



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

(21) BR 112021008526-2 A2



(22) Data do Depósito: 01/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 10/08/2021

(54) Título: ANTICORPOS ANTI-CD166 ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: A61K 47/65; A61K 47/64; A61K 47/68; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 02/11/2018 US 62/755.247; 04/01/2019 US 62/788.714; 07/01/2019 US 62/789.403; 25/02/2019 US 62/810.173; 29/03/2019 US 62/826.465.

(71) Depositante(es): CYTOMX THERAPEUTICS, INC..

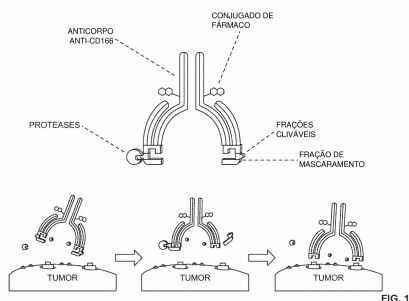
(72) Inventor(es): LORI CARMAN; RACHEL HUMPHREY; W. MICHAEL KAVANAUGH; JONATHAN A. TERRETT; ANNIE YANG WEAVER; MATTHIAS WILL.

(86) Pedido PCT: PCT US2019059363 de 01/11/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/092881 de 07/05/2020

(85) Data da Fase Nacional: 30/04/2021

(57) Resumo: ANTICORPOS ANTI-CD166 ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS. São fornecidos, neste documento, anticorpos ativáveis que, quando ativados, se ligam especificamente ao CD166 e anticorpos ativáveis conjugados que se ligam especificamente ao CD166. Também são fornecidos métodos de produção e uso desses anticorpos ativáveis em uma variedade de indicações terapêuticas, diagnósticas e profiláticas.



“ANTICORPOS ANTI-CD166 ATIVÁVEIS E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] Esta invenção refere-se geralmente a regimes de dosagem específicos para administração de anticorpos ativáveis conjugados com anti-CD166 para o tratamento de câncer.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0002] A "Listagem de Sequência" enviada eletronicamente simultaneamente com este de acordo com 37 C.F.R. § 1.821 em forma legível por computador (CFR) via EFS-Web como nome de arquivo "CYTX-059-PCT_ST25" é incorporada neste documento por referência. A cópia eletrônica da Listagem de Sequência foi criada em 29 de outubro de 2019 e o tamanho do disco é de 49 kilobytes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] As terapias baseadas em anticorpos provaram ser tratamentos efetivos para várias doenças, incluindo cânceres, mas em alguns casos, as toxicidades devido à expressão ampla do alvo limitaram sua efetividade terapêutica. Além disso, a terapêutica baseada em anticorpos exibiu outras limitações, como a rápida depuração da circulação após a administração.

[0004] No campo da terapêutica de pequenas moléculas, estratégias foram desenvolvidas para fornecer pró-fármacos de uma entidade química ativa. Tais pró-fármacos são administrados em uma forma relativamente inativa (ou significativamente menos ativa). Uma vez administrado, o pró-fármaco é metabolizado *in vivo* no composto ativo. Tais estratégias de pró-fármacos podem fornecer maior seletividade do fármaco para seu alvo pretendido e uma redução de efeitos adversos.

[0005] Por conseguinte, existe uma necessidade continuada no campo da terapêutica baseada em anticorpos para anticorpos que imitem as

características desejáveis do pró-fármaco de moléculas pequenas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] Em um aspecto da invenção, é fornecido neste documento um método de tratamento, alívio de um sintoma, ou retardamento da progressão de um câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente a um sujeito em necessidade do mesmo, em que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose superior a 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, em que o AA compreende (a) um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente a CD166 de mamífero, em que AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 240; (b) uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 222; e (c) uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 314; em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 246. Em algumas modalidades, o câncer é carcinoma da mama, carcinoma da próstata resistente à castração, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, ou câncer de pulmão de células não pequenas.

[0007] Em um aspecto relacionado da invenção, é fornecido neste documento um método de inibição ou redução do crescimento, proliferação ou metástase de células que expressam CD166 em um sujeito, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo

ativável (AA) conjugado a um agente a um sujeito em necessidade do mesmo, em que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose superior a 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, em que o AA compreende (a) um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente a CD166 de mamífero, em que AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 240; (b) uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 222; e (c) uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 314; em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 246.

[0008] Em um aspecto relacionado adicionalmente da invenção, é fornecido neste documento um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para uso em tratamento, alívio de um sintoma, ou retardamento da progressão de um câncer em um sujeito, em que o AA compreende (a) um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480 e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 240; (b) uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 222; e (c) uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. Em algumas

modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 314; em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 246. Em algumas modalidades, o câncer é carcinoma da mama, carcinoma da próstata resistente à castração, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, ou câncer de pulmão de células não pequenas. Em algumas modalidades, o câncer é carcinoma de mama, carcinoma de próstata, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma de ovário, carcinoma de cabeça e pescoço ou câncer de pulmão. O AA é para administração ao sujeito em uma quantidade terapeuticamente eficaz. Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é uma dose superior a 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

[0009] Em um aspecto ainda relacionado da invenção, é fornecido neste documento um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para uso em na inibição ou redução do crescimento, proliferação ou metástase de células que expressam CD166 para o tratamento de câncer em um sujeito, em que o AA compreende (a) um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480 e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 240; (b) uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 222; e (c) uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. Em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 314; em algumas modalidades, a cadeia leve compreende a sequência da SEQ ID NO: 246. O AA é para administração em uma quantidade terapeuticamente eficaz a um

sujeito em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz é uma dose superior a 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

[0010] Em algumas modalidades, o sujeito sofre de carcinoma da mama, carcinoma da próstata resistente à castração, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, ou câncer de pulmão de células não pequenas. Em algumas modalidades, as células são células da mama, células da próstata, células do endométrio, células do ovário, células da cabeça ou do pescoço, células do ducto biliar ou células do pulmão.

[0011] Em algumas modalidades, o agente conjugado ao AA é um maitansinóide ou seu derivado; por exemplo, o agente conjugado ao AA é DM4; em algumas modalidades, o DM4 é conjugado ao AA por meio de um ligante; em algumas modalidades, o ligante compreende uma fração SPBD (N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato).

[0012] Em algumas modalidades, o AB está ligado à CM, por exemplo, através de um peptídeo de ligação. Em algumas modalidades, a MM está ligada à CM, de modo que o AA em um estado não clivado compreenda o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM. Em algumas modalidades, o AA compreende um peptídeo de ligação entre a MM e a CM; por exemplo, o peptídeo de ligação pode compreender a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479. Em algumas modalidades, o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB; por exemplo, o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB; por exemplo, o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos de GGS.

[0013] Em algumas modalidades, o AA compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2), e em que o AA, no estado não clivado, tem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal

da seguinte forma: MM-LP1-CM-LP2-AB ou AB-LP2-CM-LP1-MM.

[0014] Em algumas modalidades, a cadeia leve está ligada a um espaçador no seu N-terminal; em algumas modalidades, o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305; Em algumas modalidades, o MM e o CM estão ligados à cadeia leve; em algumas modalidades, o MM está ligado ao CM, de modo que o AA em um estado não clivado compreende o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal em sua cadeia leve, como segue: cadeia leve espaçador-MM-LP1-CM-LP2; em algumas modalidades, o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305, LP1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479 e LP2 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a cadeia leve está ligada a um espaçador no seu N-terminal; em algumas modalidades, o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305; Em algumas modalidades, a MM e a CM estão ligadas à cadeia leve; em algumas modalidades, a MM está ligado à CM, de modo que o AA em um estado não clivado compreende o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal em sua cadeia leve, como segue: espaçador-MM-LP1-CM-LP2-cadeia leve; em algumas modalidades, o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305, LP1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479 e LP2 compreende a sequência de aminoácidos de GGS.

[0015] Em algumas modalidades, o sujeito tem pelo menos 18 anos de idade; em algumas modalidades, o sujeito tem um status de desempenho ECOG de 0-1; em algumas modalidades, o sujeito tem um diagnóstico confirmado histologicamente de um câncer metastático ativo; em algumas modalidades, o sujeito tem um diagnóstico confirmado histologicamente de um tumor sólido irresssecável localmente avançado; em algumas modalidades, o sujeito tem uma expectativa de vida superior a 3 meses no momento da administração.

[0016] Em algumas modalidades, o sujeito tem um carcinoma de mama; em algumas modalidades, o carcinoma da mama é ER+; em algumas modalidades, o sujeito recebeu terapia anti-hormonal anterior e experimentou progressão da doença; em outra modalidade, o sujeito tem um câncer de mama triplo negativo e foi submetido a pelo menos duas linhas anteriores de terapia; em outra modalidade, o sujeito não teve um histórico de doença da córnea aguda ou crônica.

[0017] Em algumas modalidades, o sujeito tem carcinoma de próstata resistente à castração, em algumas modalidades, o sujeito recebeu pelo menos uma terapia anterior.

[0018] Em algumas modalidades, o sujeito tem colangiocarcinoma. Em algumas modalidades, o sujeito falhou em pelo menos uma linha anterior de regime contendo gencitabina.

[0019] Em algumas modalidades, o sujeito tem carcinoma endometrial; em algumas modalidades, o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina para doença extra-uterina ou avançada.

[0020] Em algumas modalidades, o sujeito tem carcinoma epitelial de ovário. Em algumas modalidades, o sujeito tem um carcinoma resistente à platina; em algumas modalidades, o sujeito tem um carcinoma ovariano refratário à platina; em algumas modalidades, o sujeito tem uma mutação BRCA e é refratário aos inibidores da PARP. Em outras modalidades, o sujeito tem uma mutação não-BRCA.

[0021] Em algumas modalidades, o sujeito tem carcinoma de células pequenas da cabeça e pescoço (HNSCC); em algumas modalidades, o sujeito recebeu mais de um regime contendo platina; em algumas modalidades, o sujeito recebeu mais de um inibidor de PD-1/PD-L1.

[0022] Em algumas modalidades, o sujeito tem câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC); em algumas modalidades, o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina; em algumas modalidades, o sujeito

recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1. Em algumas modalidades, o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de checkpoint.

[0023] Em algumas modalidades, o sujeito tem uma lesão cutânea. Em algumas modalidades, a lesão cutânea é uma metástase cutânea.

[0024] Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o AA que é conjugado a um agente em uma dose superior a 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg; por exemplo, a dose administrada é superior a 6 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 7 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 8 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 9 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 10 mg/kg.

[0025] Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o AA que é conjugado a um agente em uma dose superior a 6 mg/kg a cerca de 7 mg/kg; por exemplo, a dose administrada é de cerca de 7 mg/kg a cerca de 8 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 8 mg/kg a cerca de 9 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 9 mg/kg a cerca de 10 mg/kg; a dose administrada é superior a 6 mg/kg a cerca de 8 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 7 mg/kg a cerca de 9 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 8 mg / kg a cerca de 10 mg / kg.

[0026] Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 1000 mg ou em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 400 mg ou em uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 1000 mg ou a uma dose fixa superior a 240 mg a superior a 600 mg; por exemplo, a dose fixa administrada é de cerca de 280 mg a cerca de 700 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 320 mg a cerca de 800 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 360 mg a cerca de 900 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 400 mg a cerca de 1000 mg; a dose fixa administrada é superior a 240 mg a cerca de 280 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 280 mg a cerca de 320 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 320 mg a cerca de 360 mg; a dose fixa

administrada é de cerca de 360 mg a cerca de 400 mg; a dose fixa administrada é superior a 600 mg a cerca de 700 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 700 mg a cerca de 800 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 800 mg a cerca de 900 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 900 mg a cerca de 1000 mg; a dose fixa administrada é superior a 240 mg a cerca de 320 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 280 mg a cerca de 360 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 320 mg a cerca de 400 mg; a dose fixa administrada é superior a 600 mg a cerca de 800 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 700 mg a cerca de 900 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 800 mg a cerca de 1000 mg.

[0027] Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito AA conjugado a um agente em uma dose fixa maior que 360 mg a cerca de 600 mg; por exemplo, a dose fixa administrada é superior a 360 mg a cerca de 420 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 420 mg a cerca de 480 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 480 mg a cerca de 540 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 540 mg a cerca de 600 mg; a dose fixa administrada é superior a 360 mg a cerca de 480 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 420 mg a cerca de 540 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 480 mg a cerca de 600 mg.

[0028] Em algumas modalidades, o sujeito é administrado com AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 480 mg a cerca de 800 mg; por exemplo, a dose fixa administrada é superior a 480 mg a cerca de 560 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 560 mg a cerca de 640 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 640 mg a cerca de 720 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 720 mg a cerca de 800 mg; a dose fixa administrada é superior a 480 mg a cerca de 560 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 560 mg a cerca de 720 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 640 mg a cerca de 800 mg.

[0029] Em algumas modalidades, o sujeito é administrado com o AA

conjugado a um agente por via intravenosa; em algumas modalidades, o sujeito é administrado com AA conjugado a um agente por via intravenosa a cada 21 dias; em algumas modalidades, o sujeito recebe o AA conjugado a um agente por via intravenosa a cada 14 dias.

[0030] Em algumas modalidades, o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente com uma dosagem com base no peso corporal real do sujeito. Em algumas modalidades, o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente com uma dosagem com base no peso corporal ideal ajustado do sujeito.

[0031] Em algumas modalidades, o sujeito é administrado com um ou mais tratamentos profiláticos para reduzir ou prevenir eventos adversos oculares; em algumas modalidades, o um ou mais tratamentos profiláticos são administrados diariamente; em algumas modalidades, o tratamento profilático é um ou mais tratamentos selecionados do grupo que consiste em: lágrimas artificiais lubrificantes, solução oftálmica de tartarato de brimonidina, aplicação de uma compressa fria para os olhos e colírios de esteroides tópicos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0032] **A FIG. 1** representa o conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável sendo preferencialmente ativado no microambiente do tumor, onde estão presentes as proteases específicas do tumor.

[0033] **A FIG. 2** demonstra a expressão de CD166 em amostras de tumor humano por imuno-histoquímica (IHC).

[0034] **A FIG. 3** mostra a atividade antitumoral de um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável e um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 em um modelo de tumor de camundongo de TNBC. Também é mostrada a expressão de CD166 por imuno-histoquímica (IHC). (AADC = conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável; ADC = conjugado fármaco de anti-CD166)

[0035] **A FIG. 4** mostra a atividade antitumoral de um conjugado

fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável e um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 em um modelo de tumor de camundongo de câncer de pulmão de células não pequenas. Também é mostrada a expressão de CD166 por IHC.

[0036] **A FIG. 5** mostra a atividade antitumoral de um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável e um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 em um modelo de camundongo de xenoenxerto (PDX) derivado de paciente para o câncer de ovário. Também é mostrada a expressão de CD166 por IHC.

[0037] **A FIG. 6** ilustra o projeto de ensaio clínico da Parte A e Parte B para um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável.

[0038] **As FIGS. 7A-7B** demonstra ativação preferencial de um anticorpo anti-CD166 ativável em tumores.

[0039] **As FIGS. 8A-8B** demonstram a separação de formas intactas e ativadas de um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável parcialmente ativado por matriptase (MT-SP1) ou MMP14.

[0040] **As FIGS. 9A-9F** mostram dados farmacocinéticos exemplificativos de níveis séricos de vários analitos ao longo do tempo após a administração de um conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável em sujeitos humanos.

[0041] **As FIGS. 10A-10D** mostram resultados exemplificativos das melhores mudanças nas medições de lesão tumoral a partir da linha de base em sujeitos humanos após a administração de conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável da presente divulgação.

[0042] **As FIGS. 11A-11C** mostram resultados exemplificativos das melhores mudanças nas medições de lesão tumoral a partir da linha de base em sujeitos humanos com câncer de mama após a administração de conjugado fármaco do anticorpo anti-CD166 ativável da presente divulgação.

[0043] **As FIGS. 12A e 12B** mostram resultados exemplificativos

das melhores mudanças nas medições de lesão tumoral a partir da linha de base em sujeitos humanos após a administração de conjugado fármaco de anticorpo anti-CD166 ativável da presente divulgação como categorizado em seu nível de expressão de CD166 nos tumores dos pacientes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0044] A presente invenção fornece anticorpos monoclonais ativáveis que se ligam especificamente ao CD166, também conhecidos como molécula de adesão celular de leucócitos ativada (ALCAM). Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais ativáveis são internalizados por células contendo CD166. CD166 é uma molécula de adesão celular que se liga ao CD6, um receptor da superfície celular que pertence à superfamília proteica rica em cisteína (SRCRSF) do receptor tipo scavenger (SRCR). Sabe-se que o CD166 está associado a interações célula-célula e célula-matriz, adesão celular, migração celular e ativação e proliferação de células T. A expressão aberrante e/ou atividade de sinalização relacionada a CD166 e CD166 tem sido implicada na patogênese de muitas doenças e distúrbios, tais como câncer, inflamação, e auto-imunidade. Por exemplo, CD166 é altamente expresso em uma variedade de tipos de câncer, como, por exemplo, câncer de próstata, câncer de mama, câncer pulmonar como NSCLC e/ou SCLC, câncer de orofaringe, câncer de colo do útero e câncer de cabeça e pescoço como HNSCC.

[0045] A divulgação fornece anticorpos anti-CD166 ativáveis que são úteis em métodos de tratamento, prevenção, retardo na progressão, melhoria e/ou alívio de um sintoma de uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou atividade aberrante de CD166. Por exemplo, os anticorpos anti-CD166 ativáveis são utilizados em métodos de tratamento, prevenção, retardo na progressão, melhoria e/ou alívio de um sintoma de um câncer ou outra condição neoplásica.

[0046] A divulgação fornece anticorpos anti-CD166 ativáveis que

são úteis em métodos de tratamento, prevenção, retardo na progressão, melhoria e/ou alívio de um sintoma de uma doença ou distúrbio associado a células que expressam CD166. Em algumas modalidades, as células estão associadas à expressão e/ou atividade aberrante de CD166. Em algumas modalidades, as células estão associadas à expressão e/ou atividade normal de CD166. Por exemplo, os anticorpos anti-CD166 ativáveis são utilizados em métodos de tratamento, prevenção, retardo na progressão, melhoria e/ou alívio de um sintoma de um câncer ou outra condição neoplásica.

[0047] A divulgação fornece anticorpos anti-CD166 ativáveis que são úteis em métodos de tratamento, prevenção, retardo na progressão, melhoria e/ou alívio de um sintoma de uma doença ou distúrbio em que as células doentes expressam CD166. Em algumas modalidades, as células doentes estão associadas à expressão e/ou atividade aberrante de CD166. Em algumas modalidades, as células doentes estão associadas à expressão e/ou atividade normais de CD166. Por exemplo, os anticorpos anti-CD166 ativáveis são utilizados em métodos de tratamento, prevenção, retardo na progressão, melhoria e/ou alívio de um sintoma de um câncer ou outra condição neoplásica.

[0048] Os anticorpos anti-CD166 ativáveis incluem um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD166 acoplado a uma fração de mascaramento (MM), de modo que o acoplamento da MM reduz a capacidade do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno de se ligar ao CD166. A MM é acoplada ao anticorpo/fragmento de ligação ao antígeno por meio de uma sequência que inclui um substrato para uma protease (fração clivável, CM), por exemplo, uma protease que é co-localizada com CD166 no local de tratamento em um sujeito.

Definições

[0049] A menos que definido de outra forma, os termos técnicos e científicos utilizados em conexão com a presente divulgação devem ter os significados que são comumente entendidos por aqueles de conhecimento

comum na técnica. O termo "uma" entidade refere-se a uma ou mais dessa entidade. Por exemplo, um composto refere-se a um ou mais compostos. Como tal, os termos "um", "uma", "um ou mais" e "pelo menos um" podem ser usados de forma intercambiável. Adicionalmente, a menos que seja exigido o contrário pelo contexto, os termos no singular devem incluir as pluralidades e os termos no plural devem incluir o singular. Geralmente, as nomenclaturas utilizadas em conexão a, e técnicas de, cultura de tecidos e células, biologia molecular e química de proteína e oligo- ou polinucleotídeo e hibridização descritas neste documento são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão são usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeo, e cultura e transformação de tecidos (*por exemplo*, eletroporação, lipofecção). Reações enzimáticas e técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou conforme comumente se realiza na técnica ou conforme descrito neste documento. As técnicas e os procedimentos precedentes geralmente são realizados de acordo com métodos convencionais conhecidos na técnica e conforme descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas ao longo do presente relatório descritivo. *Ver , por exemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).* As nomenclaturas utilizadas em conexão com, e os procedimentos laboratoriais e técnicas de, química analítica, química orgânica sintética, e químicas farmacêutica e medicinal descritas neste documento são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão são utilizadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, e distribuição e tratamento de sujeitos.

[0050] Conforme utilizado de acordo com a presente divulgação, os termos a seguir, salvo indicação em contrário, devem ser entendidos como tendo os seguintes significados:

[0051] Conforme usado neste documento, o termo "anticorpo" refere-se a moléculas de imunoglobulina e porções de moléculas de imunoglobulina (Ig) imunologicamente ativas, por exemplo, de ligação ao antígeno, *ou seja*, moléculas que contêm um sítio de ligação ao antígeno que se liga especificamente (imunorreage com) um antígeno. Por "ligar especificamente" ou "imunorreage com" "se liga imuno-especificamente" entende-se que o anticorpo reage com um ou mais determinantes antigênicos do antígeno desejado e não reage com outros polipeptídeos ou se liga a uma afinidade muito inferior ($K_d > 10^{-6}$). Os anticorpos incluem, mas não estão limitados a anticorpos policlonais, monoclonais, quiméricos, anticorpo de domínio, cadeia única, fragmentos de Fab e F(ab')₂, scFvs e uma biblioteca de expressão Fab.

[0052] Sabe-se que unidade estrutural básica do anticorpo compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto por dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis pelo reconhecimento de antígeno. A porção carboxi-terminal de cada cadeia estabelece uma região constante principalmente responsável pela função efetora. Em geral, as moléculas de anticorpo obtidas de humanos referem-se a qualquer uma das classes IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que diferem umas das outras pela natureza da cadeia pesada presente na molécula. Certas classes também têm subclasses, tal como IgG₁, IgG₂ e outras. Além disso, em humanos, a cadeia leve pode ser uma cadeia kappa ou uma cadeia lambda.

[0053] O termo "anticorpo monoclonal" (mAb) ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme usado neste documento, refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie molecular de molécula de anticorpo que consiste em um produto de gene de

cadeia leve único e um produto de gene de cadeia pesada único. Em particular, as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal são idênticas em todas as moléculas da população. Os MAbs contêm um sítio de ligação ao antígeno capaz de imunorreagir com um epítopo particular do antígeno, caracterizado por uma afinidade de ligação única para ele.

[0054] O termo "sítio de ligação ao antígeno" ou "porção de ligação" refere-se à parte da molécula de imunoglobulina que participa da ligação ao antígeno. O sítio de ligação ao antígeno é formado por resíduos de aminoácidos das regiões variáveis N-terminal ("V") das cadeias pesadas ("H") e leves ("L"). Três trechos altamente divergentes dentro das regiões V das cadeias pesadas e leves, denominados "regiões hipervariáveis", são interpostos entre os trechos flanqueadores mais conservados, conhecidos como "regiões framework" ou "FRs". Assim, o termo "FR" se refere a sequências de aminoácidos que são encontradas naturalmente entre e adjacentes a regiões hipervariáveis em imunoglobulinas. Em uma molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada são dispostas relativas entre si no espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação ao antígeno. A superfície de ligação ao antígeno é complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado e as três regiões hipervariáveis de cada uma dentre as cadeias pesada e leve são referidas como "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs". A atribuição de aminoácidos para cada domínio está em conformidade com as definições de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), ou Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

[0055] Conforme usado neste documento, o termo "epítopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma

imunoglobulina, um scFv ou um receptor de células T. O termo "epítopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou um receptor de células T. Determinantes epitópicos geralmente consistem em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Por exemplo, os anticorpos podem ser produzidos contra peptídeos N-terminais ou C-terminais de um polipeptídeo. Diz-se que um anticorpo se liga especificamente a um antígeno quando a constante de dissociação é $\leq 1 \mu\text{M}$; em algumas modalidades, $\leq 100 \text{ nM}$ e em algumas modalidades, $\leq 10 \text{ nM}$.

[0056] Tal como usado neste documento, os termos "ligação específica", "ligação imunológica" e "propriedades de ligação imunológica" dizem respeito às interações não covalentes do tipo que ocorrem entre uma molécula de imunoglobulina e um antígeno para o qual a imunoglobulina é específica. A força ou a afinidade das interações de ligação imunológica podem ser expressadas em termos da constante de dissociação da interação (K_d), em que um K_d menor representa uma maior afinidade. As propriedades de ligação imunológica de polipeptídeos selecionados podem ser quantificadas usando métodos bem conhecidos na técnica. Um desses métodos implica medir as taxas de formação e dissociação do complexo de antígeno/sítio de ligação ao antígeno, em que essas taxas dependem das concentrações dos parceiros complexos, da afinidade da interação e dos parâmetros geométricos que influenciam igualmente a taxa em ambas as direções. Assim, tanto a "taxa constante de associação" (K_{on}) e a "taxa constante de dissociação" (K_{off}) podem ser determinadas por meio do cálculo das concentrações e das taxas reais de associação e dissociação. (*Vide* Nature 361:186-87 (1993)). A razão de K_{off}/K_{on} permite cancelar todos os parâmetros não relacionados à afinidade e é igual à constante de dissociação K_d . (*Vide, em geral*, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Diz-se que um anticorpo da presente

divulgação se liga especificamente ao alvo, quando a constante de ligação (K_d) é $\leq 1 \mu\text{M}$, em algumas modalidades $\leq 100 \text{ nM}$, em algumas modalidades $\leq 10 \text{ nM}$ e em algumas modalidades $\leq 100 \text{ pM}$ a cerca de 1 pM , como medido por ensaios, tais como ensaios de ligação de radioligando ou ensaios semelhantes conhecidos pelos especialistas na técnica.

[0057] O termo "polinucleotídeo isolado", conforme usado neste documento, significará um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA ou sintética ou alguma combinação dos mesmos, que em virtude de sua origem o "polinucleotídeo isolado" (1) não está associado com todo ou uma porção de um polinucleotídeo em que o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza, (2) está operativamente conectado a um polinucleotídeo ao qual não está conectado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior. Os polinucleotídeos de acordo com a divulgação incluem as moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de imunoglobulina da cadeia pesada mostradas neste documento e as moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de imunoglobulina da cadeia leve mostradas neste documento.

[0058] O termo "proteína isolada" referido neste documento significa uma proteína de cDNA, RNA recombinante ou origem sintética ou alguma combinação dos mesmos que, em virtude de sua origem, ou fonte de derivação, a "proteína isolada" (1) não está associada a proteínas encontradas na natureza, (2) é livre de outras proteínas da mesma fonte, *por exemplo*, livre de proteínas murinas, (3) é expressa por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza.

[0059] O termo "polipeptídeo" é usado neste documento como um termo genérico para se referir à proteína nativa, fragmentos ou análogos de uma sequência polipeptídica. Portanto, fragmentos de proteínas nativas e análogos são espécies do gênero polipeptídeo. Os polipeptídeos de acordo com a divulgação compreendem as moléculas de imunoglobulina da cadeia

pesada mostradas neste documento e as moléculas de imunoglobulina da cadeia leve mostradas neste documento, bem como moléculas de anticorpo formadas por combinações compreendendo as moléculas de imunoglobulina da cadeia pesada com moléculas de imunoglobulina da cadeia leve, como moléculas de imunoglobulina da cadeia leve kappa e vice-versa, bem como fragmentos e análogos das mesmas.

[0060] O termo "ocorrência natural" conforme usado neste documento conforme aplicado a um objeto refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que está presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem em laboratório ou de outra forma, ocorre naturalmente.

[0061] O termo "operacionalmente ligado", conforme usado neste documento, refere-se às posições de componentes assim descritos em uma relação que permite que eles funcionem da maneira pretendida. Uma sequência de controle "operativamente ligada" a uma sequência de codificação é ligada de tal modo que a expressão da sequência de codificação seja alcançada em condições compatíveis com as sequências de controle.

[0062] O termo "sequência de controle", conforme usado neste documento, refere-se a sequências polinucleotídicas que são necessárias para afetar a expressão e o processamento das sequências de codificação às quais estão ligadas. A natureza de tais sequências de controle difere dependendo do organismo hospedeiro em procariontes, tais sequências de controle geralmente incluem promotor, sítio de ligação ribossômica e sequência de terminação da transcrição em eucariontes, geralmente, tais sequências de controle incluem promotores e sequência de terminação da transcrição. O termo "sequências de controle" se destina a incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para a expressão e processamento, e também pode incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências

líderes e sequências parceiras de fusão. O termo "polinucleotídeo", conforme referido neste documento, significa nucleotídeos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleotídeos ou desoxinucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. O termo inclui formas de DNA de fita simples e dupla.

[0063] O termo oligonucleotídeo referido neste documento inclui nucleotídeos de ocorrência natural e modificados ligados entre si por ligações de oligonucleotídeos de ocorrência natural e não natural. Os oligonucleotídeos são um subconjunto de polinucleotídeos geralmente compreendendo um comprimento de 200 bases ou menos. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos têm 10 a 60 bases de comprimento e em algumas modalidades, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 a 40 bases de comprimento. Oligonucleotídeos são geralmente de fita única, *por exemplo*, para sondas; embora oligonucleotídeos possam ser de fita dupla, *por exemplo*, para uso na construção de um mutante de gene. Os oligonucleotídeos da divulgação são oligonucleotídeos sense ou antisense.

[0064] O termo "nucleotídeos de ocorrência natural" referido neste documento inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" referido neste documento inclui nucleotídeos com grupos de açúcar modificados ou substituídos e semelhantes. O termo "ligações oligonucleotídicas" referido neste documento inclui uniões oligonucleotídicas, tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosseleroato, fosforodisseleroato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforamidato e semelhantes. *Vide*, *por exemplo*, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.* Patente U.S. nº 5.151.510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543

(1990). Um oligonucleotídeo pode incluir um marcador para detecção, se desejado.

[0065] Como usado neste documento, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviaturas seguem o uso convencional. *Vide Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Estereoisômeros (*por exemplo*, aminoácidos D) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais como aminoácidos α -, aminoácidos α -disubstituídos, aminoácidos N-alquil, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais também podem ser componentes adequados para polipeptídeos da presente divulgação. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N, N, N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxilisina, σ N-metilarginina e outros aminoácidos semelhantes e iminoácidos (*por exemplo*, 4-hidroxiprolina). Na notação polipeptídica usada neste documento, a direção do lado esquerdo é a direção amino terminal e a direção do lado direito é a direção carboxi terminal, de acordo com o uso e convenção padrão.

[0066] Da mesma forma, a menos que especificado de outra forma, a extremidade esquerda de sequências polinucleotídicas de cadeia única é a extremidade 5' à direção esquerda de sequências polinucleotídicas de cadeia dupla é referida como a direção 5'. A direção da adição de 5' a 3' de transcritos de RNA nascentes é referida como as "regiões da sequência direção da transcrição"; na fita de DNA que possui a mesma sequência como o RNA que estão na extremidade 5' a 5' do transcrito de RNA são referidas como "sequências a montante", as regiões da sequência na fita de DNA que possui a mesma sequência que o RNA que estão na extremidade 3' a 3' do transcrito de RNA são referidos como "sequências a jusante".

[0067] Conforme aplicado aos polipeptídeos, o termo "identidade substancial" significa que duas sequências de peptídeos, quando idealmente

alinhas, como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna padrão, compartilham pelo menos 80 por cento de identidade de sequência, em algumas modalidades, pelo menos 90 por cento identidade de sequência, em algumas modalidades, pelo menos 95 por cento de identidade de sequência e, em algumas modalidades, pelo menos 99 por cento de identidade de sequência.

[0068] Em algumas modalidades, as posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservativas.

[0069] Conforme discutido neste documento, pequenas variações nas sequências de aminoácidos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina são contempladas como sendo abrangidas pela presente divulgação, desde que as variações na sequência de aminoácidos mantenham pelo menos 75%, em algumas modalidades, pelo menos 80%, 90%, 95% e em algumas modalidades, 99%. Em particular, as substituições conservativas de aminoácidos são contempladas. As substituições conservativas são aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Os aminoácidos codificados geneticamente são geralmente divididos em famílias: (1) os aminoácidos ácidos são aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos são lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos não polares são alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano e (4) aminoácidos polares não carregados são glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Os aminoácidos hidrofílicos incluem arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina e treonina. Os aminoácidos hidrofóbicos incluem alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina e valina. Outras famílias de aminoácidos incluem (i) serina e treonina, que são a família hidroxil alifática; (ii) asparagina e glutamina, que são a família contendo amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que são a família alifática; e (iv) fenilalanina, triptofano e tirosina, que são a família dos

aromáticos. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina ou uma substituição semelhante de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado não terá um efeito principal na ligação ou nas propriedades da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolver um aminoácido dentro de um sítio framework. Se uma mudança de aminoácido resultará em um peptídeo funcional pode ser facilmente determinado pelo ensaio da atividade específica do derivado polipeptídico. Os ensaios são descritos em detalhes neste documento. Fragmentos ou análogos de moléculas de imunoglobulinas ou anticorpos podem ser facilmente preparados por aqueles versados na técnica. Terminais amino e carbóxi adequados de fragmentos ou análogos ocorrem perto dos domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de sequência de nucleotídeos e/ou aminoácidos com bancos de dados de sequência públicos ou proprietários. Em algumas modalidades, métodos de comparação computadorizados são usados para identificar motivos de sequência ou domínios de conformação de proteína previstos que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecida. Métodos para identificar sequências de proteínas que se dobram em uma estrutura tridimensional conhecida são conhecidos. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Assim, os exemplos anteriores demonstram que aqueles versados na técnica podem reconhecer motivos de sequência e conformações estruturais que podem ser usados para definir domínios estruturais e funcionais de acordo com a divulgação.

[0070] As substituições de aminoácidos adequadas são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos de proteínas, (4) alteram as afinidades de ligação e (5) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos. Os análogos podem incluir várias muteínas de uma sequência diferente da

sequência peptídica de ocorrência natural. Por exemplo, substituições de aminoácidos única ou múltiplas (por exemplo, substituições de aminoácidos conservativas) podem ser feitas na sequência que ocorre naturalmente (por exemplo, na porção do polipeptídeo fora do(s) domínio(s) formando contatos intermoleculares. Uma substituição de aminoácido conservativa não deve alterar substancialmente as características estruturais da sequência parental (*por exemplo*, um aminoácido substituinte deve não tender a quebrar uma hélice que ocorre na sequência de origem, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracterizam a sequência parental). Exemplos de estruturas polipeptídicas secundárias e terciárias reconhecidas na técnica são descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

[0071] O termo "fragmento de polipeptídeo", conforme usado neste documento, refere-se a um polipeptídeo que tem uma deleção amino terminal e/ou carboxi terminal e/ou uma ou mais deleções internas, mas onde a sequência de aminoácidos remanescente é idêntica às posições correspondentes na sequência de ocorrência natural deduzida, por exemplo, de uma sequência de cDNA de comprimento total. Os fragmentos normalmente têm pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento, em algumas modalidades, pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, em algumas modalidades, pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, geralmente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento e, em algumas modalidades, pelo menos 70 aminoácidos de comprimento. O termo "análogo", conforme usado neste documento, refere-se a polipeptídeos que são compostos por um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que tem identidade substancial com uma porção de uma sequência de aminoácidos deduzida e que tem ligação específica ao alvo, sob condições de ligação adequadas. Tipicamente, os análogos polipeptídicos compreendem uma substituição conservativa de

aminoácidos (ou adição ou deleção) em relação à sequência de ocorrência natural. Os análogos normalmente têm pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, em algumas modalidades, pelo menos 50 aminoácidos de comprimento ou mais e, muitas vezes, podem ser tão longos quanto um polipeptídeo de ocorrência natural de comprimento total.

[0072] O termo "agente" é usado neste documento para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica, ou um extrato feito a partir de materiais biológicos.

[0073] Tal como usado neste documento, os termos "marcador" ou "marcado" referem-se à incorporação de um marcador detectável, *por exemplo*, por incorporação de um aminoácido radiomarcado ou ligação a um polipeptídeo de porções de biotinil que podem ser detectadas por avidina marcada (*por exemplo*, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos óticos ou calorimétricos). Em certas situações, o marcador ou indicador também pode ser terapêutico. Vários métodos de marcação de polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, mas não estão limitados aos seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (*por exemplo*, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (*por exemplo*, FITC, rodamina, fósforos de lantanídeos), marcadores enzimáticos (*por exemplo*, peroxidase de rábano, p-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), quimioluminescentes, grupos biotinil, epítomos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por meio de um repórter secundário (*por exemplo*, sequências de par de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, tags de epítopo). Em algumas modalidades, os marcadores são ligados por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial. O termo "agente farmacêutico ou fármaco" conforme usado neste documento refere-se a um composto químico ou composição capaz de

induzir um efeito terapêutico desejado quando corretamente administrado a um sujeito.

[0074] Outros termos químicos neste documento são usados de acordo com o uso convencional na técnica, como exemplificado por The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[0075] Como usado neste documento, "substancialmente pura" significa que uma espécie de objeto é a espécie predominante presente (*ou seja*, numa base molar é mais abundante do que qualquer outra espécie individual na composição) e, em algumas modalidades, uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie de objeto compreende pelo menos cerca de 50 por cento (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes.

[0076] Geralmente, uma composição substancialmente pura compreenderá mais do que cerca de 80 por cento de todas as espécies macromoleculares presentes na composição, em algumas modalidades, mais do que cerca de 85%, 90%, 95% e 99%. Em algumas modalidades, a espécie de objeto é purificada até a homogeneidade essencial (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais) em que a composição consiste essencialmente de uma única espécie macromolecular.

[0077] O termo sujeito humano e sujeitos veterinários.

Anticorpos ativáveis (AAs)

[0078] A divulgação fornece AAs que incluem um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a CD166 (AB) de mamífero.

[0079] Em algumas modalidades, o CD166 de mamífero é selecionado do grupo que consiste em um CD166 humano e um CD166 de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, o AB se liga especificamente ao

CD166 humano ou ao CD166 de macaco cinomolgo com uma constante de dissociação de menos do que 1 nM. Em algumas modalidades, o CD166 de mamífero é um CD166 humano. Em algumas modalidades, o CD166 de mamífero é um CD166 de cinomolgo. Em algumas modalidades, o AB tem uma ou mais das seguintes características: (a) o AB se liga especificamente ao CD166 humano; e (b) o AB se liga especificamente ao CD166 humano e ao CD166 de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, o AB tem uma ou mais das seguintes características: (a) o AB liga especificamente CD166 humano e CD166 de macaco cinomolgo; (b) o AB inibe a ligação de CD6 de mamífero a CD166 de mamífero; (c) o AB inibe a ligação de CD6 humano ao CD166 humano; e (d) o AB inibe a ligação de CD6 de macaco cinomolgo ao CD166 de macaco cinomolgo.

[0080] Em algumas modalidades, o AB bloqueia a capacidade de um ligante ou receptor natural de se ligar ao CD166 de mamífero com um EC50 de menos ou igual a 5 nM, de menos ou igual a 10 nM, de menos ou igual a 50 nM, de menos ou igual a 100 nM, de menos ou igual a 500 nM e/ou de menos ou igual a 1000 nM. Em algumas modalidades, o AB bloqueia a capacidade do CD6 de mamífero de se ligar ao CD166 de mamífero com um EC50 de menos ou igual a 5 nM, de menos ou igual a 10 nM, de menos ou igual a 50 nM, de menos ou igual a 100 nM, de menos ou igual a 500 nM e/ou de menos ou igual a 1000 nM. Em algumas modalidades, o ligante ou receptor natural de CD166 é CD6.

[0081] Em algumas modalidades, o AB bloqueia a capacidade de um ligante natural de se ligar ao CD166 de mamífero com um EC50 de 5 nM a 1000 nM, 5 nM a 500 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 50 nM, 5 nM a 10 nM, 10 nM a 1000 nM, 10 nM a 500 nM, 10 nM a 100 nM, 10 nM a 50 nM, 50 nM a 1000 nM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 nM a 1000 nM, 100 nM a 500 nM, 150 nM a 400 nM, 200 nM a 300 nM, 500 nM a 1000 nM. Em algumas modalidades, o AB bloqueia a capacidade do CD6 de mamífero de se ligar ao

CD166 de mamífero com um EC50 de 5 nM a 1000 nM, 5 nM a 500 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 50 nM, 5 nM a 10 nM, 10 nM a 1000 nM, 10 nM a 500 nM, 10 nM a 100 nM, 10 nM a 50 nM, 15 nM a 75 nM, 30 nM a 80 nM, 40 nM a 150 nM, 50 nM a 1000 nM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 100 nM, 100 nM a 1000 nM, 100 nM a 500 nM, 150 nM a 400 nM, 200 nM a 300 nM, 500 nM a 1000 nM. Em algumas modalidades, o ligante ou receptor natural de CD166 é CD6.

[0082] Em algumas modalidades, o AB da presente divulgação inibe ou reduz o crescimento, proliferação e/ou metástase de células que expressam CD166 de mamíferos. Sem pretender estar vinculado a qualquer teoria, o AB da presente divulgação pode inibir ou reduzir o crescimento, proliferação e/ou metástase de células que expressam CD166 de mamíferos, ligando-se especificamente ao CD166 e inibindo, bloqueando e/ou impedindo a ligação de um ligante ou receptor natural do CD166 de mamífero. Em algumas modalidades, o ligante ou receptor natural de CD166 de mamífero é CD6 de mamífero.

[0083] O anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo do AA é acoplado a uma fração de mascaramento (MM), de modo que o acoplamento do MM reduz a capacidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de se ligar a CD166. Em algumas modalidades, o MM é acoplado por meio de uma sequência que inclui um substrato para uma protease, por exemplo, uma protease que é ativa em tecido doente e/ou uma protease que é co-localizada com CD166 no local de tratamento de um sujeito. Os anticorpos anti-CD166 ativáveis fornecidos neste documento, também referidos neste documento de forma intercambiável como anticorpos ativáveis AA anti-CD166 ou CD166, são estáveis em circulação, ativados nos locais pretendidos de terapia e/ou diagnóstico, mas não em, *por exemplo*, tecido saudável ou outro tecido não visado para tratamento e/ou diagnóstico e, quando ativado, exibe ligação a CD166 que é pelo menos comparável ao anticorpo não modificado correspondente, também referido neste documento

como anticorpo parental.

[0084] A divulgação fornece anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno (AB) do mesmo que se ligam especificamente ao CD166 de mamífero, para uso nos AAs. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao CD166. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga ao CD166 é um anticorpo monoclonal, anticorpo de domínio, cadeia única, fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um scFv, um scAb, um dAb, um anticorpo de cadeia pesada de domínio único ou um anticorpo de cadeia leve de domínio único. Em algumas modalidades, esse anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga ao CD166 é um anticorpo de camundongo, outro roedor, quimérico, humanizado ou monoclonal totalmente humano.

[0085] Por conseguinte, são fornecidos neste documento anticorpos ativáveis (AAs) que compreendem: (1) um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, e uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease,

[0086] Os anticorpos nos AAs da divulgação (os ABs) se ligam especificamente a um alvo CD166, como, por exemplo, CD166 de mamífero e/ou CD166 humano.

[0087] Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 100 nM ou menos para ligação ao CD166 de mamífero. Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 10 nM ou menos para ligação ao CD166 de mamífero. Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 5 nM ou menos para ligação ao CD166. Em algumas modalidades, o AB tem

uma constante de dissociação de cerca de 1 nM ou menos para ligação ao CD166. Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 0,5 nM ou menos para ligação ao CD166. Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 0,1 nM ou menos para ligação ao CD166. Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de 0,01 nM a 100 nM, 0,01 nM a 10 nM, 0,01 nM a 5 nM, 0,01 nM a 1 nM, 0,01 a 0,5 nM, 0,01 nm a 0,1 nM, 0,01 nm a 0,05 nM, 0,05 nM a 100 nM, 0,05 nM a 10 nM, 0,05 nM a 5 nM, 0,05 nM a 1 nM, 0,05 a 0,5 nM, 0,05 nm a 0,1 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 nM a 10 nM, 0,1 nM a 5 nM, 0,1 nM a 1 nM, 0,1 a 0,5 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 nM a 10 nM, 0,5 nM a 5 nM, 0,5 nM a 1 nM, 1 nM a 100 nM, 1 nM a 10 nM, 1 nM a 5 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 10 nM ou 10 nM a 100 nM, para ligação ao CD166 de mamífero.

[0088] Em algumas modalidades, o AA em um estado não clivado se liga especificamente ao CD166 de mamífero com uma constante de dissociação menor ou igual a 1 nM, menor ou igual a 5 nM, menor ou igual a 10 nM, menor ou igual a 15 nM, menor ou igual a 20 nM, menor ou igual a 25 nM, menor ou igual a 50 nM, menor ou igual a 100 nM, menor ou igual a 150 nM, menor ou igual a 250 nM, menor igual ou igual a 500 nM, menor ou igual a 750 nM, menor ou igual a 1000 nM e 122./ou menor ou igual a 2000 nM.

[0089] Em algumas modalidades, o AA em um estado não clivado se liga especificamente ao CD166 de mamífero com uma constante de dissociação maior ou igual a 1 nM, maior ou igual a 5 nM, maior ou igual a 10 nM, maior ou igual a 15 nM, maior ou igual a 20 nM, maior ou igual a 25 nM, maior ou igual a 50 nM, maior ou igual a 100 nM, maior ou igual a 150 nM, maior ou igual a 250 nM, maior igual ou igual a 500 nM, maior ou igual a 750 nM, maior ou igual a 1000 nM e 122./ou maior ou igual a 2000 nM.

