



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

(21) BR 112020004231-5 A2



(22) Data do Depósito: 30/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2020

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

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/28; A61K 47/68; A61P 35/00; A61K 47/65.

(30) **Prioridade Unionista:** 06/09/2017 US 62/554.919; 30/08/2017 US 62/552/345; 31/08/2017 US 62/553.098.

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

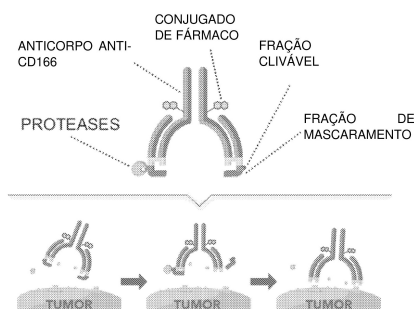
(72) **Inventor(es):** CARMAN, LORI; RACHEL HUMPHREY; W. MICHAEL KAVANAUGH; JONATHAN TERRETT; ANNIE YANG WEAVER; MATTHIAS WILL.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018048965 de 30/08/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/046652 de 07/03/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 02/03/2020

(57) **Resumo:** São fornecidos neste documento anticorpos ativáveis que 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”

PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US 62/552.345, depositado em 30 de agosto de 2017, Pedido Provisório US 62/553.098, depositado em 31 de agosto de 2017, e Pedido Provisório US 62/554.919, depositado em 6 de setembro de 2017, cujo conteúdo está incorporado neste documento por referência na sua totalidade.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0002] A “Listagem de Sequências” enviada eletronicamente ao mesmo tempo, de acordo com 37 C.F.R. § 1.821 no formato legível por computador (CFR) via EFS-Web com nome de arquivo “CYTM054004WO_30AUG2018_FINAL_ST25.txt”, é incorporada neste documento por referência. A cópia eletrônica da Listagem de sequência foi criada em 30 de agosto de 2018 e o tamanho do disco é de 49 kilobytes.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0003] Esta invenção refere-se de forma geral a regimes de dosagem específicos para administração de anticorpos ativáveis conjugados com anti-CD166 para o tratamento de câncer.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0004] 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 seguida da administração.

[0005] 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.

[0006] Por conseguinte, existe uma necessidade contínua no campo da terapêutica baseada em anticorpos para anticorpos que imitem as características desejáveis do pró-fármaco de moléculas pequenas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0007] Em um aspecto da invenção, é fornecido neste documento um método para tratar, aliviar um sintoma ou retardar a progressão de um câncer em um sujeito, sendo que o método compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para um sujeito em necessidade deste, em que o AA compreende (a) 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 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 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. 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 pulmonar de células não pequenas.

[0008] Em um aspecto relacionado da invenção, é fornecido neste documento um método para inibir ou reduzir o crescimento, proliferação ou metástase de células que expressam CD166 em um sujeito, sendo que o método compreende a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para um sujeito em necessidade deste, em que o AA compreende (a) um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno deste (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 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. 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.

[0009] Em um outro aspecto relacionado da invenção, é fornecido neste documento um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para uso em tratamento, alívio a um sintoma de, 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 deste (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 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. 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 pulmonar de células não pequenas. O AA é para administração ao sujeito em uma quantidade terapeuticamente eficaz.

[0010] Ainda em um aspecto relacionado adicional 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 deste (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 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. 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 deste.

[0011] 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 pulmonar de células não pequenas. Em algumas modalidades, as células são células da mama, células da próstata, células endometriais, células ovarianas, células escamosas de cabeça ou pescoço, células do ducto biliar ou células pulmonares.

[0012] Em algumas modalidades, o agente conjugado ao AA é um maitansinoide ou seu derivado; por exemplo, o agente conjugado ao AA é DM4; em algumas modalidades, o DM4 é conjugado ao AA via um ligante peptídico; em algumas modalidades, o ligante peptídico compreende uma fração de SPBD (N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato).

[0013] Em algumas modalidades, o AB está ligado à CM, por exemplo, através de um peptídeo de ligação. Em algumas modalidades, a MM está ligado à CM, de modo que o AA em um estado não clivado compreenda o arranjo estrutural do terminal N ao terminal C 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 da 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.

[0014] 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 terminal N ao terminal C

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

[0015] Em algumas modalidades, a cadeia leve está ligada a um espaçador no seu terminal N; em algumas modalidades, o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305; Em algumas modalidades, a MM e a CM estão ligados 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 terminal N ao terminal C 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 terminal N; em algumas modalidades, o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305; Em algumas modalidades, a MM e a CM estão ligados 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 terminal N ao terminal C 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 de GGS.

[0016] Em algumas modalidades, o sujeito tem pelo menos 18 anos de idade; em algumas modalidades, o sujeito tem um status de desempenho de ECOG de 0-1; em algumas modalidades, o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um câncer metastático ativo; em algumas modalidades, o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um tumor sólido irressecável localmente avançado; em algumas modalidades, o sujeito tem uma expectativa de vida maior do que 3 meses no momento da administração

[0017] Em algumas modalidades, o sujeito tem um carcinoma de mama; em algumas modalidades, o carcinoma de mama é ER+; em algumas modalidades, o sujeito recebeu terapia anti-hormonal prévia 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.

