTODOS DE TRATAMENTO DE UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA QUIMIORREFRATÁRIA EM UM PACIENTE, E MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE SERIA UM RESPONDEDOR ADEQUADO AO USO DE UMA MOLÉCULA BIESPECÍFICA CD123 x CD3 PARA TRATAR UMA MALIGNIDADE HEMATOLÓGICA

A presente invenção refere-se a um método de tratamento de uma malignidade hematológica, como leucemia mieloide aguda (AML) ou síndrome mielodisplásica (MDS), incluindo doenças malignas hematológicas que são refratárias a agentes quimioterápicos e/ou hipometilantes. O método diz respeito à administração de uma molécula de ligação biespecífica CD123 x CD3 a um paciente em uma quantidade eficaz para estimular a morte de células da dita malignidade hematológica no dito paciente. A presente invenção refere-se adicionalmente à modalidade de tal método em que uma amostra celular do paciente evidencia uma expressão de um ou mais genes-alvo que é aumentada em relação a um nível de linha de base de expressão de tais genes, por exemplo, um nível de linha de base de expressão de tais genes em uma população de referência de indivíduos que sofre de malignidade hematológica ou com relação ao nível de expressão de um gene de referência.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: IPI7394_Listagem de Sequências_CRP.txt
- Data de Geração do Código: 11/08/2021
- Hora de Geração do Código: 16:34:40
- Código de Controle:
 - Campo 1: FBCBB748B1B20C94
 - Campo 2: D74C7A37CC4996E6