[0090] Em algumas modalidades, o AA em um estado não clivado se liga especificamente ao CD166 de mamífero com uma constante de dissociação na faixa de 1 nM a 2000 nM, 1 nM a 1000 nM, 1 nM a 750 nM, 1

nM a 500 nM, 1 nM para 250 nM, 1 nM a 150 nM, 1 nM a 100 nM, 1 nM a 50 nM, 1 nM a 25 nM, 1 nM a 15 nM, 1 nM a 10 nM, 1 nM a 5 nM, 5 nM a 2000 nM, 5 nM a 1000 nM, 5 nM a 750 nM, 5 nM a 500 nM, 5 nM a 250 nM, 5 nM a 150 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 50 nM, 5 nM a 25 nM, 5 nM a 15 nM, 5 nM a 10 nM, 10 nM a 2000 nM, 10 nM a 1000 nM, 10 nM a 750 nM, 10 nM a 500 nM, 10 nM a 250 nM, 10 nM a 150 nM, 10 nM para 100 nM, 10 nM a 50 nM, 10 nM a 25 nM, 10 nM a 15 nM, 15 nM a 2000 nM, 15 nM a 1000 nM, 15 nM a 750 nM, 15 nM a 500 nM, 15 nM a 250 nM, 15 nM a 150 nM, 15 nM a 100 nM, 15 nM a 50 nM, 15 nM a 25 nM, 25 nM a 2000 nM, 25 nM a 1000 nM, 25 nM a 750 nM, 25 nM a 500 nM, 25 nM a 250 nM, 25 nM a 150 nM, 25 nM a 100 nM, 25 nM a 50 nM, 50 nM a 2000 nM, 50 nM a 1000 nM, 50 nM a 750 nM, 50 nM a 500 nM, 50 nM a 250 nM, 50 nM a 150 nM, 50 nM a 100 nM, 100 nM a 2000 nM, 100 nM a 1000 nM, 100 nM a 750 nM, 100 nM a 500 nM, 100 nM a 250 nM, 100 nM a 150 nM, 150 nM a 2000 nM, 150 nM a 1000 nM, 150 nM a 750 nM, 150 nM a 500 nM, 150 nM a 250 nM, 250 nM a 2000 nM, 250 nM a 1000 nM, 250 nM a 750 nM, 250 nM a 500 nM, 500 nM a 2000 nM, 500 nM a 1000 nM, 500 nM a 750 nM, 500 nM a 500 nM, 500 nM a 250 nM, 500 nM a 150 nM, 500 nM a 100 nM, 500 nM a 50 nM, 750 nM a 2000 nM, 750 nM a 1000 nM ou 1000 nM a 2000 nM.

[0091] Em algumas modalidades, o AA em um estado ativado se liga especificamente ao CD166 de mamífero com uma constante de dissociação que é menor ou igual a 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM ou 10 nM.

[0092] Em algumas modalidades, o AA em um estado ativado se liga especificamente ao CD166 de mamífero com uma constante de dissociação que é maior ou igual a 0,01 nM, 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 5 nM ou 10 nM.

[0093] Em algumas modalidades, o AA em um estado ativado se liga especificamente ao CD166 de mamífero com uma constante de

dissociação na faixa de 0,01 nM a 100 nM, 0,01 nM a 10 nM, 0,01 nM a 5 nM, 0,01 nM a 1 nM, 0,01 a 0,5 nM, 0,01 nm a 0,1 nM, 0,01 nm a 0,05 nM, 0,05 nM a 100 nM, 0,05 nM a 10 nM, 0,05 nM a 5 nM, 0,05 nM a 1 nM, 0,05 a 0,5 nM, 0,05 nm a 0,1 nM, 0,1 nM a 100 nM, 0,1 nM a 10 nM, 0,1 nM a 5 nM, 0,1 nM a 1 nM, 0,1 a 0,5 nM, 0,5 nM a 100 nM, 0,5 nM a 10 nM, 0,5 nM a 5 nM, 0,5 nM a 1 nM, 1 nM a 100 nM, 1 nM a 10 nM, 1 nM a 5 nM, 5 nM a 100 nM, 5 nM a 10 nM ou 10 nM a 100 nM.

[0094] Os anticorpos anti-CD166 ativáveis exemplificativos da invenção incluem, por exemplo, anticorpos ativáveis (AAs) que incluem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que compreendem, que são ou são derivadas das sequências de aminoácidos variáveis de cadeia pesada e cadeia leve mostradas abaixo:

Cadeia Pesada de α CD166 humano

HuCD166_HcC

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLNI
 WWSEDKHYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTTITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDY
 AFTYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 239)

Cadeia Pesada de α CD166 humano**HuCD166_HcC Des-HC**

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLNI
 WWSEDKHYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTTITNVDPVDTATYYCVQIDYGNDY
 AFTYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
 SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 480)

Domínio VL de Cadeia Leve α CD166 Humana**HuCD166_Lc1**

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIY
 QMSNLAGVPPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQG
 TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 240)

[0095] Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é maior que a do anticorpo correspondente; por exemplo, a pK do AA é maior que a do anticorpo correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é semelhante à do anticorpo correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 15 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 12 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 11 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do

AA é de pelo menos 10 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 9 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 8 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 7 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 6 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 5 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 4 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 3 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 2 dias quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 24 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 20 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 18 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 16 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 14 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 12 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 10 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 8 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 6 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 4 horas quando administrada a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do AA é de pelo menos 3 horas quando administrada a um organismo.

Anticorpos Ativáveis Exemplificativos

[0096] Em modalidades exemplificativas, os AAs da divulgação compreendem qualquer uma ou mais das seguintes sequências:

SEQ ID NO: 239

Cadeia pesada α CD166 humana (HuCD166_HcC) - Sequência de aminoácidos

(fornecido acima)

SEQ ID NO: 480

Cadeia Pesada α CD166 humana (HuCD166_HcC) - Sequência de aminoácidos Des-HC

(fornecido acima)

SEQ ID NO: 240

Domínio VL de Cadeia Leve α CD166 Humana

HuCD166_Lcl

(fornecido acima)

Sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 246

Cadeia Leve α CD166 humana (espaçador-MM-LP1-CM-LP2-Ab)

[espaçador (SEQ ID NO: 305)] [huCD166Lcl_7614.6_3001 (SEQ ID NO: 314)]

[QGQSGQG]

[LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAGVLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVMTQ
SPLSLP

VTPGEPASISCRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDP
RFSGSGSGTDFTLK

ISRVEAEDVG VYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

TASVVCLLNNFYF
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC]

Sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 314

Cadeia Leve aCD166 humana (MM-LP1-CM-LP2-Ab)

huCD166Lcl_7614.6_3001

LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSAGVLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQS
PLSLP
VTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVDP
RFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYF
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

Sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 305

Espaçador

QGQSGQG

SEQ ID NO: 222

Fração de Mascaramento 7614.6

LCHPAVLSAWESCSS

SEQ ID NO: 76

Fração Clivável 3001

AVGLLAPPGGLSGRSDNH

SEQ ID NO: 479

Peptídeo de ligação 1 (LP1)

GGGSSGGS

Peptídeo de ligação 2 (LP2)

GGG

[0097] Em uma modalidade exemplificativa, o AA compreende: **(a)** um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480 e um cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 240; **(b)** uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 222; e **(c)** uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 76.

[0098] Em uma modalidade exemplificativa, o AA compreende: **(a)** um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480 e um cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 246 e é conjugada ao DM4 via ligante spdb (este exemplo de AA

conjugado é referido neste documento como "espaçador-7614.6-3001-HcCD166-SPDB-DM4"), também referido como "Combinação 55". A toxina ligante SPDB-DM4 também é conhecida como N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato-N2'-desacetil-N2'-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina.

[0099] Em outra modalidade exemplificativa, o AA compreende: (a) anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480 e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 314 e é conjugada adicionalmente ao DM4 via ligante spdb deste AA conjugado exemplificativo é referido neste documento como "7614.6-3001-HcCD166-SPDB-DM4", também referido como "Combinação 60").

Frações de Mascaramento (MM)

[00100] Os anticorpos anti-CD166 ativáveis descritos neste documento superam uma limitação da terapêutica de anticorpos, particularmente terapêuticas de anticorpos que são conhecidas por serem tóxicas, pelo menos em algum grau, *in vivo*. A toxicidade mediada por alvo constitui uma grande limitação para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos. Os anticorpos anti-CD166 ativáveis fornecidos neste documento são projetados para visar a toxicidade associada à inibição do alvo em tecidos normais por anticorpos terapêuticos tradicionais. Estes anticorpos anti-CD166 ativáveis permanecem mascarados até ativados proteoliticamente no sítio da doença. Começando com um anticorpo anti-CD166 como um anticorpo terapêutico parental, os anticorpos ativáveis anti-CD166 da invenção foram manipulados acoplando o anticorpo a uma máscara inibidora (fração mascaradora, MM) através de um ligador que incorpora um substrato de protease (CM).

[00101] Por conseguinte, os anticorpos anti-CD166 ativáveis

fornecidos neste documento incluem uma fração de mascaramento (MM). Em algumas modalidades, a MM é uma sequência de aminoácidos que é acoplada ou de outra forma conectada ao anticorpo anti-CD166 e é posicionada dentro do construto de anticorpo ativável anti-CD166, de modo que a MM reduz a capacidade do anticorpo anti-CD166 de se ligar especificamente CD166. Frações de mascaramento apropriadas são identificadas usando qualquer uma de uma variedade de técnicas conhecidas. Por exemplo, frações de mascaramento de peptídeo são identificadas usando os métodos descritos na Publicação PCT Nº. WO 2009/025846 de Daugherty et al. cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[00102] Em algumas modalidades, na presença de CD166, a MM reduz a capacidade do AB de se ligar a CD166 em pelo menos 90% quando o CM não é clivado, em comparação com quando o CM é clivado quando analisado *in vitro* usando um ensaio de deslocamento alvo como, por exemplo, o ensaio descrito na publicação PCT nº WO 2010/081173 cujo conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[00103] Em algumas modalidades, a MM é um polipeptídeo de cerca de 2 a 40 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, a MM é um polipeptídeo de até cerca de 40 aminoácidos de comprimento.

[00104] Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica MM é diferente daquela de CD166. Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica MM não é mais do que 50% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica MM é diferente daquela de CD166 e não é mais que 40%, 30%, 25%, 20%, 15% ou 10% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB.

[00105] Em uma modalidade exemplificativa, os AAs fornecidos neste documento compreendem uma MM, cuja sequência de aminoácidos é estabelecida:

Fração de Mascaramento 7614.6

LCHPAVLSAWESCSS (SEQ ID NO: 222)

[00106] Quando o AB é modificado com uma MM e está na presença do alvo, a ligação específica do AB a seu alvo é reduzida ou inibida, em comparação com a ligação específica do AB não modificado com uma MM ou a ligação específica do AB de origem ao alvo.

[00107] O K_d do AB modificado com uma MM em relação ao alvo é de pelo menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 ou maior, ou entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 25-50, 50-250, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 500-2.500, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 2.500-5.000, 5.000-50.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 50.000-5.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes maior que o K_d do AB não modificado com uma MM ou do AB parental em relação ao alvo. Por outro lado, a afinidade de ligação do AB modificada com uma MM em relação ao alvo é de pelo menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 ou maior, ou entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 25-50, 50-250, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 500-2.500, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 2.500-5.000, 5.000-50.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 50.000-5.000.000, 100.000-1.000.000, ou 100.000-10.000.000 vezes menor que a afinidade de ligação do AB não modificada com uma MM ou do AB parental em relação ao alvo.

[00108] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de se ligar a CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo menos duas vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em

relação ao CD166.

[00109] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de ligar o CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo menos cinco vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[00102] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de se ligar a CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo menos 10 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[00103] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de ligar o CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo menos 20 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[00104] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de se ligar a CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo menos 40 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[00105] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de ligar o CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo menos 100 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[00106] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de se ligar a CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo

menos 1000 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[00107] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de se ligar a CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em relação ao CD166 seja pelo menos 10.000 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[00108] A constante de dissociação (K_d) da MM em relação ao AB é geralmente maior que o K_d do AB em relação ao alvo. O K_d da MM em relação ao AB pode ser pelo menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 ou até 10.000.000 vezes maior que o K_d do AB em direção ao AB alvo. Por outro lado, a afinidade de ligação da MM em relação ao AB é geralmente menor do que a afinidade de ligação do AB em relação ao alvo. A afinidade de ligação da MM para o AB pode ser de pelo menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 ou mesmo 10.000.000 vezes menor do que a afinidade de ligação do AB em relação ao alvo.

[00109] Em algumas modalidades, a constante de dissociação (K_d) da MM em relação ao AB é aproximadamente igual ao K_d do AB em relação ao alvo. Em algumas modalidades, a constante de dissociação (K_d) da MM em relação ao AB não é mais do que a constante de dissociação do AB em relação ao alvo.

[00110] Em algumas modalidades, a constante de dissociação (K_d) da MM em relação ao AB é menor que a constante de dissociação do AB em relação ao alvo.

[00111] Em algumas modalidades, a constante de dissociação (K_d) da MM em relação ao AB é maior que a constante de dissociação do AB em relação ao alvo.

[00112] Em algumas modalidades, a MM tem um K_d para ligação ao

AB que não é maior do que o K_d para ligação do AB ao alvo.

[00113] Em algumas modalidades, a MM tem um K_d para ligação ao AB que é menor que o K_d para ligação do AB ao alvo.

[00114] Em algumas modalidades, a MM tem um K_d para ligação ao AB que é aproximadamente igual ao K_d para ligação do AB ao alvo.

[00115] Em algumas modalidades, o MM tem um K_d para ligação ao AB que não é menor do que o K_d para ligação do AB ao alvo.

[00116] Em algumas modalidades, a MM tem um K_d para ligação ao AB que é maior que o K_d para ligação do AB ao alvo.

[00117] Em algumas modalidades, a constante de dissociação (K_d) do MM em relação ao AB não é mais do que 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 vezes ou mais, ou entre 1-5, 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 25-50, 50-250, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 25-500, 500-2.500, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 2.500-5.000, 5.000-50.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 50.000-500.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes maior que o K_d para ligação do AB ao alvo. Em algumas modalidades, a MM tem um K_d para ligação ao AB que está entre 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1.000, 20-100, 20-1000 ou 100-1.000 vezes maior que o K_d para ligação do AB ao alvo.

[00118] Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é menor que a afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00119] Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que não é mais do que a afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00120] Em algumas modalidades, o MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é aproximadamente igual à afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00121] Em algumas modalidades, o MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é menor que a afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00122] Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é maior que a afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00123] Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ou 1.000 menos que a afinidade da ligação do AB ao alvo. Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que está entre 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-25, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1.000, 20-100, 20-1.000, 25-250, 50-500, ou 100-1.000 vezes menor que a afinidade de ligação do AB ao alvo. Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é 2 a 20 vezes menor que a afinidade de ligação do AB ao alvo. Em algumas modalidades, uma MM não covalentemente ligada ao AB e em concentração equimolar ao AB não inibe a ligação do AB ao alvo.

[00124] Quando o AB é modificado com uma MM e está na presença do alvo, a ligação específica do AB a seu alvo é reduzida ou inibida, em comparação com a ligação específica do AB não modificado com uma MM ou a ligação específica do AB parental ao alvo. Quando comparada com a ligação do AB não modificada com uma MM ou com a ligação do AB parental ao alvo, a capacidade do AB de ligar o alvo quando modificado com uma MM pode ser reduzida em pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e até 100% para pelo menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 ou 96 horas, ou 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 ou 180 dias, ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses ou mais, quando medidos *in vivo* ou em um ensaio *in vitro*.

[00125] A MM inibe a ligação do AB ao alvo. A MM se liga ao domínio de ligação ao antígeno do AB e inibe a ligação do AB ao alvo. A MM pode inibir estericamente a ligação do AB ao alvo. A MM pode inibir alostericamente a ligação do AB ao seu alvo. Nestas modalidades, quando o

AB é modificado por ou acoplado a uma MM e na presença do alvo, não há ligação ou substancialmente nenhuma ligação do AB ao alvo, ou não mais que 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% ou 50% de ligação do AB ao alvo, em comparação com a ligação do AB não modificada com uma MM, o AB parental ou o AB não acoplado a uma MM ao alvo, por pelo menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 ou 96 horas ou 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 ou 180 dias ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses ou mais quando medidos *in vivo* ou em um ensaio *in vitro*.

[00126] Quando um AB é acoplado ou modificado por uma MM, os 'mascaramentos' da MM reduzem ou de outro modo inibem a ligação específica do AB ao alvo. Quando um AB é acoplado ou modificado por uma MM, tal acoplamento ou modificação pode efetuar uma alteração estrutural que reduz ou inibe a capacidade do AB de se ligar especificamente ao seu alvo.

[00127] Um AB acoplado ou modificado com uma MM pode ser representado pelas seguintes fórmulas (em ordem de uma região terminal amino (N) para uma região terminal carboxil (C):

(MM)-(AB)

(AB)-(MM)

(MM)-L-(AB)

(AB)-L-(MM)

onde MM é uma fração de mascaramento, o AB é um anticorpo ou fragmento de anticorpo deste, e o L é um ligante peptídico. Em muitas modalidades, pode ser desejável inserir um ou mais ligantes, *por exemplo*, ligantes flexíveis dentro da composição, a fim de fornecer flexibilidade.

[00128] Em certas modalidades, a MM não é um parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não contém nenhuma ou substancialmente nenhuma homologia com qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 5%, 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80% semelhante a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 25% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 50% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 20% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 10% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB.

Frações Cliváveis (CM)

[00129] Os anticorpos anti-CD166 ativáveis fornecidos neste documento incluem uma fração clivável (CM). Em algumas modalidades, a CM inclui uma sequência de aminoácidos que é um substrato para uma protease, geralmente uma protease extracelular. Substratos adequados podem ser identificados usando qualquer uma de uma variedade de técnicas conhecidas. Por exemplo, os substratos peptídicos são identificados usando os métodos descritos na Patente U.S. nº 7.666.817 de Daugherty et al.; na Patente U.S. nº 8.563.269 de Stagliano et al.; e na Publicação PCT Nº. WO 2014/026136 de La Porte et al., o conteúdo de cada um deles é aqui incorporado por referência na sua totalidade. (Ver também Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics." Biotechnol Bioeng. 106.3 (2010): 339-46).

[00130] Em algumas modalidades, a protease que cliva a CM é ativa, por exemplo, por regulação positiva ou de outra forma não regulada, no tecido doente, e a protease cliva a CM no AA quando o AA é exposto à protease. Em algumas modalidades, a protease é co-localizada com CD166 em um tecido, e a protease cliva a CM no AA quando o AA é exposto à protease. A

FIG. 1 representa os conjugados fármacos do anticorpo anti-CD166 ativável sendo preferencialmente ativado no microambiente do tumor, onde estão presentes proteases específicas do tumor.

[00131] Em algumas modalidades, os AAs incluem um AB que é modificado por uma MM e também inclui uma ou mais frações cliváveis (CM). Tais AAs exibem ligação ativável/comutável ao alvo do AB. AAs incluem geralmente um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB), modificado ou acoplado a uma fração de mascaramento (MM) e uma fração modificável ou clivável (CM). Em algumas modalidades, a CM contém uma sequência de aminoácidos que serve como substrato para pelo menos uma protease.

[00132] Em algumas modalidades, a CM é um polipeptídeo de até 15 aminoácidos de comprimento.

[00133] Em algumas modalidades, a CM é um polipeptídeo que inclui uma primeira fração clivável (CM1) que é um substrato para pelo menos uma metaloprotease de matriz (MMP) e uma segunda fração clivável (CM2) que é um substrato para pelo menos uma serina protease (SP). Em algumas modalidades, cada uma da sequência de substrato CM1 e a sequência de substrato CM2 do substrato CM1-CM2 é independentemente um polipeptídeo de até 15 aminoácidos de comprimento.

[00134] Em algumas modalidades, a CM é um substrato CM1-CM2 cuja sequência de aminoácidos é estabelecida:

Fração clivável 3001 (Substrato 3001)

AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 76)

[00135] Os elementos dos AAs estão dispostos de modo que a MM e a CM estejam posicionadas de modo que, em um estado clivado (ou relativamente ativo) e na presença de um alvo, o AB ligue um alvo enquanto o AA estiver em um estado não clivado (ou relativamente inativo) na presença do alvo, a ligação específica do AB ao seu alvo seja reduzida ou inibida. A ligação específica do AB ao seu alvo pode ser reduzida devido à inibição ou

mascamamento da capacidade do AB de se ligar especificamente ao seu alvo pela MM.

[00136] O K_d do AB modificado com uma MM e uma CM em relação ao alvo é de pelo menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 ou maior, ou entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 25-50, 50-250, 100-1.000, 100-10.000, 100 - 100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 25-500, 500-2.500, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 2.500-5.000, 5.000-50.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 50.000-5.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes maior que o K_d do AB não modificado com uma MM e uma CM ou do AB parental em relação ao alvo. Por outro lado, a afinidade de ligação do AB modificado com uma MM e uma CM em relação ao alvo é de pelo menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000 ou maior, ou entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 25-50, 50-250, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 25-500, 500-2.500, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1.000-10.000.000, 2.500-5.000, 5.000-50.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 50.000-5.000.000, 100.000-1.000.000, ou 100.000-10.000.000 vezes menor que a afinidade de ligação do AB não modificada com uma MM e uma CM ou do AB parental em direção ao alvo.

[00137] Quando o AB é modificado com uma MM e uma CM e está na presença do alvo, mas não na presença de um agente modificador (por exemplo, pelo menos uma protease), a ligação específica do AB ao seu alvo é reduzida ou inibida, em comparação com a ligação específica do AB não modificada com uma MM e uma CM ou do AB parental ao alvo. Quando comparada com a ligação do AB parental ou a ligação de um AB não

modificado com uma MM e uma CM a seu alvo, a capacidade do AB de se ligar o alvo quando modificado com uma MM e uma CM pode ser reduzida em pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% e até 100% para pelo menos 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 ou 96 horas, ou 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 ou 180 dias, ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 meses ou mais, quando medidos *in vivo* ou em um ensaio *in vitro*.

[00138] Conforme usado neste documento, o termo "estado clivado" refere-se à condição dos AAs após a modificação da CM por pelo menos uma protease. O termo "estado não clivado", conforme usado neste documento, refere-se à condição dos AAs na ausência de clivagem da CM por uma protease. Conforme discutido acima, o termo "anticorpos ativáveis" é usado neste documento para se referir a um AA tanto em seu estado não clivado (nativo) quanto em seu estado clivado. Será evidente para a pessoa comum versada na técnica que, em algumas modalidades, um AA clivado pode não ter uma MM devido à clivagem da CM por protease, resultando na liberação de pelo menos a MM (*por exemplo*, onde a MM não está em junção com os AAs por uma ligação covalente (*por exemplo*, uma ligação dissulfeto entre resíduos de cisteína).

[00139] Por ativável ou comutável entende-se que o AA exibe um primeiro nível de ligação a um alvo quando o AA está em um estado inibido, mascarado ou não clivado (*ou seja*, uma primeira conformação) e um segundo nível de ligação ao alvo no estado não inibido, não mascarado e/ou clivado (*ou seja*, uma segunda conformação), onde o segundo nível de ligação ao alvo é maior que o primeiro nível de ligação ao alvo. Em geral, o acesso do alvo ao AB do AA é maior na presença de um agente de clivagem capaz de clivar a CM, isto é, uma protease, do que na ausência de tal agente de clivagem. Assim, quando o AA está no estado não clivado, o AB é inibido da ligação ao alvo e pode ser mascarado da ligação ao alvo (*ou seja*, a primeira conformação

é tal que o AB não pode se ligar ao alvo), e no estado clivado o AB não é inibido ou é não mascarado para a ligação direcionada.

[00140] A CM e AB dos AAs são selecionados de modo que o AB represente uma fração de ligação para um determinado alvo e a CM represente um substrato para uma protease. Em algumas modalidades, a protease é co-localizada com o alvo em um local de tratamento ou local de diagnóstico em um sujeito. Conforme utilizado neste documento, co-localizado refere-se a estar no mesmo local ou relativamente próximo. Em algumas modalidades, uma protease cliva uma CM produzindo um anticorpo ativado que se liga a um alvo localizado próximo do sítio de clivagem. Os AAs divulgados neste documento encontram uso particular em que, por exemplo, uma protease capaz de clivar um sítio na CM, isto é, uma protease, está presente em níveis relativamente mais altos no tecido que contém o alvo de um local de tratamento ou local de diagnóstico do que no tecido de locais de não tratamento (por exemplo, em tecidos saudáveis). Em algumas modalidades, uma CM da divulgação também é clivada por uma ou mais outras proteases. Em algumas modalidades, são a uma ou mais outras proteases que são co-localizadas com o alvo e são responsáveis pela clivagem da CM *in vivo*.

[00141] Em algumas modalidades, os AAs podem fornecer efeitos colaterais adversos e/ou de toxicidade reduzidos que poderiam, de outro modo, resultar da ligação do AB em locais de não tratamento se o AB não fosse mascarado ou, de outro modo, inibido da ligação do alvo.

[00142] Em geral, um AA pode ser projetado através da seleção de um AB de interesse e construção do restante do AA de modo que quando restrito conformacionalmente, a MM forneça mascaramento ao AB ou redução da ligação do AB para seu alvo. Os critérios do projeto estrutural podem ser levados em conta para fornecer esse recurso funcional.

[00143] São fornecidos os AAs exibindo um fenótipo comutável de uma faixa dinâmica desejada para ligação ao alvo em uma conformação inibida

versus não inibida. A faixa dinâmica geralmente se refere a uma razão de (a) um nível máximo detectado de um parâmetro sob um primeiro conjunto de condições para (b) um valor mínimo detectado desse parâmetro sob um segundo conjunto de condições. Por exemplo, no contexto de um anticorpo ativável, a faixa dinâmica refere-se à razão de (a) um nível máximo detectado da ligação da proteína alvo a um AA na presença de pelo menos uma protease capaz de clivar a CM dos AAs para (b) um nível mínimo detectado da ligação da proteína alvo a um AA na ausência da protease. A faixa dinâmica de um AA pode ser calculada como a razão da constante de dissociação de um tratamento de agente de clivagem de AA (*por exemplo*, enzima) para a constante de dissociação do tratamento do agente de clivagem de AA. Quanto maior for a faixa dinâmica de um anticorpo ativável, melhor será o fenótipo comutável do anticorpo ativável. Os AAs tendo valores de faixa dinâmica relativamente mais altos (*por exemplo*, maiores que 1) exibem fenótipos de comutação mais desejáveis, de modo que a ligação de proteínas de alvo pelos AAs ocorre em maior extensão (*por exemplo*, ocorre predominantemente) na presença de um agente de clivagem (*por exemplo*, enzima) capaz de clivar a CM dos AAs do que na ausência de um agente de clivagem.

[00144] A CM é clivada especificamente por pelo menos uma protease a uma taxa de cerca de $0,001\text{-}1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ou pelo menos 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250 ou $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$. Em algumas modalidades, a CM é clivada especificamente a uma taxa de cerca de 100.000 $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$. Em algumas modalidades, a CM é clivada especificamente a uma taxa de cerca de 1×10^2 a cerca de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ (isto é, de cerca de 1×10^2 a cerca de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$).

[00145] É feita, para uma clivagem específica por uma enzima, o contato entre a enzima e a CM. Quando o AA compreendendo um AB acoplado a uma MM e uma CM está na presença de alvo e atividade enzimática

suficiente, a CM pode ser clivada. A atividade enzimática suficiente pode se referir à capacidade da enzima de fazer contato com a CM e efetuar a clivagem. Pode-se prever facilmente que uma enzima pode estar na vizinhança da CM, mas incapaz de clivar por causa de outros fatores celulares ou modificação de proteínas da enzima.

Configurações Estruturais dos Anticorpos Ativáveis

[00146] Os AAs da presente divulgação podem ser fornecidos em uma variedade de configurações estruturais. Fórmulas exemplificativas para AAs são fornecidas abaixo. É especificamente contemplado que a ordem N-para C-terminal do AB, MM e CM pode ser revertida dentro de um anticorpo ativável. Também é especificamente contemplado que a CM e a MM possam se sobrepor na sequência de aminoácidos, *por exemplo*, de modo que a CM esteja contida na MM.

[00147] Por exemplo, os AAs podem ser representados pela seguinte fórmula (em ordem de uma região terminal amino (N) para uma região terminal carboxil (C):

(MM)-(CM)-(AB)

(AB)-(CM)-(MM)

onde MM é uma fração mascaramento, a CM é uma fração clivável e AB é um anticorpo ou fragmento do mesmo. Deve-se notar que, embora MM e CM sejam indicados como componentes distintos nas fórmulas acima, em todas as modalidades exemplificativas (incluindo fórmulas) divulgadas neste documento, é contemplado que as sequências de aminoácidos da MM e da CM possam se sobrepor, *por exemplo*, de modo que a CM está total ou parcialmente contida na MM. Além disso, as fórmulas acima fornecem sequências adicionais de aminoácidos que podem ser posicionadas no N-terminal ou no C-terminal dos elementos AA.

[00148] Em muitas modalidades, pode ser desejável inserir um ou mais ligantes, *por exemplo*, ligantes flexíveis, na construção AA, de modo a

fornecer flexibilidade em uma ou mais das junções MM-CM, junção CM-AB ou ambas. Por exemplo, AB, MM e/ou CM podem não conter um número suficiente de resíduos (*por exemplo*, Gly, Ser, Asp, Asn, especialmente Gly e Ser, particularmente Gly) para fornecer a flexibilidade desejada. Como tal, o fenótipo comutável de tais construções de AA pode se beneficiar da introdução de um ou mais aminoácidos para fornecer um ligador flexível. Além disso, como descrito abaixo, onde o AA é fornecido como um construto com restrição de conformação, um ligador flexível pode ser operacionalmente inserido para facilitar a formação e manutenção de uma estrutura cíclica no anticorpo ativável não clivado.

[00149] Em algumas modalidades, o AA compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2), e em que o AA, no estado não clivado tem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal da seguinte forma: MM-LP1-CM-LP2-AB ou AB-LP2-CM-LP1-MM. Em algumas modalidades, os dois peptídeos de ligação não necessitam ser idênticos um ao outro.

[00150] Em algumas modalidades, pelo menos um de LP1 ou LP2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) e (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), em que n é um número inteiro de pelo menos um.

[00151] Em algumas modalidades, pelo menos um de LP1 ou LP2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em GGSG (SEQ ID NO: 3), GGSGG (SEQ ID NO: 4), GSGSG (SEQ ID NO: 5), GSGGG (SEQ ID NO: 6), GGGSG (SEQ ID NO: 7) e GSSSG (SEQ ID NO: 8).

[00152] Em algumas modalidades, LP1 compreende a sequência de aminoácidos GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 9), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 10), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 11), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 12), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 13) ou GSSGGSGGSGS

(SEQ ID NO: 14).

[00153] Em algumas modalidades, LP2 compreende a sequência de aminoácidos GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 15), GSSGT (SEQ ID NO: 16) ou GSSG (SEQ ID NO: 17).

[00154] Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 100 nM ou menos para ligação a CD166.

[00155] Por exemplo, em certas modalidades, um AA compreende uma das seguintes fórmulas (em que a fórmula abaixo representa uma sequência de aminoácidos na direção N-terminal a C- ou direção C-terminal a N-):

(MM)-LP1-(CM)-(AB)

(MM)-(CM)-LP2-(AB)

(MM)-LP1-(CM)-LP2-(AB)

em que MM, CM e AB são como definidos acima; em que LP1 e LP2 são cada um independente e opcionalmente presente ou ausente, são os mesmos ou diferentes ligantes flexíveis que incluem pelo menos 1 aminoácido flexível (*por exemplo*, Gly). Além disso, as fórmulas acima fornecem sequências adicionais de aminoácidos que podem ser posicionadas no N-terminal ou no C-terminal dos elementos de AA. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a frações de direcionamento (*por exemplo*, um ligante para um receptor de uma célula presente em um tecido-alvo) e frações que prolongam a meia-vida no soro (*por exemplo*, polipeptídeos que ligam proteínas séricas, como imunoglobulina (*por exemplo*, IgG) ou albumina sérica (*por exemplo*, albumina sérica humana (HAS)).

[00156] Em algumas modalidades, o AA é exposto e clivado por uma protease de modo que, no estado ativado ou clivado, o anticorpo ativado inclui uma sequência de aminoácidos da cadeia leve que inclui pelo menos uma porção da sequência LP2 e/ou CM após a protease clivar o CM.

[00157] Os ligantes adequados para uso nas composições descritas neste documento são geralmente aqueles que fornecem flexibilidade do AB ou

dos AAs modificados para facilitar a inibição da ligação do AB ao alvo. Esses ligantes são geralmente referidos como ligantes flexíveis. Ligantes adequados podem ser prontamente selecionados e podem ser de quaisquer diferentes comprimentos adequados, tais como de 1 aminoácido (*por exemplo*, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluindo 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, ou 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, e podem ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos de comprimento.

[00158] Os ligantes flexíveis exemplificativos incluem polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 1) e (GGGS)_n (SEQ ID NO: 2), em que n é um número inteiro de pelo menos um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, e outros ligantes flexíveis conhecidos na técnica. Os polímeros de glicina e glicina-serina são relativamente não-estruturados e, portanto, podem servir como uma cadeia neutra entre componentes. A glicina ocupa significativamente mais espaço phi-psi do que mesmo a alanina uniforme e é muito menos restrita do que os resíduos com cadeias laterais mais longas (ver Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Exemplos de ligantes flexíveis incluem, mas não são limitados a Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 3), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 5), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 7), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 8) e similares. A pessoa comum versada na técnica reconhecerá que o projeto de um AA pode incluir ligantes que são total ou parcialmente flexíveis, de modo que o ligante possa incluir um ligante flexível, bem como uma ou mais porções que conferem estrutura menos flexível para fornecer uma estrutura de AA desejada.

[00159] Em algumas modalidades, o AA também inclui um peptídeo sinal. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal é conjugado ao AA através de

um espaçador. Em algumas modalidades, o espaçador é conjugado ao AA na ausência de um peptídeo sinal. Em algumas modalidades, o espaçador é unido diretamente à MM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o espaçador está em junção diretamente à MM do AA no arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal do espaçador-MM-CM-AB. Um exemplo de um espaçador em junção diretamente ao terminal N de MM do AA é QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). Outros exemplos de um espaçador em junção direta com N-terminal de MM do AA incluem QGQSGQG (SEQ ID NO: 305), QGQSG (SEQ ID NO: 306), QGQS (SEQ ID NO: 307), QGQ, QG e Q. Outros exemplos de um espaçador em junção direta com N-terminal de MM do AA incluem GQSGQG (SEQ ID NO: 359), QSGQG (SEQ ID NO: 360), SGQG (SEQ ID NO: 361), GQG e G. Em algumas modalidades, nenhum espaçador está em junção direta com terminal N do MM. Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QGQSGQ (SEQ ID NO: 88). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QGQSGQG (SEQ ID NO: 305). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QGQSG (SEQ ID NO: 306). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QGQS (SEQ ID NO: 307). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QGQ. Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QG. Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos o resíduo de aminoácido Q. Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos GQSGQG (SEQ ID NO: 359). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QSGQG (SEQ ID NO: 360). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos SGQG (SEQ ID NO: 361). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos GQG. Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos G. Em algumas modalidades, o espaçador está ausente.

Anticorpos Ativáveis Conjugados

[00160] As composições e métodos de AA fornecidos neste documento permitem a ligação de um ou mais agentes a um ou mais resíduos de cisteína (por exemplo, cisteína, lisina) no AB sem comprometer a atividade (por exemplo, a atividade de mascarar, ativar ou ligar) do anticorpo anti-CD166 ativável. Em algumas modalidades, as composições e métodos fornecidos neste documento permitem a ligação de um ou mais agentes a um ou mais resíduos de cisteína no AB sem reduzir ou perturbar, de outra forma, uma ou mais ligações dissulfeto no MM. As composições e métodos fornecidos neste documento produzem um anticorpo anti-CD166 ativável que é conjugado com um ou mais agentes, *por exemplo*, qualquer um de uma variedade de agentes terapêuticos, de diagnóstico e/ou profiláticos, por exemplo, em algumas modalidades, sem nenhum agente conjugado com o MM do anticorpo ativável anti-CD166. As composições e métodos fornecidos neste documento produzem anticorpos anti-CD166 ativáveis conjugados nos quais a MM retém a capacidade de mascarar eficaz e eficientemente o AB do AA em um estado não-clivado. As composições e métodos fornecidos neste documento produzem anticorpos anti-CD166 ativáveis conjugados nos quais o AA ainda é ativado, *isto é*, clivado, na presença de uma protease que pode clivar a CM.

[00161] Em algumas modalidades, os AAs descritos neste documento também incluem um agente conjugado ao anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o agente conjugado é um agente terapêutico, como um agente anti-inflamatório e/ou antineoplásico. Em tais modalidades, o agente é conjugado a uma fração de carboidrato do anticorpo ativável, por exemplo, em algumas modalidades, onde a fração de carboidrato está localizada fora da região de ligação ao antígeno do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno no anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o agente é conjugado a um grupo sulfidril do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno no anticorpo ativável.

[00162] Em algumas modalidades, o agente é um agente citotóxico, tal como uma toxina (*por exemplo*, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou fragmentos da mesma) ou um isótopo radioativo (*isto é*, um radio-conjugado).

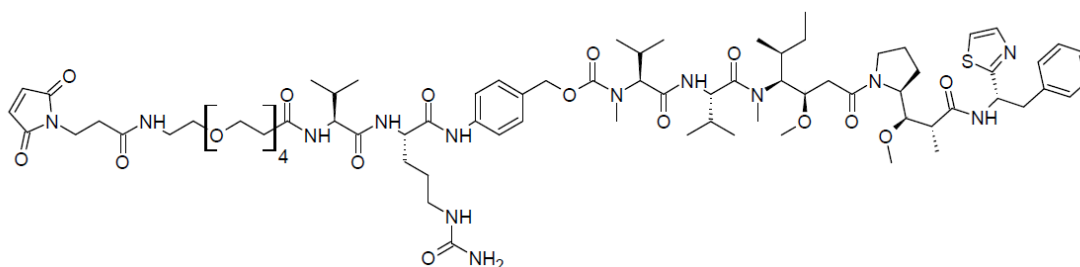
[00163] Em algumas modalidades, o agente é uma fração detectável, como, por exemplo, um marcador ou outro indicador. Por exemplo, o agente é ou inclui um aminoácido radiomarcado, uma ou mais frações de biotinil que podem ser detectadas por avidina marcada (*por exemplo*, estreptavidina contendo um indicador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou calorimétricos), um ou mais radioisótopos ou radionuclídeos, um ou mais marcadores fluorescentes, um ou mais marcadores enzimáticos e/ou um ou mais agentes quimioluminescentes. Em algumas modalidades, as frações detectáveis são conectadas por moléculas espaçadoras.

[00164] A divulgação também se refere a imunoconjugados compreendendo um anticorpo conjugado a um agente citotóxico, tal como uma toxina (*por exemplo*, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou fragmentos da mesma), ou um isótopo radioativo (*isto é*, um radio-conjugado). Os agentes citotóxicos adequados incluem, por exemplo, dolastatinas e derivados destas (*por exemplo*, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Por exemplo, o agente é monometil auristatina E (MMAE) ou monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um agente selecionado do grupo listado na Tabela 1. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoide. Em

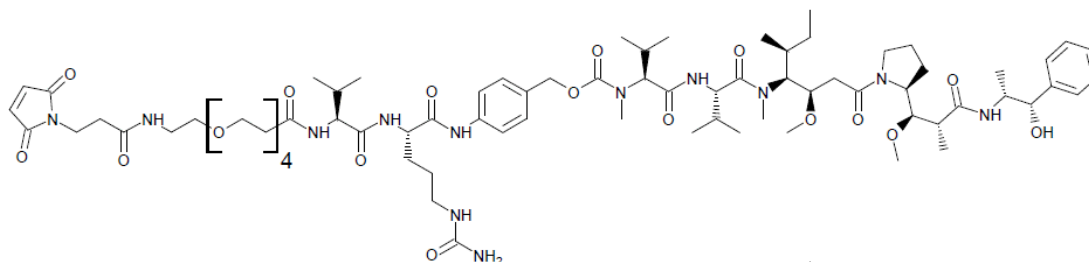
algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrolobenzodiazepina. Numa modalidade exemplificativa, o agente é DM4.

[00165] Em algumas modalidades, o agente é ligado ao AB usando um ligante maleimida caproil-valina-citrulina ou um ligante maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é ligado ao AB usando um ligante maleimida caproil-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é ligado ao AB usando um ligante maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD) ligado ao AB usando um ligante maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil, e este construto de carga útil do ligante é referido neste documento como "vc-MMAD". Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE) ligado ao AB usando um ligante maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil e este construto de carga útil do ligante é referido neste documento como "vc-MMAE". Em algumas modalidades, o agente está ligado ao AB usando um ligante maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD) ligado ao AB usando um ligante de maleimida bis-PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil e esta construção de carga útil do ligante é referida neste documento como "PEG2-vc-MMAD". As estruturas de vc-MMAD, vc-MMAE e PEG2-vc-MMAD são mostradas abaixo:

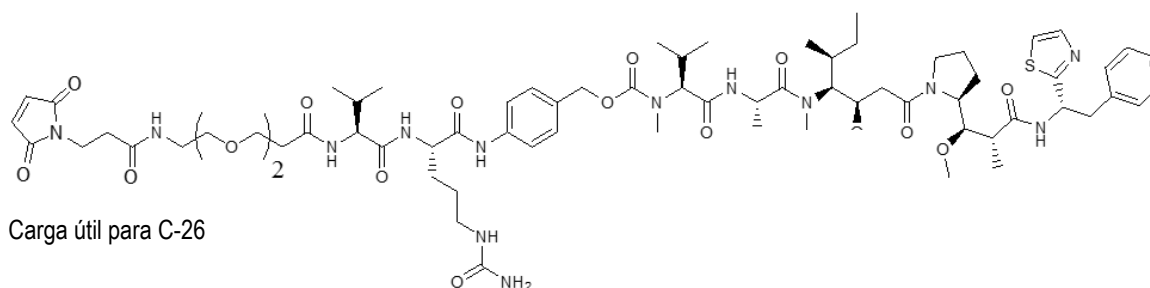
vc-MMAD:



vc-MMAE:



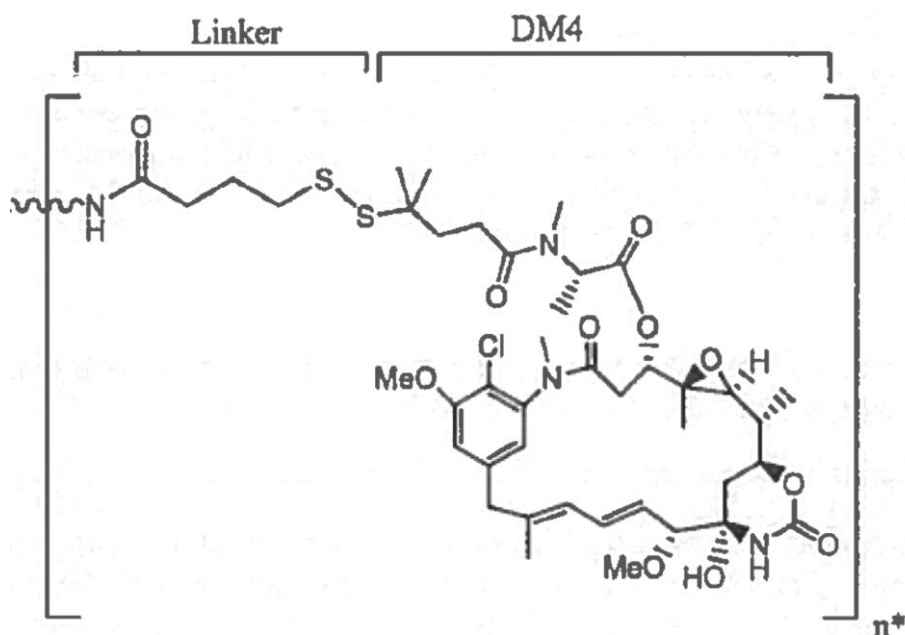
PEG2-vc-MMAD:



[00166] Em uma modalidade exemplificativa, o agente é conjugado ao AA via lisina. Em uma modalidade exemplificativa, um SPDB-DM4 é conectado a um anticorpo ativável através do grupo épsilon-amino de uma lisina no AA, por exemplo, o grupo épsilon-amino da lisina.

[00167] Em uma modalidade exemplificativa, o agente é DM4 e o ligador-DM é da seguinte forma:

Ligante



[00168] A divulgação também fornece AAs conjugados que incluem um AA ligado à carga útil de monometil auristatina D (MMAD), em que o AA inclui um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente a um alvo, uma fração de mascaramento (MM) que inibe a ligação do AB do AA em um estado não clivado ao alvo e a fração clivável (CM) acoplada ao AB, e a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para pelo menos uma protease de MMP.

[00169] Em algumas modalidades, o AA conjugado com MMAD pode ser conjugado usando qualquer um dos vários métodos para vincular agentes aos ABs: (a) vincular às frações de carboidratos do AB, ou (b) vincular aos grupos sulfidril do AB, ou (c) vincular a grupos amino do AB, ou (d) vincular a grupos de carboxilato do AB.

[00170] Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada ao AB por meio de um ligante peptídico. Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada a uma cisteína no AB por meio de um ligante peptídico. Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada a uma lisina no AB por meio de um ligante peptídico. Em algumas

modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada a outro resíduo do AB por meio de um ligante peptídico, como os resíduos divulgados neste documento. Em algumas modalidades, o ligante peptídico é um ligante peptídico contendo tiol. Em algumas modalidades, o ligante peptídico é um ligante clivável. Em algumas modalidades, o ligante peptídico é um ligante peptídico não clivável. Em algumas modalidades, o ligante peptídico é selecionado do grupo que consiste nos ligantes mostrados nas Tabelas 6 e 7. Em algumas modalidades, a carga útil AA e MMAD são ligadas por meio de um ligante maleimida caproil-valina-citrulina. Em algumas modalidades, a carga útil AA e MMAD são ligadas por meio de um ligante maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, a carga útil AA e MMAD é ligada por meio de um ligante maleimida caproil-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil. Em algumas modalidades, a carga útil AA e MMAD são ligadas por meio de um ligante PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil. Em algumas modalidades, a carga útil MMAD é conjugada ao AB usando a tecnologia de redução parcial e conjugação divulgada neste documento.

[00171] Em algumas modalidades, o componente polietileno glicol (PEG) de um ligante da presente divulgação é formada de 2 monômeros de etileno glicol, 3 monômeros de etileno glicol, 4 monômeros de etileno glicol, 5 monômeros de etileno glicol, 6 monômeros de etileno glicol, 7 monômeros de etileno glicol, 8 monômeros de etileno glicol, 9 monômeros de etileno glicol ou pelo menos 10 monômeros de etileno glicol. Em algumas modalidades da presente divulgação, o componente PEG é um polímero ramificado. Em algumas modalidades da presente divulgação, o componente PEG é um polímero não ramificado. Em algumas modalidades, o componente de polímero PEG é funcionalizado com um grupo amino ou derivado do mesmo, um grupo carboxil ou derivado do mesmo, ou ambos um grupo amino ou derivado do mesmo e um grupo carboxil ou derivado mesmo.

[00172] Em algumas modalidades, o componente PEG de um

ligante da presente divulgação é um grupo amino-tetra-etileno glicol-carboxil ou derivado do mesmo. Em algumas modalidades, o componente PEG de um ligante da presente divulgação é um grupo amino-tri-etileno glicol-carboxil ou um derivado do mesmo. Em algumas modalidades, o componente PEG de um ligante da presente divulgação é um grupo amino-di-etileno glicol-carboxil ou um derivado do mesmo. Em algumas modalidades, um derivado amino é a formação de uma ligação amida entre o grupo amino e um grupo carboxila ao qual está conjugado. Em algumas modalidades, um derivado carboxila é a formação de uma ligação amida entre o grupo de carboxila e um grupo amino ao qual está conjugado. Em algumas modalidades, um derivado de carboxil é a formação de uma ligação éster entre o grupo carboxil e um grupo hidroxil ao qual está conjugado.