[0018] Em algumas modalidades, o sujeito tem carcinoma de próstata resistente à castração, em algumas modalidades, o sujeito recebeu pelo menos uma terapia anterior.

[0019] Em algumas modalidades, o sujeito tem colangiocarcinoma. Em algumas modalidades, o sujeito falhou em pelo menos uma linha anterior de regime contendo gencitabina.

[0020] Em algumas modalidades, o sujeito tem carcinoma endometrial; em algumas modalidades, o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina para doença extrauterina ou avançada.

[0021] 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.

[0022] Em algumas modalidades, o sujeito tem carcinoma de pequenas células na 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.

[0023] 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.

[0024] Em algumas modalidades, o sujeito é administrado ao AA que é conjugado a um agente a uma dose de cerca de 0,25 mg/kg a cerca de 6 mg/kg; por exemplo, a dose administrada é de cerca de 0,25 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 0,5 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 1 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 2 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 4 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 5 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 6 mg/kg.

[0025] Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o AA que é conjugado a um agente a uma dose de cerca de 0,25 mg/kg a cerca de 6 mg/kg; por exemplo, a dose administrada é de cerca de 0,25 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 1 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 1 mg/kg a cerca de 2 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 2 mg/kg a cerca de 4 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg; a dose administrada é de cerca de 5 mg/kg a cerca de 6 mg/kg.

[0026] Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 10 mg a cerca de 200 mg ou em uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 500 mg; por exemplo, a dose fixa administrada é de cerca de 10 mg a cerca de 25 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 20 mg a cerca de 50 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 30 mg a cerca de 75 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 40 mg a cerca de 100 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 50 mg a cerca de 125 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 60 mg a cerca de 150 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 80 mg a cerca de 200 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 100 mg a cerca de 250 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 120 mg a cerca de 300 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 140 mg a cerca de 350 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 160 mg a cerca de 400 mg; a dose fixa

administrada é de cerca de 180 mg a cerca de 450 mg; a dose fixa administrada é de cerca de 200 mg a cerca de 500 mg.

[0027] Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o conjugado de AA que é conjugado a um agente por via intravenosa; em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o AA que é conjugado a um agente por via intravenosa a cada 21 dias.

[0028] Em algumas modalidades, é administrado ao o sujeito o AA conjugado a um agente com uma dosagem baseada no seu peso corporal real. Em algumas modalidades, é administrado ao sujeito o AA conjugado a um agente com uma dosagem baseada no seu peso corporal ideal ajustado.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0029] A **Figura 1** representa o conjugado anticorpo anti-CD166-fármaco ativável sendo preferencialmente ativado no microambiente do tumor, onde estão presentes as proteases específicas do tumor.

[0030] A **Figura 2** demonstra a expressão de CD166 em amostras de tumor humano por imuno-histoquímica (IHC).

[0031] A **Figura 3** mostra a atividade antitumoral de um conjugado do anticorpo anti-CD166-fármaco ativável e um conjugado do anticorpo anti-CD166-fármaco em um modelo de tumor de camundongo de TNBC. Também é mostrada a expressão de CD166 por imuno-histoquímica (IHC). (AADC = conjugado anticorpo anti-CD166-fármaco ativável; ADC = conjugado de anti-CD166-fármaco)

[0032] A **Figura 4** mostra a atividade antitumoral de um conjugado anticorpo anti-CD166-fármaco ativável e um conjugado de anticorpo anti-CD166-fármaco em um modelo de tumor de camundongo de câncer pulmonar de células não pequenas. Também é mostrada a expressão de CD166 por IHC.

[0033] A **Figura 5** mostra a atividade antitumoral de um conjugado do anticorpo anti-CD166-fármaco ativável e um conjugado do anticorpo anti-

CD166-fármaco em um modelo de xenoenxerto (PDX) derivado de paciente camundongo para o câncer de ovário. Também é mostrada a expressão de CD166 por IHC.

[0034] A **Figura 6** ilustra o desenho do ensaio clínico da Parte A e da Parte B para um conjugado de anticorpo anti-CD166-fármaco ativável.

[0035] As **Figuras 7A-7B** demonstram ativação preferencial de um anticorpo anti-CD166 ativável em tumores.

[0036] As **Figuras 8A-8B** demonstram a separação de formas intactas e ativadas de um conjugado do anticorpo anti-CD166-fármaco ativável parcialmente ativado por matriptase (MT-SP1) ou MMP14.

[0037] As **Figuras 9A-9E** mostram dados farmacocinéticos exemplificativos dos níveis séricos de vários analitos ao longo do tempo após a administração de um conjugado anticorpo anti-CD166-fármaco ativável em sujeitos humanos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0038] 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 (SRCR) do receptor tipo scavenger (SRCRSF). Sabe-se que o CD166 está associado a interações célula-célula e matriz celular, 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 autoimunidade. 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.

[0039] 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.

[0040] 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 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.

[0041] 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 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.

[0042] Os anticorpos anti-CD166 ativáveis incluem um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste 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 fragmento de ligação ao antígeno deste de se ligar ao CD166. A MM é acoplado ao fragmento de ligação anticorpo/antígeno por meio de uma sequência que inclui um substrato para uma protease (fração clivável, CM), por exemplo, uma protease que é colocalizada com CD166 no sítio de tratamento em um sujeito.

Definições

[0043] A menos que definido de outra forma, todos 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 ou "uma" entidade refere-se a uma ou mais dessas entidades. Por exemplo, um composto refere-se a um ou mais compostos. Como tal, os termos "um" ou "uma", "um ou mais" e "pelo menos um" podem ser usados de forma intercambiável neste documento. 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, célula e cultura de tecidos, biologia molecular e proteína e oligo- ou química polinucleotídica e hibridização descritas neste documento são aquelas bem conhecidas e comumente usadas na técnica. Técnicas padrão são usadas para o 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 bem conhecidos na técnica e conforme descrito em várias referências gerais e, mais específicas, que são citadas e discutidas durante o presente relatório descritivo. Ver por exemplo, Sambrook *et al.*

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a 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.

[0044] Conforme usado de acordo com a presente divulgação, os seguintes termos, salvo indicação em contrário, serão entendidos como tendo os seguintes significados:

[0045] Conforme usado neste documento, o termo "anticorpo" refere-se a moléculas de imunoglobulina, por exemplo, de ligação ao antígeno, porções de moléculas de imunoglobina (Ig), ou seja, moléculas que contêm um sítio de ligação ao antígeno que se liga especificamente (reage imunologicamente com) um antígeno. Por "ligar especificamente" ou "reage imunologicamente com" "ligar imuno-especificamente" significa 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 inferior ($K_d > 10^{-6}$). Os anticorpos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos policlonais, monoclonais, quiméricos, anticorpo de domínio, cadeia única, Fab e F(ab')₂, scFvs e uma biblioteca de expressão Fab.

[0046] Sabe-se que a unidade estrutural básica de anticorpo compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeo, possuindo cada par 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 define uma região constante

essencialmente responsável pela função efetora. Em geral, as moléculas de anticorpos obtidas a partir de seres humanos se relacionam com qualquer uma das classes IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que diferem uma da outra pela natureza da cadeia pesada presente na molécula. Certas classes também têm subclasses, tal como IgG₁, IgG₂ e outras. Adicionalmente, em humanos, a cadeia leve pode ser uma cadeia kappa ou uma cadeia lambda.

[0047] O termo "anticorpo monoclonal" (mAb) ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme utilizado neste documento, diz respeito a uma população de moléculas de anticorpo que contêm apenas uma espécie molecular de molécula de anticorpo que consiste em um produto de gene da cadeia leve única e um produto de gene da cadeia pesada única. Particularmente, 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 reagir imunologicamente com um epítipo particular do antígeno caracterizado por uma afinidade de ligação única para o mesmo.

[0048] 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 do terminal N ("V") das cadeias pesadas ("H") e leves ("L"). Três expansões altamente divergentes dentro das regiões V das cadeias pesadas e leves, denominados "regiões hipervariáveis", são interpostas entre as expansões flanqueadores mais conservadas, conhecidas como "regiões de framework" ou "FRs". Assim, o termo "FR" diz respeito a sequências de aminoácidos que são encontradas naturalmente entre e adjacentes a regiões hipervariáveis nas 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 a 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 da 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 e 1991)), ou Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

[0049] 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 consistem, em geral, em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e têm, em geral, características estruturais tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Por exemplo, os anticorpos podem ser criados contra peptídeos no terminal N ou do terminal C 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, $\leq 10 \text{ nM}$.

[0050] Conforme 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 expressas em termos da constante de dissociação (K_d) da interação, em que um K_d menor representa uma afinidade maior. 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 sítio/antígeno 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. (Ver 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 . (Ver, em geral, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). 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 , conforme medido por ensaios, tais como ensaios de ligação a radioligantes ou ensaios semelhantes, conhecidos àqueles versados na técnica.

[0051] O termo "polinucleotídeo isolado", conforme usado neste documento, significará um polinucleotídeo de origem genômica, cDNA ou sintética ou alguma combinação destes, que em virtude de sua origem o "polinucleotídeo isolado" (1) não está associado com toda ou 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.

[0052] O termo "proteína isolada" referido neste documento significa

uma proteína de cDNA, RNA recombinante, ou origem sintética ou alguma combinação desta, que em virtude de sua origem, ou fonte de derivação, a "proteína isolada" (1) não está associada com proteínas encontradas na natureza, (2) é livre de outras proteínas a partir desta fonte, por exemplo, livre de proteínas marinhas, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza.

[0053] O termo "polipeptídeo" é usado neste documento como um termo genérico para referir-se a proteína nativa, fragmentos ou análogos de uma sequência de polipeptídeo. Por isso, fragmentos de proteína nativa e análogos são espécies do genus 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 que compreendem as moléculas de imunoglobulina da cadeia pesada com moléculas de imunoglobulina da cadeia leve, tal como as moléculas de imunoglobulina da cadeia leve kappa e vice-versa, bem como fragmentos e análogos destes.

[0054] O termo "de ocorrência natural", conforme usado neste documento, como 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, é de ocorrência natural.

[0055] O termo "operacionalmente conectado" neste documento refere-se a posições de componentes descritos que estão em uma relação que lhes permite funcionar em sua maneira pretendida. Uma sequência de controle "operacionalmente ligada" a uma sequência de codificação é ligada de tal forma que a expressão da sequência de codificação é atingida sob condições

compatíveis com as sequências de controle.