[00173] As toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser usados incluem cadeia A da difteria, fragmentos ativos não ligantes da toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas dianthin, proteínas *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcuma, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Uma variedade de radionuclídeos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re .

[00174] Os conjugados do anticorpo e agente citotóxico são produzidos utilizando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (tais como adipimidato de dimetila HCL), ésteres ativos (tais como suberato de dissuccinimidil), aldeídos (tais como glutaraldeído), compostos bis-azido (tais como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados bis-diazônio (tais como bis-(p-

diazoniobenzoil)-etilenodiamina), di-isocianatos (tais como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos bis-ativos de flúor (tais como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). O ácido triaminepentaacético 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético rotulado com carbono-14 (MX-DTPA) é um agente quelante exemplificativo para a conjugação do radionucleotídeo ao anticorpo. (Vide WO94/11026).

[00175] A Tabela 1 lista alguns dos agentes farmacêuticos exemplificativos que podem ser empregados na divulgação descrita neste documento, mas de maneira alguma pretende ser uma lista exaustiva.

Tabela 1: Agentes Farmacêuticos Exemplificativos para Conjugação

<u>AGENTES CITOTÓXICOS</u>	
Auristatinas	Turbostatina
Auristatina E	Fenstatinas
Auristatina monometil D (MMAD)	Hidroxifenstatina
Auristatina E monometil (MMAE)	Spongistatin 5
Desmetil auristatina E (DMAE)	Spongistatin 7
Auristatina F	Halistatina 1
Auristatina monometil F (MMAF)	Halistatina 2
Desmetil auristatina F (DMAF)	Halistatina 3
Derivados de auristatina, <i>por exemplo</i> , amidas desta	Briostatinas modificadas
Tiristina Auristatina	Halocomstatins
Auristatina quinolina	Pirrolobenzimidazóis (PBI)
Dolastatinas	Cibrostatina6
Derivados da dolastatina	Doxaliforme
Dolastatina 16 DmJ	Análogos das antraciclinas
Dolastatina 16 Dpv	
Maitansinoides, <i>por exemplo</i> DM-1;	

DM-4		Análogo de Cemadotin (CemCH ₂ -SH)
Derivados de maitansinoides		Variante da toxina A de Pseudomonas (PE38)
Duocarmicina		Variante da toxina A de Pseudomonas (ZZ-PE38)
Derivados de duocarmicina		ZJ-101
Alfa-amanitina		OSW-1
Antraciclinas		Derivados 4-nitrobenziloxycarbonil da O6-benzilguanina
Doxorrubicina		Inibidores da topoisomerase
Daunorrubicina		Hemiasterlina
Briostatina		Cefalotaxina
Camptotecina		Homoharringtonina
Derivados de camptotecina		Dímero de pirrolobenzodiazepina (PBDs)
Camptotecina 7 substituída		Pirrolobenzodiazepenos funcionalizados
10,	11-	Calicheamicina
Difluorometilenodioxycamptotecina		Podofilotoxinas
Combretastatina		Taxanos
Debromoaplisiatoxina		Alcalóides da vinca
Kahalalide-F		
Discodermolida		<u>REAGENTES CONJUGÁVEIS DE DETECÇÃO</u>
Ecteinasclinas		Fluoresceína e derivados da mesma
		Isotiocianato de fluorescência (FITC)
<u>ANTIVIRAIS</u>		<u>RADIOFÁRMACOS</u>
Aciclovir		
Vira A		
Symmetrel		

	^{125}I
<u>ANTIFÚNGICOS</u>	^{131}I
Nistatina	^{89}Zr
	^{111}In
<u>ANTI-NEOPLÁSTICOS ADICIONAIS</u>	^{123}I
Adriamicina	^{131}I
Cerubidina	^{99m}Tc
Bleomicina	^{201}Tl
Alkeran	^{133}Xe
Velban	^{11}C
Oncovin	^{62}Cu
Fluorouracil	^{18}F
Metotrexato	^{68}Ga
Tiotepa	^{13}N
Bisantreno	^{15}O
Novantrone	^{38}K
Tioguanina	^{82}Rb
Procarabizina	^{99m}Tc (Tecnécio)
Citarabina	
	<u>METAIS PESADOS</u>
<u>ANTI-BACTERIAIS</u>	Bário
Aminoglicosídeos	Ouro
Estreptomicina	Platina
Neomicina	
Kanamicina	<u>ANTI-MICOPLASMAS</u>
Amikacin	Tilosina
Gentamicina	Espectinomicina
Tobramicina	
Estreptomicina B	

Espectinomicina	
Ampicilina	
Sulfanilamida	
Polimixina	
Clorafenicol	

[00176] Os versados na técnica reconhecerão que uma grande variedade de frações possíveis pode ser acoplada aos anticorpos resultantes ou a outras moléculas da divulgação. (Ver, por exemplo "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse e R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), cujos conteúdos são incorporados neste documento por referência).

[00177] Em algumas modalidades, o AA é conjugado com um ou mais equivalentes de um agente. Em algumas modalidades, o AA é conjugado com um equivalente do agente. Em algumas modalidades, o AA é conjugado com dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais do que dez equivalentes do agente. Em algumas modalidades, o AA é parte de uma mistura de AAs com um número homogêneo de equivalentes de agentes conjugados. Em algumas modalidades, o AA é parte de uma mistura de AAs com um número heterogêneo de equivalentes de agentes conjugados. Em algumas modalidades, a mistura de AAs é tal que o número médio de agentes conjugados para cada AA está entre zero e um, entre um e dois, entre dois e três, entre três e quatro, entre quatro e cinco, entre quatro e cinco, entre cinco e seis, entre seis e sete, entre sete e oito, entre oito e nove, entre nove e dez e dez e maior. Em algumas modalidades, a mistura de AAs é tal que o número médio de agentes conjugados para cada AA é um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez ou mais. Em algumas modalidades, há uma mistura de AAs de modo que o número médio de agentes conjugados para cada AA esteja entre três e quatro. Em algumas modalidades, há uma mistura de AAs de tal modo que o número médio de agentes conjugados para cada AA está

entre 3,4 e 3,8. Em algumas modalidades, há uma mistura de AA de tal modo que o número médio de agentes conjugados para cada AA está entre 3,4 e 3,6. Em algumas modalidades, o AA compreende uma ou mais modificações na sequência de aminoácidos específicos do sítio, de modo que o número de resíduos de lisina e/ou cisteína seja aumentado ou diminuído em relação à sequência de aminoácidos original do anticorpo ativável, assim, em algumas modalidades correspondentemente aumentar ou diminuir o número de agentes que podem ser conjugados ao anticorpo ativável ou, em algumas modalidades, limitar a conjugação dos agentes ao AA de uma maneira específica do sítio. Em algumas modalidades, o AA modificado é modificado com um ou mais aminoácidos não naturais de uma maneira específica do sítio, assim, em algumas modalidades, limitando a conjugação dos agentes a apenas os sítios dos aminoácidos não naturais.

Composições e Métodos para Gerar Anticorpos Ativáveis Conjugados

[00178] Os anticorpos anti-CD166 ativáveis têm pelo menos um ponto de conjugação para um agente (para produzir um AA conjugado). Em algumas modalidades, nem todos os pontos possíveis de conjugação são usados. Em algumas modalidades, alguns dos pontos naturais de contato são modificados ou removidos para não estar mais disponíveis para conjugação com um agente. Em algumas modalidades, o um ou mais pontos de conjugação são átomos de nitrogênio, tal como o grupo amino épsilon da lisina.

[00179] Em algumas modalidades, um ou mais pontos de conjugação são átomos de enxofre envolvidos em ligações dissulfeto. Em algumas modalidades, um ou mais pontos de conjugação são átomos de enxofre envolvidos em ligações dissulfeto intercadeia. Em algumas modalidades, um ou mais pontos de conjugação são átomos de enxofre envolvidos em ligações de sulfeto intercadeia, mas não átomos de enxofre envolvidos em ligações dissulfeto intracadeia. Em algumas modalidades, um ou

mais pontos de conjugação são átomos de enxofre de cisteína ou outros resíduos de aminoácidos contendo um átomo de enxofre. Esses resíduos podem ocorrer naturalmente na estrutura do anticorpo ou podem ser incorporados no anticorpo por mutagênese dirigida ao local, conversão química ou incorporação incorreta de aminoácidos não naturais.

[00180] Também são fornecidos métodos para preparar um conjugado de um anticorpo anti-CD166 ativável tendo uma ou mais ligações dissulfeto intercadeia no AB e uma ou mais ligações dissulfeto intracadeia no MM, e é fornecido um fármaco reativo com tióis livres. O método de forma geral inclui reduzir parcialmente ligações dissulfeto intercadeia no AA com um agente redutor, tal como, por exemplo, TCEP; e conjugar o fármaco reativo com tióis livres ao anticorpo ativável parcialmente reduzido. Conforme utilizado neste documento, o termo redução parcial refere-se a situações em que um anticorpo anti-CD166 ativável é contatado com um agente redutor e menos que todas as ligações dissulfeto, *por exemplo*, menos que todos os sítios possíveis de conjugação são reduzidos. Em algumas modalidades, menos de 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% ou menos de 5% de todos os sítios possíveis de conjugação são reduzidos.

[00181] Em ainda outras modalidades, é fornecido um método de redução e conjugação de um agente, por exemplo, um fármaco, a um anticorpo anti-CD166 ativável, resultando em seletividade na colocação do agente. O método de maneira geral inclui reduzir parcialmente o anticorpo anti-CD166 ativável com um agente redutor, de modo que quaisquer sítios de conjugação na fração de mascaramento ou outra porção não AB do AA não sejam reduzidos e conjugar o agente para interligar tióis no AB. O(s) local(is) de conjugação são selecionados de modo a permitir a colocação desejada de um agente para permitir que a conjugação ocorra no local desejado. O agente redutor é, por exemplo, TCEP. As condições da reação de redução, como, por

exemplo, a razão do agente redutor para o anticorpo ativável, a duração da incubação, a temperatura durante a incubação, o pH da solução da reação redutora, etc, são determinadas pela identificação das condições que produzem um AA conjugado em que a MM retém a capacidade de mascarar eficaz e eficientemente o AB do AA em um estado não-clivado. A razão de agente de redução para o anticorpo anti-CD166 ativável variará dependendo do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a razão do agente redutor para anticorpo anti-CD166 ativável estará em uma faixa de cerca de 20:1 a 1:1, de cerca de 10:1 a 1:1, de cerca de 9:1 a 1:1, de cerca de 8:1 a 1:1, de cerca de 7:1 a 1:1, de cerca de 6:1 a 1:1, de cerca de 5:1 a 1:1, de cerca de 4:1 a 1:1, de cerca de 3:1 a 1:1, de cerca de 2:1 a 1:1, de cerca de 20:1 a 1:1,5, de cerca de 10:1 a 1:1,5, de cerca de 9:1 a 1:1,5, de cerca de 8:1 a 1:1,5, de cerca de 7:1 a 1:1,5, de cerca de 6:1 a 1:1,5, de cerca de 5:1 a 1:1,5, de cerca de 4:1 a 1:1,5, de cerca de 3:1 a 1:1,5, de cerca de 2:1 a 1:1,5, de cerca de 1,5:1 a 1:1,5 ou de cerca de 1:1 a 1:1,5. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 5:1 a 1:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 5:1 a 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 4:1 a 1:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 4:1 a 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 8:1 a 1:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 2,5:1 a 1:1.

[00182] Em algumas modalidades, um método de redução de ligações dissulfeto entre cadeias no AB de um anticorpo anti-CD166 ativável e conjugação de um agente, por exemplo, um agente contendo tiol, como um fármaco, aos tióis de intercadeias resultantes para localizar seletivamente o(s) agente(s) no AB é fornecido. O método de forma geral inclui reduzir parcialmente o AB com um agente redutor para formar pelo menos dois tióis intercadeias sem formar todos os tióis intercadeias possíveis no anticorpo ativável; e conjugar o agente aos tióis intercadeias do AB parcialmente reduzido. Por exemplo, o AB do AA é parcialmente reduzido por cerca de 1

hora a cerca de 37 °C na razão desejada de agente redutor:anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a razão de agente redutor para AA estará em uma faixa de cerca de 20:1 a 1:1, de cerca de 10:1 a 1:1, de cerca de 9:1 a 1:1, de cerca de 8:1 a 1:1, de cerca de 7:1 a 1:1, de cerca de 6:1 a 1:1, de cerca de 5:1 a 1:1, de cerca de 4:1 a 1:1, de cerca de 3:1 a 1:1, de cerca de 2:1 a 1:1, de cerca de 20:1 a 1:1,5, de cerca de 10:1 a 1:1,5, de cerca de 9:1 a 1:1,5, de cerca de 8:1 a 1:1,5, de cerca de 7:1 a 1:1,5, de cerca de 6:1 a 1:1,5, de cerca de 5:1 a 1:1,5, de cerca de 4:1 a 1:1,5, de cerca de 3:1 a 1:1,5, de cerca de 2:1 a 1:1,5, de cerca de 1,5:1 a 1:1,5 ou de cerca de 1:1 a 1:1,5. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 5:1 a 1:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 5:1 a 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 4:1 a 1:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 4:1 a 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 8:1 a 1:1. Em algumas modalidades, a razão está em uma faixa de cerca de 2,5:1 a 1:1.

[00183] O reagente contendo tiol pode ser, por exemplo, cisteína ou N-acetilcisteína. O agente redutor pode ser, por exemplo, TCEP. Em algumas modalidades, o AA reduzido pode ser purificado antes da conjugação, utilizando, por exemplo, cromatografia em coluna, diálise ou diafiltração. Alternativamente, o anticorpo reduzido não é purificado após redução parcial e antes da conjugação.

[00184] A invenção também fornece anticorpos anti-CD166 ativáveis parcialmente reduzidos nos quais pelo menos uma ligação dissulfeto inter-cadeia no AA foi reduzida com um agente redutor sem perturbar nenhuma ligação dissulfeto intracadeia no anticorpo ativável, em que o AA inclui um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno (AB) do mesmo que se liga especificamente a CD166, uma fração de mascaramento (MM) que inibe a ligação do AB do AA em um estado não clivado ao alvo CD166 e uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que o CM é um polipeptídeo que funciona

como um substrato para uma protease. Em algumas modalidades, a MM é acoplada ao AB por meio da CM. Em algumas modalidades, uma ou mais ligações dissulfeto intracadeias do AA não são perturbadas pelo agente redutor. Em algumas modalidades, uma ou mais ligações dissulfeto intracadeia da MM dentro do AA não é perturbada pelo agente redutor. Em algumas modalidades, o AA no estado não clivado tem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM. Em algumas modalidades, o agente redutor é TCEP.

[00185] A invenção também fornece anticorpos AAs reduzidos parcialmente nos quais pelo menos uma ligação dissulfeto intercadeia no AA foi reduzida com um agente redutor sem perturbar nenhuma ligação dissulfeto intracadeia no anticorpo ativável, em que o AA inclui um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno (AB) do mesmo que se liga especificamente ao alvo, por exemplo, CD166, uma fração de mascaramento (MM) que inibe a ligação do AB do AA em um estado não clivado ao alvo e uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease. Em algumas modalidades, a MM é acoplada ao AB por meio da CM. Em algumas modalidades, uma ou mais ligações dissulfeto intracadeias do AA não são perturbadas pelo agente redutor. Em algumas modalidades, uma ou mais ligações dissulfeto intracadeia da MM dentro do AA não é perturbada pelo agente redutor. Em algumas modalidades, o AA no estado não clivado tem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM. Em algumas modalidades, o agente redutor é TCEP.

[00186] Ainda em outras modalidades, um método de redução e conjugação de um agente, por exemplo, um fármaco, a um anticorpo anti-CD166 ativável, resultando em seletividade na colocação do agente, fornecendo um anticorpo anti-CD166 ativável com um número definido e posições de resíduos de lisina e/ou cisteína. Em algumas modalidades, o

número definido de resíduos de lisina e/ou cisteína é maior ou menor que o número de resíduos correspondentes na sequência de aminoácidos do anticorpo parental ou anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o número definido de resíduos de lisina e/ou cisteína pode resultar em um número definido de equivalentes de agente que podem ser conjugados ao anticorpo anti-CD166 ou anticorpo anti-CD166 ativável. Em algumas modalidades, o número definido de resíduos de lisina e/ou cisteína pode resultar em um número definido de equivalentes de agente que podem ser conjugados ao anticorpo anti-CD166 ou anticorpo anti-CD166 ativável de uma maneira específica do local. Em algumas modalidades, o A modificado é modificado com um ou mais aminoácidos não naturais de uma maneira específica do local, assim, em algumas modalidades, limitando a conjugação dos agentes a apenas nos sítios dos aminoácidos não naturais. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ou anticorpo anti-CD166 ativável com um número definido e posições de resíduos de lisina e/ou cisteína pode ser parcialmente reduzido com um agente redutor, conforme discutido neste documento, de modo que quaisquer sítios de conjugação na fração de mascaramento ou em outra porção não AB do AA não é reduzida, e conjuga o agente para os tióis intercadeia no AB.

[00187] O acoplamento pode ser realizado por qualquer reação química que irá ligar as duas moléculas, desde que o anticorpo e a outra fração retenham suas respectivas atividades. Esta ligação pode incluir muitos mecanismos químicos, por exemplo, ligação covalente, ligação por afinidade, intercalação, ligação coordenada e complexação. Em algumas modalidades, a ligação é, no entanto, ligação covalente. A ligação covalente pode ser alcançada por condensação direta das cadeias laterais existentes ou pela incorporação de moléculas de ponte externas. Muitos agentes de ligação bivalentes ou polivalentes são úteis no acoplamento de moléculas de proteínas, tais como os anticorpos da presente divulgação, a outras moléculas. Por exemplo, agentes de acoplamento representativos podem incluir compostos

orgânicos, tais como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldeído, diazobenzenos e hexametileno diaminas. Esta listagem não tem a intenção de ser exaustiva das várias classes de agentes de acoplamento conhecidos na técnica, mas, em vez disso, é um exemplo dos agentes de acoplamento mais comuns. (Ver Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); e Vitetta et al., Science 238:1098 (1987).

[00188] Em algumas modalidades, além das composições e métodos fornecidos neste documento, o AA conjugado também pode ser modificado para conjugação específica do local através de sequências de aminoácidos modificadas inseridas ou, de outro modo, incluídas na sequência de AA. Estas sequências de aminoácidos modificadas são projetadas para permitir a colocação controlada e/ou dosagem do agente conjugado dentro de um anticorpo ativável conjugado. Por exemplo, o AA pode ser projetado para incluir substituições de cisteína em posições nas cadeias leves e pesadas que fornecem grupos tiol reativos e não impactam negativamente a dobragem e montagem de proteínas, nem alteram a ligação ao antígeno. Em algumas modalidades, o AA pode ser manipulado para incluir ou de outra forma introduzir um ou mais resíduos de aminoácidos não naturais dentro do AA para fornecer sítios adequados para conjugação. Em algumas modalidades, o AA pode ser manipulado para incluir ou de outra forma introduzir sequências peptídicas ativáveis enzimaticamente dentro da sequência AA.

[00189] Os ligadores adequados são descritos na literatura. (Ver, *por exemplo*, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984), que descreve o uso de MBS (M-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida éster). Ver *também*, Patente U.S. n.º 5.030.719, que descreve o uso de um derivado de acetil hidrazida halogenado acoplado a um anticorpo por meio de um ligante de oligopeptídeo. Em algumas modalidades, ligantes adequados incluem: (i) EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) cloridrato de carbodiimida; (ii) SMPT (4-

succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio) propionamido]hexanoato (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6[3-(2-piridilditio)propianamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); e (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfossuccinimida: Pierce Chem. Co., Cat. # 24510) conjugado a EDC. Ligantes adicionais incluem, entre outros, SMCC ((succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato), sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato), SPDB (N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato) ou sulfo-SPDB (N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo butanoato).

[00190] Os ligantes descritos acima contêm componentes que têm atributos diferentes, levando assim a conjugados com propriedades físico-químicas diferentes. Por exemplo, os ésteres sulfo-NHS de carboxilatos de alquil são mais estáveis do que os ésteres sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Os ligantes contendo éster NHS são menos solúveis do que os ésteres sulfo-NHS. Além disso, o ligante SMPT contém uma ligação dissulfeto estericamente impedida e pode formar conjugados com estabilidade aumentada. As ligações dissulfeto são, em geral, menos estáveis do que outras ligações porque a ligação dissulfeto é clivada *in vitro*, resultando em menos conjugado disponível. Sulfo-NHS, em particular, pode aumentar a estabilidade de acoplamentos de carbodimida. Os acoplamentos de carbodimida (como EDC), quando usados em conjunto com o sulfo-NHS, formam ésteres que são mais resistentes à hidrólise do que a reação de acoplamento de carbodimida sozinha. Em uma modalidade exemplificativa, o ligante é SPDB. Em outra modalidade exemplificativa, o ligante é o agente SPDB é DM4.

[00191] Em algumas modalidades, os ligantes são cliváveis. Em algumas modalidades, os ligantes são não cliváveis. Em algumas modalidades, dois ou mais ligantes estão presentes. Os dois ou mais ligantes são todos iguais, isto é, cliváveis ou não cliváveis, ou os dois ou mais ligantes são

diferentes, isto é, pelo menos um clivável e pelo menos um não clivável.

[00192] A presente divulgação utiliza vários métodos para ligar agentes a ABs: (a) ligação às frações de carboidrato do AB, ou (b) ligação a grupos sulfidril do AB, ou (c) ligação a grupos amino do AB, ou (d) ligação a grupos carboxilato do AB. De acordo com a divulgação, os ABs podem ser covalentemente ligados a um agente por meio de um ligante intermediário com pelo menos dois grupos reativos, um para reagir com AB e um para reagir com o agente. O ligante, que pode incluir qualquer composto orgânico compatível, pode ser escolhido de modo que a reação com AB (ou agente) não afete adversamente a reatividade e seletividade AB. Além disso, a ligação do ligante ao agente pode não destruir a atividade do agente. Ligantes adequados para reação com anticorpos oxidados ou fragmentos de anticorpos oxidados incluem aqueles que contêm uma amina selecionada do grupo que consiste em grupos de amina primária, amina secundária, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, fenil-hidrazina, semicarbazida e tiosemicarbazida. Tais grupos funcionais reativos podem existir como parte da estrutura do ligante, ou podem ser introduzidos por modificação química adequada de ligantes que não contêm tais grupos.

[00193] De acordo com a presente divulgação, ligantes adequados para ligação a ABs reduzidos incluem aqueles que têm certos grupos reativos capazes de reação com um grupo sulfidril de um anticorpo ou fragmento reduzido. Esses grupos reativos incluem, mas não estão limitados a: grupos haloalquil reativos (incluindo, por exemplo, grupos haloacetil), grupos p-mercuribenzoato e grupos capazes de reações de adição do tipo Michael (incluindo, por exemplo, maleimidas e grupos do tipo descrito por Mitra e Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

[00194] De acordo com a presente divulgação, ligantes adequados para ligação a ABs nem oxidados nem reduzidos incluem aqueles que têm certos grupos funcionais capazes de reação com os grupos amino primários presentes em resíduos de lisina não modificados no Ab. Esses grupos reativos

incluem, mas não estão limitados a, NHS carboxílicos ou ésteres carbônicos, sulfo-NHS carboxílicos ou ésteres carbônicos, 4-nitrofenil carboxílicos ou ésteres carbônicos, pentafluorofenil carboxílicos ou ésteres carbônicos, acil imidazoles, isocianatos e isotiocianatos.

[00195] De acordo com a presente divulgação, ligantes adequados para ligação a Abs nem oxidados nem reduzidos incluem aqueles que têm certos grupos funcionais capazes de reação com os grupos de ácido carboxílico presentes em resíduos de aspartato ou glutamato no Ab, que foram ativados com reagentes adequados. Reagentes de ativação adequados incluem EDC, com ou sem NHS ou sulfo-NHS adicionado, e outros agentes desidratantes utilizados para a formação de carboxamida. Nestes casos, os grupos funcionais presentes nos ligantes adequados incluiriam aminas primárias e secundárias, hidrazinas, hidroxilaminas e hidrazidas.

[00196] O agente pode ser conectado ao ligante antes ou depois do ligante ser conectado ao AB. Em certas aplicações, pode ser desejável produzir primeiro um intermediário de ligante AB em que o ligante está livre de um agente associado. Dependendo da aplicação particular, um agente específico pode então ser covalentemente ligado ao ligante. Em algumas modalidades, o AB é primeiro conectado à MM, CM e ligantes associados e depois conectados ao ligante para fins de conjugação.

[00197] *Ligantes ramificados*: Em modalidades específicas, são utilizados ligantes ramificados que têm vários sítios para conexão de agentes. Para ligantes de sítios múltiplos, uma única ligação covalente a um AB resultaria em um intermediário de ligante AB capaz de ligar um agente em um número de sítios. Os sítios podem ser grupos aldeído ou sulfidril ou qualquer sítio químico ao qual os agentes podem ser conectados.

[00198] Em algumas modalidades, a atividade específica mais alta (ou a razão maior de agentes para AB) pode ser alcançada pela ligação de um ligante de sítio único em uma pluralidade de sítios no AB. Esta pluralidade de

sítios pode ser introduzida no AB por qualquer um dentre dois métodos. Primeiro, pode-se gerar vários grupos aldeído e/ou grupos sulfidril no mesmo AB. Segundo, pode-se ligar a um aldeído ou sulfidril do AB um "ligante ramificado" com múltiplos sítios funcionais para subsequente ligação aos ligantes. Os sítios funcionais do ligante ramificado ou ligante de sítios múltiplos podem ser grupos aldeído ou sulfidril, ou podem ser qualquer sítio químico ao qual os ligantes podem ser ligados. Atividades específicas ainda mais altas podem ser obtidas combinando essas duas abordagens, ou seja, conectando ligantes de sítios múltiplos em vários sítios no AB.

[00199] *Ligantes cliváveis*: ligantes peptídicos que são suscetíveis à clivagem por enzimas do sistema de complemento, tal como, mas não se limitado ao ativador de u-plasminogênio, ativador de plasminogênio tecidual, tripsina, plasmina ou outra enzima que tem atividade proteolítica, podem ser usados em uma modalidade da presente divulgação. De acordo com um método da presente divulgação, um agente é conectado por meio de um ligante suscetível a clivagem por complemento. O anticorpo é selecionado de uma classe que pode ativar o complemento. O conjugado de agente de anticorpo, portanto, ativa a cascata do complemento e libera o agente no sítio alvo. De acordo com outro método da presente divulgação, um agente é conectado por meio de um ligante suscetível à clivagem por enzimas com uma atividade proteolítica, como um ativador de u-plasminogênio, um ativador de plasminogênio tecidual, plasmina ou tripsina. Esses ligantes cliváveis são úteis em AAs conjugados que incluem uma toxina extracelular, *por exemplo*, a título de exemplo não limitativo, qualquer uma das toxinas extracelulares mostradas na Tabela 1.

[00200] Exemplos não limitativos de sequências de ligantes cliváveis são fornecidos na Tabela 2.

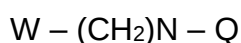
Tabela 2: Sequências Ligantes para Conjugação Exemplificativas

Tipos de Sequências Cliváveis	Sequência de Aminoácidos
<u>Sequências cliváveis de plasmina</u>	
Pró-uroquinase	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 89)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 90)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 91)
Plasminogênio	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 92)
Estafilocinase	SSSFDKGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 93)
	SSSFDKGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 94)
<u>Sequências Cliváveis do Fator Xa</u>	IEGR (SEQ ID NO: 95)
	IDGR (SEQ ID NO: 96)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 97)
<u>Sequências Cliváveis de MMP</u>	
Gelatinase A	PLGLWA (SEQ ID NO: 98)
<u>Sequências cliváveis de collagenase</u>	
Colágeno da pele da panturrilha (cadeia α1 (I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 99)
Colágeno da pele da panturrilha (cadeia α2 (I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 100)
Colágeno da cartilagem bovina (cadeia α1 (II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 101)
Colágeno do fígado humano (cadeia α1(III))	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 102)
α ₂ M humano	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 103)
PZP humano	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 104)
	AGLGVVER (SEQ ID NO: 105)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 106)
α ₁ M de camundongo	EPQALAMS (SEQ ID NO: 107)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 108)
α ₂ M de camundongo	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 109)

	MDAFLESS (SEQ ID NO: 110)
α_1I_3 (2J) de camundongo	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 111)
α_1I_3 (27J) de camundongo	SAPAVESE (SEQ ID NO: 112)
Colagenase de fibroblasto humano	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 113)
<u>(clivagens autolíticas)</u>	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 114)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 115)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 116)

[00201] Além disso, os agentes podem ser ligados por meio de ligações dissulfeto (por exemplo, as ligações dissulfeto em uma molécula de cisteína) ao AB. Uma vez que muitos tumores liberam naturalmente altos níveis de glutathione (um agente redutor), isso pode reduzir as ligações dissulfeto com a liberação subsequente do agente no local de distribuição. Em algumas modalidades, o agente redutor que modificaria uma CM também modificaria o ligante do anticorpo ativável conjugado.

[00202] *Espaçadores e Elementos Cliváveis*: Em algumas modalidades, pode ser necessário construir o ligante de maneira a otimizar o espaçamento entre o agente e o AB do anticorpo ativável. Isso pode ser realizado pelo uso de um ligante de estrutura geral:



em que

W é --NH--CH₂-- ou --CH₂--;

Q é um aminoácido, peptídeo; e

n é um número inteiro de 0 a 20.

[00203] Em algumas modalidades, o ligante pode compreender um elemento espaçador e um elemento clivável. O elemento espaçador serve para posicionar o elemento clivável longe do núcleo do AB de modo que o elemento clivável seja mais acessível para a enzima responsável pela clivagem. Alguns dos ligantes ramificados descritos acima podem servir como elementos espaçadores.

[00204] Ao longo desta discussão, deve ser entendido que a ligação do ligante ao agente (ou do elemento espaçador ao elemento clivável, ou do elemento clivável ao agente) não precisa ser um modo particular de ligação ou reação. Qualquer reação que forneça um produto de estabilidade e compatibilidade biológica adequadas é aceitável.

[00205] *Complemento Sérico e Seleção de Ligantes*: De acordo com um método da presente divulgação, quando se deseja a liberação de um agente, é utilizado um AB que é um anticorpo de uma classe que pode ativar o complemento. O conjugado resultante retém a capacidade de ligar o antígeno e ativar a cascata do complemento. Assim, de acordo com esta modalidade da presente divulgação, um agente é unido a uma extremidade do ligante clivável ou elemento clivável e a outra extremidade do grupo de ligante é conectada a um sítio específico no AB. Por exemplo, se o agente tiver um grupo hidroxil ou um grupo amino, ele pode ser ligado ao terminal carboxil de um peptídeo, aminoácido ou outro ligante escolhido adequadamente através de uma ligação éster ou amida, respectivamente. Por exemplo, tais agentes podem ser ligados ao peptídeo de ligação por meio de uma reação de carbodimida. Se o agente contém grupos funcionais que iriam interferir com a ligação ao ligante, esses grupos funcionais interferentes podem ser bloqueados antes da ligação e desbloqueados uma vez que o produto conjugado ou intermediário esteja feito. O terminal oposto ou amino do ligante é então usado diretamente ou após modificação adicional para ligação a um AB que é capaz de ativar o complemento.

[00206] Os ligantes (ou elementos espaçadores dos ligantes) podem ter qualquer comprimento desejado, uma das extremidades dos quais pode ser covalentemente conectada a sítios específicos no AB do anticorpo ativável. A outra extremidade do ligante ou elemento espaçador pode ser conectada a um aminoácido ou peptídeo de ligação.

[00207] Assim, quando esses conjugados se ligam ao antígeno na

presença de complemento, a ligação amida ou éster que conecta o agente ao ligante será clivada, resultando na liberação do agente em sua forma ativa. Esses conjugados, quando administrados a um sujeito, realizarão a entrega e a liberação do agente no local alvo e são particularmente eficazes para a entrega in vivo de agentes farmacêuticos, antibióticos, antimetabólitos, agentes antiproliferativos e similares, conforme apresentado, mas não limitado àquelas da Tabela 1.

[00208] *Ligantes para Liberação sem Ativação do Complemento*: Ainda em outra aplicação de entrega direcionada, a liberação do agente sem ativação do complemento é desejada um vez que a ativação da cascata do complemento acabará por lisar a célula alvo. Portanto, esta abordagem é útil quando a distribuição e a liberação do agente devem ser realizadas sem matar a célula alvo. Esse é o objetivo quando a distribuição de mediadores celulares, como hormônios, enzimas, corticosteroides, neurotransmissores, genes ou enzimas para células alvo é desejada. Estes conjugados podem ser preparados ligando o agente a um AB que não é capaz de ativar o complemento por meio de um ligante que é levemente suscetível à clivagem por proteases séricas. Quando este conjugado for administrado a um indivíduo, complexos antígeno-anticorpo se formarão rapidamente, enquanto a clivagem do agente ocorrerá lentamente, resultando assim na liberação do composto no sítio alvo.

[00209] *Reticuladores bioquímicos*: Em algumas modalidades, o AA pode ser conjugado com um ou mais agentes terapêuticos usando certos reticuladores bioquímicos. Os reagentes de reticulação formam pontes moleculares que unem grupos funcionais de duas moléculas diferentes. Para ligar duas proteínas diferentes em etapas, reticuladores hetero-bifuncionais podem ser usados para eliminar a formação de homopolímero indesejado.

[00210] Os ligantes peptídil cliváveis por proteases lisossomais também são úteis, por exemplo, Val-Cit, Val-Ala ou outros dipeptídeos. Além

disso, ligantes ácido-lábeis cliváveis no ambiente de baixo pH do lisossoma podem ser usados, por exemplo: éter bis-sialílico. Outros ligantes adequados incluem substratos capsina-lábeis, particularmente aqueles que mostram função ideal em um pH ácido.

[00211] Reticuladores hetero-bifuncionais exemplificativos são referenciados na Tabela 3.

Tabela 3: Reticuladores hetero-bifuncionais exemplificativos

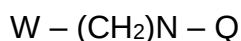
<u>RETICULADORES HETERO-BIFUNCIONAIS</u>			
Ligante	Reativo em relação a	Vantagens e Aplicações	Comprimento do Braço Espaçador após reticulação (Angstroms)
SMPT	Aminas primárias	Maior estabilidade	11,2 Å
	Sulfidrils		
SPDP	Aminas primárias	Tiolação	6,8 Å
	Sulfidrils	Reticulação clivável	
LC-SPDP	Aminas primárias	Braço espaçador estendido	15,6 Å
	Sulfidrils		
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primárias	Braço espaçador extensor	15,6 Å
	Sulfidrils	Solúvel em água	
SMCC	Aminas primárias	Grupo reativo maleimida estável	11,6 Å
	Sulfidrils	Conjugação enzima-anticorpo	
		Conjugação de	

		proteína carregadora de hapteno	
Sulfo-SMCC	Aminas primárias	Grupo reativo maleimida estável	11,6 Å
	Sulfidrils	Solúvel em água	
		Conjugação enzima-anticorpo	
MBS	Aminas primárias	Conjugação enzima-anticorpo	9,9 Å
	Sulfidrils	Conjugação de proteína carregadora de hapteno	
Sulfo-MBS	Aminas primárias	Solúvel em água	9,9 Å
	Sulfidrils		
SIAB	Aminas primárias	Conjugação enzima-anticorpo	10,6 Å
	Sulfidrils		
Sulfo-SIAB	Aminas primárias	Solúvel em água	10,6 Å
	Sulfidrils		
SMPB	Aminas primárias	Braço espaçador estendido	14,5 Å
	Sulfidrils	Conjugação enzima-anticorpo	
Sulfo-SMPB	Aminas primárias	Braço espaçador estendido	14,5 Å
	Sulfidrils	Solúvel em água	
EDE/Sulfo-NHS	Aminas primárias	Conjugação carregadora de hapteno	0

	Grupos carboxil		
ABH	Carboidratos	Reage com grupos de açúcar	11,9 Å
	Não seletivo		

[00212] *Ligantes Não Cliváveis ou Conexão Direta*: Em algumas modalidades da divulgação, o conjugado pode ser projetado para que o agente seja entregue ao alvo, mas não liberado. Isso pode ser realizado ligando um agente a um AB diretamente ou por meio de um ligante não clivável.

[00213] Estes ligantes não cliváveis podem incluir aminoácidos, peptídeos, D-aminoácidos ou outros compostos orgânicos que podem ser modificados para incluir grupos funcionais que podem ser subsequentemente utilizados na ligação a ABs pelos métodos descritos neste documento. Uma fórmula geral para tal ligante orgânico poderia ser



em que

W é --NH--CH₂-- ou --CH₂--;

Q é um aminoácido, peptídeo; e

n é um número inteiro de 0 a 20.

[00214] *Conjugados Não Cliváveis*: Em algumas modalidades, um composto pode ser conectado aos ABs que não ativam o complemento. Ao usar ABs que são incapazes de ativação do complemento, esta ligação pode ser realizada usando ligantes que são suscetíveis à clivagem por complemento ativado ou usando ligantes que não são suscetíveis à clivagem por complemento ativado.

[00215] Os anticorpos divulgados neste documento também podem ser formulados como imunolipossomas. Os lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); e Patente U.S. N^os. 4,485,045 e

4,544,545. Lipossomas com tempo de circulação potencializado são divulgados na Patente U.S. nº 5.013.556.

[00216] Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivatizada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudados através de filtros de tamanho de poro definido para render lipossomas com o diâmetro desejado. Os fragmentos Fab' do anticorpo da presente divulgação podem ser conjugados aos lipossomas conforme descrito em Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) através de uma reação de intercâmbio de dissulfureto.

Anticorpos Ativáveis Multiespecíficos

[00217] Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou anticorpo ativável conjugado anti-CD166 é monoespecífico.

[00218] A divulgação também fornece anticorpos ativáveis anti-CD166 multiespecíficos. Por conseguinte, em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou anticorpo ativável conjugado anti-CD166 é multiespecífico, *por exemplo*, a título de exemplo não limitativo, biespecífico ou trifuncional. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou anticorpo ativável conjugado anti-CD166 é formulado como parte de uma molécula pró-biespecífica T Cell Engager (BITE). Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou anticorpo ativável conjugado anti-CD166 é formulado como parte de uma célula T modificada pelo receptor de antígeno pró-quimérico (CAR) ou outro receptor manipulado.

[00219] Em algumas modalidades, o AA ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é incorporado em um AA multiespecífico ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que pelo menos um braço do AA multiespecífico se liga especificamente ao CD166. Em algumas modalidades, o AA ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é incorporado em um anticorpo biespecífico ou seu fragmento de ligação ao antígeno, em que pelo

menos um braço do AA biespecífico liga especificamente o CD166.

[00220] Os AAs multiespecíficos fornecidos neste documento são anticorpos multiespecíficos que reconhecem CD166 e pelo menos um ou mais antígenos ou epítomos diferentes e que incluem pelo menos uma fração de mascaramento (MM) ligada a pelo menos um domínio de ligação ao antígeno ou epítomo do anticorpo multiespecífico, de modo que o acoplamento da MM reduz a capacidade do domínio de ligação ao antígeno ou ao epítomo de se ligar ao seu alvo. Em algumas modalidades, o MM é acoplado ao domínio de ligação ao antígeno ou epítomo do anticorpo multiespecífico por meio de uma fração clivável (CM) que funciona como um substrato para pelo menos uma protease. Os anticorpos multiespecíficos ativáveis fornecidos neste documento são estáveis em circulação, ativados nos locais pretendidos de terapia e/ou diagnóstico, mas não em tecidos normais, *ou seja*, em tecido saudável e, quando ativados, exibem ligação a um alvo que é pelo menos comparável ao anticorpo multiespecífico correspondente não modificado.

[00221] Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos são projetados para envolver células efetoras imunes, também referidos neste documento como anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem células efetoras imunes. Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos são projetados para envolver leucócitos, também referidos neste documento como anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem leucócitos. Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos são projetados para envolver células T, também referidos neste documento como anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem células T. Em algumas modalidades, os AA multiespecíficos envolvem um antígeno de superfície em um leucócito, como em uma célula T, em uma célula natural killer (NK), em uma célula mononuclear mielóide, em um macrófago e/ou em outra célula efetora do sistema imunológico. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é um leucócito. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é uma célula T. Em algumas modalidades, a célula

efetora imune é uma célula NK. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é uma célula mononuclear, como uma célula mononuclear mieloide. Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos são projetados para se ligar ou interagir de outra forma com mais de um alvo e/ou mais de um epítipo, também referidos neste documento como anticorpos ativáveis para direcionamento de antígenos múltiplos. Conforme usado neste documento, os termos "alvo" e "antígeno" são usados indistintamente.

[00222] Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos que envolvem células efetoras imunes da divulgação incluem um anticorpo de direcionamento ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga a CD166 e um anticorpo que envolve as células efetoras imunes ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que pelo menos um dos anticorpos direcionados ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e/ou o anticorpo que envolve células efetoras imunes ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo está mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células efetoras imunes ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células efetoras imunes, em que o AB1 está ligado a uma fração de mascaramento (MM1) de modo que o acoplamento da MM1 reduza a capacidade do AB1 de se ligar ao primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo de direcionamento ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um segundo anticorpo ou fragmento do mesmo que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) do mesmo que se liga ao CD166, em que o AB2 está conectado a uma fração de mascaramento (MM2) de modo que o acoplamento da MM2 reduza a capacidade do AB2 de se ligar ao CD166. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células efetoras imunes ou fragmento de ligação ao antígeno da mesma inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) do mesmo que liga um primeiro alvo que envolve células efetoras imunes, em que o AB1 está conectado a uma fração de

mascamamento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduza a capacidade do AB1 de se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um segundo anticorpo ou fragmento do mesmo que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) do mesmo que liga CD166, em que o AB2 está ligado a uma fração de mascaramento (MM2), de modo que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 de ligar o CD166. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células efetoras não imunes é um anticorpo direcionado ao câncer. Em algumas modalidades, o anticorpo efetor de células não imunes é uma IgG. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células efetoras imunes é um scFv. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado a CD166 (por exemplo, anticorpo efetor de células não imunes) é uma IgG e o anticorpo que envolve células efetoras imunes é um scFv. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é um leucócito. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é uma célula T. Em algumas modalidades, a célula efetora imune é uma célula NK. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é uma célula mononuclear mieloide.

[00223] Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos que envolvem a célula T da divulgação incluem um anticorpo direcionado a CD166 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e um anticorpo que envolve células T ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo, em que pelo menos um dos anticorpos direcionados a CD166 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e/ou o anticorpo que envolve a célula T ou a porção de ligação ao antígeno do mesmo é mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células T ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células T, onde o AB1 está conectado a uma fração de mascaramento (MM1) de modo que o acoplamento da MM1 reduza a capacidade do AB1 de se ligar ao primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo de direcionamento ou fragmento de

ligação ao antígeno do mesmo inclui um segundo anticorpo ou fragmento do mesmo que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) do mesmo que se liga ao CD166, em que o AB2 está conectado a uma fração de mascaramento (MM2) de modo que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 de se ligar ao CD166. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve a célula T ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) do mesmo que liga um primeiro alvo de envolvimento da célula T, em que o AB1 está conectado a uma fração de mascaramento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduza a capacidade do AB1 de se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo de direcionamento ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um segundo anticorpo ou fragmento do mesmo que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) do mesmo que se liga a CD166, em que o AB2 está conectado a uma fração de mascaramento (MM2), de modo que o acoplamento da MM2 reduza a capacidade do AB2 de se ligar o CD166.

[00224] Em algumas modalidades de um anticorpo ativável multiespecífico que envolve células efetoras imunológicas, um antígeno é CD166 e outro antígeno é tipicamente um receptor estimulador ou inibitório presente na superfície de uma célula T, célula natural killer (NK), célula mononuclear mieloide, macrófago e/ou outras células efetoras imunológicas, como, mas não se limitando a, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 ou VISTA. Em algumas modalidades, o antígeno é um receptor estimulador presente na superfície de uma célula T ou célula NK; exemplos de tais receptores estimuladores incluem, sem limitação, CD3, CD27, CD28, CD137 (também referido como 4-1BB), GITR, HVEM, ICOS, NKG2D e OX40. Em algumas modalidades, o antígeno é um receptor inibitório presente na superfície de uma célula T; exemplos de tais receptores inibitórios incluem, sem limitação, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 e

KIRs expressos por NK. O domínio de anticorpo que confere especificidade ao antígeno de superfície das células T também pode ser substituído por um ligante ou domínio de ligante que se liga a um receptor de células T, um receptor de células NK, um receptor de macrófagos e/ou outro receptor de células efectoras imunes, como, sem limitação, B7-1, B7-2, B7H3, PDL1, PDL2 ou TNFSF9.

[00225] Em algumas modalidades, o AA multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CD3 epsilon (CD3 ϵ , também referido neste documento como CD3e e CD3) e um anticorpo de direcionamento ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que pelo menos um dos scFv anti-CD3 ϵ e/ou o anticorpo direcionado ou a porção de ligação ao antígeno do mesmo são mascarados. Em algumas modalidades, o scFv CD3 ϵ inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB1) que se liga a CD3 ϵ , onde o AB1 está ligado a uma fração de mascaramento (MM1) de modo que o acoplamento da MM1 reduza a capacidade do AB1 de se ligar a CD3 ϵ . Em algumas modalidades, o anticorpo de direcionamento ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um segundo anticorpo ou fragmento do mesmo que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) do mesmo que se liga ao CD166, em que o AB2 está conectado a uma fração de mascaramento (MM2) de modo que o acoplamento da MM2 reduza a capacidade do AB2 de se ligar ao CD166. Em algumas modalidades, o scFv CD3 ϵ inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB1) que liga CD3 ϵ , em que o AB1 está conectado a uma fração de mascaramento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduza a capacidade do AB1 de se ligar ao CD3 ϵ , e o anticorpo de direcionamento ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo inclui um segundo anticorpo ou fragmento do mesmo que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) do mesmo que se liga CD166, em que o AB2 está conectado a uma fração de mascaramento (MM2), de modo que o acoplamento da MM2 reduza a capacidade do AB2 de se ligar o CD166.

[00226] Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados a múltiplos antígenos e/ou AAs direcionados a múltiplos antígenos incluem pelo menos um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga um primeiro alvo e/ou primeiro epítopo e um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que liga um segundo alvo e/ou um segundo epítopo. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados a múltiplos antígenos e/ou AAs direcionados a múltiplos antígenos ligam dois ou mais alvos diferentes. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados a múltiplos antígenos e/ou AAs direcionados a múltiplos antígenos ligam dois ou mais epítomos diferentes no mesmo alvo. Em algumas modalidades, os anticorpos de direcionamento a múltiplos antígenos e/ou AAs de direcionamento a múltiplos antígenos ligam uma combinação de dois ou mais alvos diferentes e dois ou mais epítomos diferentes no mesmo alvo.

[00227] Em algumas modalidades, um AA multiespecífico compreendendo uma IgG tem os domínios variáveis de IgG mascarados. Em algumas modalidades, um AA multiespecífico compreendendo um scFv tem os domínios scFv mascarados. Em algumas modalidades, um AA multiespecífico tem domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que pelo menos um dos domínios variáveis de IgG é acoplado a uma fração de mascaramento. Em algumas modalidades, um AA multiespecífico tem domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que pelo menos um dos domínios scFv é acoplado a uma fração de mascaramento. Em algumas modalidades, um AA multiespecífico tem domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que pelo menos um dos domínios variáveis de IgG é acoplado a uma fração de mascaramento e pelo menos um dos domínios de scFv é acoplado a uma fração de mascaramento. Em algumas modalidades, um AA multiespecífico tem domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que pelo menos um dos domínios variáveis de IgG e dos domínios scFv é acoplado a sua própria fração de mascaramento. Em algumas modalidades, um domínio de anticorpo de um AA multiespecífico

possui especificidade para um antígeno alvo e outro domínio de anticorpo possui especificidade para um antígeno de superfície de células T. Em algumas modalidades, um domínio de anticorpo de um AA multiespecífico possui especificidade para um antígeno alvo e outro domínio de anticorpo possui especificidade para outro antígeno alvo. Em algumas modalidades, um domínio de anticorpo de um AA multiespecífico tem especificidade para um epítopo de um antígeno alvo e outro domínio de anticorpo tem especificidade para outro epítopo do antígeno alvo.

[00228] Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fundido ao terminal carboxil da cadeia pesada de um anticorpo IgG ativável, ao terminal carboxil da cadeia leve de um anticorpo IgG ativável ou ao terminal carboxil de ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo IgG ativável. Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fundido ao terminal amino da cadeia pesada de um anticorpo IgG ativável, ao terminal amino da cadeia leve de um anticorpo IgG ativável ou ao terminal amino de ambas as cadeias pesada e leve de um anticorpo IgG ativável. Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fundido a qualquer combinação de um ou mais terminais carboxil e um ou mais terminais amino de um anticorpo IgG ativável. Em algumas modalidades, uma fração de mascaramento (MM) ligada a uma fração clivável (CM) é conectada e mascara um domínio de ligação ao antígeno da IgG. Em algumas modalidades, uma fração de mascaramento (MM) ligada a uma fração clivável (CM) é conectada e mascara um domínio de ligação ao antígeno de pelo menos um scFv. Em algumas modalidades, uma fração de mascaramento (MM) ligada a uma fração clivável (CM) é conectada e mascara um domínio de ligação ao antígeno de uma IgG e uma fração de mascaramento (MM) unida a uma fração clivável (CM) é conectada e mascara um domínio de ligação ao antígeno de pelo menos um scFv.

[00229] A divulgação fornece exemplos de estruturas AA multiespecíficas que incluem, mas não estão limitadas às seguintes: (VL-

$CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2$; $(VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH^*-L3-VL^*)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL^*-L3-VH^*)_2$; $(VL-CL)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL-CL)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$; ou $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ em que: VL e VH representam os domínios variáveis leves e pesados da primeira especificidade, contidos na IgG; VL* e VH* representam os domínios variáveis de segunda especificidade, contidos no scFv; L1 é um peptídeo ligante que conecta a fração de mascaramento (MM) e a CM (CM); L2 é um peptídeo de ligação que conecta a CM (CM) e o anticorpo; L3 é um peptídeo de ligação que conecta os domínios variáveis do scFv; L4 é um peptídeo de ligação que conecta o anticorpo da primeira especificidade ao anticorpo da segunda especificidade; CL é o

domínio constante da cadeia leve; e CH1, CH2, CH3 são os domínios constantes da cadeia pesada. A primeira e a segunda especificidades podem ser em relação a qualquer antígeno ou epítipo.

[00230] Em algumas modalidades de um anticorpo ativável multiespecífico que envolve a célula T, um antígeno é CD166 e outro antígeno é tipicamente um receptor estimulador (também referido no presente documento como ativando) ou inibitório presente na superfície de uma célula T, célula natural killer (NK), célula mononuclear mielóide, macrófago e/ou outras células efectoras imunológicas, tais como, mas não se limitando a B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137 (também referido como TNFRSF9), CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 ou VISTA. O domínio de anticorpo que confere especificidade ao antígeno de superfície das células T também pode ser substituído por um ligante ou domínio de ligante que se liga a um receptor de células T, um receptor de células NK, um receptor de macrófagos e/ou outro receptor de células efectoras imunes.

[00231] Em algumas modalidades, o anticorpo de direcionamento é um anticorpo anti-CD166 divulgado neste documento. Em algumas modalidades, o anticorpo de direcionamento pode estar na forma de um anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o(s) scFv(s) podem estar na forma de um Pro-scFv (ver, por exemplo, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

[00232] Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a CD3 ϵ e compreende ou é derivado de um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga a CD3 ϵ , por exemplo, CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHT1 ou V9. Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a CTLA-4 (também referido neste documento como CTLA e CTLA4).

[00233] Em algumas modalidades, o scFv anti-CTLA-4 inclui a sequência de aminoácidos:

scFv	Anti-CTLA-4
------	-------------

GGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ
SVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQ
LVQTGGGVVQPGRSLRLSCAAS
GSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS (SEQ ID
NO: 117)

[00234] Em algumas modalidades, o anti-CTLA-4 scFv inclui a sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 117.

[00235] Em algumas modalidades, o scFv anti-CD3 ϵ inclui a sequência de aminoácidos:

ScFv ϵ	anti-CD3
GGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS GYTFTRYTMHWVKQRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPK RWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFT FGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 118)	

[00236] Em algumas modalidades, o ϵ scFv anti-CD3 inclui a sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 118.

[00237] Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação de uma ou mais células T, uma ou mais células NK e/ou um ou mais macrófagos. Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a um alvo selecionado do grupo que consiste em B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM,

ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 ou VISTA.

[00238] Em algumas modalidades, o AA multiespecífico também inclui um agente conjugado ao AB. Em algumas modalidades, o agente é um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o agente é um agente antineoplásico. Em algumas modalidades, o agente é uma toxina ou um fragmento da mesma. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AA multiespecífico por meio de um ligante. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB por meio de um ligante clivável. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante não clivável. Em algumas modalidades, o agente é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o agente é um agente que danifica ácidos nucleicos, como um alquilador de DNA ou intercalador de DNA ou outro agente que danifica o DNA. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante clivável. Em algumas modalidades, o agente é um agente selecionado do grupo listado na Tabela 1. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoide. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou um derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrolobenzodiazepina. Em algumas modalidades, o agente é um dímero de pirrolobenzodiazepina.

[00239] Em algumas modalidades, o AA multiespecífico também inclui uma fração detectável. Em algumas modalidades, a fração detectável é um agente de diagnóstico.

[00240] Em algumas modalidades, o AA multiespecífico contém naturalmente uma ou mais ligações dissulfeto. Em algumas modalidades, o AA

multiespecífico pode ser manipulado para incluir uma ou mais ligações dissulfeto.

[00241] A divulgação também fornece uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um AA multiespecífico descrito neste documento, bem como vetores que incluem essas sequências isoladas de ácido nucleico. A divulgação fornece métodos para produzir um AA multiespecífico cultivando uma célula sob condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que a célula compreende essa molécula de ácido nucleico. Em algumas modalidades, a célula compreende esse vetor.

[00242] A divulgação também fornece um método de fabricação de AAs multiespecíficos da divulgação por (a) cultura de uma célula compreendendo uma construção de ácido nucleico que codifica o AA multiespecífico sob condições que levam à expressão do ativável multiespecífico e (b) recuperação do anticorpo ativável multiespecífico. AB, MM e/ou CM adequados incluem qualquer um dos AB, MM e/ou CM divulgados neste documento.

[00243] A divulgação também fornece AAs multiespecíficos e/ou composições de AA multiespecíficas que incluem pelo menos um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) do mesmo que se liga especificamente a um primeiro alvo ou primeiro epítipo e um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) do mesmo que liga um segundo alvo ou um segundo epítipo, em que pelo menos AB1 é acoplado ou de outro modo conectado a uma fração de mascaramento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade de AB1 de ligar seu alvo. Em algumas modalidades, a MM1 é acoplada ao AB1 por meio de uma sequência da primeira fração clivável (CM1) que inclui um substrato para uma protease, por exemplo, uma protease que é co-localizada com o alvo de AB1 em um sítio de tratamento ou em um sítio de diagnóstico em um sujeito. Os AAs multiespecíficos fornecidos neste documento são estáveis em circulação,

ativados nos sítios pretendidos de terapia e/ou diagnóstico, mas não no tecido normal, isto é, tecido saudável e, quando ativados, exibem ligação ao alvo de AB1 que é pelo menos comparável ao anticorpo multiespecífico não modificado correspondente. AB, MM e/ou CM adequados incluem qualquer um dos AB, MM e/ou CM divulgados neste documento.

[00244] A divulgação também fornece composições e métodos que incluem um AA multiespecífico que inclui pelo menos um primeiro anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB1) que se liga especificamente a um alvo e um segundo anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB2), em que pelo menos o primeiro AB no AA multiespecífico é acoplado a uma fração de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 de se ligar ao seu alvo. Em algumas modalidades, cada AB é acoplado a uma MM que diminui a capacidade de seu AB correspondente para cada alvo. Por exemplo, em modalidades de AA biespecíficas, AB1 é acoplado a uma primeira fração de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 de se ligar ao seu alvo, e AB2 é acoplado a uma segunda fração de mascaramento (MM2) que diminui a capacidade de AB2 de se ligar ao seu alvo. Em algumas modalidades, o AA multiespecífico compreende mais de duas regiões AB; em tais modalidades, AB1 é acoplado a uma primeira fração de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 de se ligar ao seu alvo, AB2 é acoplado a uma segunda fração de mascaramento (MM2) que diminui a capacidade de AB2 de se ligar ao seu alvo, AB3 é acoplado a uma terceira fração de mascaramento (MM3) que diminui a capacidade de AB3 de se ligar ao seu alvo e assim por diante para cada AB no anticorpo ativável multiespecífico. AB, MM e/ou CM adequados incluem qualquer um dos AB, MM e/ou CM divulgados neste documento.

[00245] Em algumas modalidades, o AA multiespecífico inclui adicionalmente pelo menos uma fração clivável (CM) que é um substrato para uma protease, em que a CM liga uma MM a um AB. Por exemplo, em algumas modalidades, o AA multiespecífico inclui pelo menos um primeiro anticorpo ou

fragmento de anticorpo (AB1) que se liga especificamente a um alvo e um segundo anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB2), em que pelo menos o primeiro AB no AA multiespecífico é acoplado por meio de uma primeira fração clivável (CM1) a uma fração de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 de se ligar ao seu alvo. Em algumas modalidades de AA biespecíficos, AB1 é acoplado por meio do CM1 a MM1 e AB2 é acoplado através de uma segunda fração clivável (CM2) a uma segunda fração de mascaramento (MM2) que diminui a capacidade de AB2 de se ligar ao seu alvo. Em algumas modalidades, o AA multiespecífico compreende mais de duas regiões AB; em algumas dessas modalidades, AB1 é acoplado por meio de CM1 a MM1, AB2 é acoplado por meio de CM2 a MM2 e AB3 é acoplado através de uma terceira fração clivável (CM3) a uma terceira fração de mascaramento (MM3) que diminui a capacidade de AB3 de se ligar ao seu alvo e assim por diante para cada AB no anticorpo ativável multiespecífico. AB, MM e/ou CM adequados incluem qualquer um dos AB, MM e/ou CM divulgados neste documento.

Anticorpos Ativáveis com Frações Estéricas Não Ligantes ou Parceiros de Ligação para Frações Estéricas Não Ligantes

[00246] A divulgação também fornece AAs que incluem frações estéricas não ligantes (NB) ou parceiros de ligação (BP) para frações estéricas não ligantes, em que a BP recruta ou de outra forma atrai o NB ao anticorpo ativável. Os AAs fornecidos neste documento incluem, por exemplo, um AA que inclui uma fração estérica não ligante (NB), um ligante clivável (CL) e anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB) que se liga a um alvo; um AA que inclui um parceiro de ligação para uma fração estérica não ligante (BP), um CL e um AB; e um AA que inclui um BP no qual um NB foi recrutado, um CL e um AB que se liga ao alvo. Os AAs nos quais o NB está covalentemente ligado ao CL e AB do AA ou está associado pela interação com uma BP que está covalentemente ligada ao CL e AB do AA são referidos neste documento como "anticorpos ativáveis que contêm NB". Por ativável ou comutável entende-se

que o AA exibe um primeiro nível de ligação a um alvo quando o AA está em um estado inibido, mascarado ou não clivado (*ou seja*, uma primeira conformação) e um segundo nível de ligação ao alvo quando o AA está em um estado não inibido, não mascarado e/ou clivado (*isto é*, uma segunda conformação, *isto é*, anticorpo ativado), onde o segundo nível de ligação ao alvo é maior que o primeiro nível de ligação ao alvo. As composições de AA podem exibir biodisponibilidade aumentada e biodistribuição mais favorável em comparação com a terapêutica de anticorpos convencional.

[00247] Em algumas modalidades, os AAs fornecem toxicidade e/ou efeitos colaterais adversos reduzidos que poderiam, de outro modo, resultar da ligação dos AAs nos locais de não tratamento e/ou locais não diagnósticos se o AB não fosse mascarado ou, de outro modo, inibido de se ligar a este sítio.

[00248] Os AAs anti-CD166 que incluem uma fração estérica não ligante (NB) podem ser produzidos usando os métodos estabelecidos na Publicação PCT Nº WO 2013/192546, cujo conteúdo é incorporado neste documento por referência em sua totalidade.

Produção de Anticorpos Ativáveis

[00249] A divulgação também fornece métodos de produção de um polipeptídeo de anticorpo anti-CD166 ativável por cultura de uma célula em condições que levam à expressão do polipeptídeo, em que a célula compreende uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um anticorpo e/ou um AA descrito neste documento e/ou vetores que incluem essas sequências isoladas de ácido nucleico. A divulgação fornece métodos de produção de um anticorpo e/ou AA cultivando uma célula sob condições que levam à expressão do anticorpo e/ou anticorpo ativável, em que a célula compreende uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um anticorpo e/ou um AA descrito neste documento e/ou vetores que incluem essas sequências isoladas de ácido nucleico.

[00250] A invenção também fornece um método de fabricação de

AAs que em um estado ativado se liga a CD166 (a) cultivando uma célula compreendendo um construto de ácido nucleico que codifica o AA sob condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que o AA compreende uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) e um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste (AB) que se liga especificamente a CD166, (i) em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease; e (ii) em que a CM está posicionada no AA de modo que, quando o AA está em um estado não clivado, a MM interfere na ligação específica do AB ao CD166 e, no estado clivado, o MM não interfere ou compete com a ligação específica do AB para CD166; e (b) recuperar o anticorpo ativável. AB, MM e/ou CM adequados incluem qualquer um dos AB, MM e/ou CM divulgados neste documento.

[00251] As seguintes sequências nucleotídicas exemplificativas são fornecidas para uso na fabricação e uso dos AAs e AAs conjugados fornecidos neste documento. Também são fornecidas sequências nucleotídicas que são pelo menos 90%, 95% ou mesmo 99% homólogas às sequências nucleotídicas fornecidas abaixo.

SEQ ID NO: 241 Codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 239

Cadeia Pesada α CD166 Humana (HuCD166_HcC) - Sequência nucleotídica
 CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTGAAACCCACCCAGAC
 CCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACGGCA
 TGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCT
 GGCCAACATCTGGTGGTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCAGCCTGAAGT
 CCCGGCTGACCATCACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGCTGACA
 ATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGTGCAGAT
 CGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCTACTGGGGCCAGGGCACACTG
 GTGACAGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGC
 CCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTG

GTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAAGTCTGGCGC
 CCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGC
 CTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGG
 ACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCC
 TGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCC
 AAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG
 TGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAAC
 AGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT
 GCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGC
 GAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAA
 TCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCG
 CCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCAC
 CCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGA
 CCGTGGAACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGT
 GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGA
 GCCCCGGCAAG

SEQ ID NO: 481 Codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480

Cadeia Pesada α CD166 Humana (HuCD166_HcC) - Sequência nucleotídica de Des-HC

CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTGAAACCCACCCAGAC
 CCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACGGCA
 TGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCT
 GGCCAACATCTGGTGGTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCAGCCTGAAGT
 CCCGGCTGACCATCACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGTGACA

ATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGCGTGCAGAT
 CGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCTACTGGGGCCAGGGCACACTG
 GTGACAGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGC
 CCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTG
 GTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGC
 CCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGC
 CTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGG
 ACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCC
 TGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCC
 AAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCG
 TGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAAC
 AGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
 GACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCT
 GCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGC
 GAGCCTCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAA
 TCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCG
 CCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCAC
 CCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGA
 CCGTGGAACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGT
 GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGA
 GCCCCGGC

SEQ ID NO: 247 Codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 246

Cadeia leve de α CD166 Humana (espaçador-MM-LP1-CM-LP2-Ab)

[espaçador (SEQ ID NO: 319)] [huCD166Lc1_7614.6_3001 (SEQ ID NO: 315)]

[CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC][CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGCC
 TGGGAGTCCTGTTCCAGCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGG
 GCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGCCTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGG
 CGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGCCCCGTGACTC
 CTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCCTCCAAGTCCCTGCTGCAC
 TCCAACGGCATCACCTACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCCGGCCAGTC
 CCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCG
 ACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCC
 CGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTAATACTGCGCCCAGAACCTGG
 AACTGCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACC
 GTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAA
 GTCCGGCACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCCGCG
 AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTC
 CCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGT
 CCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTAC
 GCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCT
 TCAACCGGGGCGAGTGC]

SEQ ID NO: 315 Codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 314

Cadeia Leve aCD166 humana (MM-LP1-CM-LP2-Ab)

huCD166Lcl_7614.6_3001

CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAGTCCTGTTCCAGCGGCGG
 AGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGC
 CTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATGACCCA
 GTCCCCCCTGTCCCTGCCCCGTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCT
 GCCGGTCCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCACCTACCTGTAC
 TGGTATCTGCAGAAGCCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGAT
 GTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCC

```

GGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGGAAGCCGAGGACGTGG
GCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAAGTGGCCCTACACCTTCGGCCAG
GGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCAT
CTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTCT
GCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT
GGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAA
GGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAG
GGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

```

SEQ ID NO: 319 Sequência Nucleotídica Que Codifica o Espaçador da
SEQ ID NO: 305
 CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC

Uso Terapêutico de Anticorpos Ativáveis e Anticorpos Ativáveis
Conjugados

[00252] A divulgação fornece métodos de tratamento, prevenção e/ou retardo do início ou progressão ou alívio de um sintoma associado à expressão e/ou atividade aberrante de CD166 em um sujeito usando AAs que se ligam a CD166, particularmente AAs que se ligam e neutralizam ou inibem, de outra forma, pelo menos uma atividade biológica de CD166 e/ou sinalização mediada por CD166.

[00253] A divulgação também fornece métodos de tratamento, prevenção e/ou retardo do início ou progressão ou alívio de um sintoma associado à presença, crescimento, proliferação, metástase e/ou atividade de células que estão expressando CD166 ou expressando de forma aberrante CD166 em um sujeito usando AAs que se ligam a CD166, particularmente AAs que se ligam, direcionam, neutralizam, eliminam ou, de outra forma, inibem pelo menos uma atividade biológica de células que estão expressando ou expressando de forma aberrante CD166.

[00254] A divulgação também fornece métodos de tratamento, prevenção e/ou retardo do início ou progressão ou alívio de um sintoma associado à presença, crescimento, proliferação, metástase e/ou atividade de células que estão expressando CD166 em um sujeito usando AA que se liga a CD166, particularmente AAs que se ligam, direcionam, neutralizam, eliminam ou, de outra forma, inibem pelo menos uma atividade biológica de células que estão expressando CD166.

[00255] A divulgação também fornece métodos de tratamento, prevenção e/ou retardo do início ou progressão ou alívio de um sintoma associado à presença, crescimento, proliferação, metástase e/ou atividade de células que estão expressando de forma aberrante CD166 em um sujeito usando AAs que se ligam a CD166, particularmente AAs que se ligam, direcionam, neutralizam, eliminam ou, de outra forma, inibem pelo menos uma atividade biológica de células que estão expressando de forma aberrante CD166.

[00256] A divulgação também fornece métodos para prevenir, retardar a progressão, tratar, aliviar um sintoma de ou melhorar o câncer em um sujeito ao administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado descrito neste documento a um sujeito em necessidade destes.

[00257] A divulgação também fornece AAs que se ligam a CD166, particularmente AAs que se ligam e neutralizam ou, de outra forma, inibem pelo menos uma atividade biológica de CD166 e/ou sinalização de CD166, para uso no tratamento, prevenção e/ou retardo do início ou progressão, ou alívio de um sintoma associado com a expressão e/ou atividade aberrante de CD166 em um sujeito.

[00258] A divulgação também fornece AAs que se ligam a CD166, particularmente AAs que se ligam, direcionam, neutralizam, eliminam ou, de

outra forma, inibem pelo menos uma atividade biológica de células que estão expressando ou expressando de forma aberrante CD166, para uso no tratamento, prevenção e/ou retardo no início ou progressão, ou alívio de um sintoma associado à presença, crescimento, proliferação, metástase e/ou atividade de células que estão expressando ou expressando de forma aberrante CD166 em um sujeito.

[00259] A divulgação também fornece um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado descrito neste documento, para uso na prevenção, retardo da progressão, tratamento, alívio de um sintoma, ou, de outra forma, melhoria do câncer em um sujeito, em que o anticorpo é para administração em uma quantidade terapeuticamente eficaz.

[00260] A título de exemplo não limitativo, os AAs da divulgação podem ser usados para tratar, prevenir e/ou retardar o início ou a progressão de um câncer de células epiteliais ou escamosas, um câncer carcinoide e/ou neuroendócrino. Os exemplos de câncer incluem, sem limitação, adenocarcinoma, câncer do duto biliar, câncer de bexiga, câncer de mama, por exemplo, câncer de mama triplo-negativo, câncer de mama Her2-negativo, câncer de mama positivo para receptores de estrogênio; câncer carcinoide; câncer cervical; colangiocarcinoma; colorretal; endometrial; glioma; câncer de cabeça e pescoço, por exemplo, câncer de células escamosas de cabeça e pescoço; leucemia; câncer de fígado; câncer de pulmão, por exemplo, NSCLC, SCLC; linfoma; melanoma; câncer de esôfago; câncer de ovário; câncer de pâncreas; câncer de próstata, *por exemplo*, carcinoma de próstata metastático resistente à castração; câncer renal; câncer de pele; câncer de células escamosas; câncer de estômago; câncer de testículo; câncer de tireoide; e câncer urotelial.

[00261] Em algumas modalidades, o câncer é qualquer câncer epitelial ou escamoso. Em algumas modalidades, o câncer é câncer de

próstata, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer cervical, câncer de orofaringe e/ou câncer de cabeça e pescoço.

[00262] Em algumas modalidades, o câncer é um câncer de bexiga, um câncer ósseo, um câncer de mama, um carcinoide, um câncer cervical, um câncer colorretal, um câncer de cólon, um câncer endometrial, um câncer epitelial, um glioma, um câncer de cabeça e pescoço, câncer de fígado, câncer de pulmão, melanoma, câncer de orofaringe, câncer de ovário, câncer de pâncreas, câncer de próstata, câncer de rim, sarcoma, câncer de pele, câncer de estômago, testículo, câncer de tireoide, um câncer urogenital e/ou um câncer urotelial.

[00263] Em algumas modalidades, o câncer é selecionado do grupo que consiste em câncer de mama triplo negativo (TNBC), câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), câncer de pulmão de células pequenas (SCLC), carcinoma colorretal mutante Ras, um câncer epitelial raro, câncer de orofaringe, câncer cervical, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) e/ou câncer de próstata. Em algumas modalidades, o câncer está associado a um tumor que expressa CD166. Em algumas modalidades, o câncer é devido a um tumor que expressa CD166.

[00264] Um anticorpo anti-CD166, um anticorpo anti-CD166 conjugado, um anticorpo anti-CD166 ativável e/ou um anticorpo anti-CD166 ativável conjugado usado em qualquer uma das modalidades desses métodos e usos podem ser administrados em qualquer estágio da doença. Por exemplo, esse anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado pode ser administrado a um sujeito que sofre de câncer de qualquer estágio, do início ao metastático.

[00265] Em modalidades exemplificativas, o sujeito sofre ou suspeita de sofrer de carcinoma de mama, câncer de próstata resistente à castração (CPRC), colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma

epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC).

[00266] Em modalidades exemplificativas, o sujeito está sofrendo, ou suspeita estar sofrendo de uma lesão de pele. Em algumas modalidades, a lesão cutânea é uma metástase cutânea.

[00267] Conforme fornecido neste documento, o sujeito a ser tratado é um mamífero, como um primata humano, não humano, animal de companhia (*por exemplo*, gato, cachorro, cavalo), animal de fazenda, animal de trabalho ou animal de zoológico. Em algumas modalidades, o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um animal de companhia. Em algumas modalidades, o sujeito é um animal sob os cuidados de um veterinário.

[00268] Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um carcinoma de mama, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, tem um tumor que expressa o receptor de estrogênio (ER +) e deveria ter recebido anti-terapia hormonal e experimentou progressão da doença antes de ser tratado com o AA da presente divulgação. Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um carcinoma de mama, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, tem um carcinoma de mama triplo negativo (TNBC) e recebeu ≥ 2 linhas de terapia anteriores, antes de serem tratadas com o AA da presente divulgação.

[00269] Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um carcinoma de próstata resistente à castração, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, recebeu ≥ 1 terapia anterior, antes de ser tratado com o AA da presente divulgação.

[00270] Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um colangiocarcinoma, que recebe um AA da presente

divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, falhou ≥ 1 linha anterior de regime contendo gencitabina, antes de ser tratado com o AA da presente divulgação.

[00271] Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um carcinoma endometrial, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, recebeu ≥ 1 regime contendo platina para doença extra-uterina ou avançada, antes de ser tratado com o AA da presente divulgação.

[00272] Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um carcinoma epitelial de ovário, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, tem uma mutação (de linhagem germinativa ou somática) que não é o câncer de mama (BRCA) ou tem um status mutacional desconhecido de BRCA e apresenta carcinoma de ovário resistente à platina ou refratário à platina. Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um carcinoma epitelial de ovário, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, tem uma mutação BRCA e é refratário, ou inelegível para, Inibidores de PARP.

[00273] Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um HNSCC, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, recebeu ≥ 1 regime contendo platina e um inibidor de PD-1/PD-L1 (se aprovado para indicação e localidade do sujeito), antes de ser tratado com o AA da presente divulgação.

[00274] Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um NSCLC, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou Combinação 60, recebeu ≥ 1 regime contendo platina, antes de ser tratado com o AA da presente divulgação. Em algumas modalidades, um sujeito que sofre, ou suspeita de sofrer, de um NSCLC, que recebe um AA da presente divulgação, por exemplo, Combinação 55 ou

Combinação 60, recebeu anteriormente um inibidor de checkpoint (se aprovado para a indicação do sujeito em sua localidade), antes de ser tratado com o AA da presente divulgação.

[00275] Em algumas modalidades, um sujeito que tem qualquer um dos seguintes itens pode não ser elegível para receber um AA da presente divulgação para o tratamento de carcinoma de mama, câncer de próstata resistente à castração (CPRC), colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, HNSCC e NSCLC: distúrbio corneano ativo ou crônico, histórico de transplante de córnea, ceratite herpética ativa e condições oculares ativas que requerem tratamento/monitoramento contínuo; doença concorrente grave, incluindo infecção ativa clinicamente relevante; histórico ou doenças autoimunes ativas atuais; doença cardíaca significativa, como infarto do miocárdio recente; histórico de esclerose múltipla ou outra doença desmielinizante, síndrome de Eaton-Lambert (síndrome paraneoplásica), histórico de acidente vascular cerebral hemorrágico ou isquêmico nos últimos 6 meses ou doença hepática alcoólica; ferida(s) ou úlcera(s) não cicatrizada(s), exceto lesões ulcerativas causadas pela neoplasia subjacente; histórico de reações alérgicas ou anafiláticas graves à terapia prévia com anticorpos monoclonais; atualmente recebendo terapia de anticoagulação com varfarina; ou cirurgia de grande porte (que requer anestesia geral) dentro de 3 meses antes da administração.

[00276] Anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e formulações terapêuticas destes são administrados a um sujeito que sofre ou é suscetível a uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou atividade aberrante de CD166. Um sujeito que sofre ou é suscetível a uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou atividade aberrante de CD166 é identificado usando qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os sujeitos que sofrem de câncer ou outra condição neoplásica são identificados usando uma variedade de

testes clínicos e/ou laboratoriais, como exame físico e análises de sangue, urina e/ou fezes para avaliar o estado de saúde. Por exemplo, os sujeitos que sofrem de inflamação e/ou distúrbio inflamatório são identificados usando qualquer um de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, tais como exame físico e/ou análise de fluidos corporais, por exemplo, análise de sangue, urina e/ou fezes, para avaliar o estado de saúde.

[00277] A administração de um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado a um sujeito que sofre de uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou atividade aberrante de CD166 é considerada bem-sucedida se qualquer um de vários objetivos clínicos ou laboratoriais for alcançado. Por exemplo, a administração de um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado a um sujeito que sofre de uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou atividade aberrante de CD166 é considerado bem-sucedido se um ou mais dos sintomas associados à doença ou distúrbio são aliviados, reduzidos, inibidos ou não progridem para um estado mais avançado, *ou seja*, pior. A administração de um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado a um sujeito que sofre de uma doença ou distúrbio associado à expressão e/ou atividade aberrante de CD166 é considerada bem-sucedida se a doença ou distúrbio entra em remissão ou não progride para um estado mais avançado, *ou seja*, pior.

[00278] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e formulações terapêuticas destes são administrados a um sujeito que sofre ou é suscetível a uma doença ou distúrbio, como sujeitos que sofrem de câncer ou outra condição neoplásica, em que as células doentes do sujeito estão expressando CD166. Em algumas modalidades, as células doentes estão associadas à expressão e/ou atividade

aberrante de CD166. Em algumas modalidades, as células doentes estão associadas à expressão e/ou atividade normais de CD166. Um sujeito que sofre ou é suscetível a uma doença ou distúrbio em que as células doentes expressam CD166 é identificado usando qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os sujeitos que sofrem de câncer ou outra condição neoplásica são identificados usando uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, como exame físico e análises de sangue, urina e/ou fezes para avaliar o estado de saúde. Por exemplo, os sujeitos que sofrem de inflamação e/ou distúrbio inflamatório são identificados usando qualquer um de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, tais como exame físico e/ou análise de fluidos corporais, por exemplo, análise de sangue, urina e/ou fezes, para avaliar o estado de saúde.

[00279] Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou o anticorpo ativável conjugado anti-CD166 e formulações terapêuticas destes são administrados a um sujeito que sofre ou é suscetível a uma doença ou distúrbio associado a células que expressam CD166 ou a presença, crescimento, proliferação, metástase e/ou atividade dessas células, como sujeitos que sofrem de câncer ou outras condições neoplásicas. Em algumas modalidades, as células estão associadas à expressão e/ou atividade aberrante de CD166. Em algumas modalidades, as células estão associadas à expressão e/ou atividade normal de CD166. Um sujeito que sofre ou é suscetível a uma doença ou distúrbio associado às células que expressam CD166 é identificado usando qualquer um de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, os sujeitos que sofrem de câncer ou outra condição neoplásica são identificados usando uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, como exame físico e análises de sangue, urina e/ou fezes para avaliar o estado de saúde. Por exemplo, os sujeitos que sofrem de inflamação e/ou distúrbio inflamatório são identificados usando qualquer um de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, tais como exame físico e/ou análise de fluidos corporais, por exemplo, análise de sangue, urina e/ou

fezes, para avaliar o estado de saúde.

[00280] A administração de um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado a um sujeito que sofre de uma doença ou distúrbio associado às células que expressam CD166 é considerada bem-sucedida se qualquer um de uma variedade de objetivos laboratoriais ou clínicos for alcançado. Por exemplo, a administração de um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado a um sujeito que sofra de uma doença ou distúrbio associado às células que expressam CD166 é considerada bem-sucedida se um ou mais dos sintomas associados à doença ou distúrbio são aliviados, reduzidos, inibidos ou não progridem para um estado adicional, *ou seja*, pior. A administração de um anticorpo anti-CD166, anticorpo anti-CD166 conjugado, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado a um sujeito que sofre de uma doença ou distúrbio associado às células que expressam CD166 é considerada bem-sucedida se a doença ou distúrbio entra em remissão ou não progride para um estado adicional, *ou seja*, pior.

[00281] Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou o anticorpo ativável conjugado anti-CD166 é administrado durante e/ou após o tratamento em combinação com um ou mais agentes adicionais, como, por exemplo, um agente quimioterapêutico, um agente anti-inflamatório, e/ou um agente imunossupressor. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o(s) agente(s) adicional(ais) são administrados simultaneamente. Por exemplo, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou o anticorpo ativável conjugado anti-CD166 e o(s) agente(s) adicional(ais) podem ser formulados em uma única composição ou administrados como duas ou mais composições separadas. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou o anticorpo ativável

conjugado anti-CD166 e o(s) agente(s) adicional(ais) são administrados sequencialmente.

[00282] Em algumas modalidades, os anticorpos anti-CD166 ativáveis e/ou anticorpos anti-CD166 ativáveis conjugados descritos neste documento são usados em conjunto com um ou mais agentes adicionais ou uma combinação de agentes adicionais. Agentes adicionais adequados incluem terapias farmacêuticas e/ou cirúrgicas atuais para uma aplicação pretendida, como, por exemplo, câncer. Por exemplo, os anticorpos anti-CD166, anticorpos anti-CD166 conjugados, anticorpos anti-CD166 ativáveis e/ou anticorpos anti-CD166 ativáveis conjugados podem ser usados em conjunto com um agente quimioterapêutico ou antineoplásico adicional.

[00283] Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(is) são um agente quimioterápico, tal como um agente quimioterápico selecionado do grupo que consiste em docetaxel, paclitaxel, abraxano (ou seja, paclitaxel conjugado com albumina), doxorrubicina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, irinotecano, e gencitabina.

[00284] Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(is) são um inibidor de checkpoint, um inibidor de quinase, um agente que visa inibidores no microambiente tumoral e/ou uma célula T ou agonista de NK. Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(is) é a terapia de radiação, sozinha ou em combinação com outro(s) agente(s) adicional(is), tais como um agente quimioterápico ou antineoplásico. Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(is) é uma vacina, um oncovírus e/ou um agente ativador de DC, tal como, a título de exemplo não limitativo, um agonista de receptor semelhante a toll (TLR) e/ou α -CD40. Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(is) é um anticorpo direcionado ao tumor projetado para eliminar o tumor via ADCC ou via conjugação direta com uma toxina (por exemplo, um conjugado anticorpo-droga (ADC)).

[00285] Em algumas modalidades, o inibidor de checkpoint é um

inibidor de um alvo selecionado do grupo que consiste em CTLA-4, LAG-3, PD-1, CD166, TIGIT, TIM-3, B7H4 e Vista. Em algumas modalidades, o inibidor da quinase é selecionado a partir do grupo que consiste em inibidores B-RAFi, MEKi e Btk, como ibrutinib. Em algumas modalidades, o inibidor da quinase é crizotinib. Em algumas modalidades, o inibidor do microambiente tumoral é selecionado a partir do grupo que consiste em um inibidor de IDO, um inibidor de α -CSF1R, um inibidor de α -CCR4, um TGF-beta, uma célula supressora derivada de mieloide ou uma célula T reguladora. Em algumas modalidades, o agonista é selecionado a partir do grupo que consiste em Ox40, GITR, CD137, ICOS, CD27 e HVEM.

[00286] Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de CTLA-4. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de LAG-3. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de PD-1. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de CD166. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de TIGIT. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de TIM-3. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de B7H4. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de Vista. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de B-RAFi. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de MEKi. tkEm algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de Btk. Em algumas modalidades, o inibidor é ibrutinib. Em algumas modalidades, o inibidor é crizotinib. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de IDO. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de α -CSF1R. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de α -CCR4. Em algumas modalidades, o inibidor é um TGF-beta. Em algumas modalidades, o inibidor é uma célula supressora derivada de mieloide. Em algumas modalidades, o inibidor é uma célula T reguladora.

[00287] Em algumas modalidades, o agonista é Ox40. Em algumas modalidades, o agonista é GITR. Em algumas modalidades, o agonista é CD137. Em algumas modalidades, o agonista é ICOS. Em algumas

modalidades, o agonista é CD27. Em algumas modalidades, o agonista é HVEM.

[00288] Em algumas modalidades, o AA e/ou AA conjugado é administrado durante e/ou após o tratamento em combinação com um ou mais agentes adicionais, como, por exemplo, um agente quimioterapêutico, um agente anti-inflamatório, e/ou um agente imunossupressor. Em algumas modalidades, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o agente adicional são formulados em uma única composição terapêutica e anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e agente adicional são administrados simultaneamente. Alternativamente, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o agente adicional são separados um do outro, *por exemplo*, cada um é formulado em uma composição terapêutica separada e o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anti-CD166 ativável conjugado o anticorpo e o agente adicional são administrados simultaneamente, ou o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o agente adicional são administrados em momentos diferentes durante um regime de tratamento. Por exemplo, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado são administrados antes da administração do agente adicional, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado é administrado subsequentemente à administração do agente adicional ou anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o agente adicional são administrados de uma maneira alternada. Conforme descrito neste documento, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o agente adicional são administrados em doses únicas ou em doses múltiplas.

[00289] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o(s) agente(s) adicional(ais) são administrados simultaneamente. Por exemplo, o anticorpo ativável anti-

CD166 e/ou o anticorpo ativável conjugado anti-CD166 e o(s) agente(s) adicional(ais) podem ser formulados em uma única composição ou administrados como duas ou mais composições separadas. Em algumas modalidades, anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o(s) agente(s) adicional(ais) são administrados sequencialmente, ou anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado e o agente adicional são administrados em momentos diferentes durante um regime de tratamento.

[00290] Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou o anticorpo ativável conjugado anti-CD166 é administrado durante e/ou após o tratamento em combinação com um ou mais agentes adicionais, como, a título de exemplo não limitativo, um agente quimioterapêutico, um agente anti-inflamatório e/ou um agente imunossupressor, como um agente alquilante, um antimetabolito, um agente antimicrotúbulo, um inibidor da topoisomerase, um antibiótico citotóxico e/ou qualquer outro agente prejudicial ao ácido nucleico. Em algumas modalidades, o agente adicional é um taxano, como paclitaxel (por exemplo, Abraxane®). Em algumas modalidades, o agente adicional é um antimetabolito, como a gencitabina. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente alquilante, como quimioterapia à base de platina, como carboplatina ou cisplatina. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente direcionado, como um inibidor de quinase, por exemplo, sorafenibe ou erlotinibe. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente direcionado, como outro anticorpo, por exemplo, um anticorpo monoclonal (por exemplo, bevacizumabe), um anticorpo biespecífico ou um anticorpo multiespecífico. Em algumas modalidades, o agente adicional é um inibidor de proteossoma, como bortezomib ou carfilzomib. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente imunomodulador, como lenolidomina ou IL-2. Em algumas modalidades, o agente adicional é radiação. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente considerado padrão de atendimento pelos versados na técnica. Em algumas

modalidades, o agente adicional é um agente quimioterapêutico bem conhecido pelos versados na técnica.

[00291] Em algumas modalidades, o agente adicional é outro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste, outro anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, outro AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou outro AA conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste. Em algumas modalidades, o agente adicional é outro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste, outro anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, outro AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou outro AA conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste contra o mesmo alvo como o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste, o primeiro anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou um AA conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, por exemplo, contra CD166. Em algumas modalidades, o agente adicional é outro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste, outro anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, outro AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou outro AA conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste contra um alvo diferente do alvo do primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste, o primeiro anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou um AA conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste.

[00292] Em algumas modalidades, o anticorpo adicional ou fragmento de ligação ao antígeno deste, anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou AA conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste é um anticorpo monoclonal, anticorpo de domínio, cadeia única, fragmento Fab, um fragmento F (ab')₂, um scFv, um scAb, um dAb, um anticorpo de cadeia pesada de

domínio único ou um anticorpo de cadeia leve de domínio único. Em algumas modalidades, o anticorpo adicional ou fragmento de ligação ao antígeno deste, anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste e/ou AA conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste é um camundongo, outro roedor, quimérico, humanizado ou anticorpo monoclonal totalmente humano.

[00293] Será apreciado que a administração de entidades terapêuticas de acordo com a divulgação será administrada com carreadores, excipientes e outros agentes adequados que são incorporados em formulações para fornecer transferência, distribuição, tolerância melhorada e semelhantes. Uma variedade de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido por todos os químicos farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente o Capítulo 87 de Blaug, Seymour. Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, unguentos, geleias, ceras, óleos, lipídios, vesículas contendo lipídios (catiônicos ou aniônicos) (tal como Lipoefctin™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões óleo-em-água e água-em-óleo, emulsões de carbowax (polietilenoglicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos e misturas semissólidas contendo carbowax. Qualquer uma das misturas anteriores pode ser apropriada em tratamentos e terapias, de acordo com a presente divulgação, desde que o ingrediente ativo na formulação não seja inativado pela formulação e a formulação seja fisiologicamente compatível e tolerável com a via de administração. Consulte também Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts". J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) e citações no documento em questão para

informações adicionais relacionadas a formulações, excipientes e carreadores bem conhecidos por químicos farmacêuticos.

[00294] As formulações terapêuticas da divulgação, que incluem um anticorpo anti-CD166 ativável, como por exemplo não limitativo, AA e/ou um AA conjugado, são usadas para prevenir, tratar ou melhorar de outra forma uma doença ou distúrbio associado ao alvo aberrante expressão e/ou atividade. Por exemplo, formulações terapêuticas da divulgação, que incluem um AA e/ou um anticorpo ativável conjugado, são usadas para tratar ou melhorar um câncer ou outra condição neoplásica, inflamação, um distúrbio inflamatório e/ou uma doença autoimune. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido ou uma malignidade hematológica onde o alvo é expresso. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido onde o alvo é expresso. Em algumas modalidades, o câncer é uma malignidade hematológica onde o alvo é expresso. Em algumas modalidades, o alvo é expresso no parênquima (por exemplo, no câncer, a porção de um órgão ou tecido que muitas vezes realiza função(ões) do órgão ou tecido). Em algumas modalidades, o alvo é expresso em uma célula, tecido ou órgão. Em algumas modalidades, o alvo é expresso no estroma (ou seja, a estrutura de suporte conectiva de uma célula, tecido ou órgão). Em algumas modalidades, o alvo é expresso em um osteoblasto. Em algumas modalidades, o alvo é expresso no endotélio (vasculatura). Em algumas modalidades, o alvo é expresso em uma célula-tronco cancerosa. Em algumas modalidades, o agente ao qual o AA está conjugado é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o agente ao qual o AA está conjugado é um agente prejudicial ao ácido nucleico.

[00295] A eficácia da prevenção, melhoria ou tratamento é determinada em associação com qualquer método conhecido para diagnosticar ou tratar a doença ou distúrbio associado à expressão e/ou atividade do alvo, como, por exemplo, expressão e/ou atividade do alvo aberrante. Prolongar a sobrevivência de um sujeito ou retardar a progressão da doença ou distúrbio

associado à expressão e/ou atividade do alvo, por exemplo, expressão e/ou atividade do alvo aberrante, em um sujeito indica que o AA e/ou o AA conjugado conferem um benefício clínico.

[00296] Um AA e/ou um AA conjugado podem ser administrados na forma de composições farmacêuticas. Princípios e considerações envolvidos na preparação destas composições, bem como orientação na escolha dos componentes são fornecidos, por exemplo, em Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; e Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

[00297] Em algumas modalidades onde fragmentos de anticorpo são usados, o menor fragmento que se liga especificamente ao domínio de ligação da proteína alvo é selecionado. Por exemplo, com base nas sequências da região variável de um anticorpo, podem ser projetadas moléculas de peptídeo que retêm a capacidade de se ligar à sequência da proteína alvo. Tais peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por tecnologia de DNA recombinante. (See, *por exemplo*, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 90: 7889-7893 (1993)). A formulação pode conter também mais do que um composto ativo, conforme necessário para a indicação específica sendo tratada, por exemplo, em algumas modalidades, aqueles com atividades complementares que não prejudiquem umas às outras. Em algumas modalidades, ou além disso, a composição pode compreender um agente que potencialize sua função, como, por exemplo, um agente citotóxico, citocina, agente quimioterápico ou agente inibidor de crescimento. Tais moléculas estão devidamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade almejada.

[00298] Os ingredientes ativos também podem ser retidos em

microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou pela polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas gelatinosas e microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, em sistemas de administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas da albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões.

[00299] As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é prontamente alcançado pela filtração através de membranas de filtração estéreis.

[00300] Preparações de liberação sustentada também podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos moldados, *por exemplo*, películas ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) ou álcool polivinílico, polilactidas (Patente U.S. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinil não degradável, de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis, tais como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Embora os polímeros, tais como acetato de etileno-vinila e ácido láctico-ácido glicólico, permitam a liberação de moléculas por mais de 100 dias, determinados hidrogéis liberam proteínas por períodos mais curtos de tempo.

Usos Diagnósticos

[00301] A invenção também fornece métodos e kits para o uso de anticorpos anti-CD166 ativáveis e/ou anticorpos anti-CD166 ativáveis conjugados em uma variedade de indicações de diagnóstico e/ou profiláticas. Por exemplo, a invenção fornece métodos e kits para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem e um alvo de interesse em um sujeito ou

amostra ao (i) entrar em contato com um sujeito ou amostra com um anticorpo ativável anti-CD166, em que o AA anti-CD166 compreende uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o AA anti-CD166 em um estado não ativado e não clivado compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que o MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB a CD166 e em que o MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação que ocorre naturalmente do AB e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural de o AB; e (b) em que, quando o AB está em um estado não clivado, não ativado, o MM interfere na ligação específica do AB a CD166 e, quando o AB está em um estado ativado e clivado, o MM não interfere ou compete com ligação específica do AB a CD166; e (ii) medir um nível de anti-CD166 AA ativado no sujeito ou amostra, em que um nível detectável de anti-CD166 AA ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem e CD166 estão presentes no sujeito ou amostra e em que nenhum nível detectável de AA anti-CD166 ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem, CD166 ou ambos, o agente de clivagem e CD166 estão ausentes no sujeito ou amostra.

[00302] Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ativável é um anticorpo anti-CD166 ativável ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ativável não é conjugado com um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de anticorpo anti-CD166 ativável no sujeito ou na amostra é realizada usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um

marcador detectável.