[0056] O termo "sequência de controle" conforme usado neste documento refere-se a sequências de polinucleotídeo que são necessárias efetuar a expressão e o processamento das sequências de codificação às quais elas são ligadas. A natureza de tais sequências de controle difere dependendo do organismo do hospedeiro em procariontes, tais sequências de controle geralmente incluem o promotor, sítio de ligação ribossômico e sequência de terminação de transcrição; em eucariontes, geralmente, tais sequências de controle incluem os promotores e a sequência de terminação de transcrição. O termo "sequências de controle" destina-se 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 líder e sequências de parceiro de fusão. O termo "polinucleotídeo", conforme referido neste documento, significa nucleotídeos de pelo menos 10 bases de comprimento, tanto ribonucleotídeos quanto desoxinucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer dos tipos de nucleotídeos. O termo inclui formas de DNA de fita dupla ou única.

[0057] O termo "oligonucleotídeo" referido neste documento inclui nucleotídeos de ocorrência natural e modificados unidos entre si por uniões de oligonucleotídeo de ocorrência natural e não-naturalmente. Oligonucleotídeos são um subconjunto de polinucleotídicas que compreendem geralmente 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 simples, por exemplo, para sondas, embora os oligonucleotídeos possam ser de fita dupla, por exemplo, para uso na construção de um gene mutante. Os oligonucleotídeos da divulgação são tanto oligonucleotídeos sense ou antisense.

[0058] O termo "nucleotídeos que ocorrem naturalmente" 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, fosforodisselenoato, fosforoanilotoato, fosforaniladato, fosforamidato e semelhantes. Ver, 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 US 5,151,510; Uhlmann e Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Um oligonucleotídeo pode incluir uma marcação para detecção, se desejado.

[0059] Conforme usado neste documento, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviaturas seguem o uso convencional. Ver Immunology - A Synthesis (2ª Edição, E.S. Golub e D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Estereoisômeros (por exemplo, aminoácidos D) de vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais como aminoácidos α - α -dissubstituídos, N-alkil aminoácidos, 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 de polipeptídeo usada neste documento, a direção da esquerda é a direção amino-terminal e a direção da direita é a direção carboxi-terminal, em conformidade com a convenção e o uso padrão.

[0060] Da mesma forma, a menos que especificado ao contrário, 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 às 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 como o RNA que estão na extremidade 3' a 3' do transcrito de RNA são referidos como "sequências a jusante".

[0061] Conforme aplicado aos polipeptídeos, o termo "identidade substancial" significa que duas sequências peptídicas, quando alinhadas de forma otimizada, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de intervalo padrão, compartilham pelo menos 80 por cento de identidade de sequência, por exemplo, pelo menos 90 por cento de sequência identidade, pelo menos 95 por cento de identidade de sequência, ou pelo menos 99 por cento de identidade de sequência.

[0062] Em algumas modalidades, as posições do resíduo que não são idênticas diferem por substituições de aminoácido conservativas.

[0063] Conforme discutido neste documento, pequenas variações nas sequências de aminoácidos de moléculas de imunoglobulinas ou anticorpos são contempladas como sendo abrangidas pela presente divulgação, desde que as variações na sequência de aminoácidos mantenham pelo menos 75%, por exemplo, pelo menos 80%, 90%, 95% e em algumas modalidades 99%. Em particular, são contempladas substituições de aminoácidos conservativas. Substituições conservativas são aquelas que ocorrem dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Os aminoácidos codificados geneticamente são divididos geralmente em famílias: (1) 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 hidroxi alifática; (ii) asparagina e glutamina, que são a família que contém amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que são a família alifática; e (iv) fenilalanina, triptofano e tirosina, que são a família aromática. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina, isoleucina ou valina, um aspartato com um glutamato, uma treonina com uma serina, ou uma semelhante substituição de um aminoácido com um aminoácido estruturalmente relacionado não terá um efeito importante sobre a ligação ou propriedades da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolver um aminoácido em um sítio de framework. Se uma mudança de aminoácido resulta em um peptídeo funcional pode ser determinado prontamente por meio do ensaio de atividade específica do derivado de polipeptídeo. 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 carboxi adequados de fragmentos ou análogos ocorrem perto dos domínios funcionais. Domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de sequência de nucleotídeos e/ou aminoácidos com bancos de dados de sequências públicos ou exclusivos. Em algumas modalidades, métodos de comparação computadorizados são usados para identificar motivos de sequência ou domínios de conformação de proteína predita que ocorrem em outras proteínas de estrutura conhecida e/ou função. São conhecidos métodos para identificar sequências de proteína que dobram-se formando uma estrutura tridimensional. 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 usadas para definir domínios estruturais e funcionais em conformidade com a divulgação.

[0064] Substituições de aminoácidos adequadas são aquelas que: (1) reduzem a susceptibilidade à proteólise, (2) reduzem a susceptibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formação de complexos proteicos (4) alteram 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 que não seja a sequência de peptídeo que ocorre naturalmente. 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 parental, ou corromper outros tipos de estrutura secundária que caracterizam a sequência parental). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeo reconhecidos na técnica são descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman e Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991).