[00303] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o anticorpo anti-CD166 ativável inclui uma marcação detectável. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação detectável inclui um agente de imagem, um agente de contraste, uma enzima, um rótulo fluorescente, um cromóforo, um corante, um ou mais íons metálicos ou uma marcação à base de ligante. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de geração de imagens compreende um radioisótopo. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o radioisótopo é índio ou tecnécio. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de contraste compreende iodo, gadolínio ou óxido de ferro. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a enzima compreende peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina ou β -galactosidase. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação fluorescente compreende proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente ciana (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha modificada (mRFP), proteína fluorescente vermelha tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED ou um derivado de európio. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação luminescente compreende um derivado de N-metilacrídio. Em algumas modalidades desses métodos, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor®, tal como Alex Fluor® 680 ou Alexa Fluor® 750. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação à base de ligante compreende biotina, avidina, estreptavidina ou um ou mais haptenos.

[00304] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades desses métodos, o sujeito é humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero não humano, como um primata não humano, animal doméstico (por exemplo, gato, cachorro, cavalo), animal de fazenda, animal de trabalho ou animal de zoológico. Em algumas modalidades, o sujeito é um roedor.

[00305] Em algumas modalidades destes métodos e kits, o método é um método *in vivo* . Em algumas modalidades destes métodos, o método é um método *in situ*. Em algumas modalidades destes métodos, o método é um método *ex vivo*. Em algumas modalidades destes métodos, o método é um método *in vitro* .

[00306] Em algumas modalidades dos métodos e kits, o método é usado para identificar ou refinar uma população de pacientes adequada para tratamento com um AA anti-CD166 da divulgação, seguida pelo tratamento pela administração desse anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado a um sujeito em necessidade deste. Por exemplo, pacientes que testam positivo tanto para o alvo (por exemplo, CD166) quanto para uma protease que cliva o substrato no CM (CM) do AA anti-CD166 sendo testado nesses métodos são identificados como candidatos adequados para o tratamento este AA anti-CD166 compreendendo um CM e é então administrada ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado que foi testado. Da mesma forma, os pacientes que testam negativo para um ou ambos os alvos (*por exemplo*, CD166) e a protease que quebra o substrato no CM no AA sendo testado usando esses métodos podem ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, esses pacientes podem ser testados com outros AAs anti-CD166 até que um AA anti-CD166 adequado para tratamento seja identificado (por exemplo, um AA anti-CD166 compreendendo um CM que é clivado pelo paciente no sítio da doença). Em algumas modalidades, é então administrada ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD166 ativável e/ou conjugado para o qual o paciente testou positivo. AB, MM e/ou CM adequados incluem qualquer um dos AB, MM e/ou CM divulgados neste documento.

[00307] Em algumas modalidades, o AA e/ou AA conjugado contém uma marcação detectável. Um anticorpo intacto, ou um fragmento deste (*por*

exemplo, Fab, scFv ou F(ab)₂ é usado. O termo "marcado", em relação ao anticorpo, destina-se a abranger a marcação direta da sonda ou anticorpo por acoplamento (*ou seja*, ligação física) de uma substância detectável à sonda ou anticorpo, bem como marcação indireta da sonda ou anticorpo por reatividade com outro reagente que é diretamente marcado. Exemplos de marcação indireta incluem a detecção de um anticorpo primário utilizando um anticorpo secundário marcado fluorescentemente e marcação final de uma sonda de DNA com biotina de tal modo que pode ser detectada com estreptavidina marcada fluorescentemente. O termo "amostra biológica" se destina a incluir tecidos, células e fluidos biológicos isolados de um sujeito, bem como tecidos, células e fluidos presentes dentro de um sujeito. Incluído no uso do termo "amostra biológica", portanto, está o sangue e uma fração ou componente do sangue, incluindo soro sanguíneo, plasma sanguíneo ou linfa. Isto é, o método de detecção da divulgação pode ser usado para detectar um mRNA, proteína ou DNA genômico de analito em uma amostra biológica *in vitro* bem como *in vivo*. Por exemplo, técnicas *in vitro* para detecção de um mRNA de analito incluem hibridizações Northern e hibridizações *in situ*. As técnicas *in vitro* para a detecção de uma proteína de analito incluem ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISAs), Western blots, imunoprecipitações, coloração imunoquímica e imunofluorescência. As técnicas *in vitro* para a detecção de um analito de DNA genômico incluem hibridizações Southern. Os procedimentos para a realização de imunoenaios são descritos, por exemplo, em "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis e T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; e "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdã, 1985. Além disso, as técnicas *in vivo* para a detecção de uma proteína de analito incluem a introdução em um sujeito de um anticorpo de anti-proteína de analito marcado. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um marcador radioativo cuja presença e localização em um sujeito podem ser

detectadas por técnicas de imagem padrão.

[00308] Por conseguinte, os AAs e AAs conjugados da divulgação também são úteis em uma variedade de formulações de diagnóstico e profiláticas. Em uma modalidade, um AA e/ou um AA conjugado são administrados a sujeitos que correm o risco de desenvolver um ou mais dos distúrbios mencionados acima. A predisposição de um sujeito ou órgão a um ou mais dos distúrbios mencionados acima pode ser determinada usando marcações genóticas, sorológicas ou bioquímicas.

[00309] Em algumas modalidades da divulgação, um AA e/ou um AA conjugado são administrados a indivíduos humanos diagnosticados com uma indicação clínica associada a um ou mais dos distúrbios mencionados acima. Após o diagnóstico, um AA e/ou um AA conjugado são administrados para mitigar ou reverter os efeitos da indicação clínica.

[00310] Um anticorpo ativável e/ou um AA conjugado da divulgação também é útil na detecção de um alvo em amostras de sujeitos e, consequentemente, são úteis como diagnóstico. Por exemplo, os anticorpos e/ou anticorpos ativáveis e suas versões conjugadas da divulgação são usados em ensaios *in vitro*, *por exemplo*, ELISA, para detectar níveis alvo em uma amostra de sujeito.

[00311] Em uma modalidade, um AA e/ou um AA conjugado da divulgação são imobilizados em um suporte sólido (*por exemplo*, o(s) poço(s) de uma placa de microtitulação). O AA imobilizado e/ou AA conjugado serve como um anticorpo de captura para qualquer alvo que possa estar presente em uma amostra de teste. Antes de entrar em contato com o anticorpo ativável imobilizado e/ou suas versões conjugadas, com uma amostra em questão, o suporte sólido é lavado e tratado com um agente de bloqueio, como proteína do leite ou albumina, para evitar a adsorção não específica do analito.

[00312] Posteriormente, os poços são tratados com uma amostra de teste suspeita de conter o antígeno, ou com uma solução contendo uma

quantidade padrão do antígeno. Tal amostra é, *por exemplo*, uma amostra de soro de um sujeito suspeito de ter níveis de antígeno circulante considerado diagnóstico de uma patologia. Depois de enxaguar a amostra de teste ou padrão, o suporte sólido é tratado com um segundo anticorpo que é marcado de forma detectável. O segundo anticorpo marcado serve como um anticorpo de detecção. O nível de marcador detectável é medido e a concentração do antígeno-alvo na amostra de teste é determinada por comparação com uma curva padrão desenvolvida a partir das amostras padrão.

[00313] Será apreciado que, com base nos resultados obtidos usando os AAs da divulgação e suas versões conjugadas, em um ensaio de diagnóstico *in vitro*, é possível simular uma doença em um sujeito com base nos níveis de expressão do antígeno-alvo. Para uma determinada doença, são colhidas amostras de sangue de sujeitos diagnosticados como estando em vários estágios da progressão da doença e/ou em vários pontos do tratamento terapêutico da doença. Usando uma população de amostras que fornece resultados estatisticamente significativos para cada estágio de progressão ou terapia, uma faixa de concentrações do antígeno que pode ser considerada característica de cada estágio é designada.

[00314] Um AA e/ou um AA conjugado também podem ser usados em métodos de diagnóstico e/ou de geração de imagem. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vitro*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vivo*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in situ*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *ex vivo*. Por exemplo, AAs com uma CM enzimaticamente clivável podem ser usados para detectar a presença ou ausência de uma enzima que é capaz de clivar a CM. Esses AAs podem ser usados em diagnósticos, que podem incluir a detecção *in vivo* (*por exemplo*, qualitativa ou quantitativa) da atividade enzimática (ou, em algumas modalidades, um ambiente de maior potencial de redução, como aquele que pode fornecer a redução de uma ligação dissulfeto)

através do acúmulo medido de anticorpos ativados (isto é, anticorpos resultantes da clivagem de um anticorpo ativável) em uma determinada célula ou tecido de um determinado organismo hospedeiro. Tal acúmulo de anticorpos ativados indica não apenas que o tecido expressa atividade enzimática (ou um potencial de redução aumentado dependendo da natureza da CM), mas também que o tecido expressa um alvo ao qual o anticorpo ativado se liga.

[00315] Por exemplo, a CM pode ser selecionada para ser substrato para pelo menos uma protease encontrada no local de um tumor, no local de uma infecção viral ou bacteriana em um local biologicamente confinado (*por exemplo*, como em um abscesso, em um órgão e similares) e similares. O AB pode ser um que se liga a um antígeno-alvo. Usando métodos conforme divulgados neste documento, ou quando apropriado, métodos familiares para uma pessoa versada na técnica, um marcador detectável (*por exemplo*, um marcador fluorescente ou um marcador radioativo ou traçador radioativo) pode ser conjugado a um AB ou outra região de um anticorpo e/ou anticorpo ativável. Marcadores detectáveis adequados são discutidos no contexto dos métodos de triagem acima e exemplos específicos adicionais são fornecidos abaixo. Usando um AB específico para uma proteína ou peptídeo do estado da doença, juntamente com pelo menos uma protease cuja atividade é elevada no tecido da doença de interesse, os AAs exibem uma taxa aumentada de ligação ao tecido da doença em relação aos tecidos onde a enzima específica da CM não está presente em um nível detectável ou está presente em um nível mais baixo do que no tecido da doença ou é inativo (*por exemplo*, na forma de zimogênio ou em complexo com um inibidor). Uma vez que pequenas proteínas e peptídeos são rapidamente eliminados do sangue pelo sistema de filtração renal, e porque a enzima específica para a CM não está presente em um nível detectável (ou está presente em níveis mais baixos nos tecidos que não são da doença ou está presente na conformação inativa), a acumulação de anticorpos ativados no tecido doente é aumentada em comparação com os tecidos não doentes.

[00316] Em outro exemplo, os AAs podem ser usados para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em uma amostra. Por exemplo, onde os AAs contêm uma CM suscetível à clivagem por uma enzima, os AAs podem ser usados para detectar (qualitativa ou quantitativamente) a presença de uma enzima na amostra. Em outro exemplo, nos casos em que os AAs contêm uma CM suscetível à clivagem pelo agente redutor, os AAs podem ser usados para detectar (qualitativa ou quantitativamente) a presença de condições de redução em uma amostra. Para facilitar a análise nesses métodos, os AAs podem ser marcados de forma detectável e vinculados a um suporte (*por exemplo*, um suporte sólido, como um deslizante ou uma esfera). A marcação detectável pode ser posicionada em uma porção do AA que não é liberada após a clivagem, por exemplo, a marcação detectável pode ser uma marcação fluorescente suprimida ou outra marcação que não é detectável até que ocorra a clivagem. O ensaio pode ser realizado ao, por exemplo, colocar em contato os AAs marcados de forma detectável imobilizados com uma amostra suspeita de conter uma enzima e/ou agente redutor por um tempo suficiente para ocorrer a clivagem, e então lavando para remover o excesso de amostra e contaminantes. A presença ou ausência do agente de clivagem (*por exemplo*, enzima ou agente redutor) na amostra é então avaliada por uma alteração no sinal detectável dos AAs antes de entrar em contato com a amostra, *por exemplo*, a presença e/ou um aumento no sinal detectável devido à clivagem do AA pelo agente de clivagem na amostra.

[00317] Tais métodos de detecção podem ser adaptados para também fornecer a detecção da presença ou ausência de um alvo que seja capaz de se ligar ao AB dos AAs quando clivado. Assim, os ensaios podem ser adaptados para avaliar a presença ou ausência de um agente de clivagem e a presença ou ausência de um alvo de interesse. A presença ou ausência do agente de clivagem pode ser detectada pela presença e/ou um aumento na marcação detectável dos AAs, conforme descrito acima, e a presença ou

ausência do alvo pode ser detectada pela detecção de um complexo alvo-AB, *por exemplo*, pelo uso de um anticorpo anti-alvo marcado de forma detectável.

[00318] Os AAs também são úteis na geração de imagens *in situ* para a validação da ativação do AA, *por exemplo*, por clivagem de protease e ligação a um alvo específico. A geração de imagens *in situ* é uma técnica que permite a localização da atividade proteolítica e alvo em amostras biológicas, como culturas de células ou seções de tecido. Usando esta técnica, é possível confirmar a ligação a um determinado alvo e a atividade proteolítica com base na presença de um marcador detectável (por exemplo, um marcador fluorescente).

[00319] Estas técnicas são úteis com quaisquer células congeladas ou tecido derivado de um local de doença (*por exemplo*, tecido tumoral) ou tecidos saudáveis. Estas técnicas também são úteis com amostras frescas de células ou tecidos.

[00320] Nessas técnicas, um AA é marcado com um marcador detectável. O marcador detectável pode ser um corante fluorescente, (por exemplo, um fluoróforo, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Isotiocianato de Rodamina (TRITC), um marcador Alexa Fluor®), um corante infravermelho próximo (NIR) (por exemplo, nanocristais Qdot®), um metal coloidal, um hapteno, um marcador radioativo, biotina e um reagente de amplificação, como estreptavidina, ou uma enzima (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina).

[00321] A detecção do marcador em uma amostra que foi incubada com o AA marcado indica que a amostra contém o alvo e contém uma protease específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença da protease pode ser confirmada usando inibidores de protease de amplo espectro, como os descritos neste documento, e/ou usando um agente que é específico para a protease, por exemplo, um anticorpo como A11, que é específico para a protease matriptase e inibe a atividade proteolítica da

matriptase; ver, por exemplo, Publicação Internacional Número WO 2010/129609, publicada em 11 de novembro de 2010. A mesma abordagem do uso de inibidores de protease de amplo espectro, como os descritos neste documento, e/ou usando um agente inibidor mais seletivo pode ser usada para identificar uma protease específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença do alvo pode ser confirmada usando um agente que é específico para o alvo, *por exemplo*, outro anticorpo, ou o marcador detectável pode competir com o alvo não marcado. Em algumas modalidades, AA não marcado pode ser usado, com detecção por um anticorpo secundário marcado ou um sistema de detecção mais complexo.

[00322] Técnicas semelhantes também são úteis para geração de imagens *in vivo*, em que a detecção do sinal fluorescente em um sujeito, *por exemplo*, um mamífero, incluindo um humano, indica que o local da doença contém o alvo e contém uma protease específica para a CM do anticorpo ativável.

[00323] Essas técnicas também são úteis em kits e/ou como reagentes para a detecção, identificação ou caracterização da atividade da protease em uma variedade de células, tecidos e organismos com base na CM específica da protease no anticorpo ativável.

[00324] A divulgação fornece métodos de uso dos AAs em uma variedade de indicações de diagnóstico e/ou profiláticas. Por exemplo, a divulgação fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem e um alvo de interesse em um sujeito ou amostra ao (i) entrar em contato com um sujeito ou amostra com um anticorpo ativável, em que o AA compreende uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, por exemplo, protease, e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o AA em um estado não ativado e não clivado compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da

seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que o MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB ao alvo e em que o MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação que ocorre naturalmente do AB ao alvo e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; e (b) em que, em um estado não ativado e não clivado, o MM interfere na ligação específica do AB a ao alvo e em um estado ativado e clivado, o MM não interfere ou compete com ligação específica do AB ao alvo; e (ii) medir um nível de AA ativado no sujeito ou amostra, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem e o alvo estão presentes no sujeito ou amostra e em que nenhum nível detectável de AA ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos o agente de clivagem e o alvo estão ausentes no sujeito ou na amostra. Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o AA compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de AA no sujeito ou na amostra é realizada usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um marcador detectável.

[00325] A divulgação também fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra ao (i) colocar em contato um sujeito ou amostra com um AA na presença de um alvo de interesse, *por exemplo*, o alvo, em que o AA compreende uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, *por exemplo*, protease, e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o AA em um estado não ativado e não clivado compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte

maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que o MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB ao alvo, e em que o MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB ao alvo e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; e (b) em que, em um estado não ativado e não clivado, o MM interfere na ligação específica do AB a ao alvo e, em um estado ativado e clivado, o MM não interfere ou compete com ligação específica do AB ao alvo; e (ii) medir um nível de AA ativado no sujeito ou amostra, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou amostra, e em que nenhum nível detectável de AA ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos o agente de clivagem e o alvo estão ausentes no sujeito ou na amostra. Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o AA compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de AA no sujeito ou na amostra é realizada usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um marcador detectável.

[00326] A divulgação também fornece kits para uso em métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem e o alvo em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um AA que compreende uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, por exemplo, protease, e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o AA em um estado não ativado e não clivado compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que a MM é um peptídeo que

inibe a ligação do AB ao alvo, e em que a MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB ao alvo e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; e (b) em que, em um estado não ativado e não clivado, a MM interfere na ligação específica do AB a ao alvo e, em um estado ativado e clivado, a MM não interfere ou compete com ligação específica do AB ao alvo; e (ii) medir um nível de AA ativado no sujeito ou amostra, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou amostra, e em que nenhum nível detectável de AA ativado no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos o agente de clivagem e o alvo estão ausentes no sujeito ou na amostra. Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o AA compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de AA no sujeito ou na amostra é realizada usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um marcador detectável.

[00327] A divulgação também fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou amostra ao (i) colocar um sujeito ou amostra em contato com um anticorpo ativável, em que o AA compreende uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, por exemplo, uma protease, um domínio de ligação ao antígeno (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o AA em um estado não ativado e não clivado compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; em que a MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB ao alvo, e em que a MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação

de ocorrência natural do AB ao alvo e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; em que, em um estado não ativado e não clivado, a MM interfere na ligação específica do AB ao alvo e em um estado ativado e clivado, o MM não interfere ou compete com ligação específica do AB ao alvo; e em que o marcador detectável é posicionado em uma porção do AA que é liberada após a clivagem da CM; e (ii) medir um nível de marcação detectável no sujeito ou na amostra, em que um nível da marcação detectável no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem está ausente e/ou não suficientemente presente no sujeito ou na amostra, e em que nenhum nível detectável da marcação detectável no sujeito ou amostra indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra. Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o AA compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de AA no sujeito ou na amostra é realizada usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um marcador detectável.

[00328] A divulgação também fornece kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem e o alvo em um sujeito ou uma amostra, onde os kits incluem pelo menos um AA e/ou AA conjugado (por exemplo, um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado) descrito neste documento para uso no contato com um sujeito ou amostra biológica e meios para detectar o nível de AA ativado e/ou AA conjugado no sujeito ou amostra biológica, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem e o alvo estão presentes no sujeito ou na amostra biológica e em que nenhum nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de

clivagem, o alvo ou o agente de clivagem e o alvo estão ausentes e/ou não suficientemente presente no sujeito ou na amostra biológica, de modo que a ligação ao alvo e/ou a clivagem de protease do AA não possam ser detectadas no sujeito ou na amostra biológica.

[00329] A divulgação também fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra (i) colocar um sujeito ou amostra biológica em contato com um AA na presença do alvo e (ii) medir um nível de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra biológica e em que nenhum nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o o agente de clivagem está ausente e/ou não está suficientemente presente no sujeito ou na amostra biológica em um nível detectável, de modo que a clivagem de protease do AA não possa ser detectada no sujeito ou na amostra biológica. Tal AA inclui uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, por exemplo, uma protease, e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o AA em um estado não clivado (*isto é*, não ativado) compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que a MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB ao alvo, e em que a MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural no AB; e (b) em que a MM do AA em um estado não clivado interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um AA em um estado clivado (*isto é*, ativado) não interfere ou compete com a ligação específica do AB ao alvo. Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o marcador detectável é anexado à fração de mascaramento. Em algumas modalidades, o marcador detectável é fixado ao terminal N da CM do sítio de clivagem de protease. Em

algumas modalidades, um único sítio de ligação ao antígeno do AB é mascarado. Em algumas modalidades em que um anticorpo da divulgação tem pelo menos dois sítios de ligação ao antígeno, pelo menos um sítio de ligação ao antígeno é mascarado e pelo menos um sítio de ligação ao antígeno não é mascarado. Em algumas modalidades, todos os sítios de ligação ao antígeno são mascarados. Em algumas modalidades, a etapa de medição inclui o uso de um reagente secundário que compreende um marcador detectável.

[00330] A divulgação também fornece kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem e o alvo em um sujeito ou uma amostra, onde os kits incluem pelo menos um AA e/ou AA conjugado descritos neste documento para uso no contato de um sujeito ou amostra biológica com um AA na presença do alvo e na medição de um nível de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra biológica, e em que nenhum nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está ausente e/ou não está suficientemente presente no sujeito ou na amostra biológica em um nível detectável, de modo que a clivagem de protease do AA não possa ser detectada no sujeito ou na amostra biológica. Tal AA inclui uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, por exemplo, uma protease, e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o AA em um estado não clivado (*isto é*, não ativado) compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que a MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB ao alvo, e em que a MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural no AB; e (b) em que a MM do AA em um estado não clivado interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um AA em um estado clivado (*isto é*, ativado) não interfere ou compete com a ligação específica do AB ao alvo. Em

algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o marcador detectável é anexado à fração de mascaramento. Em algumas modalidades, o marcador detectável é fixado ao terminal N da CM do sítio de clivagem de protease. Em algumas modalidades, um único sítio de ligação ao antígeno do AB é mascarado. Em algumas modalidades em que um anticorpo da divulgação tem pelo menos dois sítios de ligação ao antígeno, pelo menos um sítio de ligação ao antígeno é mascarado e pelo menos um sítio de ligação ao antígeno não é mascarado. Em algumas modalidades, todos os sítios de ligação ao antígeno são mascarados. Em algumas modalidades, a etapa de medição inclui o uso de um reagente secundário que compreende um marcador detectável.

[00331] A divulgação também fornece kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou amostra, em que os kits incluem pelo menos um AA e/ou AA conjugado descrito neste documento para uso no contato com um sujeito ou amostra biológica e meios para detectar o nível de AA ativado e/ou AA conjugado no sujeito ou na amostra biológica, em que o AA inclui uma marcação detectável que está posicionada em uma porção do AA que é liberada após a clivagem da CM, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está ausente e/ou não está suficientemente presente no sujeito ou na amostra biológica, de modo que a ligação ao alvo e/ou a clivagem de protease do AA não possam ser detectadas no sujeito ou na amostra biológica, e em que nenhum nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra biológica em um nível detectável.

[00332] A divulgação fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem e o alvo em um sujeito ou uma amostra ao (i) colocar um sujeito ou amostra biológica em contato com um anticorpo

ativável, em que o AA inclui um marcador detectável que está posicionado em uma porção do AA que é liberada após a clivagem da CM e (ii) medir um nível de AA ativado no sujeito ou amostra biológica, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem, o alvo ou o agente de clivagem e o alvo estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra biológica, de modo que a ligação ao alvo e/ou a clivagem de protease do AA não possam ser detectadas no sujeito ou na amostra biológica, e em que um nível detectável reduzido de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem e o alvo estão presentes no sujeito ou na amostra biológica. Um nível reduzido de marcador detectável é, por exemplo, uma redução de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% e/ou cerca de 100%. Tal AA inclui uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o AA em um estado não clivado (*isto é*, não ativado) compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que a MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB ao alvo, e em que a MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural no AB; e (b) em que a MM do AA em um estado não clivado interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um AA em um estado clivado (*isto é*, ativado) não interfere ou compete com a ligação específica do AB ao alvo. Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o AA compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de AA no sujeito ou na

amostra é realizada usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um marcador detectável.

[00333] A divulgação também fornece kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem e o alvo em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um AA e/ou AA conjugado descritos neste documento para uso no contato com um sujeito ou amostra biológica e meios para detectar o nível de AA ativado e/ou AA conjugado no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos o agente de clivagem e o alvo estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra biológica, de modo que a ligação ao alvo e/ou a clivagem de protease do AA não possam ser detectadas no sujeito ou na amostra biológica, e em que um nível detectável reduzido de AA ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem e o alvo estão presentes no sujeito ou na amostra biológica. Um nível reduzido de marcador detectável é, por exemplo, uma redução de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% e/ou cerca de 100%.

[00334] A divulgação também fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou amostra ao (i) entrar em contato com um sujeito ou amostra biológica com um anticorpo ativável, em que o AA inclui uma marcação detectável que está posicionada em uma porção do AA que é liberado após a clivagem da CM; e (ii) medir um nível de marcação detectável no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável da marcação detectável no sujeito ou na amostra biológica indica

que o agente de clivagem está ausente e/ou não está suficientemente presente no sujeito ou na amostra biológica em um nível detectável, de modo que a clivagem de protease do AA não possa ser detectada no sujeito ou na amostra biológica, e em que um nível detectável reduzido da marcação detectável no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra biológica. Um nível reduzido de marcador detectável é, por exemplo, uma redução de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% e/ou cerca de 100%. Tal AA inclui uma fração de mascaramento (MM), uma fração clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, e um domínio de ligação ao antígeno ou fragmento deste (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o AA em um estado não clivado (*isto é*, não ativado) compreende um arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM; (a) em que a MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB ao alvo, e em que a MM não tem uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural no AB; e (b) em que a MM do AA em um estado não clivado interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um AA em um estado clivado (*isto é*, ativado) não interfere ou compete com a ligação específica do AB ao alvo. Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o AA compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de AA no sujeito ou na amostra é realizada usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um marcador detectável.

[00335] A divulgação também fornece kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem de interesse em um sujeito ou uma amostra, onde os kits incluem pelo menos um AA e/ou AA conjugado descritos neste documento para uso no contato com um sujeito ou amostra biológica e meios para detectar o nível de AA ativado e/ou AA conjugado no sujeito ou na amostra biológica, em que o AA inclui um marcador detectável que está posicionado em uma porção do AA que é liberada após a clivagem da CM, em que um nível detectável do marcador detectável no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem, o alvo ou o agente de clivagem e o alvo estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra biológica, de modo que a ligação ao alvo e/ou a clivagem de protease do AA não pode ser detectada no sujeito ou na amostra biológica, e em que um nível detectável reduzido do marcador detectável no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem e o alvo estão presentes no sujeito ou na amostra biológica. Um nível reduzido de marcador detectável é, por exemplo, uma redução de cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, cerca de 40%, cerca de 45%, cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 95% e/ou cerca de 100%.

[00336] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AA inclui um marcador detectável. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação detectável inclui um agente de imagem, um agente de contraste, uma enzima, um rótulo fluorescente, um cromóforo, um corante, um ou mais íons metálicos ou uma marcação à base de ligante. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de geração de imagens compreende um radioisótopo. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o radioisótopo é índio ou tecnécio. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de contraste compreende iodo, gadolínio ou óxido de

ferro. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a enzima compreende peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina ou β -galactosidase. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação fluorescente compreende proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente ciana (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha modificada (mRFP), proteína fluorescente vermelha tdimer2 (RFP tdimer2), HCRED ou um derivado de európio. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação luminescente compreende um derivado de N-metilacrídio. Em algumas modalidades desses métodos, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor®, tal como Alex Fluor® 680 ou Alexa Fluor® 750. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação à base de ligante compreende biotina, avidina, estreptavidina ou um ou mais haptenos.

[00337] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero não humano, como um primata não humano, animal doméstico (por exemplo, gato, cachorro, cavalo), animal de fazenda, animal de trabalho ou animal de zoológico. Em algumas modalidades, o sujeito é um roedor.

[00338] Em algumas modalidades destes métodos, o método é um método *in vivo*. Em algumas modalidades destes métodos, o método é um método *in situ*. Em algumas modalidades destes métodos, o método é um método *ex vivo*. Em algumas modalidades destes métodos, o método é um método *in vitro*.

[00339] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in situ* e/ou a geração de imagens *in vivo* são úteis em métodos para identificar quais sujeitos tratar. Por exemplo, na geração de imagens *in situ*, os AAs são usados para realizar a triagem de amostras do sujeito para identificar aqueles que possuem protease(s) e alvo(s) apropriados(s) no local apropriado, *por exemplo*, no local do tumor.

[00340] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in situ* é usada para identificar ou refinar uma população de sujeitos adequada para o tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos que testam positivo para o alvo (por exemplo, o alvo) e para uma protease que cliva o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no local da doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com tal AA que compreende tal CM. Da mesma forma, os sujeitos que testam negativo para um ou ambos os alvos (*por exemplo*, o alvo) e a protease que cliva o substrato na CM no AA sendo testado usando esses métodos podem ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, tais sujeitos que testam negativo em relação a um primeiro AA podem ser testados com outros AAs compreendendo CMs diferentes até que um AA adequado para tratamento seja identificado (por exemplo, um AA compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no local de doença). Em algumas modalidades, ao sujeito é então administrada uma quantidade terapeuticamente eficaz do AA para a qual o sujeito testou positivo.

[00341] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in vivo* é usada para identificar ou refinar uma população de sujeitos adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos que testam positivo para o alvo (por exemplo, o alvo) e para uma protease que cliva o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no local da doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com tal AA que compreende tal CM. Da mesma forma, os sujeitos que testam negativo podem ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, tais sujeitos que testam negativo em relação a um primeiro AA podem ser testados com outros AAs compreendendo CMs diferentes até que um AA adequado para tratamento seja identificado (por exemplo, um AA

compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no local de doença). Em algumas modalidades, ao sujeito é então administrada uma quantidade terapeuticamente eficaz do AA para a qual o sujeito testou positivo.

[00342] Em algumas modalidades dos métodos e kits, o método ou kit é usado para identificar ou de outra forma refinar uma população de sujeitos adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos que testam positivo tanto para o alvo (por exemplo, o alvo) quanto para uma protease que cliva o substrato na CM (CM) do AA sendo testado nesses métodos são identificados como candidatos adequados para o tratamento com um AA compreendendo essa CM. Da mesma forma, os sujeitos que testam negativo para ambos os alvos (*por exemplo*, o alvo) e a protease que cliva o substrato na CM no AA sendo testado usando esses métodos podem ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, tais sujeitos podem ser testados com outros AAs até que um AA adequado para tratamento seja identificado (por exemplo, um AA compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no local de doença). Em algumas modalidades, os sujeitos que testam negativo para qualquer um dos alvos (*por exemplo*, o alvo) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com um AA que compreende essa CM. Em algumas modalidades, os sujeitos que testam negativo para qualquer um dos alvos (*por exemplo*, o alvo) são identificados como não sendo candidatos adequados para o tratamento com um AA que compreende essa CM. Em algumas modalidades, tais sujeitos podem ser testados com outros AAs até que um AA adequado para tratamento seja identificado (por exemplo, um AA compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no local de doença). Em algumas modalidades, o AA é um AA ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o AA não está conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o AA compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o marcador detectável é posicionado no AB. Em algumas modalidades, a medição do nível de AA no sujeito ou na amostra é realizada

usando um reagente secundário que se liga especificamente ao anticorpo ativado, em que o reagente compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo que compreende um marcador detectável.

[00343] Em algumas modalidades, um método ou kit é usado para identificar ou de outra forma refinar uma população de sujeitos adequada para tratamento com um AA anti-alvo e/ou AA conjugado (por exemplo, AA ao qual um agente terapêutico é conjugado) da divulgação, seguido por tratamento com administração desse AA e/ou AA conjugado a um sujeito em necessidade deste. Por exemplo, os sujeitos que testam positivo tanto para os alvos (por exemplo, o alvo) quanto para uma protease que cliva o substrato na CM (CM) do AA e/ou AA conjugado sendo testado nesses métodos são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo e/ou um AA conjugado compreendendo essa CM, e ao sujeito é então administrada uma quantidade terapeuticamente eficaz do AA e/ou AA conjugado que foi testado. Da mesma forma, os sujeitos que testam negativo para um ou ambos os alvos (por exemplo, o alvo) e a protease que cliva o substrato na CM no AA sendo testado usando esses métodos podem ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, esses sujeitos podem ser testados com outro anticorpo e/ou AA conjugado até que um anticorpo e/ou AA conjugado adequado para tratamento seja identificado (*por exemplo*, um AA e/ou AA conjugado compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no local da doença). Em algumas modalidades, o sujeito é então administrado uma quantidade terapeuticamente eficaz do AA e/ou AA conjugado para a qual o sujeito testou positivo.

[00344] Em algumas modalidades desses métodos e kits, a MM é um peptídeo tendo um comprimento de cerca de 4 a 40 aminoácidos. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AA compreende um peptídeo de ligação, em que o peptídeo de ligação é posicionado entre a MM e a CM.

Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AA compreende um peptídeo de ligação, em que o peptídeo de ligação está posicionado entre o AB e a CM. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AA compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2), em que o primeiro peptídeo de ligação é posicionado entre a MM e a CM e o segundo peptídeo de ligação é posicionado entre o AB e a CM. Em algumas modalidades desses métodos e kits, cada um dentre LP1 e LP2 é um peptídeo de cerca de 1 a 20 aminoácidos de comprimento e em que cada um dentre LP1 e LP2 não precisa ser o mesmo ligante. Em algumas modalidades destes métodos e kits, um ou ambos LP1 e LP2 compreendem um polímero de glicina-serina. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um dentre LP1 e LP2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em (GS) n , (GSGGS) n (SEQ ID NO: 1) e (GGGS) n (SEQ ID NO: 2), em que n é um número inteiro igual a pelo menos um. Em algumas modalidades destes métodos e kits, pelo menos um dentre LP1 e LP2 compreende uma sequência de aminoácidos com a fórmula (GGS) n , onde n é um número inteiro igual a pelo menos um. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um dentre LP1 e LP2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 3), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 4), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 5), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 7), e Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 8).

[00345] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AB compreende uma sequência de anticorpo ou fragmento de anticorpo selecionada dentre as sequências de anticorpo de reação cruzada apresentadas neste documento. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AB compreende um fragmento Fab, um scFv ou um anticorpo de cadeia simples (scAb).

[00346] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente

de clivagem é uma protease que está co-localizada no sujeito ou amostra com o alvo e a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para a protease, em que a protease cliva a CM no AA quando o AA é exposto à protease. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é um polipeptídeo de até cerca de 15 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é acoplada ao terminal N do AB. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é acoplada ao terminal C do AB. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é acoplada ao terminal N de uma cadeia VL do AB.

[00347] Os anticorpos, anticorpos conjugados, AAs e AAs conjugados da divulgação são usados em formulações de diagnóstico e profiláticas. Em uma modalidade, um AA é administrado a sujeitos que correm o risco de desenvolver uma ou mais das inflamações, distúrbios inflamatórios, câncer ou outros distúrbios mencionados acima.

[00348] A predisposição de um sujeito ou órgão a um ou mais dos distúrbios mencionados acima pode ser determinada usando marcações genótípicas, sorológicas ou bioquímicas.

[00349] Em algumas modalidades da divulgação, um AA e/ou um AA conjugado são administrados a indivíduos humanos diagnosticados com uma indicação clínica associada a um ou mais dos distúrbios mencionados acima. Após o diagnóstico, um AA e/ou um AA conjugado são administrados para mitigar ou reverter os efeitos da indicação clínica.

[00350] Os anticorpos, anticorpos conjugados, AAs e AAs conjugados da divulgação também são úteis na detecção do alvo em amostras de sujeitos e, portanto, são úteis como diagnóstico. Por exemplo, os anticorpos, anticorpos conjugados, AAs e AAs conjugados da divulgação são usados em ensaios *in vitro*, *por exemplo*, ELISA, para detectar os níveis do alvo em uma amostra de sujeito.

[00351] Em uma modalidade, um anticorpo e/ou AA da divulgação

são imobilizados em um suporte sólido (*por exemplo*, o(s) poço(s) de uma placa de microtitulação). O anticorpo e/ou AA imobilizado serve como um anticorpo de captura para qualquer alvo que possa estar presente em uma amostra de teste. Antes de colocar o anticorpo e/ou AA imobilizado em contato com uma amostra de sujeito, o suporte sólido é enxaguado e tratado com um agente de bloqueio, como proteína de leite ou albumina, para evitar a adsorção não específica do analito.

[00352] Posteriormente, os poços são tratados com uma amostra de teste suspeita de conter o antígeno, ou com uma solução contendo uma quantidade padrão do antígeno. Tal amostra é, *por exemplo*, uma amostra de soro de um sujeito suspeito de ter níveis de antígeno circulante considerado diagnóstico de uma patologia. Depois de enxaguar a amostra de teste ou padrão, o suporte sólido é tratado com um segundo anticorpo que é marcado de forma detectável. O segundo anticorpo marcado serve como um anticorpo de detecção. O nível de marcador detectável é medido e a concentração do antígeno-alvo na amostra de teste é determinada por comparação com uma curva padrão desenvolvida a partir das amostras padrão.

[00353] Será apreciado que, com base nos resultados obtidos usando os anticorpos e/ou AAs da divulgação em um ensaio de diagnóstico *in vitro*, é possível simular uma doença em um sujeito com base nos níveis de expressão do antígeno alvo. Para uma determinada doença, são colhidas amostras de sangue de sujeitos diagnosticados como estando em vários estágios da progressão da doença e/ou em vários pontos do tratamento terapêutico da doença. Usando uma população de amostras que fornece resultados estatisticamente significativos para cada estágio de progressão ou terapia, uma faixa de concentrações do antígeno que pode ser considerada característica de cada estágio é designada.

[00354] Anticorpos, anticorpos conjugados, AAs e AAs conjugados também podem ser usados em métodos de diagnóstico e/ou de geração de

imagens. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vitro*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vivo*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in situ*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *ex vivo*. Por exemplo, AAs com uma CM enzimaticamente clivável podem ser usados para detectar a presença ou ausência de uma enzima que é capaz de clivar a CM. Esses AAs podem ser usados em diagnósticos, que podem incluir a detecção *in vivo* (*por exemplo*, qualitativa ou quantitativa) da atividade enzimática (ou, em algumas modalidades, um ambiente de maior potencial de redução, como aquele que pode fornecer a redução de uma ligação dissulfeto) através do acúmulo medido de anticorpos ativados (isto é, anticorpos resultantes da clivagem de um anticorpo ativável) em uma determinada célula ou tecido de um determinado organismo hospedeiro. Tal acúmulo de anticorpos ativados indica não apenas que o tecido expressa atividade enzimática (ou um potencial de redução aumentado dependendo da natureza da CM), mas também que o tecido expressa um alvo ao qual o anticorpo ativado se liga.

[00355] Por exemplo, a CM pode ser selecionada para ser um substrato de protease para uma protease encontrada no local de um tumor, no local de uma infecção viral ou bacteriana em um local biologicamente confinado (*por exemplo*, como em um abscesso, em um órgão e similares) e similares. O AB pode ser um que se liga a um antígeno-alvo. Usando métodos familiares para uma pessoa versada na técnica, um marcador detectável (*por exemplo*, um marcador fluorescente ou marcador radioativo ou traçador radioativo) pode ser conjugado a um AB ou outra região de um anticorpo ativável. Marcadores detectáveis adequados são discutidos no contexto dos métodos de triagem acima e exemplos específicos adicionais são fornecidos abaixo. Usando um AB específico para uma proteína ou peptídeo do estado da doença, juntamente com uma protease cuja atividade é elevada no tecido da doença de interesse, os AAs exibem uma taxa aumentada de ligação ao tecido da doença em relação aos tecidos onde a enzima específica da CM não está presente em um

nível detectável ou está presente em um nível mais baixo do que no tecido da doença ou é inativa (por exemplo, na forma de zimogênio ou em complexo com um inibidor). Uma vez que pequenas proteínas e peptídeos são rapidamente eliminados do sangue pelo sistema de filtração renal, e porque a enzima específica para a CM não está presente em um nível detectável (ou está presente em níveis mais baixos nos tecidos que não são da doença ou está presente na conformação inativa), a acumulação de anticorpos ativados no tecido doente é aumentada em comparação com os tecidos não doentes.

[00356] Em outro exemplo, os AAs podem ser usados para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em uma amostra. Por exemplo, onde os AAs contêm uma CM suscetível à clivagem por uma enzima, os AAs podem ser usados para detectar (qualitativa ou quantitativamente) a presença de uma enzima na amostra. Em outro exemplo, nos casos em que os AAs contêm uma CM suscetível à clivagem pelo agente redutor, os AAs podem ser usados para detectar (qualitativa ou quantitativamente) a presença de condições de redução em uma amostra. Para facilitar a análise nesses métodos, os AAs podem ser marcados de forma detectável e vinculados a um suporte (*por exemplo*, um suporte sólido, como um deslizante ou uma esfera). A marcação detectável pode ser posicionada em uma porção do AA que não é liberada após a clivagem, por exemplo, a marcação detectável pode ser uma marcação fluorescente suprimida ou outra marcação que não é detectável até que ocorra a clivagem. O ensaio pode ser realizado ao, por exemplo, colocar em contato os AAs marcados de forma detectável imobilizados com uma amostra suspeita de conter uma enzima e/ou agente redutor por um tempo suficiente para ocorrer a clivagem, e então lavando para remover o excesso de amostra e contaminantes. A presença ou ausência do agente de clivagem (*por exemplo*, enzima ou agente redutor) na amostra é então avaliada por uma alteração no sinal detectável dos AAs antes de entrar em contato com a amostra, *por exemplo*, a presença e/ou um aumento no sinal detectável devido à clivagem do AA pelo agente de clivagem na amostra.

[00357] Tais métodos de detecção podem ser adaptados para também fornecer a detecção da presença ou ausência de um alvo que seja capaz de se ligar ao AB dos AAs quando clivado. Assim, os ensaios podem ser adaptados para avaliar a presença ou ausência de um agente de clivagem e a presença ou ausência de um alvo de interesse. A presença ou ausência do agente de clivagem pode ser detectada pela presença e/ou um aumento na marcação detectável dos AAs, conforme descrito acima, e a presença ou ausência do alvo pode ser detectada pela detecção de um complexo alvo-AB, *por exemplo*, pelo uso de um anticorpo anti-alvo marcado de forma detectável.

[00358] Os AAs também são úteis na geração de imagens *in situ* para a validação da ativação do AA, *por exemplo*, por clivagem de protease e ligação a um alvo específico. A geração de imagens *in situ* é uma técnica que permite a localização da atividade proteolítica e alvo em amostras biológicas, como culturas de células ou seções de tecido. Usando esta técnica, é possível confirmar a ligação a um determinado alvo e a atividade proteolítica com base na presença de um marcador detectável (por exemplo, um marcador fluorescente).

[00359] Estas técnicas são úteis com quaisquer células congeladas ou tecido derivado de um local de doença (*por exemplo*, tecido tumoral) ou tecidos saudáveis. Estas técnicas também são úteis com amostras frescas de células ou tecidos.

[00360] Nessas técnicas, um AA é marcado com um marcador detectável. O marcador detectável pode ser um corante fluorescente, (por exemplo, Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Isotiocianato de Rodamina (TRITC), um corante infravermelho próximo (NIR) (por exemplo, nanocristais Qdot®), um metal coloidal, um hapteno, um marcador radioativo, biotina e um reagente de amplificação, como estreptavidina, ou uma enzima (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina).

[00361] A detecção do marcador em uma amostra que foi incubada

com o AA marcado indica que a amostra contém o alvo e contém uma protease específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença da protease pode ser confirmada usando inibidores de protease de amplo espectro, como os descritos neste documento, e/ou usando um agente que é específico para a protease, por exemplo, um anticorpo como A11, que é específico para a protease matriptase e inibe a atividade proteolítica da matriptase; ver, por exemplo, Publicação Internacional Número WO 2010/129609, publicada em 11 de novembro de 2010. A mesma abordagem do uso de inibidores de protease de amplo espectro, como os descritos neste documento, e/ou usando um agente inibidor mais seletivo pode ser usada para identificar uma protease ou classe de protease específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença do alvo pode ser confirmada usando um agente que é específico para o alvo, *por exemplo*, outro anticorpo, ou o marcador detectável pode competir com o alvo não marcado. Em algumas modalidades, AA não marcado pode ser usado, com detecção por um anticorpo secundário marcado ou um sistema de detecção mais complexo.

[00362] Técnicas semelhantes também são úteis para geração de imagens *in vivo*, em que a detecção do sinal fluorescente em um sujeito, *por exemplo*, um mamífero, incluindo um humano, indica que o local da doença contém o alvo e contém uma protease específica para a CM do anticorpo ativável.

[00363] Essas técnicas também são úteis em kits e/ou como reagentes para a detecção, identificação ou caracterização da atividade da protease em uma variedade de células, tecidos e organismos com base na CM específica da protease no anticorpo ativável.

[00364] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in situ* e/ou a geração de imagens *in vivo* são úteis em métodos para identificar quais sujeitos tratar. Por exemplo, na geração de imagens *in situ*, os AAs são usados para realizar a triagem de amostras do sujeito para identificar aqueles que

possuem protease(s) e alvo(s) apropriados(s) no local apropriado, *por exemplo*, no local do tumor.

[00365] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in situ* é usada para identificar ou refinar uma população de sujeitos adequada para o tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos que testam positivo para o alvo e para uma protease que cliva o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no local da doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com tal AA que compreende tal CM. Da mesma forma, sujeitos que apresentam testam negativos para um ou ambos os alvos e para a protease que cliva o substrato na CM no AA sendo testado usando esses métodos são identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia (*isto é*, não são adequados para o tratamento com o AA sendo testado). Em algumas modalidades, tais sujeitos que testam negativo em relação a um primeiro AA podem ser testados com outros AAs compreendendo CMs diferentes até que um AA adequado para tratamento seja identificado (por exemplo, um AA compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no local de doença).

[00366] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in vivo* é usada para identificar ou refinar uma população de sujeitos adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos que testam positivo para o alvo e para uma protease que cliva o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no local da doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com tal AA que compreende tal CM. Da mesma forma, sujeitos que testam negativo são identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia (*ou seja*, não são adequados para o tratamento com o AA sendo testado). Em algumas modalidades, tais sujeitos que testam negativo com relação a um primeiro AA podem ser testados com outros AAs compreendendo CMs diferentes até que um AA adequado para tratamento seja

identificado (por exemplo, um AA compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no local de doença).

Composições Farmacêuticas

[00367] Os AAs e AAs conjugados da divulgação (também referidos neste documento como "compostos ativos") e derivados, fragmentos, análogos e homólogos destes podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração. Tais composições tipicamente compreendem o AA e/ou AA conjugado e um carreador farmacêuticamente aceitável. Tal como usado neste documento, o termo "carreador farmacêuticamente aceitável" destina-se a incluir todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardamento da absorção e isotônicos e semelhantes compatíveis com administração farmacêutica. Carreadores adequados são descritos na edição mais recente da Remington's Pharmaceutical Sciences, um texto de referência padrão no campo, que é incorporado neste documento por referência. Exemplos adequados de tais carreadores ou diluentes incluem, mas não se limitam a, água, solução salina, soluções de ringer, solução de dextrose e albumina de soro humano a 5%. Lipossomas e veículos não aquosos, como óleos fixos, também podem ser usados. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é amplamente conhecido na técnica. Exceto nos casos em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, a utilização nas composições é contemplada. Compostos ativos complementares podem também ser incorporados nas composições.

[00368] Uma composição farmacêutica da divulgação é formulada para ser compatível com a sua via de administração pretendida. Exemplos de vias de administração incluem administração parenteral, *por exemplo*, intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (*por exemplo*, por inalação), transdérmica (*isto é*, tópica), transmucosa e retal. Em uma modalidade

exemplificativa, a via de administração é intravenosa.

[00369] Soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parenteral, intradérmica, ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril, como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatos, e agentes para o ajuste da tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser armazenadas em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou de plástico.

[00370] Composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para a administração intravenosa, carreadores adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) ou tampão salino fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida na medida em que exista uma fácil seringabilidade. A composição deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservada contra a ação contaminante de micro-organismos, tais como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão que contém, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes), e misturas adequadas destes. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário em caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser

garantida por diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e similares. Em algumas modalidades, será desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol e cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida por meio da inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00371] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ingrediente ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido pela esterilização do filtrado. Em geral, dispersões são preparadas ao incorporar o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários a partir daqueles acima enumerados. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos para preparação são secagem a vácuo e de liofilização que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução deste previamente filtrada esterilizada deste.

[00372] As composições orais incluem geralmente um diluente inerte ou um carreador comestível. Eles podem ser incluídos em cápsulas de gelatina ou comprimidos na forma de pastilhas. Para fins de administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e utilizado na forma de pastilhas, edulcorantes ou cápsulas. Composições orais também podem ser preparadas usando um carreador fluido para uso como enxaguante bucal, em que o composto no carreador fluido é aplicado por via oral e aspirado e expectorado ou engolido. Agentes de aglutinação e/ou materiais adjuvantes farmacologicamente compatíveis podem ser incluídos como parte da composição. As pastilhas, pílulas, cápsulas, edulcorantes e semelhantes podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes ou

compostos de natureza semelhante: um ligante, tal como celulose microcristalina, goma adragante ou gelatina; um excipiente, tal como amido ou lactose, um agente desintegrante, tal como ácido algínico, Primogel ou amido de milho; um lubrificante, tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um deslizante, tal como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante, tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante, tal como aromatizante de hortelã-pimenta, de alicilato de metil ou de laranja.

[00373] Para administração por inalação, os compostos são distribuídos na forma de um spray de aerossol vindo de um recipiente ou dispensador pressurizado que contém um propulsor adequado, *por exemplo*, um gás, tal como dióxido de carbono ou um nebulizador.

[00374] A administração sistêmica também pode ser por via transmucosa ou transdérmica. Para a administração transmucosal ou transdérmica, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, detergentes, sais biliares e derivados de ácido fusídico. Administração transmucosa pode ser realizada com o uso de sprays nasais ou supositórios. Para administração transdérmica, os compostos ativos são formulados na forma de unguentos, pomadas, géis ou cremes, como é conhecido de forma geral na técnica.

[00375] Os compostos também podem ser preparados na forma de supositórios (*por exemplo*, com bases de supositório convencionais, tais como manteiga de cacau e outras glicerinas) ou enemas de retenção para administração retal.

[00376] Em uma modalidade, os compostos ativos são preparados com carreadores que protegerão o composto contra a rápida eliminação do corpo, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de distribuição microencapsulados. Podem ser usados polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, tais como acetato de vinila, polianidridos,

ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para preparação de tais formulações serão evidentes para aqueles versados na técnica. Os materiais também podem ser obtidos comercialmente pela Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões lipossomais (incluindo os lipossomas direcionados a células infectadas com anticorpos monoclonais para antígenos virais) também podem ser usadas como carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, conforme descrito na Patente US Nº 4.522.811.

[00377] É especialmente vantajoso formular composições orais ou parenterais na forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e uniformidade de dosagem. Forma de unidade de dosagem, conforme utilizado neste documento, refere-se a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para o sujeito a ser tratado; cada unidade contém uma quantidade predeterminada do composto terapêutico calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacêutico exigido. A especificação para as formas de unidade de dosagem da divulgação são ditadas por e diretamente dependentes das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico específico a ser alcançado e das limitações inerentes na técnica de produção de tal composto ativo para o tratamento de indivíduos.

[00378] As composições farmacêuticas podem ser incluídas em um recipiente, embalagem ou distribuidor, juntamente com instruções para administração.

Dosagem

[00379] Conforme fornecido neste documento, a um sujeito é administrado o AA ou um AA conjugado a uma dose de cerca de 1 ng/kg a 100 g/kg. Em modalidades exemplificativas, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de mais de 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Em uma

modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de mais de 6 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 7 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 8 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 9 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 10 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de mais de 6 mg/kg a cerca de 7 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 7 mg/kg a cerca de 8 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 8 mg/kg a cerca de 9 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 9 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de mais de 6 mg/kg a cerca de 8 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 7 mg/kg a cerca de 9 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 8 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 1000 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 400 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 1000 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 240 mg a mais de 600 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 280 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 320 mg. Em uma outra

modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 360 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 360 mg a cerca de 400 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 320 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 360 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 400 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 700 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 700 mg a cerca de 800 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 800 mg a cerca de 900 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 900 mg a cerca de 1000 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 800 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 700 mg a cerca de 900 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose fixa de cerca de 800 mg a cerca de 1000 mg.

[00380] Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado um AA conjugado com base no peso do sujeito.

[00381] Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado um AA conjugado, no qual a dosagem, quando medida em mg/kg, é baseada no peso corporal real do sujeito.

[00382] Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado um AA conjugado em que a dosagem, quando medida em mg/kg, é baseada no peso corporal ideal ajustado (AIBW) do sujeito. Em algumas modalidades, o peso

corporal ideal ajustado é calculado com base em uma diferença entre o peso corporal real do determinado sujeito e um peso corporal ideal (IBW) predeterminado para sujeitos masculinos e femininos, dependendo do sujeito. Em algumas modalidades, o peso corporal ideal do determinado sujeito é baseado na altura do sujeito. Em algumas modalidades, o peso corporal ideal (IBW) para um determinado sujeito do sexo masculino em quilogramas é determinado como $IBW = 0,9 \times (\text{altura em cm}) - 88$, e o IBW para um determinado sujeito do sexo feminino em quilogramas é determinado como $IBW = 0,9 \times (\text{altura em cm}) - 92$. Em algumas modalidades, o peso corporal ideal ajustado (AIBW) para um determinado sujeito em quilogramas é determinado por $AIBW = IBW + 0,4 \times (\text{peso real} - IBW)$, onde o IBW é baseado em sua altura e sexo. Em algumas modalidades, os sujeitos machos e fêmeas são sujeitos humanos. Em algumas modalidades, o AIBW dos sujeitos humanos é de cerca de 40 kg a cerca de 100 kg.

[00383] Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado por via intravenosa todos os dias, a cada 2 dias, a cada 3 dias, a cada 4 dias, a cada 5 dias, a cada 6 dias, a cada 7 dias, a cada 8 dias, a cada 9 dias, a cada 10 dias, a cada 11 dias, a cada 12 dias, a cada 13 dias, a cada 14 dias, a cada 15 dias, a cada 16 dias, a cada 17 dias, a cada 18 dias, a cada 19 dias, a cada 20 dias, a cada 21 dias, ou mesmo a cada 30 dias. Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado por via intravenosa enquanto o AA e/ou agente forem eficazes.

[00384] Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado uma vez ao dia. Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado várias vezes ao dia, por exemplo, a cada 4 horas, a cada 6 horas, a cada 4-6 horas, a cada 8 horas ou a cada 12 horas.

[00385] Em algumas modalidades da presente divulgação, em conjunto com a administração do AA conjugado da presente divulgação, o sujeito pode ser tratado profilaticamente com um ou mais regimes de

tratamento e/ou precauções destinadas a mitigar ou prevenir a toxicidade ocular. Sem haver limitação pela teoria, essas medidas profiláticas destinam-se a mitigar e/ou prevenir a toxicidade ocular associada aos maitansinoides, como o DM4 associado aos AAs conjugados da presente divulgação. Medidas profiláticas exemplificativas para mitigar e/ou prevenir a toxicidade ocular incluem o uso de proteção ocular UV A/B (*por exemplo*, óculos de sol), o uso de colírios de lágrimas artificiais, colírios vasoconstritores tópicos (*por exemplo*, solução oftálmica de tartarato de brimonidina, colírios de tetraidrozolina), e/ou colírios de esteroides tópicos (*por exemplo*, colírios de acetato de prednisolona). Em algumas modalidades, a administração de medidas profiláticas oculares aos sujeitos tratados é opcional. Em algumas modalidades, a administração de medidas profiláticas oculares aos sujeitos tratados é obrigatória.

[00386] A invenção será adicionalmente descrita nos exemplos a seguir, que não limitam o escopo da invenção descrito nas reivindicações.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Produção e Teste de Anticorpos Ativáveis Conjugados que se Ligam a CD166

[00387] Os AAs usados no exemplo abaixo são fornecidos neste documento e foram gerados e caracterizados usando os métodos divulgados na Publicação PCT Nº WO 2016/179285, cujo conteúdo é incorporado neste documento por referência em sua totalidade.

[00388] Os conjugados de fármacos ativáveis para anticorpos anti-CD166 (AADC) (representados na FIG. 1) demonstram atividade antitumoral em modelos de camundongos com tumores de xenoinxerto humano e são bem tolerados em estudos pré-clínicos (Weaver et al. Conferência Internacional AACR-NCI-EOTRC 2015). CD166 é amplamente expresso em muitos cânceres e em tecidos saudáveis, como demonstrado na FIG. 2, Tabela 4A, Tabela 4B e Tabela 5.

Tabela 4A

Tipo de câncer (amostras comerciais)	Prevalência da expressão de CD166 (IHC 3+), %	Prevalência da expressão de CD166 (IHC ≥2 +), %	Prevalência da negatividade de CD166 (IHC <1+), %	Número de casos examinados
Biliar (colangiocarcinoma)	Não calculada	56,5	11,9	177
Mama	70%	87,1	1,7	533
Endometrial	57%	75,2	6,0	315
Cabeça e pescoço	49%	81,1	0,8	122
Pulmão	60%	71,0	8,2	465
Próstata	89%	98,3	0,8	119
Ovariano	52%	70,5	3,9	129

Tabela 4B

Tipo de câncer (assuntos tratados)	Prevalência da expressão de CD166 (IHC 3+), %	Número de casos examinados
Mama	79%	95
Endometrial	67%	3
Cabeça e pescoço	62%	21
Pulmão	64%	22
Próstata	0%	2
Ovariano	59%	107

Tabela 5

Expressão de CD166 em tecidos humanos saudáveis por IHC

Tipo de Tecido	Expressão de	Tipo de Tecido	Expressão de
----------------	--------------	----------------	--------------

	CD166 Humano		CD166 humano
Glândula Adrenal	-/+	Nervo	+ /++
Medula Óssea	-/+	Ovário	- /++
Mama	+ /++	Pâncreas	++ /+++
Cérebro, Telencéfalo	-/+	Próstata	++ /+++
Cérebro, Cerebelo	-/+	Pele	+ /++
Cérvix	+ /++	Intestino Delgado	+ /+++
Cólon	++	Baço	+ /++
Esôfago	+ /++	Estômago	+++
Olho	+	Músculo Estriado/Esquelético	- /+
Coração	+	Testículos	- /++
Rim	+ /+++	Tireoide	++ /+++
Laringe	+ /++	Timo	+
Fígado	++	Útero	+ /+++
Pulmão	+ /++		

[00389] As FIGs. 3-6 mostram que os conjugados de fármaco CD166 AA da invenção produziram respostas completas e duráveis em modelos de camundongos de tumores de xenoinxerto humano em doses iguais ou inferiores à dose humana prevista.

Exemplo 2: Estudo de Marcação Aberta, Multicêntrico e de Escalonamento de dose para Determinar a Segurança de Conjugados Anticorpo Anti-CD166 Fármaco Ativáveis em Sujeitos com Tumores de Alta Expressão de CD-166

[00390] Neste estudo, desfechos de segurança primários, dose máxima tolerável (MTD), dose recomendada de fase 2 (RP2D), toxicidade limitante da dose e atividade antitumoral preliminar de conjugados de fármacos ativáveis contra anticorpos anti-CD166, administrados como monoterapia em

sujeitos com tumores de alta expressão de CD166 (carcinomas de mama, pulmão, próstata, ovário, endométrio, cabeça e pescoço e biliar) são avaliados.

[00391] Desfechos secundários incluem: (1) medir a taxa de resposta objetiva de acordo com a Avaliação de Resposta em Critérios em Tumores Sólidos (RECIST) versão 1.1 ou critérios específicos de tumor, conforme aplicável; (2) tempo para resposta; (3) duração da resposta; (4) sobrevida livre de progressão; (5) sobrevida global; (6) perfil farmacocinético dos AADCs, incluindo a análise de AADCs intactos, AADCs totais, DM4 total conjugado com AADC, DM4 livre e S-metil DM4; e (7) incidência de formação de anticorpos antifármacos.

[00392] Desfechos adicionais incluem (1) a identificação de biomarcadores preditivos associados à atividade clínica de AADCs, como expressão de CD166 e marcadores mitóticos (por exemplo, Ki-67) em amostras de tumor antes e durante o tratamento; e (2) caracterização da atividade de protease e ativação de ADCCs em amostras de biópsia de tumor em tratamento e sangue periférico, respectivamente.

[00393] O estudo apresentado neste exemplo é um estudo de fase 1/2 de marcação aberta, multicêntrico, de escalonamento de dose e de prova de conceito de AADCs anti-CD166, em que o AADC anti-CD166 compreende um anticorpo ativável conjugado com DM4 do anticorpo ativável anti-CD166 referido neste documento como Combinação 55, que compreende a sequência de cadeia pesada da SEQ ID NO: 480 e a sequência de cadeia leve da SEQ ID NO: 246.

[00394] O estudo inclui sujeitos com carcinoma de mama, câncer de próstata resistente à castração (CPRC), colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (HNSCC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Os sujeitos são tratados com um conjugado de fármaco de anticorpo anti-CD166 ativável por via intravenosa a cada 21 dias, e o estudo prossegue nas duas

partes a seguir, Parte A e Parte B. O projeto do estudo também está representado na FIG. 6.

[00395] Na Parte A (Escalonamento de Dose) ($n \leq 50$), a titulação acelerada da dose do ADCC anti-CD166 administrado é seguida por um projeto 3+3 tradicional. Um projeto 3+3 é descrito da seguinte forma: 3 sujeitos são tratados com uma primeira dose de um AADC anti-CD166 e são considerados os efeitos adversos. Se não for observada toxicidade, a dose é aumentada e mais três sujeitos são tratados. Se 1 de 3 sujeitos exibir toxicidade, 3 sujeitos adicionais serão incluídos na primeira dose. Se 2 a 3 sujeitos apresentarem toxicidade, essa dose será indicada como a dose máxima tolerada (descrita em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684552/>). Este estudo é realizado para determinar a MTD e termina em uma coorte de projeto de intervalo de probabilidade de toxicidade modificada 2 (mTPI-2) tratada na MTD para determinar a RP2D.

[00396] A parte B (Expansão da Dose) do estudo é um teste de fase de expansão da dose do AADC anti-CD166 administrado no RP2D nos 7 tipos de tumor (até 14 sujeitos cada, $n \leq 98$).

[00397] Os sujeitos são tratados até a progressão; a duração do tratamento é de aproximadamente 6 meses, com contato de acompanhamento a cada 3 a 6 meses ou por mais 1 ou 2 anos ou enquanto o sujeito estiver vivo.

[00398] Até 150 sujeitos estão incluídos no estudo, tanto na escalada de dose quanto na coorte de expansão. Os principais critérios de elegibilidade para os sujeitos são mostrados na Tabela 6A.

Tabela 6A.

Parte A	• Idade ≥ 18 anos • Status do desempenho do Grupo de Oncologia Cooperativa Eastern (ECOG) de 0 a 1 • Diagnóstico confirmado histologicamente de qualquer tumor sólido irressecável metastático ativo ou
---------	---

	localmente avançado • Concorde em fornecer tecido tumoral (aquisição arquivística, nova ou recente) antes do início do AADC anti-CD166 • Expectativa de vida de ≥ 3 meses
Parte B	• Consentimento de pelo menos 7 sujeitos (pelo menos 1 de cada tipo de tumor), para fornecer uma referência e uma amostra de biópsia do tumor no estudo (se for seguro para realizar a biópsia) e uma amostra de sangue periférico
Carcinoma de mama	• Os sujeitos com carcinoma da mama que expressam receptor de estrogênio (ER+) deveriam ter recebido terapia anti-hormonal e experimentaram progressão da doença • O TNBC recebeu ≥ 2 linhas de terapia anteriores
Carcinoma da próstata resistente à castração	• Recebeu ≥ 1 terapia anterior
Colangiocarcinoma	• Falhou ≥ 1 linha anterior do regime contendo gencitabina
Carcinoma endometrial	• Recebeu ≥ 1 regime contendo platina para doença extra-uterina ou avançada
Carcinoma epitelial de ovário	• Sujeitos com mutação que não seja de câncer de mama (BRCA) (linhagem germinativa ou somática) ou sujeitos com status mutacional de BRCA desconhecido devem ter carcinoma ovariano resistente à platina ou refratário à platina • Sujeitos com mutações no BRCA devem ser refratários ou inelegíveis para inibidores da PARP

HNSCC	• Recebeu ≥ 1 regime contendo platina e inibidor de PD-1 / PD-L1, se aprovado para indicação e localidade do sujeito
NSCLC	• Regime que recebeu ≥ 1 de platina • Um inibidor de checkpoint deveria ter sido administrado, se aprovado para a indicação do sujeito em sua localidade.
Critérios de exclusão	• Transtorno corneano ativo ou crônico, histórico de transplante de córnea, queratite herpética ativa e condições oculares ativas que requerem tratamento/monitoramento contínuo • Doença concorrente grave, incluindo infecção ativa clinicamente relevante • Histórico ou doenças autoimunes ativas atuais • Doença cardíaca significativa, como infarto do miocárdio recente • Histórico de esclerose múltipla ou outra doença desmielinizante, síndrome de Eaton-Lambert (síndrome para-neoplásica), histórico de acidente vascular cerebral hemorrágico ou isquêmico nos últimos 6 meses ou doença hepática alcoólica; • Ferida(s) ou úlcera(s) não cicatrizada(s), exceto lesões ulcerativas causadas pela neoplasia subjacente; • Histórico de reações alérgicas ou anafiláticas graves à terapia prévia com anticorpos monoclonais; • Atualmente recebendo terapia de anticoagulação com varfarina; • Cirurgia de grande porte (exigindo anestesia geral) dentro de 3 meses antes da dosagem.

[00399] Até 150 sujeitos estão incluídos no estudo, tanto na escalada de dose quanto na coorte de expansão. Os eventos adversos e medicações concomitantes são avaliados nos dias 1, 8 e 15 do ciclo 1 do AADC anti-CD166, seguidos de avaliações no primeiro dia de cada ciclo de tratamento subsequente ao final do tratamento. A avaliação dos sintomas oculares e a pontuação do desempenho do ECOG são realizadas na triagem, no primeiro dia de cada ciclo de tratamento e no final do tratamento. O exame oftalmológico completo é realizado em todos os sujeitos na triagem e durante certos pontos do estudo. Os sujeitos que relatarem alterações emergentes do tratamento na visão ou outros sintomas oculares serão submetidos a exames repetidos antes da infusão em todos os outros ciclos e conforme indicado clinicamente. A hematologia e a química sérica são avaliadas a cada visita de tratamento. Amostras de tecido de arquivo ou de biópsia recentes são fornecidas em níveis de avaliação inicial para os sujeitos participando da Parte A. Na Parte B, as biópsias antes e durante o tratamento e a coleta de amostras de sangue periférico (em parte para determinar a integridade do anticorpo ativável) serão obrigatórias para pelo menos 7 sujeitos, 1 de cada tipo de tumor. Em alguns casos, são coletadas biópsias de mais de 1 sujeito de cada tipo de tumor, por exemplo, biópsias de 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou mais sujeitos são coletadas para cada tipo de tumor. As amostras de sangue para análises farmacocinéticas, farmacodinâmicas e de biomarcadores são obtidas em momentos pré-especificados. É realizada geração de imagens para avaliação da resposta de tumor a cada 8 semanas a partir da primeira dose do AADC anti-CD166. Após a última dose da medicação em estudo, os sujeitos são avaliados a cada 3 meses durante o primeiro ano e depois a cada 6 meses ou até a morte.

[00400] Neste estudo exemplificativo, todos os pacientes são submetidos a exame oftalmológico completo na avaliação inicial e durante certos pontos do estudo. Neste estudo exemplificativo, os pacientes que

relatam mudanças emergentes do tratamento na visão ou outros sintomas oculares são submetidos a exames repetidos antes da infusão em cada dois ciclos e conforme indicado clinicamente.

[00401] Em um ponto em que 78 pacientes foram inscritos para tratamento no estudo exemplificativo, 58 dos pacientes (74%) mostraram ter alta expressão de CD166, definida como intensidade de coloração membranosa de 3+ em $\geq 50\%$ das células tumorais. Este grupo de 78 pacientes foi tratado com uma mediana de 6 (variando de 1 a 20) terapias anteriores, incluindo agentes antimicrotúbulo ou agentes contendo platina (75/78 pacientes; 96%), e agentes anti-PD-1 ou anti-PD-L1 (25/78 pacientes; 32%).

[00402] Em uma determinada data limite durante este estudo exemplificativo, 63/78 pacientes (81%) interromperam o tratamento devido à progressão da doença (35/78 pacientes; 45%), deterioração sintomática (10/78 pacientes; 13%), eventos adversos relacionados ao fármaco em estudo (9/78 pacientes; 12%) e por decisão do pesquisador (3/78 pacientes; 4%), desistência do paciente (3/78 pacientes; 4%) e morte não relacionada ao fármaco em estudo (3/78 pacientes; 4%). Até esta determinada data limite no estudo, os pacientes receberam uma mediana de 2 doses do fármaco (variando de 1 a 13 doses), e a duração mediana do tratamento foi de 6,3 semanas (variando de 0,3 a 42,1 semanas). Um resumo da duração e das doses administradas é mostrado na Tabela 6B.

Tabela 6B

Dose (mg/kg)	Nº Mediano de Doses (faixa)	Duração Mediana do Tratamento, semanas (faixa)
< 4 (n = 10)	3 (1 – 3)	8,9 (3,0 – 9,3)
4 -5 (n = 19)	3 (1 – 13)	9,0 (3,0 – 42,1)
6 -7 (n = 18)	2 (1 – 11)	6,2 (3,0 – 33,0)
8 – 9 (n = 23)	2 (1 – 7)	6,1 (0,3 – 22,1)

10 (n = 8)	2 (1 – 3)	6,0 (2,4 – 10,4)
Todas as Coortes (n = 78)	2 (1 – 13)	6,3 (0,3 – 42,1)

[00403] Vários métodos adicionais para avaliar a ativação e atividade do conjugado de anticorpo anti-CD166 ativável por fármaco estão listados na Tabela 7 e na FIG. 7A, 7B.

Tabela 7

Objetivo	Amostra(s)	Ensaio	Método
Determinar a ativação do conjugado de anticorpo anti-CD166 e fármaco	Biopsia, plasma	Ensaio WES TM	Eletroforese capilar com imunodeteção para identificar AADC mascarado e ativado
	Biopsia	Ensaio QZ TM	Deteção de atividade de protease
Correlação de marcadores com atividade do conjugado de anticorpo anti-CD166 e fármaco	Biopsia	IHC	Expressão de CD166, Ki-67

Exemplo 3. Quantificação de Anticorpos Ativáveis anti-CD166

Ativados e Intactos em Amostras Biológicas

[00404] Este Exemplo descreve a capacidade de detectar o anticorpo ativável anti-CD166 ativado e intacto 7614.6-3001-HuCD166 em amostras de tumor de plasma e xenoinxerto de camundongos administrados com 7614.6-3001-HuCD166.

[00405] Os estudos apresentados neste documento usaram o anticorpo ativável anti-CD166 referido neste documento como 7614.6-3001-HuCD166, também conhecido como HuCD166-7614.6-3001, que compreende

a sequência de cadeia pesada da SEQ ID NO: 480 e a sequência de cadeia leve da SEQ ID NO: 246.

[00406] A quantificação de anticorpo ativável anti-CD166 ativável e intacto 7614.6-3001-HuCD166 foi avaliada pelo sistema Wes usando anticorpos IgG anti-humanos (IgG anti-humano (H&L), American Qualex Catalog # A110UK). Os camundongos nude foram implantados por via subcutânea com células 5x10⁶ H292 em meio isento de soro, misturado 1:1 com Matrigel™. Os camundongos contendo 200-500 mm² de xenoenxertos H292 foram doseados com 5 mg/kg de anticorpo ativável anti-CD166 7614.6-3001-HuCD166. Um dia após o tratamento, o tumor e o plasma (heparina) foram coletados e armazenados a -80 °C antes da análise. Homogenatos de tumor foram preparados em Tampão de Lise IP Pierce™ da Thermo Scientific (Catálogo #87788) com Kit de Coctel de Inibidor de Protease de uso Único Halt™ da Thermo Scientific (Catálogo #78430) usando Barocycler (Pressure Biosciences). Um mg/mL de lisado de proteína em tampão de lise IP com inibidor de protease HALT/EDTA e amostras de plasma diluídas 1 em 20 em PBS foram analisadas pelo sistema Wes, conforme descrito neste documento. As FIG. 7A e FIG. 7B demonstram ativação preferencial no tumor (FIG. 7B) em comparação com o plasma (FIG. 7A).

Exemplo 4. Quantificação de Anticorpos Ativáveis Conjugados Anti-CD166 Ativados e Intactos em Amostras Biológicas

[00407] Este Exemplo descreve a capacidade de detectar anticorpo ativável anti-CD166 ativado e intacto, conjugado à toxina maitansinoide DM4 por meio de um ligante de SPDB (combinação 55).

[00408] O exemplo usou um anticorpo ativável conjugado com DM4 do anticorpo ativável anti-CD166 referido neste documento como Combinação 55, que compreende a sequência de cadeia pesada da SEQ ID NO: 480 e a sequência de cadeia leve da SEQ ID NO: 246 conjugada com DM4 através de um ligante de spdb.

[00409] O anticorpo ativável conjugado anti-CD166 foi ativado com 80 µg/ml de matriptase (Catálogo da R&D Systems #3946-SE) ou 80 µg/ml de MMP14 (Catálogo da R&D Systems #918-MP) por 2 horas a 37 °C e misturado com anticorpo ativável conjugado intacto. A mistura foi então analisada pelo sistema Wes conforme descrito acima usando IgG anti-humana (H&L) (Catálogo da American Qualex #A110UK). As FIGS. 8A e 8B mostram a capacidade de separar anticorpos ativáveis conjugados ativados por matriptase (FIG. 8A) ou ativados por MMP14 (FIG. 8B) de anticorpos ativáveis conjugados intactos.

Exemplo 5. Evidência de Resposta Parcial em Vários Sujeitos após Tratamento com Conjugado de Fármaco e Anticorpo Ativável Anti-CD166

[00410] Este exemplo demonstra que a administração de anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado à toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante de SPDB (Combinação 55) resulta em atividade antitumoral, incluindo respostas parciais não confirmadas em vários indivíduos tratados com uma variedade de tipos de tumor.

[00411] Neste exemplo, o sujeito apresentou carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço (HNSCC), exibindo apenas lesões-alvo e sem lesões não alvo na triagem inicial. O sujeito não parece ter desenvolvido novos tumores durante o estudo. O sujeito foi tratado com 5 mg/kg de anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado com a toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante de SPDB (combinação 55) a cada três (3) semanas. A dosagem administrada do anticorpo ativável conjugado foi baseada no peso corporal ideal ajustado do sujeito.

[00412] O sujeito apresentou uma mudança de -31,7% na carga tumoral, desde a triagem inicial (41 mm) até a visita do Ciclo 3 (28 mm), *ou seja*, 9 semanas após a primeira administração. Na visita do Ciclo 6, *ou seja*, 18 semanas após a primeira administração, o sujeito apresentava uma carga

tumoral de (31,6 mm). Portanto, o sujeito apresentou uma Resposta Parcial desde a triagem inicial com base na classificação RECIST v1.1.

[00413] Conforme mostrado nas Tabelas 8A e 8B, um estudo exemplificativo de vários indivíduos tratados com pelo menos 4 mg/kg do anticorpo ativável conjugado (Combinação 55) em diferentes datas limites é resumido. As avaliações resumidas para sujeitos avaliáveis são baseadas em avaliações de resposta pós-avaliação inicial com base na classificação RECIST v1.1. "Controle da doença" refere-se à soma de sujeitos que exibiram resposta completa (CR) não confirmada, resposta parcial (PR) não confirmada e doença estável. A classificação de doença estável incluiu sujeitos que tiveram pelo menos uma avaliação de doença estável ≥ 7 semanas após a data de início do tratamento e não exibiram resposta completa ou doença progressiva após o tratamento. "Não avaliável" incluiu pacientes com doença estável com apenas uma varredura tumoral pós-avaliação inicial avaliável < 7 semanas após o início do tratamento. "Descontinuação precoce" incluiu pacientes que descontinuaram o estudo sem fornecer uma varredura pós-avaliação inicial. Dos 7 pacientes na Tabela 8B que mostraram resposta parcial não confirmada, 5 pacientes apresentaram toxicidade ocular de Grau ≥ 2 que resultou em atraso na dose ou interrupção do tratamento do estudo.

Tabela 8A.

Dose (mg/kg)	Nº de Sujeitos Tratados (n)	Resposta Parcial Não Confirmada	Doença Estável	Controle de Doença	Doença Progressiva	Não Avaliável
4	7	0	4	4	3	0
5	7	2	2	4	3	0
6	7	0	2	2	2	3
7	5	0	2	2	3	0
8	8	1	2	3	4	1

9	2	2	0	2	0	0
10	1	0	0	0	1	0
Todas as dosagens	45	5	12	17	16	4

Tabela 8B (população avaliável por resposta com avaliação da doença pós-avaliação inicial)

Dose (mg/kg)	Nº de Sujeitos Tratados (n)	Resposta Parcial Não Confirmada	Doença Estável	Doença Progressiva	Não Avaliável	Interrupção Precoce
<4	10	0	0	7 (70%)	1 (10%)	2 (20%)
4 – 5	19	3 (16%)	5 (26%)	7 (37%)	0	4 (21%)
6 – 7	18	0	5 (28%)	6 (33%)	3 (17%)	4 (22%)
8 – 9	20	3 (15%)	7 (35%)	7 (35%)	0	3 (15%)
10	4	1 (25%)	0	3 (75%)	0	0
Todas as coortes	71	7 (10%)	17 (24%)	30 (42%)	4 (6%)	13 (18%)

[00414] Em cinco (5) sujeitos exemplificativos no estudo, dois (2) sujeitos apresentaram carcinoma epitelial de ovário, dois (2) sujeitos apresentaram carcinoma de mama e um (1) sujeito apresentou carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). Os sujeitos foram tratados com anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado com a toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante de SPDB (combinação 55) a cada três (3) semanas. A dosagem administrada do anticorpo ativável conjugado foi baseada no peso corporal ideal ajustado do sujeito. Para cada

um desses sujeitos, a quantidade de anticorpo ativável conjugado administrado e a diminuição aproximada na carga tumoral (*ou seja*, redução do tumor) de sua respectiva medição de avaliação inicial estão resumidas na Tabela 9.

Tabela 9

Tipo de Câncer	Dosagem por Ciclo (mg / kg)	Mudança na Carga Tumoral Aprox.	Semanas de Iniciação Pós-Tratamento
HNSCC	5	– 30%	8
Ovariano	5	– 30%	16
Mama	8	– 50%	7
Ovariano	9	– 35%	6
Mama	9	– 85%	5

[00415] No sujeito que apresenta carcinoma de mama triplo-negativo e tratado com 9 mg/kg do anticorpo ativável conjugado, uma tomografia computadorizada transversal realizada na avaliação inicial e 8 semanas após o início do tratamento mostrou redução do tumor no pulmão e nódulos linfáticos consistentes com uma resposta parcial não confirmada em pelo menos duas seções transversais. Este sujeito teve uma recaída anterior após o tratamento com várias linhas de quimioterapia e radioterapia localizada.

[00416] No sujeito refratário ao pembrolizumabe que apresenta carcinoma de mama triplo-negativo e tratado com 8 mg/kg do anticorpo ativável conjugado, uma metástase que se apresenta como uma lesão cutânea antes do tratamento foi resolvida em três ciclos de tratamento com o anticorpo ativável conjugado. Este sujeito teve uma recaída anterior após o tratamento com quimioterapia citorrredutora neo-adjuvante, cirurgia e radioterapia.

[00417] Estes resultados exemplificativos demonstram que dosagens ≥ 4 mg/kg do anticorpo ativável anti-CD166 conjugado com DM4 demonstraram atividade antitumoral, incluindo respostas parciais não confirmadas em uma gama de tumores.

Exemplo 6. Farmacocinética de Anticorpos e Metabólitos Ativáveis Anti-CD166 Totais e Intactos em Seres Humanos Após Tratamento

[00418] Este exemplo demonstra a farmacocinética do anticorpo ativável anti-CD166 total e intacto conjugado à toxina maitansinoide DM4 por meio de um peptídeo ligante de SPDB (combinação 55) após administração em sujeitos humanos.

[00419] No segmento de escalonamento de dose descrito acima, o estudo foi projetado para avaliar a farmacocinética (PK) e a ADA em sujeitos que receberam doses de 0,25 mg/kg a 4,0 mg/kg (com base no peso corporal ideal ajustado do sujeito) do anticorpo ativável anti-CD166 conjugado (Combinação 55). Para os estudos de farmacocinética, análises múltiplas foram usadas para determinar os níveis séricos de (1) anticorpo anti-CD166 ativável intacto, com e sem DM4 conjugado, (2) anticorpo ativável anti-CD166 total (*isto é*, intacto e clivado) total com e sem DM4 conjugado, (3) anticorpo ativável anti-CD166 total (*ou seja*, intacto e clivado) com DM4 conjugado, (4) DM4 livre e (5) S-metil DM4, um metabólito de DM4 citotóxico.

[00420] Os estudos foram realizados analisando amostras de sangue coletadas de sujeitos humanos recebendo o anticorpo ativável anti-CD166 conjugado intacto (Combinação 55). No Ciclo 1 (*isto é*, a administração da 1ª rodada de fármaco), o estudo foi projetado de modo que amostras de sangue fossem coletadas dos sujeitos avaliados pré-infusão no final da infusão e nos dias 2, 3, 4, 8, e 15 durante a visita do sujeito. Nos Ciclos 2, 4, 6, 8 e a cada 8 ciclos subsequentes, o estudo foi projetado de modo que as amostras de sangue sejam coletadas antes da infusão para cada Ciclo. No Ciclo 3, o estudo foi projetado de modo que as amostras de sangue fossem coletadas antes da infusão, no final da infusão e nos dias 8 e 15 durante a visita do sujeito. O estudo foi projetado para coletar uma amostra final de sangue no final do ensaio durante a visita do sujeito.

[00421] Conforme mostrado nas Figs. 9A-9F, os resultados exemplificativos da análise de farmacocinética após a administração das dosagens indicadas da Combinação 55 são representados. Em cada gráfico, a linha pontilhada indica o nível mais baixo de quantificação (LLOQ) para os respectivos ensaios, e os pontos abaixo dessa linha recebem um valor de LLOQ/2. Na Figura 9A, o gráfico mostra as concentrações séricas ao longo do tempo do anticorpo ativável anti-CD166 intacto (*isto é*, não clivado), que é não conjugado ou conjugado com DM4 após a administração da Combinação 55 na dosagem indicada (com base no AIBW) a sujeitos humanos. Na Figura 9B, o gráfico mostra as concentrações séricas ao longo do tempo do anticorpo ativável anti-CD166 total (*isto é*, não clivado e clivado), que é conjugado com DM4 após a administração da Combinação 55 na dosagem indicada (com base no AIBW) a sujeitos humanos. Na Figura 9C, o gráfico mostra as concentrações séricas ao longo do tempo de DM4 livre após a administração da Combinação 55 na dosagem indicada (com base no AIBW) a sujeitos humanos. Na Figura 9D, o gráfico mostra as concentrações séricas ao longo do tempo de S-metil DM4 (DM4-Me) após a administração da Combinação 55 na dosagem indicada (com base em AIBW) a sujeitos humanos. Na Figura 9E, o gráfico mostra as concentrações séricas ao longo do tempo do anticorpo ativável anti-CD166 total (*isto é*, não clivado e clivado), que são ou não conjugadas com DM4 após a administração da Combinação 55 na dosagem indicada (com base no AIBW) a sujeitos humanos. Na Figura 9F, o gráfico mostra as concentrações séricas ao longo do tempo do anticorpo ativável anti-CD166 total (*isto é*, não clivado e clivado) que são ou não conjugadas com DM4 após a administração da Combinação 55 na dosagem indicada (com base no AIBW) a sujeitos humanos. As linhas pontilhadas indicam as quantidades de anticorpo ativável anti-CD166 total (AA), e as linhas sólidas indicam as quantidades de anticorpo ativável anti-CD166 intacto (AA).

[00422] Em alguns estudos exemplificativos da presente divulgação,

o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado (Combinação 55) foi administrado a sujeitos humanos, e a quantidade de anticorpo anti-CD166 ativável dentro dos tumores dos sujeitos que estava na forma ativada (*por exemplo*, clivado) foi determinada. Nestes estudos exemplificativos, a quantidade de anticorpo ativável clivado foi determinada por análise de Western blot usando anticorpos monoclonais específicos para o anticorpo ativável. Em certos resultados exemplificativos desses estudos, sujeitos humanos administrados com dosagens que variam de 4 a 8 mg/kg do anticorpo ativável conjugado (com base em AIBW) forneceram 11 amostras de seus tecidos tumorais, que foram testados quanto à concentração de anticorpo ativável ativado. Os resultados exemplificativos mostraram uma relação em que a quantidade de anticorpo ativável ativado intratumoral aumentou com a dosagem inicial (variando de 4 a 8 mg/kg).

[00423] Os dados farmacocinéticos exemplificativos mostram que o anticorpo ativável anti-CD166 circula no soro predominantemente na forma intacta. O DM4 livre e o DM4-Me circulavam como <1,9 mol% do anticorpo ativável anti-CD166 total. O anticorpo ativável anti-CD166 intacto mediano $t_{1/2}$ variou de 3,71 a 8,57 dias. Após dosagens múltiplas, a razão de acumulação da concentração plasmática mínima (C_{min}) (Dose 3:Dose 1) para anticorpo ativável anti-CD166 intacto não excedeu 1,34 e não apresentou tendência com a dose.

[00424] Os dados exemplificativos também mostram que a razão de anticorpo ativável anti-CD166 intacto total para Dose 1 $AUC_{0-\tau}$ (área sob a curva avaliada até o final do intervalo de dosagem) e C_{max} (concentração plasmática máxima) pareciam aproximadamente consistentes. A exposição intacta e total ao anticorpo ativável anti-CD166 após uma dose única de anticorpo ativável anti-CD166 conjugado geralmente aumentou com o aumento da dose conforme medido por $AUC_{0-\tau}$ e C_{max} .

Exemplo 7. Determinação da Dose Máxima Tolerada (MTD) em

Sujeitos após Tratamento com Anticorpo Ativável Anti-CD166

[00425] Este exemplo demonstra que a administração de anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado à toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante SPDB (Combinação 55) até 10 mg/kg (com base no peso corporal ideal ajustado) não resultou no alcance de uma dose máxima tolerada (MTD).

[00426] Neste exemplo, designado como Parte A2 do estudo, os sujeitos apresentaram carcinoma de mama, carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC), carcinoma epitelial de ovário, carcinoma endometrial ou carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). Além disso, os sujeitos apresentaram alta expressão de CD166 em seus tumores, o que foi definido como coloração de imuno-histoquímica (IHC) de $\geq 50\%$ de coloração de células tumorais em intensidade 3+ (forte) em uma amostra de tecido tumoral de arquivo, onde apenas coloração associada à membrana dentro de células tumorais foi avaliada quanto a estes critérios. Os sujeitos foram administrados com 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg ou 10 mg/kg a cada três (3) semanas em um estudo de escalonamento de dose de anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado à toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante SPDB (Combinação 55). A dosagem administrada do anticorpo ativável conjugado foi baseada no peso corporal ideal ajustado do sujeito. A avaliação quanto à toxicidade limitante de dose (DLT) para cada sujeito foi realizada durante os 21 dias após a administração.

[00427] Durante o período de avaliação da DLT, os eventos adversos foram capturados de acordo com os Critérios de Terminologia Comuns para Eventos Adversos do NCI (NCI CTCAE) v4.03. Com base nestes critérios para eventos adversos (AEs), as DLTs foram definidas como AEs relacionados ao tratamento de Grau 5, certos AEs de relacionados ao tratamento de Grau 4 (incluindo distúrbios oculares de Grau 4) e certos AEs

relacionados ao tratamento de Grau 3. Com base nesses critérios de DLT, uma MTD seria determinada como a dose acima da qual ≥ 2 DLTs por 3 sujeitos em uma coorte (ou ≥ 2 DLTs por 6 sujeitos em uma coorte) foram observadas durante o período de avaliação. Neste exemplo, a MTD não foi alcançada com dosagens de até e incluindo 10 mg/kg.

Exemplo 8. Eventos Adversos Observados em Sujeitos após Tratamento de Monoterapia com Conjugado de Fármaco de Anticorpo Ativável Anti-CD166

[00428] Este exemplo mostra a quantidade e o grau de eventos adversos observados em sujeitos após a administração de anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado com a toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante SPDB (Combinação 55) até 10 mg/kg (todas as dosagens com base no peso corporal ideal ajustado).

[00429] Neste estudo exemplificativo, as observações de eventos adversos foram feitas em sujeitos tratados tanto da Parte A do estudo exemplificativo (*ou seja*, estudos de escalonamento de dose de monoterapia), em que os sujeitos foram tratados com de 0,25 mg/kg a 10 mg/kg de Combinação 55, quanto da Parte A2 do estudo exemplificativo (*ou seja*, pacientes de CD166+++ recebendo dosagens de monoterapia de 4 mg/kg e mais que foram eliminadas na Parte A), em que os sujeitos foram tratados com de 4 mg/kg a 10 mg/kg da Combinação 55. Todas as dosagens administradas foram baseadas no peso corporal ideal ajustado do sujeito. A avaliação de eventos adversos para cada sujeito foi realizada durante os 21 dias após a administração.

[00430] Durante o período de avaliação, os eventos adversos foram capturados de acordo com os Critérios de Terminologia Comuns para Eventos Adversos do NCI (NCI CTCAE) v4.03. O número de sujeitos tratados com o tipo e grau de eventos adversos indicados é mostrado na Tabela 10.

Tabela 10

Dose (mg/kg)	Nº de Sujeitos Tratados (n)	Sujeitos com Eventos Adversos Relacionados ao Tratamento		Sujeitos com Toxicidade Ocular		Sujeitos com Reações à Infusão	
		Grau 1-2	Grau 3-4	Grau 1-2	Grau 3-4	Grau 1-2	Grau 3-4
0,25	1	0	0	0	0	0	0
0,5	3	1	0	0	0	0	0
1	3	2	0	0	0	1	0
2	3	3	0	0	0	1	0
4	10	7	1	2	0	1	0
5	9	6	3	5	1	2	0
6	9	7	2	2	0	3	0
7	9	6	2	3	0	3	0
8	12	6	5	6	2	2	1
9	7	3	2	1	2	0	0
10	5	1	2	1	1	0	0
Todas as dosagens	71	42 (59%)	17 (24%)	20 (28%)	6(8%)	13 (18%)	1(1%)

[00431] Estes dados exemplares mostram que a MTD para o fármaco administrado não foi alcançada com dosagens de até e incluindo 10 mg/kg. Além disso, esses dados exemplificativos também mostram que o medicamento administrado mostrou um perfil de segurança favorável neste estudo exemplificativo com base no número de sujeitos nos quais eventos adversos relacionados ao tratamento de Grau 3-4 (*por exemplo*, náusea, vômito, fadiga, ceratite, hipocalcemia, hiponatremia, neuropatia periférica, testes de função hepática e anemia) foram observados. Neste estudo exemplificativo, AEs graves (Graus 3-4) foram observados em 27 (35%) pacientes. Exemplos

de AEs sérios ocorrendo em ≥ 2 pacientes incluíram náusea (n=4), vômito (n=4), dor abdominal (n=3), obstrução do intestino delgado (n=3), hipocalcemia (n=2), hiponatremia (n=2), reação relacionada à infusão (n=2) e derrame pericárdico (n=2). Neste estudo exemplificativo, AEs relacionados ao tratamento (TRAEs) foram observados em 69 (89%) pacientes; a maioria era de graus CTCAE 1 e 2. Os TRAEs mais comuns ($>10\%$) de qualquer grau foram náusea (32%), fadiga (24%), diminuição do apetite (23%), diarreia (19%), ceratite (19%), reação relacionada à infusão (18%), visão turva (17%), vômito (15%) e aspartato aminotransferase aumentada (13%). Todos os eventos foram administrados por médicos, com melhora ou resolução após o atraso da dose, descontinuação e/ou redução da dose. Neste estudo exemplificativo, 18 pacientes tiveram pelo menos 1 atraso no tratamento; as razões mais comuns para atrasos no tratamento incluíram toxicidade ocular (n=12, 67%) e neuropatia periférica (n=4, 22%).

[00432] Um resumo do número e porcentagem de sujeitos observados com eventos adversos relacionados ao tratamento de Grau 3-4 (TRAE) está resumido nas Tabelas 11A e 11B.