[0065] 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 deleção(ões) interna(s), mas onde a sequência de aminoácidos restante é idêntica às posições correspondentes na sequência que ocorre naturalmente deduzida, por exemplo, de uma sequência

de cDNA comprimento completo. Os fragmentos tipicamente são pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento, em algumas modalidades, pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, por exemplo, pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, pelo menos 50 aminoácidos de comprimento ou pelo menos 70 aminoácidos de comprimento. O termo "análogo" conforme usado neste documento refere-se a polipeptídeos que compreendem 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 são de 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 que ocorre naturalmente de comprimento completo.

[0066] O termo "agente" é usado neste documento para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extrato feito de materiais biológicos.

[0067] Conforme usado neste documento, os termos "marcação" ou "marcado" referem-se à incorporação de um marcador detectável, por exemplo, por incorporação de um aminoácido radiomarcado ou conexão a um polipeptídeo de frações de biotínil 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, a marcação ou marcador também pode ser terapêutico. Vários métodos de marcação polipeptídicos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcações 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),

marcações fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantanídeos), marcações enzimáticas (por exemplo, peroxidase de rábano, p-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), quimioluminescentes, grupos biotínicos, epítopos de polipeptídeo predeterminados reconhecidos por meio de um repórter secundário (por exemplo, sequências de pares de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, tags de epítipo). Em algumas modalidades, as marcações são conectadas por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o potencial de impedimento estérico. 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.

[0068] Outros termos de química deste documento são utilizados 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)).

[0069] Conforme usado neste documento, "puro substancialmente" 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 as espécies de objeto compreendem pelo menos cerca de 50 por cento (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes.

[0070] Geralmente, uma composição substancialmente pura compreenderá mais de cerca de 80 por cento de todas as espécies macromoleculares presentes na composição, por exemplo, 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 convencional) em que

a composição consiste essencialmente de uma única espécie macromolecular.

[0071] O termo “sujeito” significa sujeitos humanos e veterinários.

Anticorpos ativáveis (AAs)

[0072] A divulgação fornece AAs que incluem um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste que se liga especificamente a CD166 (AB) de mamífero.

[0073] Em algumas modalidades, o CD166 de mamífero é selecionado do grupo que consiste em um CD166 humano e um CD166 de macaco cynomolgus. Em algumas modalidades, o AB se liga especificamente ao CD166 humano ou ao CD166 de macaco cynomolgus 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 cynomolgus. 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 cynomolgus. Em algumas modalidades, o AB tem uma ou mais das seguintes características: (a) o AB liga especificamente CD166 humano e CD166 de macaco cynomolgus; (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 cynomolgus ao CD166 de macaco cynomolgus.

[0074] 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 de ou igual a 5 nM, de menos de ou igual a 10 nM, de menos de ou igual a 50 nM, de menos de ou igual a 100 nM, de menos de ou igual a 500 nM e/ou de menos de 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 de ou igual a 5 nM, de menos de ou igual a 10 nM, de menos de ou igual a 50 nM, de menos de ou igual a 100 nM, de menos de ou

igual a 500 nM e/ou de menos de ou igual a 1000 nM. Em algumas modalidades, o ligante ou receptor natural de CD166 é CD6.

[0075] 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.

[0076] 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.

[0077] O anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste do AA é acoplado a uma fração de mascaramento (MM), de modo que o acoplamento da MM reduz a capacidade do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste de se ligar a CD166. Em algumas modalidades, a 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 colocalizada com CD166 no sítio de tratamento de um sujeito. Os anticorpos anti-CD166 ativáveis fornecidos neste documento, também referidos neste documento de forma intercambiável como anticorpos ativáveis anti-CD166 AAs ou CD166, são estáveis em circulação, ativados nos locais pretendidos de terapia e/ou diagnóstico, mas não no normal, por exemplo, tecido saudável ou outro tecido não visados para tratamento e/ou diagnóstico e, quando ativado, exhibe ligação a CD166 que é pelo menos comparável ao anticorpo não modificado correspondente, também referido neste documento como anticorpo parental.

[0078] A divulgação fornece anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno (AB) deste que se ligam especificamente ao CD166 de mamífero, para uso nos AAs. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste que se liga especificamente ao CD166. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste 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 da cadeia pesada de domínio único ou um anticorpo da cadeia leve de domínio único. Em algumas modalidades, esse anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste que se liga ao CD166 é um anticorpo de camundongo, outro roedor, quimérico, humanizado ou monoclonal totalmente humano.

[0079] Por conseguinte, são fornecidos neste documento anticorpos ativáveis (AAs) que compreendem: (1) um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno deste (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,

[0080] 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.

[0081] 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 a 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 a CD166. Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 0,1 nM ou menos para ligação a CD166. Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca 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.

[0082] 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.

[0083] 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 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.

[0084] Em algumas modalidades, o AA em um estado não clivado se liga especificamente ao CD166 de mamífero com uma constante de dissociação no intervalo de 1 nM a 2000 nM, 1 nM a 1000 nM, 1 nM a 750 nM, 1 nM a 500 nM, 1 nM a 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.

[0085] 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.

[0086] 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.

[0087] 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.