Tabela 11A

Dose (mg/kg)	Nº de Sujeitos (≥ 2) Observados com TRAEs de Grau 3-4 (% de Sujeitos Observados)					
	TRAEs de Grau 3-4 Totais	Distúrbios Oculares	Distúrbios de Metabolismo & Nutrição	Testes da Função Hepática ¹	Doenças Gastrointestinais	Distúrbios do Sistema Nervoso
< 4 (n=10)	0	0	0	0	0	0
4-5 (n=19)	4 (21,1%)	1 (5,3%)	0	0	0	1 (5,3%)

	)					
6-7 (n=18)	4 (22,2%)	0	2 (11,1%)	0	1 (5,6%)	2 (11,1%)
8-9 (n=23)	11 (52,4%)	5 (23,8%)	2 (9,5%)	1 (4,8%)	2 (9,5%)	0
10 (n=8)	4 (50%)	1 (12,5%)	0	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0

Tabela 11B

Dose (mg/kg)	Nº de Sujeitos (≥ 2) Observados com TRAEs de Grau 3-4 (% de Sujeitos Observados)								
	Cerati te	AST Aument ada	ALT Aument ada	Náus ea	HN	Anem ia	Fadi ga	PS N	Vômi to
< 4 (n=10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-5 (n=19)	1 (5%)	0	0	0	0	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	0
6-7 (n=18)	0	0	0	1 (6%)	2 (11%)	1 (6%)	0	1 (6%)	1 (6%)
8-9 (n=23)	4 (17%)	1 (4%)	1 (4%)	2 (9%)	1 (4%)	0	0	0	1 (4%)
10 (n=8)	1 (13%)	3 (38%)	2 (25%)	1 (13%)	0	0	1 (13%)	0	0

							)		
Todas as Coortes (n=78)	6 (8%)	4 (5%)	3 (4%)	4 (5%)	3 (4%)	2 (3%)	2 (3%)	2 (3%)	2 (3%)

AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; HN, hiponatremia; PSN, neuropatia sensorial periférica

[00433] Em uma determinada data limite neste estudo exemplar, 9/78 pacientes (12%) tiveram eventos adversos relacionados ao tratamento (TRAE) que levaram à descontinuação do tratamento. Destes, a ceratite foi o TRAE que resultou na interrupção em 6 pacientes, e a visão turva, a neuropatia periférica e a náusea foram os TRAEs que resultaram na interrupção em 1 paciente cada. Destes, 2 pacientes (2,6%) tinham TRAEs de Grau 4 (1 cada: ceratite, gama-glutamil transferase aumentada). Neste estudo, a profilaxia ocular (*por exemplo*, colírio esteroide) foi introduzida para os 2 níveis de dose principais (*por exemplo*, 9 e 10 mg/kg).

Exemplo 9. Atividade Observada em Vários Sujeitos após o Tratamento com o Conjugado de Fármaco de Anticorpo Ativável Anti-CD166

[00434] Este estudo exemplificativo fornece resultados exemplificativos que demonstram que a administração de anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado à toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante de SPDB (Combinação 55) resulta em atividade antitumoral em certos sujeitos, incluindo respostas parciais não confirmadas em vários indivíduos tratados com uma variedade de tipos de tumor.

[00435] De acordo com a Parte A ou Parte A2 do estudo exemplificativo descrito neste documento, o anticorpo ativável anti-CD166

conjugado com a toxina maitansinoide DM4 através de um peptídeo ligante SPDB (Combinação 55) foi administrado a sujeitos humanos em várias dosagens a cada três (3) semanas. O tamanho médio das lesões tumorais do sujeito foi medida antes e após a administração.

[00436] Com referência às Figs. 10A-10C, os sujeitos que apresentavam o câncer indicado (BR = carcinoma de mama, CC = colangiocarcinoma, EM = carcinoma endometrial, HN = carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, LU = carcinoma de pulmão de células não pequenas, OV = carcinoma epitelial de ovário) e foram administrados com o anticorpo anti-CD166 ativável conjugado (Combinação 55) a uma dosagem do número associado em mg/kg com base no peso corporal ideal ajustado (*por exemplo*, OV-10 corresponde ao sujeito que apresenta câncer epitelial de ovário e foi administrado com uma dosagem de 10 mg/kg AIBW do fármaco a cada três (3) semanas). Com referência à Figura 10B, um gráfico que mostra a mudança percentual na carga tumoral para vários pacientes com várias indicações na dosagem indicada neste estudo exemplificativo. A Figura 10B mostra pacientes que apresentaram Resposta Parcial (PR), Doença Progressiva (PD), Doença Estável (SD) ou Não Avaliável (NE). Esses números não incluem pacientes que foram avaliados quanto à eficácia, mas têm (1) dados de varredura incompletos no momento da data limite (n=9) ou (2) doença não mensurável na avaliação inicial (n=2). Pacientes (n=3) com uma varredura tumoral pós-avaliação inicial avaliável <7 semanas após o início do tratamento classificados como Doença Estável foram considerados como tendo uma melhor resposta geral de Não Avaliável. Conforme mostrado nos resultados exemplificativos da Fig. 10A, o gráfico mostra a melhor variação percentual da soma das medições de lesão alvo de cada sujeito a partir de suas respectivas medições de avaliação inicial. Estes resultados exemplificativos demonstram que as dosagens ≥ 4 mg/kg do anticorpo ativável anti-CD166 conjugado com DM4 demonstraram atividade antitumoral com base na redução do tumor em múltiplas indicações de câncer.

[00437] Como mostrado nos resultados exemplificativos mostrados nas Figs. 10C e 10D, os gráficos mostram a melhor variação percentual da soma das medições da lesão-alvo de cada sujeito a partir de suas respectivas medições de avaliação inicial. Os sujeitos representados na Fig. 10C foram previamente tratados com inibidores da via de PD, enquanto os sujeitos representados na Fig. 10D não foram tratados anteriormente com inibidores da via de PD. Estes resultados exemplificativos demonstram que as dosagens ≥ 4 mg / kg do anticorpo ativável anti-CD166 conjugado com DM4 demonstraram atividade antitumoral com base na redução do tumor em múltiplas indicações de câncer, independentemente do fato de se o sujeito foi previamente tratado com inibidores da via de PD.

[00438] Com referência às Figs. 11A e 11B, estes resultados exemplificativos mostram a resposta de pacientes com câncer de mama que foram tratados com 4-10 mg/kg do anticorpo ativável anti-CD166 (Combinação 55) conjugado com DM4 neste estudo exemplificativo. Esses gráficos mostram a melhor variação percentual da soma das medidas da lesão-alvo de cada sujeito a partir de suas respectivas medições de avaliação inicial. A Figura 11C mostra os tempos de tratamento para os pacientes correspondentes, em que cada barra indica um período de 3 semanas após a administração do fármaco e lacunas indicando períodos de tempo em que o paciente não recebeu uma administração subsequente após 3 semanas após a administração anterior. O Paciente 1 teve uma varredura tumoral de acompanhamento com avaliação de eficácia incompleta e é mostrado como Não Avaliável no gráfico para esta avaliação. Pacientes (N=3) que foram avaliados quanto à eficácia, mas com dados de varredura incompletos inseridos na data limite de dados, não estão incluídos na figura. Pacientes (n=2) com 1 varredura tumoral pós-avaliação inicial avaliável <7 semanas após o início do tratamento classificados como Doença Estável foram considerados como tendo uma melhor resposta geral de Não Avaliável. Estes resultados exemplificativos demonstram que 3 desses

pacientes avaliáveis por resposta aos quais foram administradas dosagens ≥ 4 mg/kg do anticorpo ativável anti-CD166 conjugado com DM4 apresentaram Resposta Parcial na data limite.

[00439] Conforme mostrado nos resultados exemplificativos nas Figs. 12A e 12B, estes resultados exemplares mostram a resposta dos pacientes na Parte A e/ou A2 e seu nível de expressão de CD166 em suas células tumorais. Conforme descrito neste documento, neste estudo exemplificativo, os pacientes foram tratados com 4-10 mg/kg do anticorpo ativável anti-CD166 (Combinação 55) conjugado com DM4. A Figura 12A mostra os resultados dos pacientes com alta expressão de CD166, que foi definida como coloração imuno-histoquímica (IHC) de $\geq 50\%$ da coloração de células tumorais em intensidade 3+ (forte) em uma amostra de tecido tumoral de arquivo, onde apenas colorações associada à membrana dentro das células tumorais foram avaliadas quanto a estes critérios. A Figura 12B mostra os resultados dos pacientes com expressão de CD166 mais baixa. Esses gráficos mostram a melhor variação percentual da soma das medidas da lesão-alvo de cada sujeito a partir de suas respectivas medições de avaliação inicial. Estes resultados exemplificativos demonstram uma correlação entre o nível de expressão de CD166 no paciente com a eficácia do tratamento com o fármaco, incluindo a observação de que pacientes com alta expressão de CD166 apresentaram Resposta Parcial.

MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[00440] A invenção pode ser definida por referência às seguintes modalidades ilustrativas enumeradas.

Modalidade 1. Um método para tratar, aliviar um sintoma ou retardar a progressão de um câncer em um sujeito, o qual compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado com um agente para um sujeito em necessidade deste, em que ao sujeito é administrado o AA conjugado com um agente em uma

dose superior a 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg,

(A) em que o AA compreende:

a. um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 240;

b. uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 222; e

c. uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76; ou

(B) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 314; ou

(C) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239 e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 246;

e/ou, ou declarado de uma maneira alternativa, a Modalidade 1 é um anticorpo ativável (AA) conjugado com um agente para uso no tratamento, alívio de um sintoma de, ou retardamento da progressão de um câncer em um sujeito,

(A) em que o AA compreende:

a. um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 240;

b. uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 222; e

c. uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76; ou

(B) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 314; ou

(C) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239 e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 246;

[00441] **Modalidade 2.** O método ou uso de acordo com a modalidade 1, em que o câncer é carcinoma da mama, carcinoma da próstata resistente à castração, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço ou câncer de pulmão de células não pequenas.

[00442] **Modalidade 3.** O método ou uso de acordo com a modalidade 1, em que o câncer é carcinoma de mama, carcinoma de próstata, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma de ovário, carcinoma de cabeça e pescoço ou câncer de pulmão.

[00443] **Modalidade 4.** Um método para inibir ou reduzir o crescimento, a proliferação ou a metástase de células que expressam CD166 em um sujeito, o qual compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para um sujeito em necessidade deste, em que ao sujeito é administrado o AA conjugado a um agente em uma dose superior a 6 mg/kg a cerca de 10 mg / kg, em que o AA compreende:

a. um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste (AB) que se liga especificamente a CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480, e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 240;

b. uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 222; e

c. uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76.

[00444] e/ou, ou declarada de uma maneira alternativa, a Modalidade 3 é um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para uso na inibição ou redução do crescimento, da proliferação ou da metástase de células que expressam CD166, por exemplo, para o tratamento de câncer em um sujeito, em que o AA compreende:

a. um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste (AB)

que se liga especificamente a CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 480, e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO : 240;

b. uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 222; e

c. uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76; e

em que o AA é para administração em uma quantidade terapeuticamente eficaz a um sujeito em necessidade deste.

[00445] **Modalidade 5.** O método ou uso de acordo com a modalidade 4, em que o sujeito sofre de carcinoma da mama, carcinoma da próstata resistente à castração, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço ou câncer de pulmão de células não pequenas.

[00446] **Modalidade 6.** O método ou uso de acordo com a modalidade 4, em que o sujeito sofre de carcinoma de mama, carcinoma de próstata, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma de ovário, carcinoma de cabeça e pescoço ou câncer de pulmão.

[00447] **Modalidade 7.** O método da modalidade 4, em que as células são células da mama, células da próstata, células endometriais, células de ovário, células de cabeça ou pescoço, células do duto biliar, ou células do pulmão.

[00448] **Modalidade 8.** O método de acordo com qualquer uma das modalidades 1-7, em que o agente é um maitansinoide ou derivado deste.

[00449] **Modalidade 9.** O método de acordo com qualquer uma das

modalidades 1-8, em que o agente é DM4.

[00450] **Modalidade 10.** O método de acordo com qualquer uma das modalidades 1-9, em que o DM4 é conjugado ao AA através de um ligante peptídico.

[00451] **Modalidade 11.** O método ou uso de acordo com a modalidade 10, em que o ligante peptídico compreende uma fração de SPBD.

[00452] **Modalidade 12.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-11, em que o AB está ligado à CM.

[00453] **Modalidade 13.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-12, em que a MM está ligada à CM, de modo que o AA em um estado não clivado compreende o arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte forma: MM-CM-AB ou AB-CM-MM.

[00454] **Modalidade 14.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-13, em que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a MM e a CM.

[00455] **Modalidade 15.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-14, em que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

[00456] **Modalidade 16.** O método ou uso de acordo com a modalidade 14, em que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479.

[00457] **Modalidade 17.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-16, em que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

[00458] **Modalidade 18.** O método ou uso de acordo com a modalidade 17, em que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos de GGS.

[00459] **Modalidade 19.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidade 1-18, em que o AA compreende um primeiro peptídeo de

ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2), e em que o AA, no estado não clivado, tem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal da seguinte forma: MM-LP1-CM-LP2-AB ou AB-LP2-CM-LP1-MM.

[00460] **Modalidade 20.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-19, em que a cadeia leve está ligada a um espaçador em seu terminal N.

[00461] **Modalidade 21.** O método ou uso de acordo com a modalidade 20, em que o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305.

[00462] **Modalidade 22.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-21, em que a MM e a CM estão ligadas à cadeia leve.

[00463] **Modalidade 23.** O método ou uso de acordo com a modalidade 22, em que a MM está ligada à CM, de modo que o AA em um estado não clivado compreende o arranjo estrutural do terminal N ao terminal C em sua cadeia leve da seguinte forma: espaçador-MM-LP1-CM-LP2-cadeia leve.

[00464] **Modalidade 24.** O método ou uso da modalidade 23, em que o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305, LP1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479 e LP2 compreende a sequência de aminoácidos de GGS.

[00465] **Modalidade 25.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-24, em que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 314.

[00466] **Modalidade 26.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-25, em que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 246.

[00467] **Modalidade 27.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-26, em que o sujeito tem pelo menos 18 anos de idade.

[00468] **Modalidade 28.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-27, em que o sujeito possui um status de desempenho de ECOG de 0-1.

[00469] **Modalidade 29.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-28, em que o sujeito possui um diagnóstico histologicamente confirmado de um câncer metastático ativo.

[00470] **Modalidade 30.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-28, em que o sujeito possui um diagnóstico histologicamente confirmado de um tumor sólido não operável localmente avançado.

[00471] **Modalidade 31.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-30, em que o sujeito tem uma expectativa de vida de pelo menos 3 meses no momento da administração ou uso.

[00472] **Modalidade 32.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-31, em que o sujeito possui um carcinoma de mama.

[00473] **Modalidade 33.** O método ou uso de acordo com a modalidade 32, em que o carcinoma de mama é ER+.

[00474] **Modalidade 34.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 31-33, e que recebeu terapia anti-hormonal prévia e experimentou progressão da doença.

[00475] **Modalidade 35.** O método ou uso de acordo com a modalidade 32, em que o sujeito tem um câncer de mama triplo negativo e foi submetido a pelo menos duas linhas de terapia prévias.

[00476] **Modalidade 36.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-31, em que o sujeito tem carcinoma de próstata resistente à castração.

[00477] **Modalidade 37.** O método ou uso de acordo com a modalidade 36, em que o sujeito recebeu pelo menos uma terapia anterior.

[00478] **Modalidade 38.** O método ou uso de acordo com qualquer

uma das modalidades 1-31, em que o sujeito tem colangiocarcinoma.

[00479] **Modalidade 39.** O método ou uso de acordo com a modalidade 38, em que o sujeito falhou em pelo menos uma linha de regime contendo gencitabina prévia.

[00480] **Modalidade 40.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-31, em que o sujeito possui um carcinoma endometrial.

[00481] **Modalidade 41.** O método ou uso de acordo com a modalidade 40, em que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina para doença extrauterina ou avançada.

[00482] **Modalidade 42.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-31, em que o sujeito tem um carcinoma epitelial de ovário.

[00483] **Modalidade 43.** O método ou uso de acordo com a modalidade 42, em que o sujeito tem um carcinoma resistente à platina.

[00484] **Modalidade 44.** O método ou uso de acordo com a modalidade 42, em que o sujeito possui um carcinoma de ovário refratário à platina.

[00485] **Modalidade 45.** O método ou uso de acordo com a modalidade 42, em que o sujeito tem uma mutação BRCA e é refratário ou, de outro modo, inelegível para inibidores de PARP.

[00486] **Modalidade 46.** O método ou uso de acordo com a modalidade 42, em que o sujeito tem uma mutação não BRCA.

[00487] **Modalidade 47.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-31, em que o sujeito tem carcinoma de cabeça e pescoço de pequenas células (HNSCC).

[00488] **Modalidade 48.** O método ou uso de acordo com a modalidade 47, em que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

[00489] **Modalidade 49.** O método ou uso de acordo com a modalidade 47, em que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

[00490] **Modalidade 50.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-31, em que o sujeito tem câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC).

[00491] **Modalidade 51.** O método ou uso de acordo com a modalidade 50, em que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

[00492] **Modalidade 52.** O método ou uso de acordo com a modalidade 50, em que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de checkpoint.

[00493] **Modalidade 53.** O método ou uso de acordo com a modalidade 50, em que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

[00494] **Modalidade 54.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 7 mg/kg.

[00495] **Modalidade 55.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 8 mg/kg.

[00496] **Modalidade 56.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 9 mg/kg.

[00497] **Modalidade 57.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 10 mg/kg.

[00498] **Modalidade 58.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de mais de 6 mg/kg a cerca de 7 mg/kg.

[00499] **Modalidade 59.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 7 mg/kg a cerca de 8 mg/kg.

[00500] **Modalidade 60.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 8 mg/kg a cerca de 9 mg/kg.

[00501] **Modalidade 61.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 9 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

[00502] **Modalidade 62.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de mais de 6 mg/kg a cerca de 8 mg/kg.

[00503] **Modalidade 63.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 7 mg/kg a cerca de 9 mg/kg.

[00504] **Modalidade 64.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que a dose é de cerca de 8 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

[00505] **Modalidade 65.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 1000 mg.

[00506] **Modalidade 66.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 400 mg.

[00507] **Modalidade 67.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 1000 mg.

[00508] **Modalidade 68.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 240 mg a mais de 600 mg.

[00509] **Modalidade 69.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma

dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 700 mg.

[00510] **Modalidade 70.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 800 mg.

[00511] **Modalidade 71.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 360 mg a cerca de 900 mg.

[00512] **Modalidade 72.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 400 mg a cerca de 1000 mg.

[00513] **Modalidade 73.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 280 mg.

[00514] **Modalidade 74.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 320 mg.

[00515] **Modalidade 75.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 360 mg.

[00516] **Modalidade 76.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 360 mg a cerca de 400 mg.

[00517] **Modalidade 77.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 700 mg.

[00518] **Modalidade 78.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 700 mg a cerca de 800 mg.

[00519] **Modalidade 79.** O método ou uso de acordo com qualquer

uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 800 mg a cerca de 900 mg.

[00520] **Modalidade 80.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 900 mg a cerca de 1000 mg.

[00521] **Modalidade 81.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 320 mg.

[00522] **Modalidade 82.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 360 mg.

[00523] **Modalidade 83.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 400 mg.

[00524] **Modalidade 84.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 800 mg.

[00525] **Modalidade 85.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 700 mg a cerca de 900 mg.

[00526] **Modalidade 86.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-53, em que o AA conjugado a um agente está em uma dose fixa de cerca de 800 mg a cerca de 1000 mg.

[00527] **Modalidade 87.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-86, em que o sujeito é administrado ao AA conjugado a um agente por via intravenosa, ou o AA é formulado para uso intravenoso.

[00528] **Modalidade 88.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-83, em que o sujeito é administrado ao AA conjugado a um agente por via intravenosa a cada 21 dias, ou formulado para uso a cada

21 dias.

[00529] **Modalidade 89.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-83, em que o sujeito é administrado ao AA conjugado a um agente por via intravenosa a cada 14 dias, ou formulado para uso a cada 14 dias.

[00530] **Modalidade 90.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 54-64 e 87-89, em que o AA é conjugado a um agente com uma dosagem com base no peso corporal real do sujeito.

[00531] **Modalidade 91.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 54-64 e 87-89, em que o AA é conjugado a um agente com uma dosagem com base no peso corporal ideal ajustado do sujeito.

[00532] **Modalidade 92.** O método ou uso de acordo com qualquer uma das modalidades 1-91, em que o sujeito não teve histórico de doença da córnea aguda ou crônica.

[00533] **Modalidade 93.** O método de acordo com qualquer uma das modalidades 1-92, em que o método compreende a administração ao sujeito de um tratamento profilático para reduzir ou prevenir eventos oculares adversos.

[00534] **Modalidade 94.** O método ou uso de acordo com a modalidade 93, em que o tratamento profilático é administrado diariamente.

[00535] **Modalidade 95.** O método de acordo com as modalidades 93 ou 94, em que o tratamento profilático é um ou mais tratamentos selecionados do grupo que consiste em: lubrificação com lágrimas artificiais, solução oftálmica de tartarato de brimonidina, aplicação de uma compressa fria para os olhos, e colírios de esteroides tópicos.

OUTRAS MODALIDADES

[00536] Embora a invenção tenha sido descrita em combinação com a descrição detalhada da mesma, a descrição supracitada é destinada a ilustrar e não limitar o escopo da invenção, o que é definido pelo escopo das

reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento, alívio de um sintoma, ou retardo da progressão de um câncer em um sujeito, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente a um sujeito em necessidade, em que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose mais de 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, e

(A) em que o AA compreende:

a. um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 240;

b. uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 222; e

c. uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76; ou

(B) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 314; ou

(C) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB

compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 246.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é carcinoma da mama, carcinoma da próstata resistente à castração, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, ou câncer pulmonar de células não pequenas.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é carcinoma de mama, carcinoma de próstata, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma de ovário, carcinoma de cabeça e pescoço, ou câncer de pulmão.

4. Método de inibição ou redução do crescimento, proliferação ou metástase de células que expressam CD166 em um sujeito, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente a um sujeito em necessidade,

em que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose mais de 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, e

(A) em que o AA compreende:

a. um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 240;

b. uma fração de mascaramento (MM) acoplada ao AB, em que a MM inibe a ligação do AB ao CD166 de mamífero quando o AA está em um estado não clivado, em que a MM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 222; e

c. uma fração clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease, e em que a CM compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76; ou

(B) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 314; ou

(C) em que o AA compreende:

um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB) que se liga especificamente ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 ou SEQ ID NO: 239, e uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 246.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito sofre de carcinoma da mama, carcinoma da próstata resistente à castração, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma epitelial de ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, ou câncer pulmonar de células não pequenas.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito sofre de carcinoma de mama, carcinoma de próstata, colangiocarcinoma, carcinoma endometrial, carcinoma de ovário, carcinoma de cabeça e pescoço, ou câncer de pulmão.

7. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que as células são células da mama, células da próstata, células endometriais, células de ovário, células de cabeça ou pescoço, células do duto biliar, ou células do pulmão.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7,

caracterizado pelo fato de que o agente é um maitansinoide ou seu derivado.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, **caracterizado** pelo fato de que o agente é DM4.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, **caracterizado** pelo fato de que o DM4 é conjugado ao AA através de um ligante.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o ligante compreende uma fração SPBD.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o AB está ligado à CM.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, **caracterizado** pelo fato de que a MM está ligada à CM de modo que o AA, em um estado não clivado, compreende o arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte forma: MM-CM-AB ou AB-CM-MM.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-13, **caracterizado** pelo fato de que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a MM e a CM.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-14, **caracterizado** pelo fato de que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, **caracterizado** pelo fato de que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos de GGS.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18, **caracterizado** pelo fato de que o AA compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2), e em que o AA, no estado não clivado, tem o arranjo estrutural do terminal N ao terminal C da seguinte forma: MM-LP1-CM-LP2-AB ou AB-LP2-CM-LP1-MM.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-19, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia leve está ligada a um espaçador em seu terminal N.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-21, **caracterizado** pelo fato de que a MM e a CM estão ligadas à cadeia leve.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a MM está ligada à CM, de modo que o AA, em um estado não clivado, compreende o arranjo estrutural do terminal N ao terminal C em sua cadeia leve da seguinte forma: espaçador-MM-LP1-CM-LP2-cadeia leve.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305, LP1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479, e LP2 compreende a sequência de aminoácidos de GGS.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-24, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 314.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-25, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 246.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem pelo menos 18 anos de idade.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-27, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um status de desempenho de ECOG de 0-1.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um câncer metastático ativo.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um tumor sólido irresssecável localmente avançado.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-30, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem uma expectativa de vida de pelo menos 3 meses no momento da administração.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um carcinoma de mama.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que o carcinoma de mama é ER+.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 32-33, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu terapia anti-hormonal prévia e sofreu progressão da doença.

35. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um câncer de mama triplo negativo e foi submetido a pelo menos duas linhas de terapia prévias.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma da próstata resistente à castração.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos uma terapia prévia.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem colangiocarcinoma.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito não obteve êxito em pelo menos uma linha do regime contendo gemcitabina prévia.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma de endometrial.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina para doença extrauterina ou avançada.

42. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma epitelial de ovário.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um carcinoma resistente à platina.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um carcinoma ovariano refratário à platina.

45. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem uma mutação BRCA e é refratário ou, de outro modo, ineligível para inibidores de PARP.

46. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem uma mutação não BRCA.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma de cabeça e pescoço de pequenas células (HNSCC).

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

49. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

50. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-31, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem câncer pulmonar de células não pequenas (NSCLC).

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

52. Método, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de checkpoint.

53. Método, de acordo com a reivindicação 50, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 7 mg/kg.

55. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 8 mg/kg.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 9 mg/kg.

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 10 mg/kg.

58. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de mais de 6 mg/kg a cerca de 7 mg/kg.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 7 mg/kg a cerca de 8 mg/kg.

60. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 8 mg/kg a cerca de 9 mg/kg.

61. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 9 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

62. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de mais de 6 mg/kg a cerca de 8 mg/kg.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 7 mg/kg a cerca de 9 mg/kg.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 8 mg/kg a cerca de 10 mg/kg.

65. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 1000 mg.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 400 mg.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 1000 mg.

68. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 240 mg a mais de 600 mg.

69. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 700 mg.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 800 mg.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 360 mg a cerca de 900 mg.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a

um agente em uma dose fixa de cerca de 400 mg a cerca de 1000 mg.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 280 mg.

74. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 320 mg.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 360 mg.

76. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 360 mg a cerca de 400 mg.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 700 mg.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 700 mg a cerca de 800 mg.

79. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 800 mg a cerca de 900 mg.

80. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 900 mg a cerca de 1000 mg.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 240 mg a cerca de 320 mg.

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53,

caracterizado pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 280 mg a cerca de 360 mg.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 320 mg a cerca de 400 mg.

84. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de mais de 600 mg a cerca de 800 mg.

85. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 700 mg a cerca de 900 mg.

86. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-53, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 800 mg a cerca de 1000 mg.

87. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-86, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente por via intravenosa.

88. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-87, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente por via intravenosa a cada 21 dias.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-87, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente por via intravenosa a cada 14 dias.

90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54-64 e 87-89, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente com uma dosagem baseada no peso corporal real do sujeito.

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 54-64 e 87-89, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA

conjugado a um agente com uma dosagem baseada no peso corporal ideal ajustado do sujeito.

92. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-91, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito não teve histórico de doença da córnea aguda ou crônica.

93. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-92, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende a administração, ao sujeito, de um tratamento profilático para reduzir ou prevenir eventos adversos oculares.

94. Método, de acordo com a reivindicação 93, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento profilático é administrado diariamente.

95. Método, de acordo com a reivindicação 93 ou reivindicação 94, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento profilático é um ou mais tratamentos selecionados do grupo que consiste em: lubrificação com lágrimas artificiais, solução oftálmica de tartarato de brimonidina, aplicação de uma compressa fria para os olhos, e colírios de esteroides tópicos.

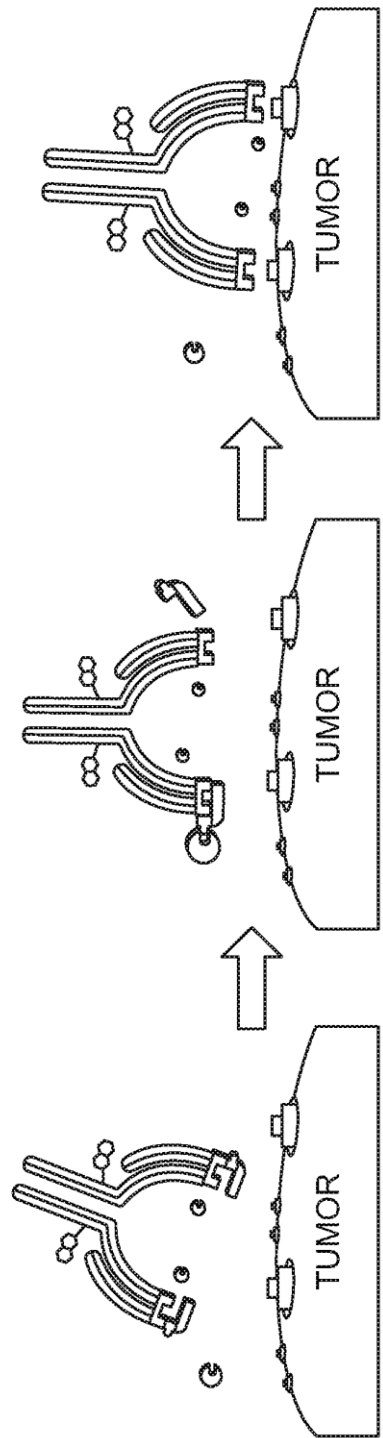
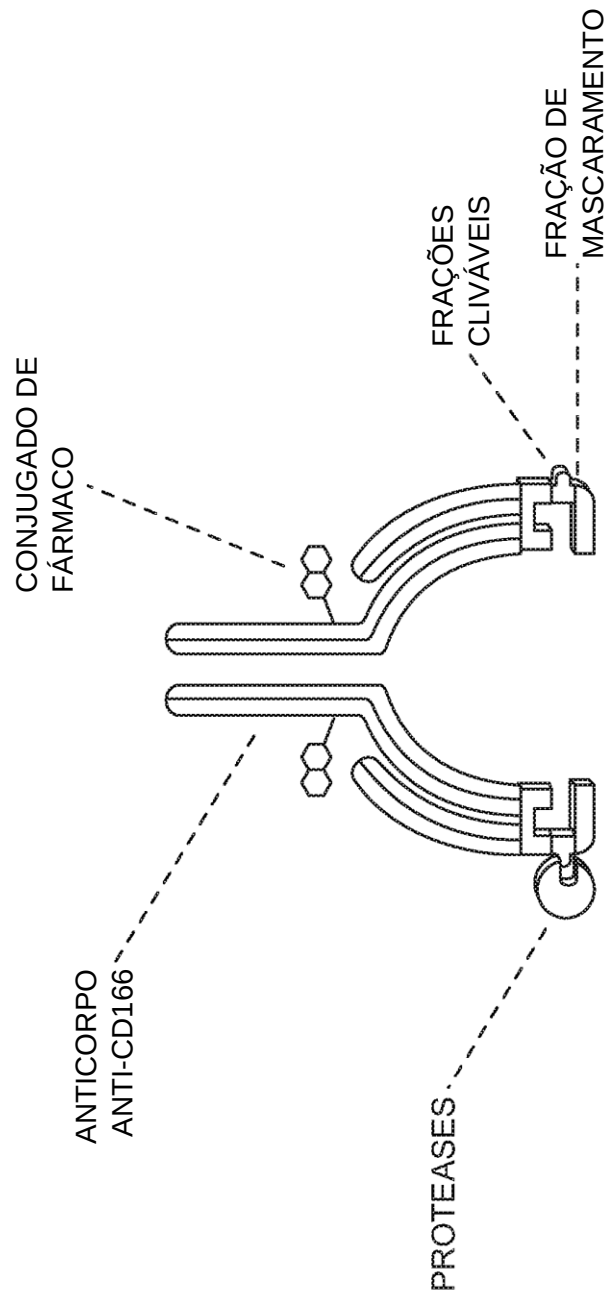


FIG.1

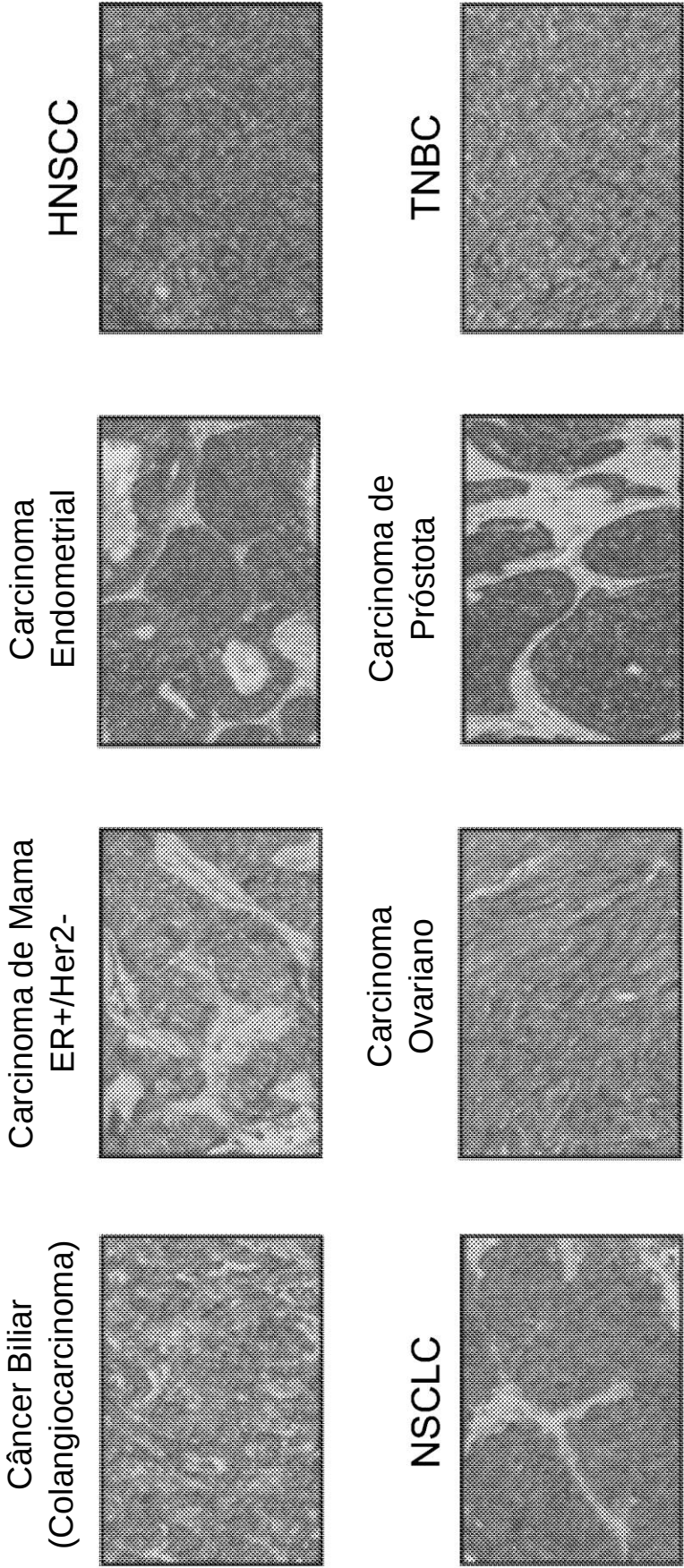
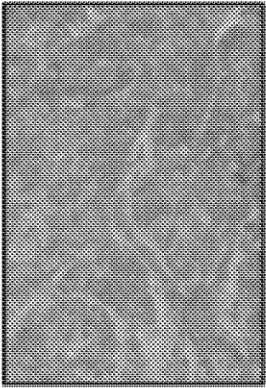
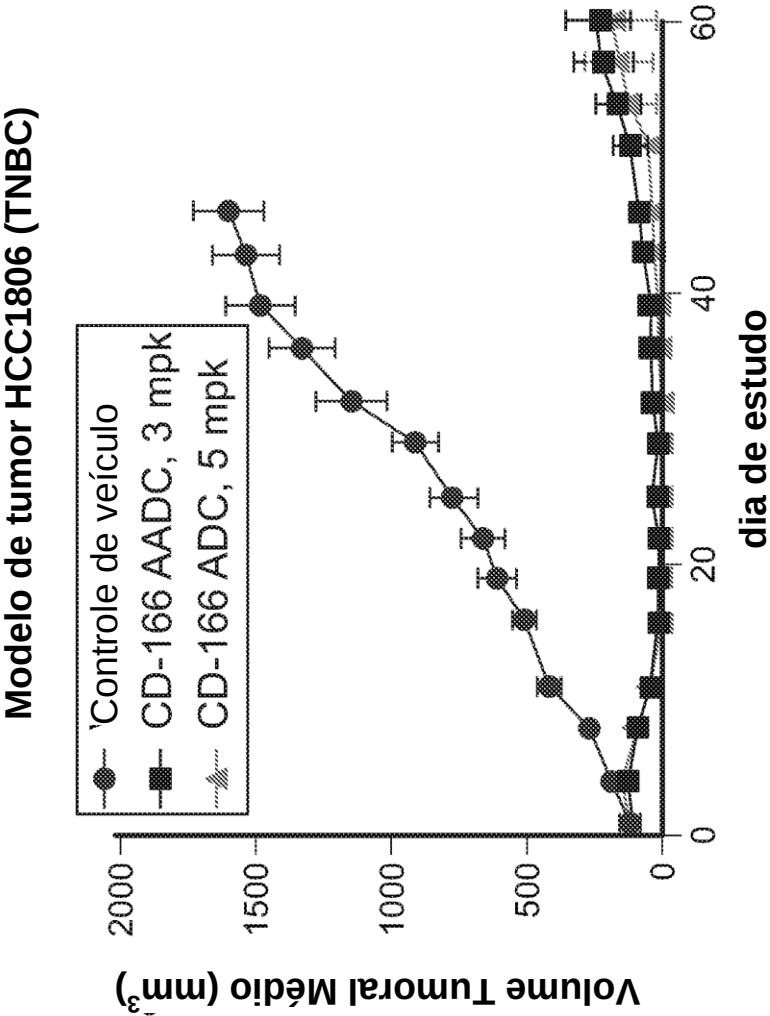


FIG. 2



CD166 IHC

FIG. 3

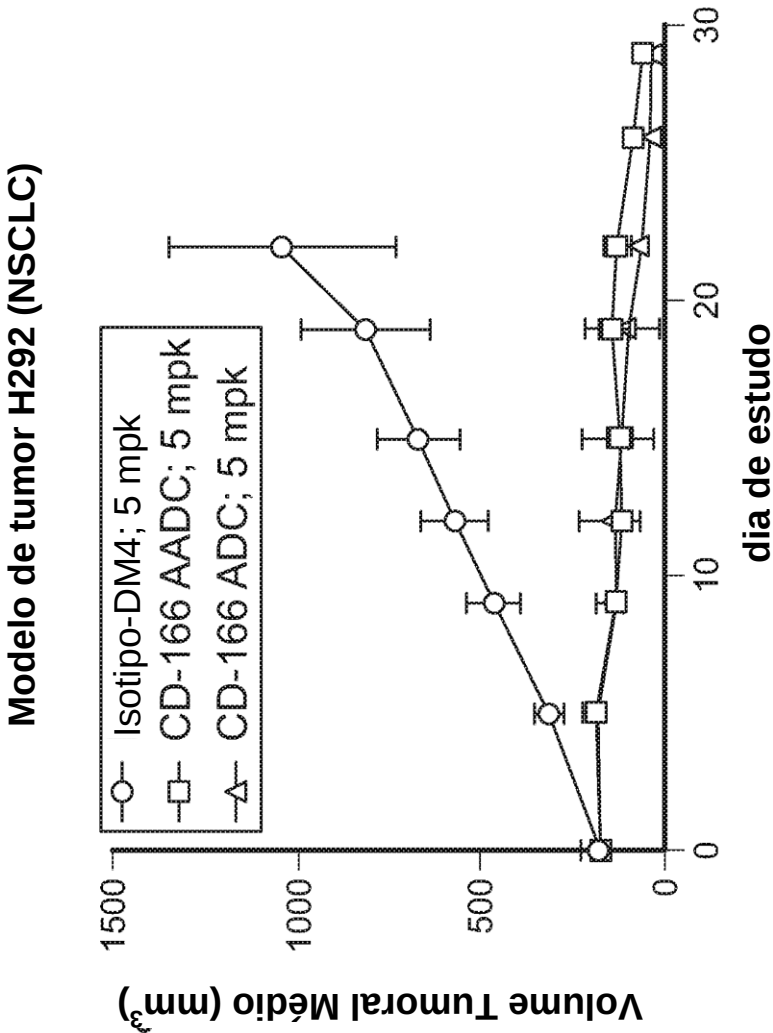


FIG. 4

Modelo de PDX Ovariano

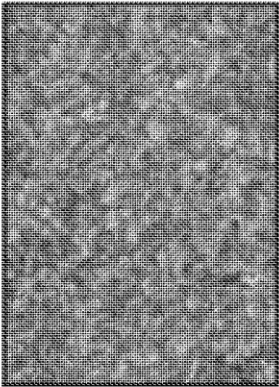
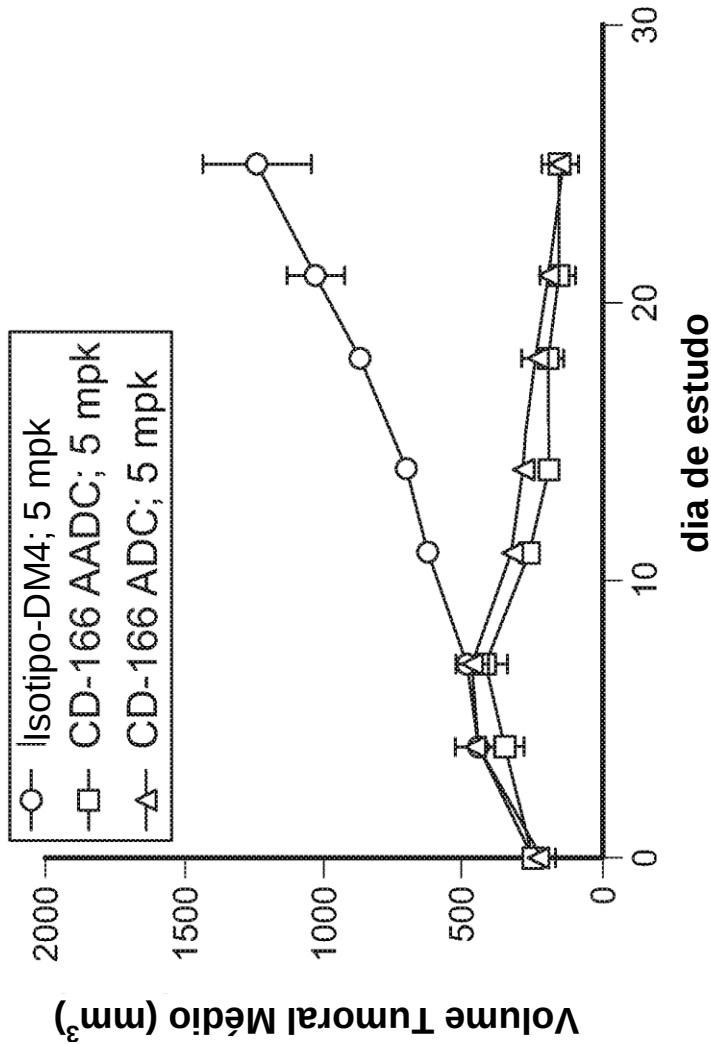


FIG. 5

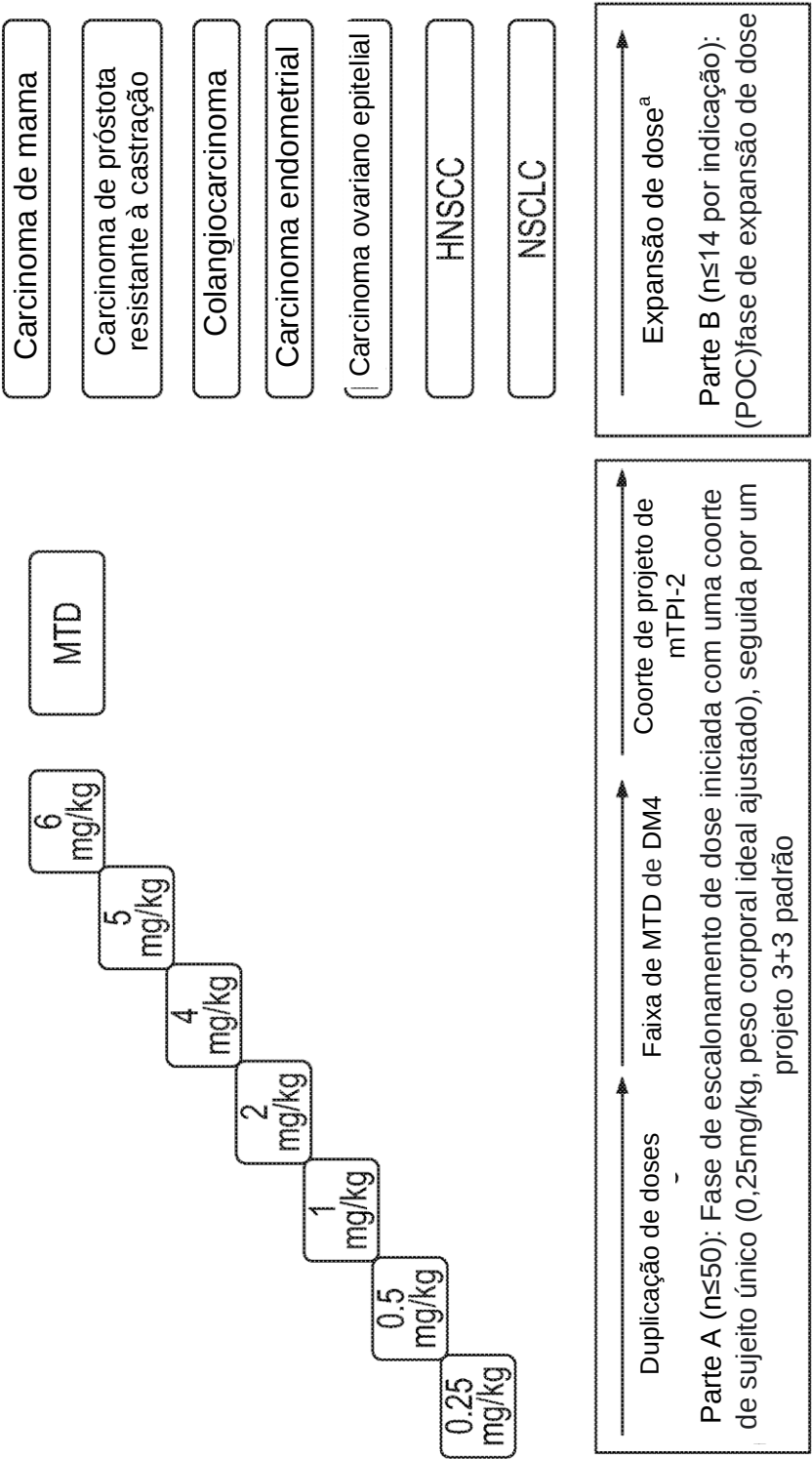
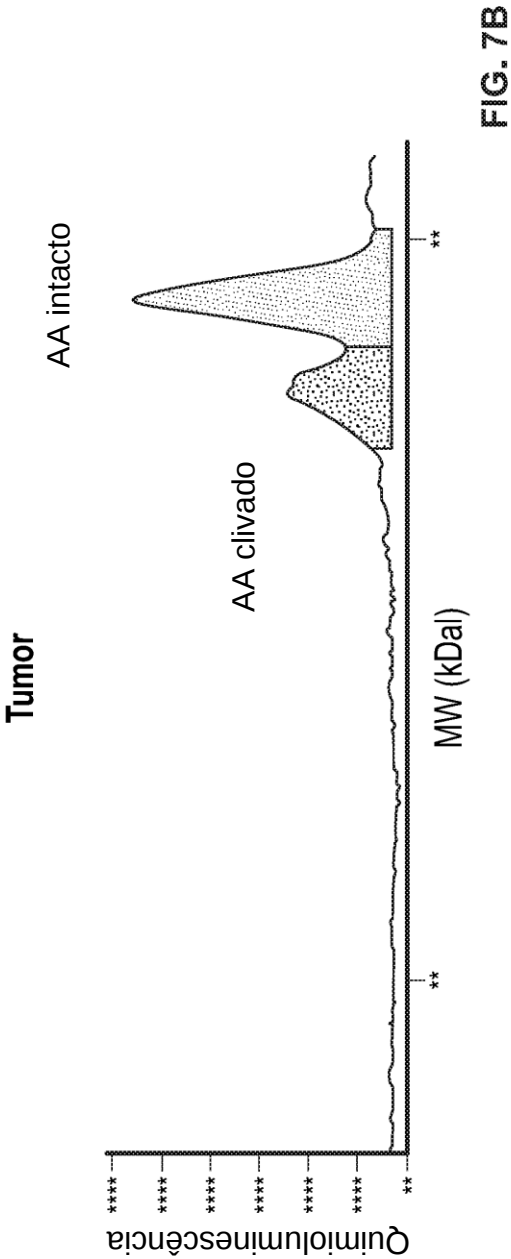
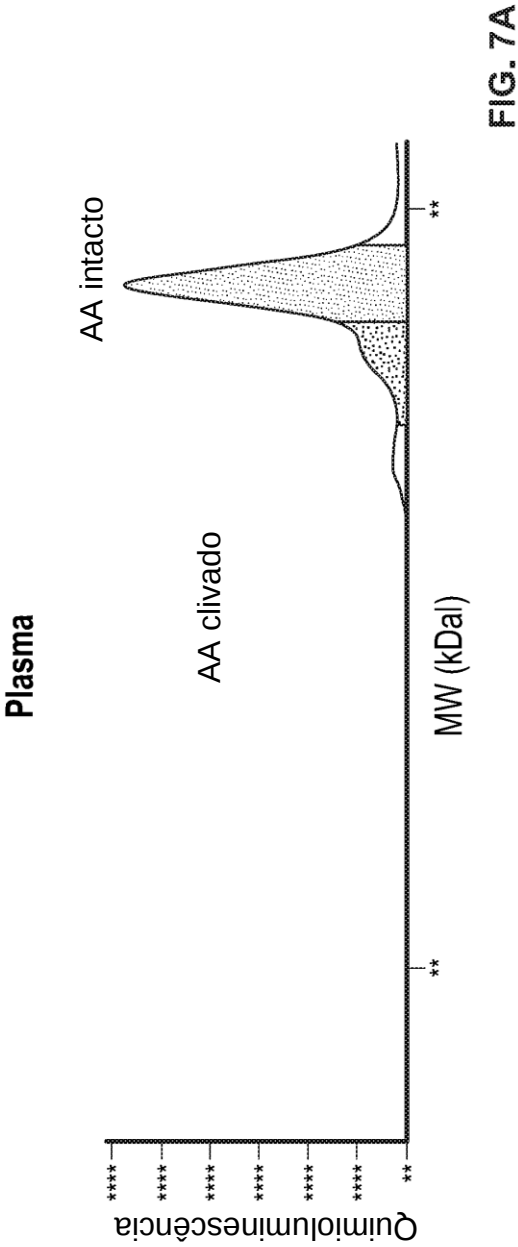