[0088] 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 estão ou são derivadas das sequências de aminoácidos variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve mostrado abaixo:

<p>Cadeia pesada de αCD166-humano HuCD166_HcC QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGK ALEWLANIWWSEDKHYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLITNVDPVDTATYYCV QIDYGNDYAFTYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</p>
--

RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (**SEQ ID
 NO: 239**)

Cadeia Pesada de α CD166-humano

HuCD166_HcC Des-HC

QITLKESGPTLVKPTQTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGK
 ALEWLANIWWSEDKHYSPLKSRITITKDTSKNQVVLITINVDPVDTATYYCV
 QIDYGNDYAFTYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
 PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (**SEQ ID
 NO: 480**)

Domínio VL da Cadeia Leve α CD166 Humana

HuCD166_Lc1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPG
 QSPQLLIYQMSNLAGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLE
 LPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC (**SEQ ID NO: 240**)

[0089] 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

[0090] 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 da Cadeia Leve α CD166 Humana

HuCD166_Lcl

(fornecido acima)

SEQ ID NO: 246 Sequência de Aminoácidos

Cadeia Leve α CD166 humana

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

[QGQSGQG]

[LCHPAVLSAWESCSSGGGSSGGSVAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSL
P

VTPGEPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSG
SGSGTDFTLK

ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYP

REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC]

SEQ ID NO: Sequência de aminoácidos 314**Cadeia Leve aCD166 humana (MM-LP1-CM-LP2-Ab)****huCD166Lcl_7614.6_3001**

LCHPAVLSAWESCSSGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIVMTQSPLSLP
VTPGEPASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLAGVDPDRFSGS
GSGTDFTLK

ISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
CLLNNFYP

REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKS FNRGEC

SEQ ID NO: Sequência de aminoácidos 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**União do peptídeo 1 (LP1)**

GGGSSGGS

União do peptídeo 2 (LP2)

GGS

[0091] Em uma modalidade exemplificativa, o AA compreende: (a) um anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno deste (AB) que se liga especificamente a CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 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.

[0092] Em uma modalidade exemplificativa, o AA compreende: (a) 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 da SEQ ID NO: 480 e um cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 246 e é conjugada ao DM4 via ligante peptídico 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.

[0093] Em outra modalidade exemplificativa, o AA compreende: (a) 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 da SEQ ID NO: 480 e uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 314 e é conjugada adicionalmente ao DM4 via ligante peptídico

spdb deste AA conjugado exemplificativo é referido neste documento como "espaçador-7614.6-3001-HcCD166-SPDB-DM4", também referido como "Combinação 60").

Frações de Mascaramento (MM)

[0094] 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 de mascaramento, MM) através de um ligante peptídico que incorpora um substrato de protease (CM).

[0095] 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 identificados usando os métodos descritos na Publicação PCT WO 2009/025846 de Daugherty et al. cujo conteúdo é incorporado neste documento por referência na sua totalidade.

[0096] Em algumas modalidades, na presença de CD166, a MM reduz a capacidade do AB de se ligar a CD166 em pelo menos 90% quando a CM não é clivado, em comparação com quando a CM é clivado quando analisado *in vitro* usando um ensaio de deslocamento alvo como, por exemplo, o ensaio descrito na publicação PCT WO 2010/081173 cujos conteúdos estão incorporados por meio deste por referência em sua totalidade.

[0097] 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.

[0098] Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica da MM é diferente do que CD166. Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica da MM não é mais do que 50% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica da 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.

[0099] 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)

[00100] Quando o AB é modificado com uma MM e está na presença do alvo, 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 ou com a ligação específica do AB parental para o alvo.

[00101] 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, 1000.000, 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.

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

[00103] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de ligar ao CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM no CD166 seja pelo menos cinco 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 ao CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM em direção ao CD166 seja pelo menos 10 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em direção

ao CD166.

[00105] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de se ligar ao 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.

[00106] Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB de ligar ao CD166, de modo que a constante de dissociação (K_d) do AB quando acoplada à MM no CD166 seja pelo menos 40 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em direção a 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 100 vezes maior que o K_d do AB quando não acoplado à MM em relação ao CD166.

[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 1000 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 se ligar ao 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.

[00110] 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, 2500, 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 que a afinidade de ligação do AB em relação ao alvo. A afinidade de ligação de 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 menor que a afinidade de ligação do AB em relação ao AB o alvo.

[00111] 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.

[00112] 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.

[00113] 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.

[00114] 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.

[00115] 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.

[00116] 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.

[00117] Em algumas modalidades, a MM tem um K_d para ligação ao AB que não é menor do que o K_d para ligação do AB ao alvo.

[00118] 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.

[00119] Em algumas modalidades, a constante de dissociação (K_d) da 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, 50.000-5.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes maior que o Kd para ligação do AB ao alvo. Em algumas modalidades, a MM tem um Kd 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 Kd para ligação do AB ao alvo.

[00120] Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é menor que a afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00121] 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.

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

[00123] Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é menor que a afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00124] Em algumas modalidades, a MM tem uma afinidade para ligação ao AB que é maior que a afinidade de ligação do AB ao alvo.

[00125] 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, 20-1000 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 ligado ao AB e em concentração equimolar ao AB não inibe a ligação do AB ao alvo.

embodiments, the MM has an affinity for binding to the AB that is between 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-25, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1,000, 20-100, 20-1000, 25-250, 50-500, or 100-1,000 fold

[00126] Quando o AB é modificado com uma MM e está na presença do alvo, a ligação específica do AB ao seu alvo é reduzida ou inibida, em comparação com a ligação específica do AB não modificado com uma MM ou com 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*.

[00127] A MM inibe a ligação do AB ao alvo. A MM liga o 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*.

[00128] Quando um AB é acoplado ou modificado por uma MM, os 'mascaramentos' da MM reduzem ou inibem, de outro modo, 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.

[00129] Um AB acoplado ou modificado a uma MM pode ser representado pelas seguintes fórmulas (em ordem de uma região terminal amino (N) para uma região terminal carboxila (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 peptídicos, por exemplo, ligantes peptídicos flexíveis dentro da composição, a fim de fornecer flexibilidade.

[00130] 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 da 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 da 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% idêntico a qualquer parceiro de ligação natural da AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 25% idêntico 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%

idêntico a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não é mais do que 10% idêntico a qualquer parceiro de ligação natural do AB.

Frações Cliváveis (CM)

[00131] 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 US 7,666,817 de Daugherty et al.; na Patente US 8,563,269 de Stagliano et al.; e na publicação PCT WO 2014/026136 de La Porte et al., cujo conteúdo de cada um deles é incorporado neste documento por referência na sua totalidade. (*Ver também* Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide for proteases that exhibit rapid hidrolisis kinetics." *Biotechnol Bioeng.* 106,3 (2010): 339-46).

[00132] Em algumas modalidades, a protease que cliva a CM é ativa, por exemplo, por regulação positiva ou de outra forma regulação negativa no tecido doente, e a protease cliva a CM no AA quando o AA é exposto à protease. Em algumas modalidades, a protease é colocalizada com CD166 em um tecido, e a protease cliva a CM no AA quando o AA é exposto à protease. A Figura 1 representa os conjugados do anticorpo anti-CD166-fármaco ativável sendo preferencialmente ativado no microambiente do tumor, onde estão presentes proteases específicas do tumor.

[00133] 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 unidade 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.

[00134] Em algumas modalidades, a CM é um polipeptídeo de até cerca de 15 aminoácidos de comprimento.

[00135] 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.

[00136] 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)
--

[00137] Os elementos dos AAs estão dispostos de modo que a MM e a CM estejam posicionados 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 é reduzida ou inibida. A ligação específica do AB ao seu alvo pode ser reduzida devido à inibição ou mascaramento da capacidade do AB de se ligar especificamente ao seu alvo pela MM.

[00138] 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 modificada 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, 1000.000, 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.

[00139] 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 e 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*.

[00140] 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).

[00141] Por ativável ou comutável significa 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 desinibido, não mascarado e/ou clivado (isto é, 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 direcionar a ligação.

[00142] 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 colocalizada com o alvo em um sítio de tratamento ou sítio de diagnóstico em um sujeito. Conforme utilizado neste documento, colocalizado refere-se a estar no mesmo sítio ou relativamente próximo das redondezas. Em algumas

modalidades, uma protease cliva uma CM produzindo um anticorpo ativado que se liga a um alvo localizado nas redondezas 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 sítio de tratamento ou sítio de diagnóstico do que no tecido de sítios 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 uma ou mais outras proteases que são colocalizadas com o alvo e são responsáveis pela clivagem da CM *in vivo*.

[00143] Em algumas modalidades, os AAs podem fornecer efeitos colaterais adversos e/ou de toxicidade reduzida que poderiam, de outro modo, resultar da ligação do AB em sítios de não tratamento se o AB não fosse mascarado ou, de outro modo, inibido da ligação do alvo.

[00144] Em geral, um AA pode ser projetado através da seleção de um AB de interesse e construir o restante do AA de modo que, quando restrito em conformidade, a MM forneça ao mascaramento do AB ou a redução da ligação do AB para seu alvo. Os critérios do projeto estrutural podem ser levados em conta para fornecer esse recurso funcional.

[00145] 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 a faixa dinâmica de um anticorpo ativável, melhor 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 na ausência de um agente de clivagem.

[00146] A CM é clivada especificamente por pelo menos uma protease a uma taxa de cerca de $0,001-1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 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 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$).

[00147] 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

[00148] 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 do terminal N para o C de 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.

[00149] Por exemplo, os AAs podem ser representados pela seguinte fórmula (em ordem de uma região terminal amino (N) para uma região terminal carboxila (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 deste. 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 terminal N ou no terminal C dos elementos AA.

[00150] Em muitas modalidades, pode ser desejável inserir um ou mais ligantes peptídicos, por exemplo, ligantes peptídicos 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 ligante peptídico flexível. Além disso, como descrito abaixo, onde o AA é fornecido como um construto com restrição de conformação, um ligante peptídico flexível

pode ser operacionalmente inserido para facilitar a formação e manutenção de uma estrutura cíclica no anticorpo ativável não clivado.

[00151] 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 terminal N ao terminal C da seguinte forma: MM-LP1-CM-LP2-AB ou AB-LP2-CM-LP1-MM. Em algumas modalidades, os peptídeos de ligação não necessitam ser idênticos um ao outro.

[00152] 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.

[00153] 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).

[00154] Em algumas modalidades, LP1 compreende a sequência de aminoácidos GSSGGSGGSGG (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).