FIG. 6



7614.6-3001-HuCD166 clivado por MMP14

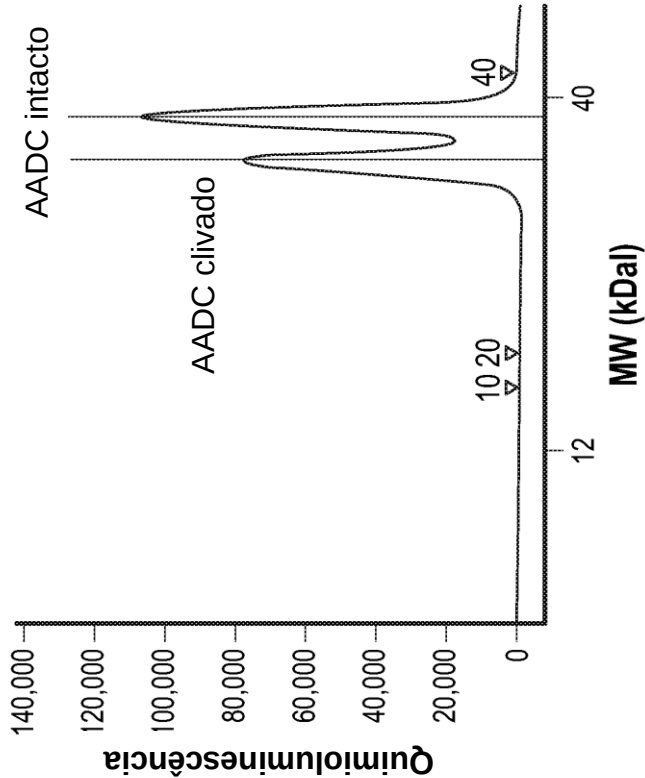


FIG. 8B

7614.6-3001-HuCD166 clivado por MT-SPI

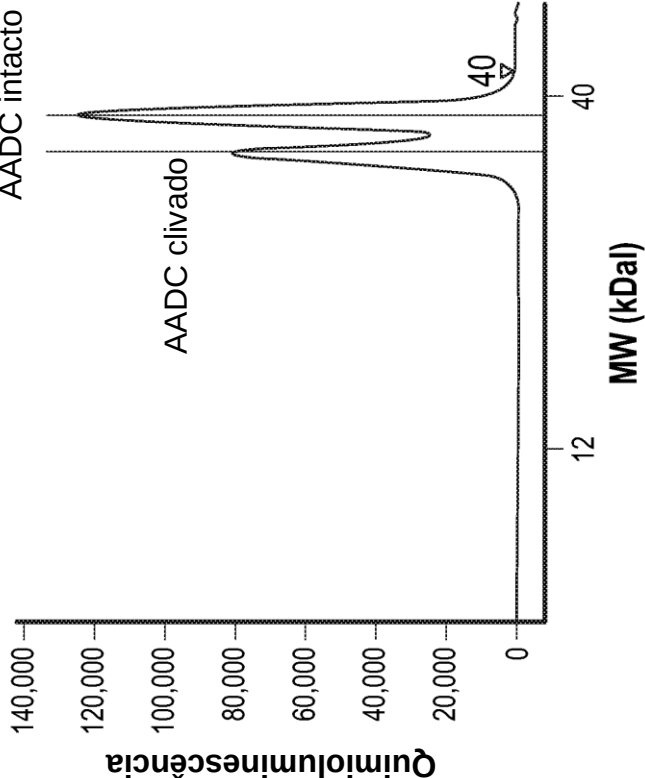


FIG. 8A

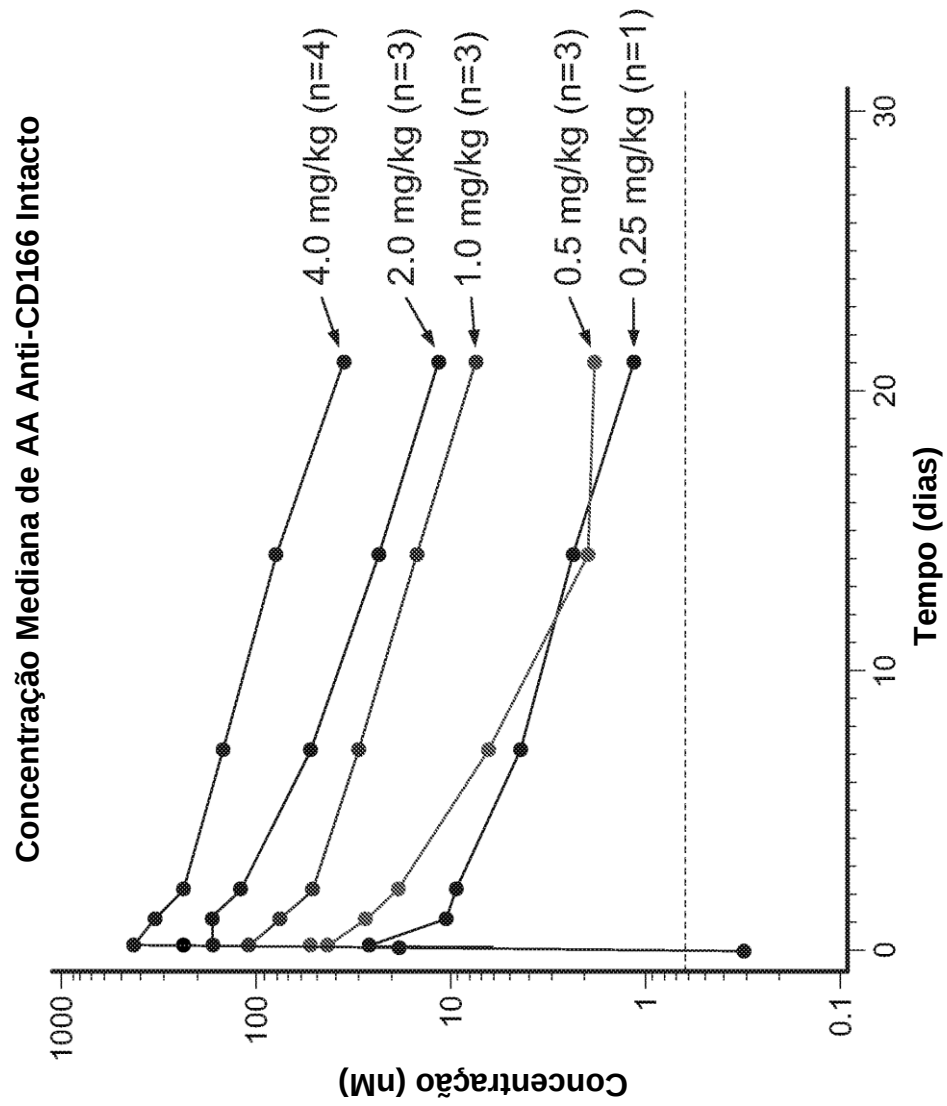


FIG. 9A

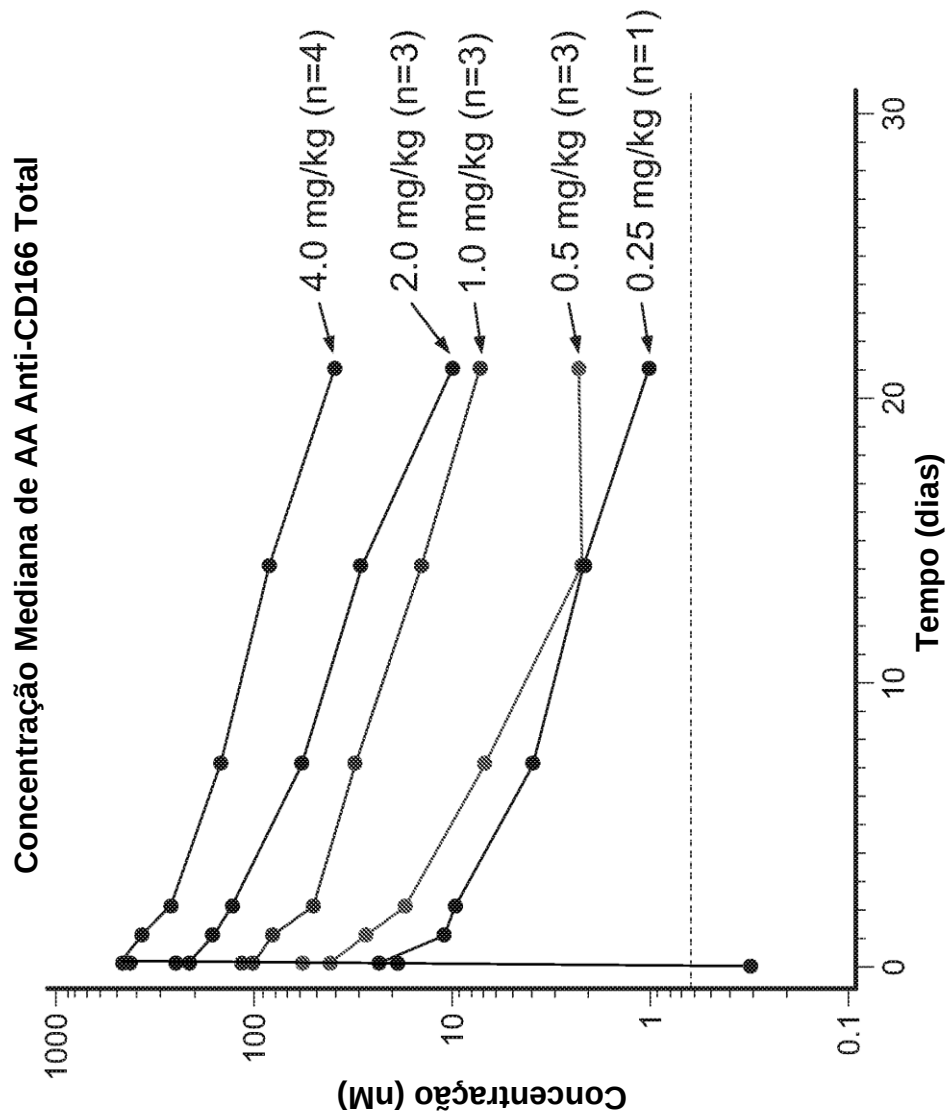


FIG. 9B

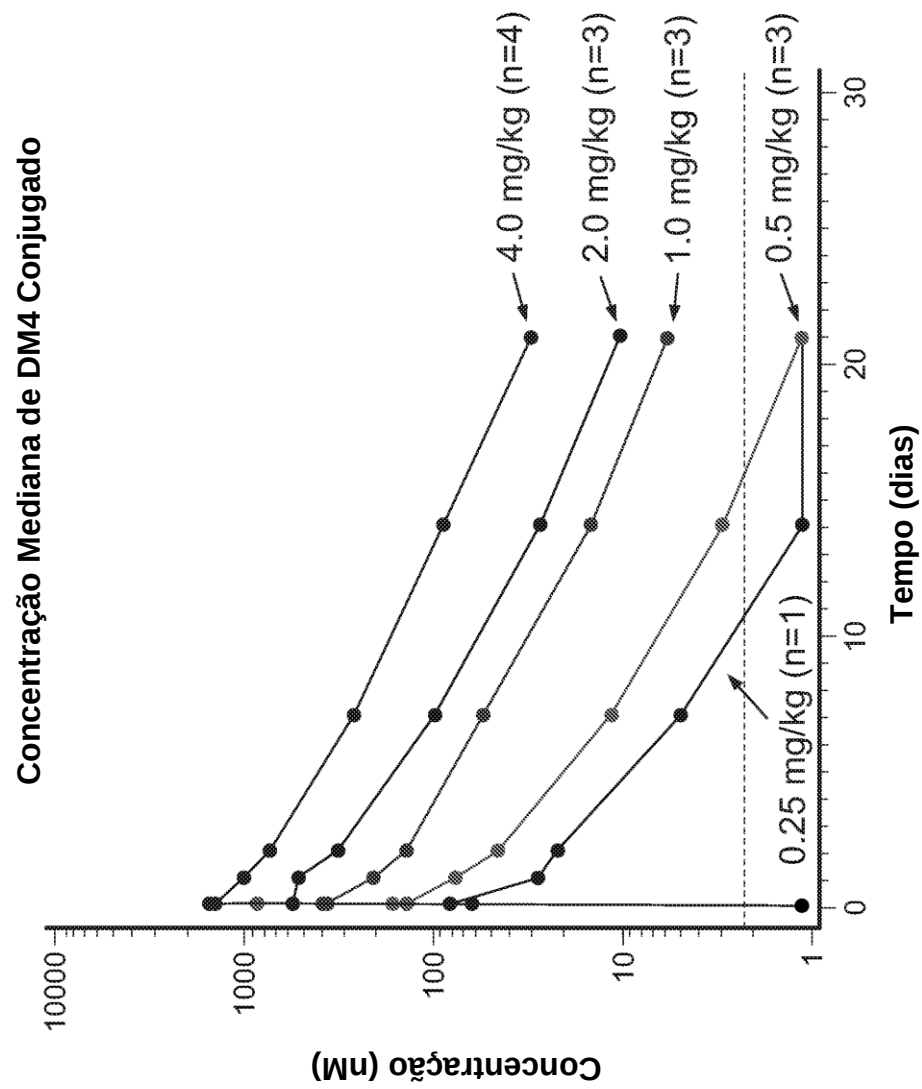


FIG. 9C

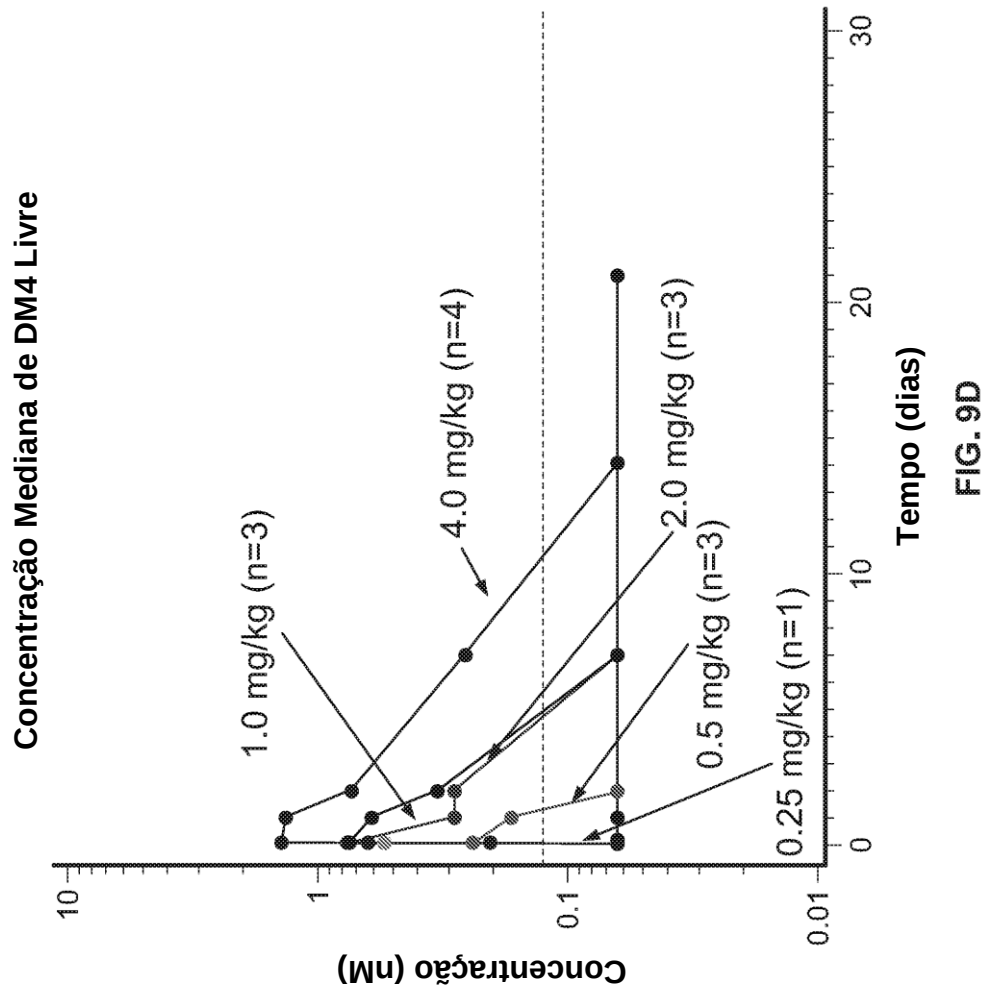


FIG. 9D

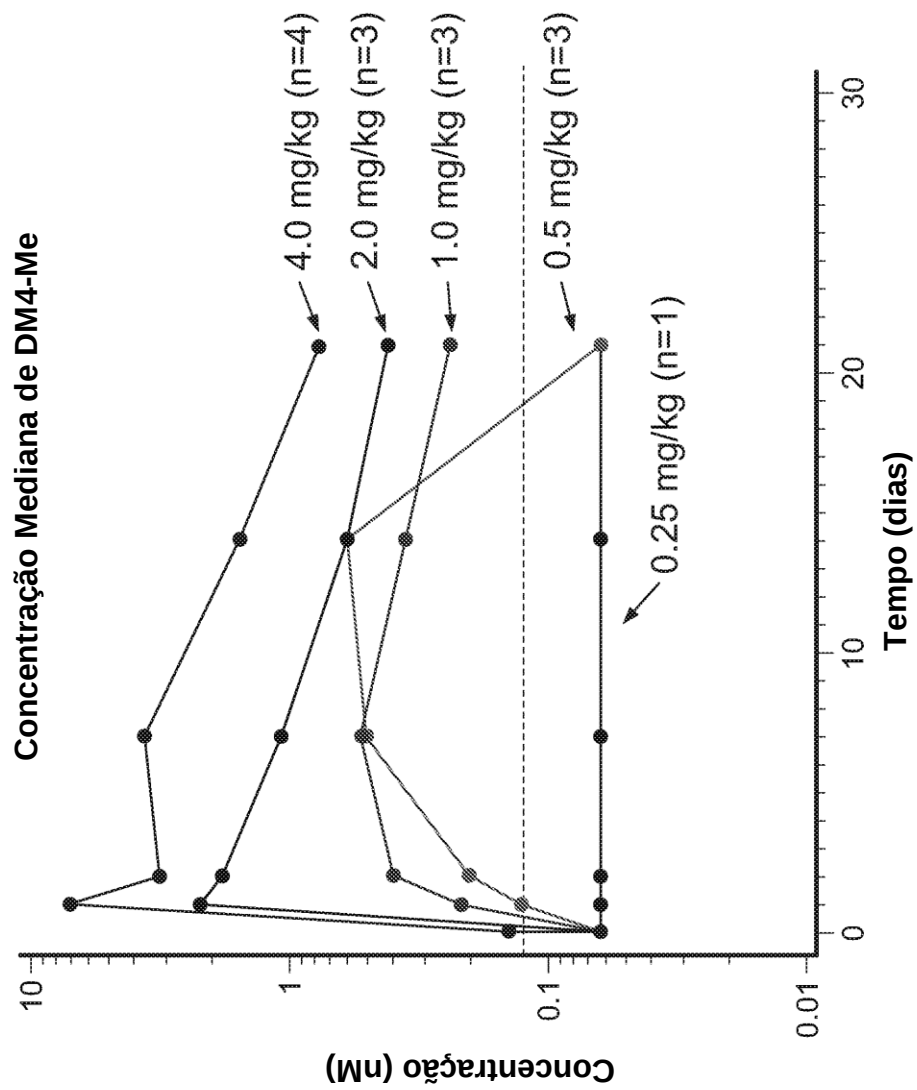


FIG. 9E

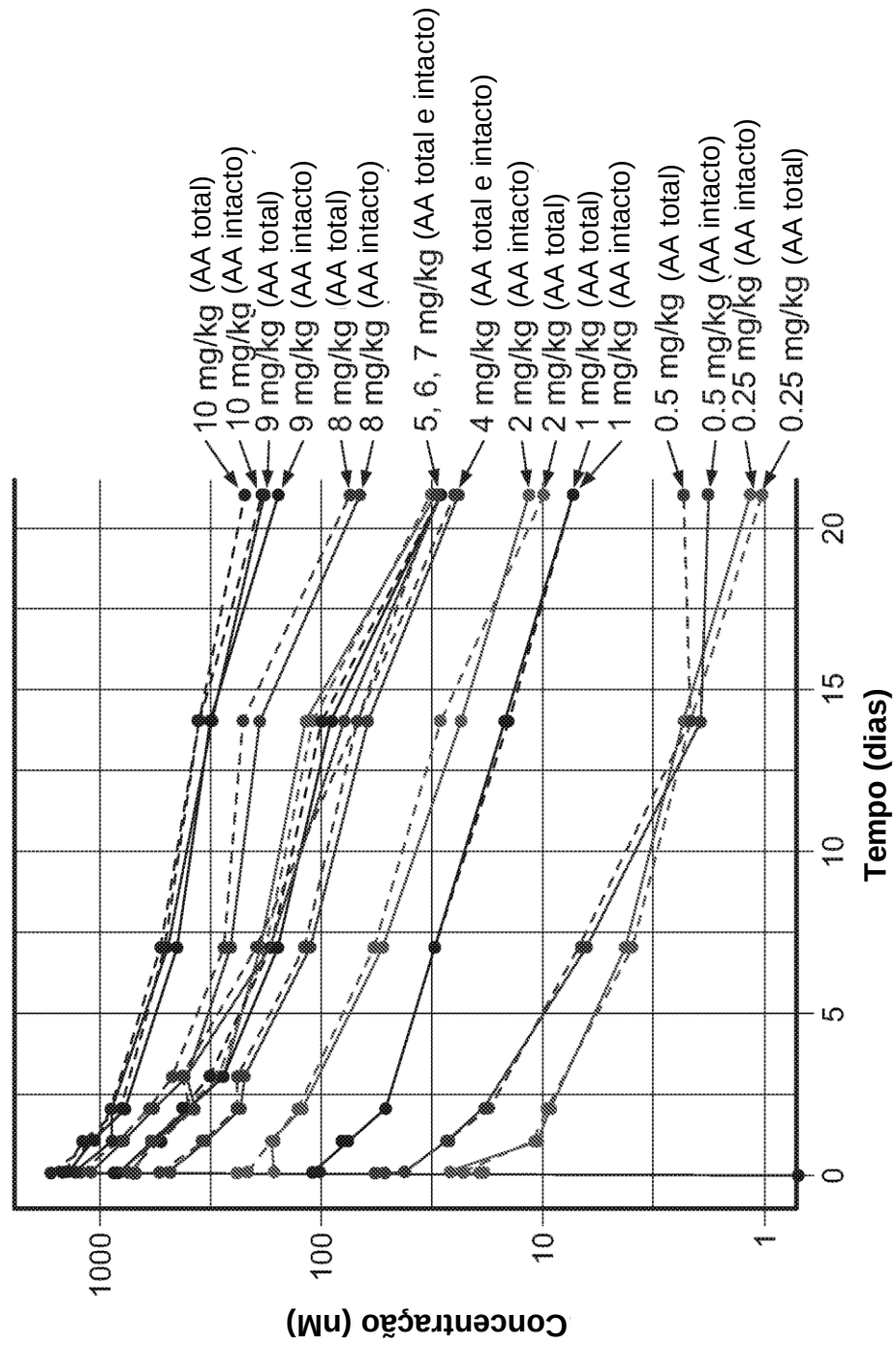
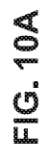


FIG. 9F



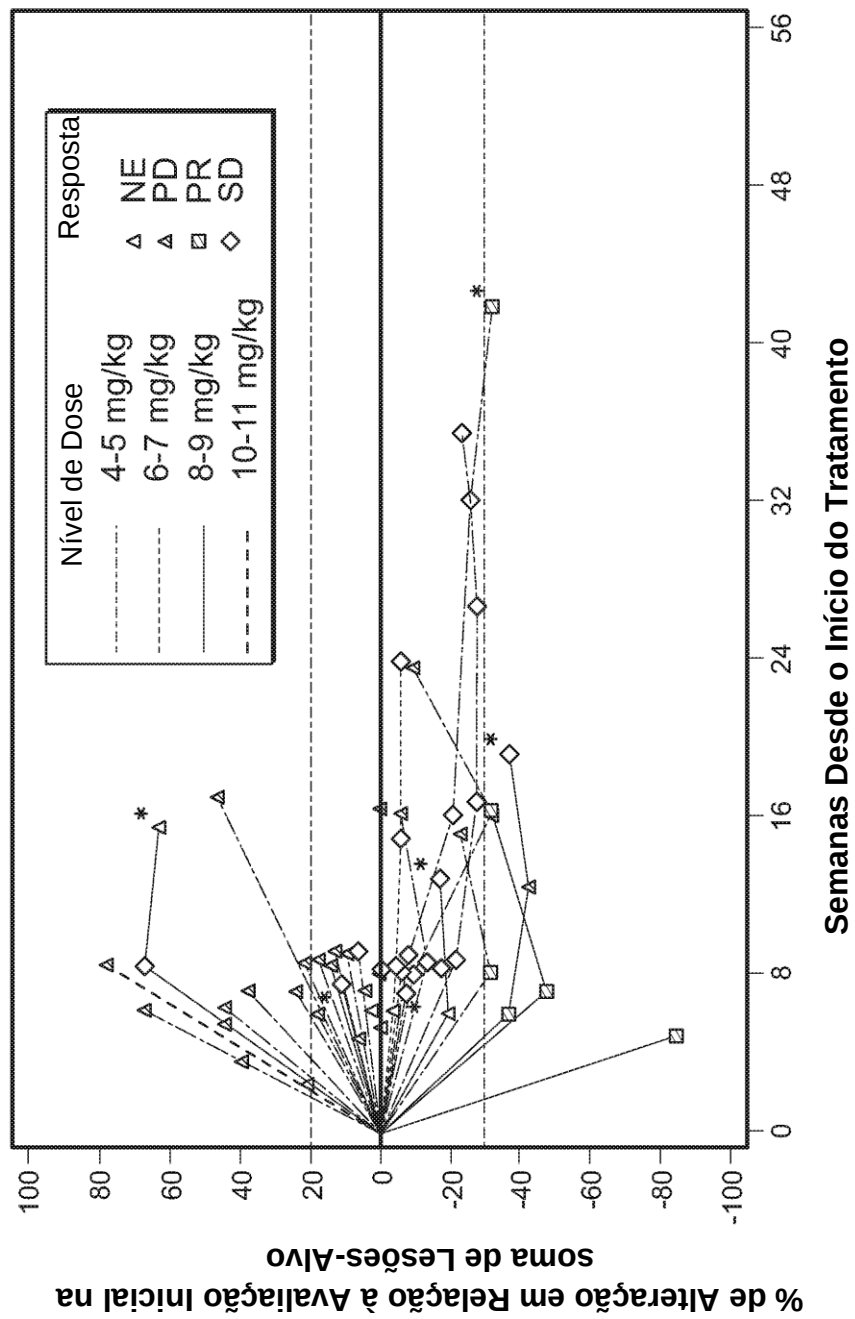


FIG. 10B

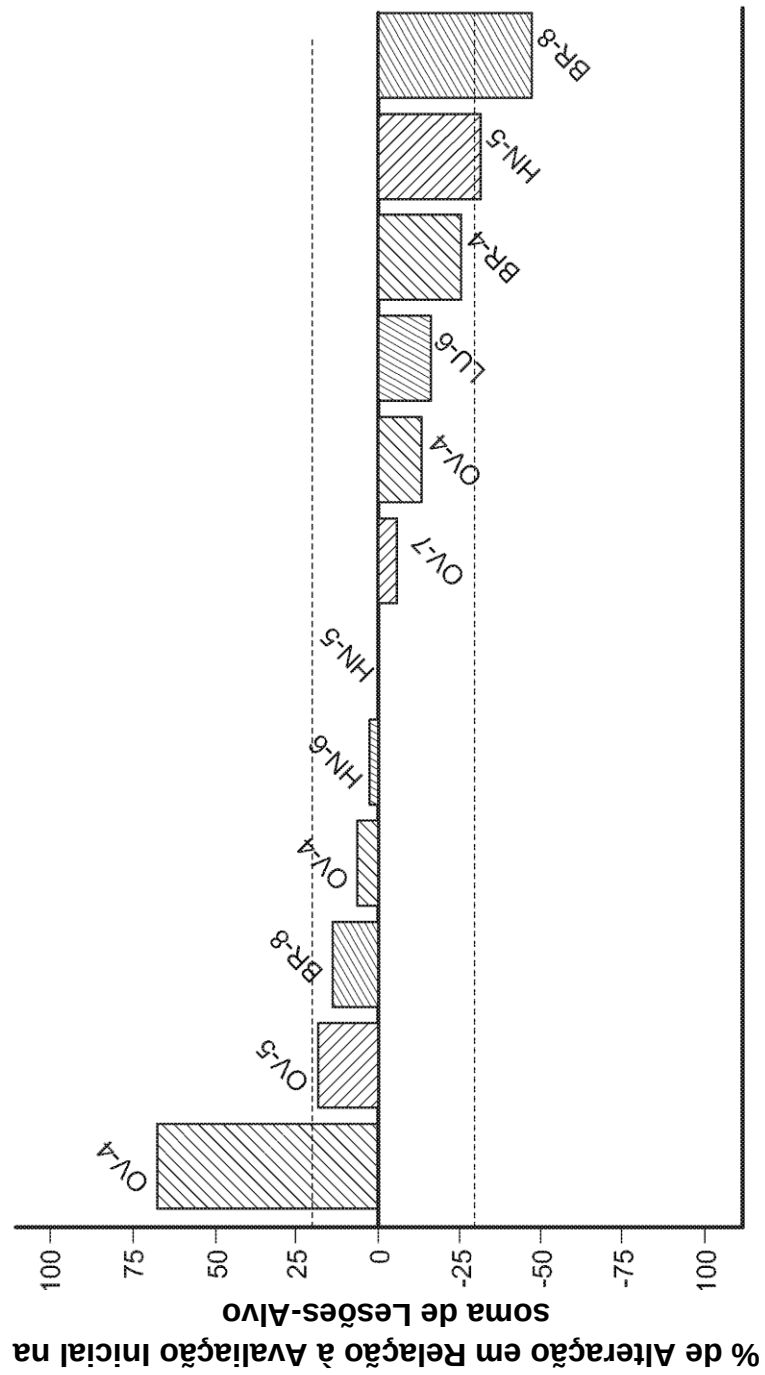


FIG. 10C

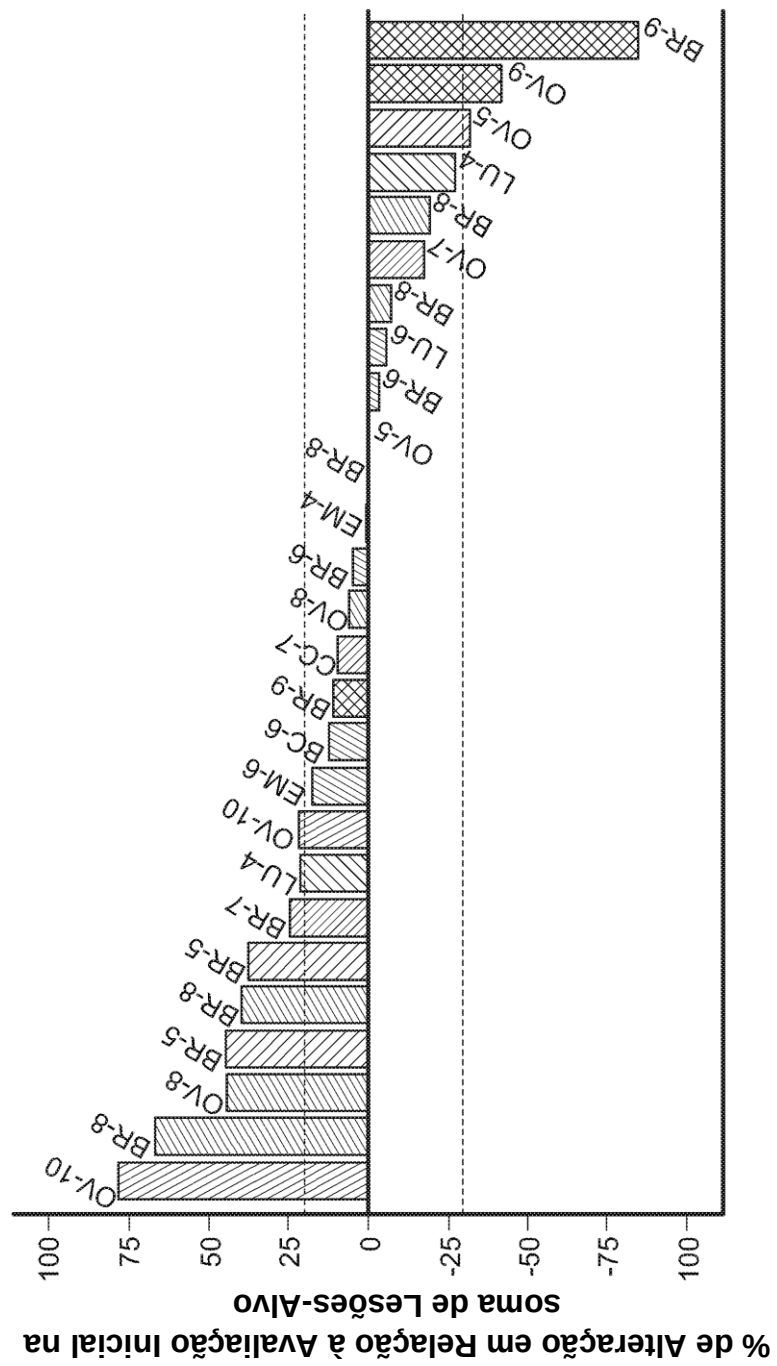
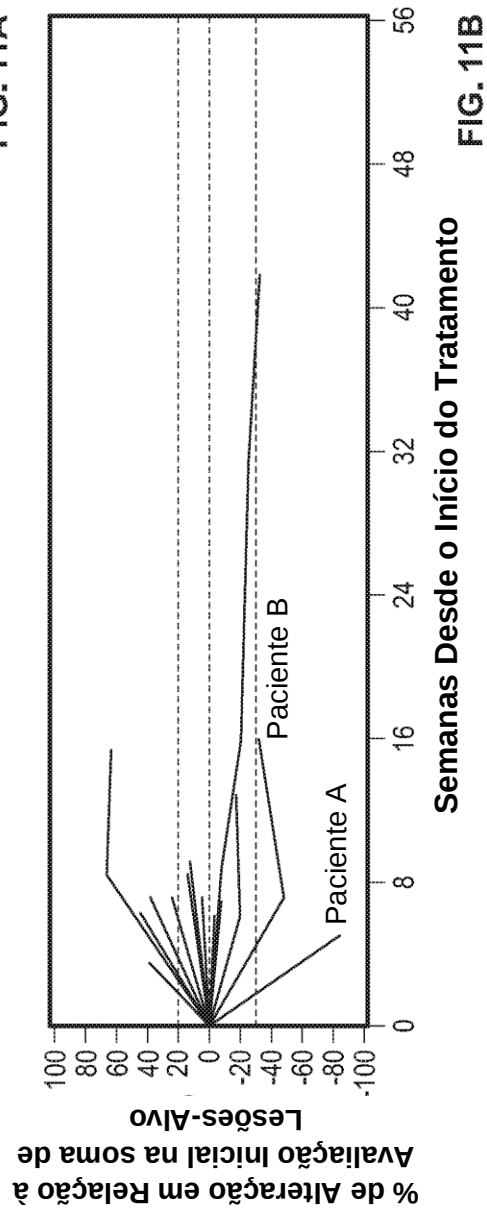
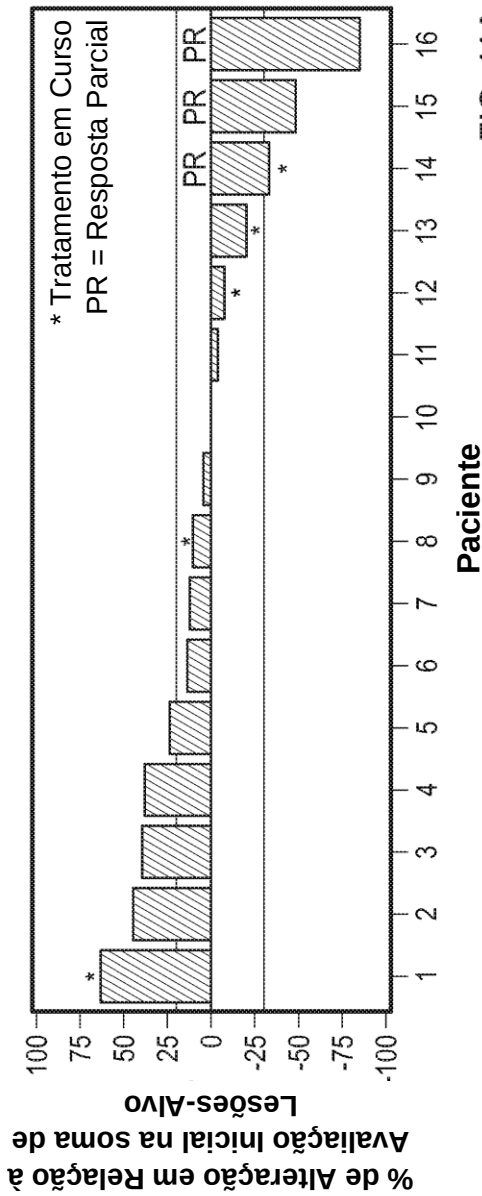


FIG. 10D



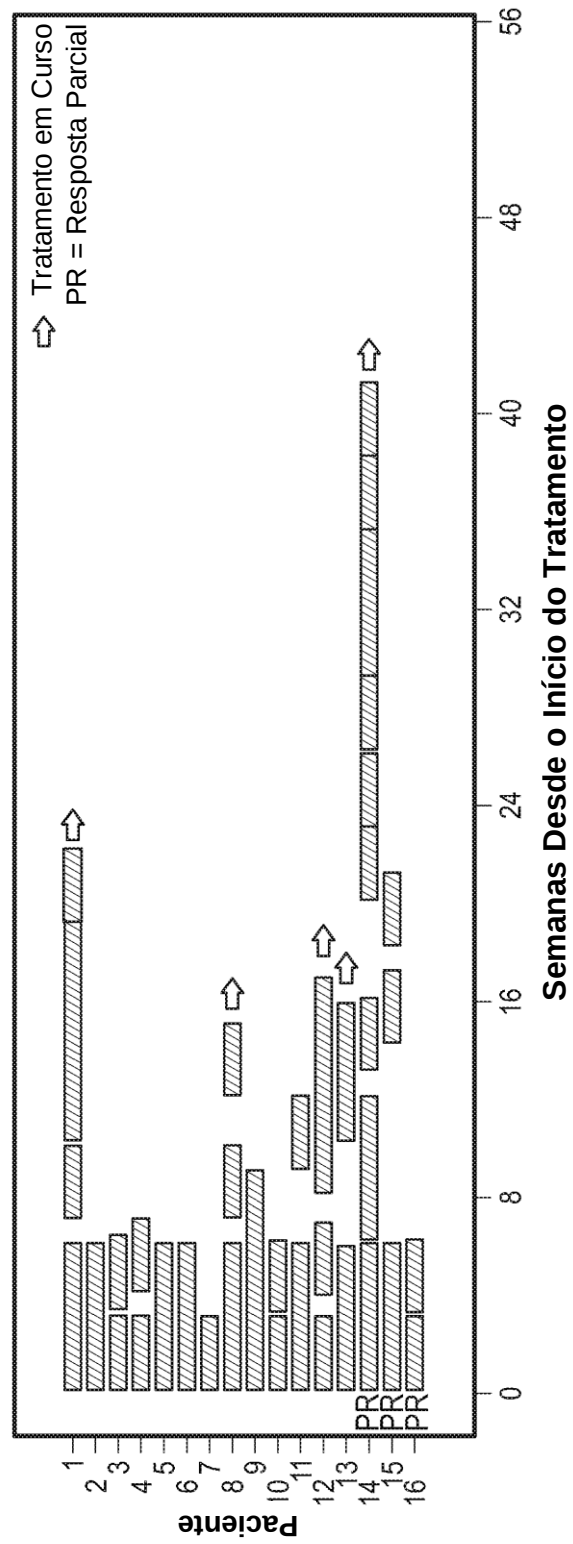
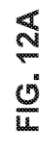


FIG. 11C



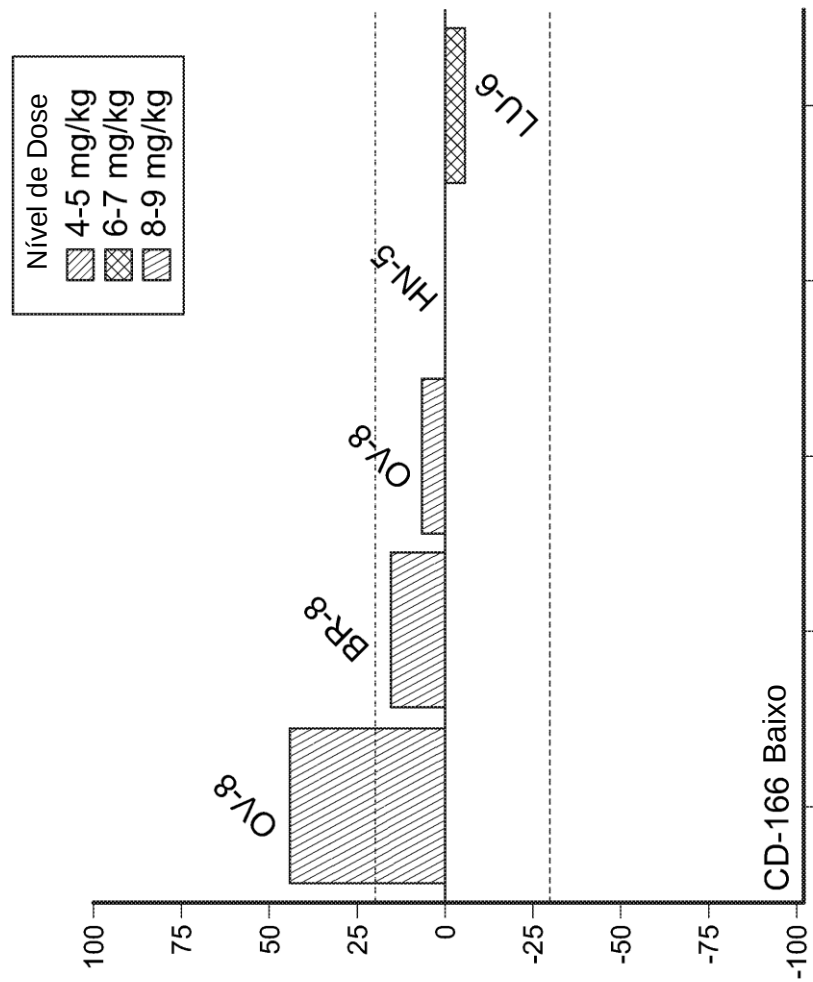


FIG. 12B

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequência.txt
- Data de Geração do Código: 25/06/2021
- Hora de Geração do Código: 17:49:33
- Código de Controle:
 - Campo 1: 52FC5F900041D5F3
 - Campo 2: E376D43A5EE7D824