[00155] 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).

[00156] Em algumas modalidades, o AB tem uma constante de dissociação de cerca de 100 nM ou menos para ligação a CD166.

[00157] Por exemplo, em certas modalidades, um AA compreende uma das seguintes fórmulas (em que a fórmula abaixo representa uma

sequência de aminoácidos na direção do terminal N ao C ou na direção do terminal C ao 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 peptídicos flexíveis que incluem pelo menos 1 aminoácido flexível (por exemplo, Gly). Além disso, as fórmulas acima fornecem sequências adicionais de sequências de aminoácidos que podem ser posicionadas no terminal N ou no terminal C 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))).

[00158] 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 clivou a CM.

[00159] Os ligantes peptídicos 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 peptídicos são geralmente referidos como ligantes peptídicos flexíveis. Ligantes peptídicos adequados podem ser prontamente selecionados e podem ser de quaisquer adequados comprimentos diferentes, 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

[00160] Os ligantes peptídicos 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 peptídicos 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 acessa significativamente mais espaço phi-psi do que 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 peptídicos 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 peptídicos que são total ou parcialmente flexíveis, de modo que o ligante peptídico possa incluir um ligante peptídico flexível, bem como uma ou mais porções que conferem estrutura menos flexível para fornecer uma estrutura de AA desejada.

[00161] 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 terminal N ao terminal C 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 terminal N 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 terminal N 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 terminais N da 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

[00162] 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 CD166 anti-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 na 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 a 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.

[00163] 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 com uma fração de carboidrato do anticorpo ativável, por exemplo, em algumas modalidades, onde a fração de carboidratos 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.

[00164] 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 desta) ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado).

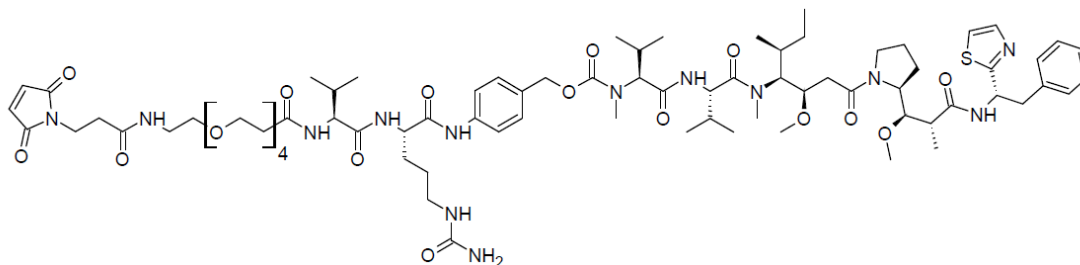
[00165] Em algumas modalidades, o agente é uma fração detectável, como, por exemplo, uma marcação ou outro marcador. Por exemplo, o agente é ou inclui um aminoácido radiomarcado, uma ou mais frações biotínica que podem ser detectadas pela avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou calorimétricos), um ou mais radioisótopos ou radionuclídeos, uma ou mais marcações fluorescentes, uma ou mais marcações enzimáticas e/ou um ou mais agentes quimioluminescentes. Em algumas modalidades, frações detectáveis são ligadas por moléculas espaçadoras.

[00166] A invenção também se refere a imunocombinados compreendendo um anticorpo combinado a um agente citotóxico, tal como uma toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal ou fragmentos desta), ou um isótopo radioativo (isto é, um radioconjugado). Agentes citotóxicos adequados incluem, por exemplo e dolastatinas e derivados deste (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 derivado deste. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou derivado deste. 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 derivado de maitansinoide ou maitansinoide. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou derivado deste. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou derivado deste. Em algumas modalidades, o agente citotóxico é uma pirrolobenzodiazepina. Numa modalidade exemplificativa, o

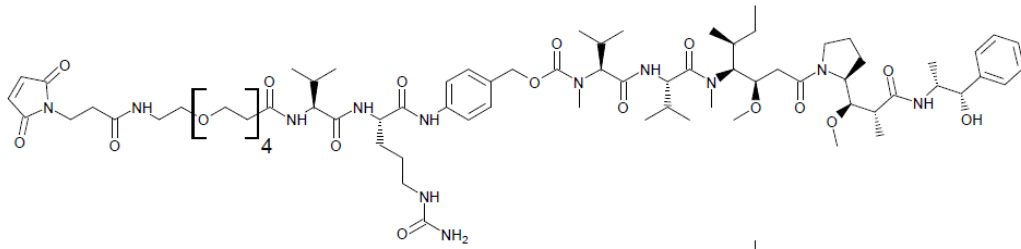
agente é DM4.

[00167] Em algumas modalidades, o agente está ligado ao AB usando um ligante peptídico maleimida-caproil-valina-citrulina ou um ligante peptídico maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente está ligado ao AB usando um ligante peptídico maleimida caproil-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente está ligado ao AB usando um ligante peptídico maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD) ligado ao AB usando um ligante peptídico maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil, e esse construto de carga útil do ligante peptídico é referida neste documento como "vc-MMAD". Em algumas modalidades, o agente é a monometil auristatina E (MMAE) ligada ao AB usando um ligante peptídico maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil, e essa construção de carga útil do ligante peptídico neste documento referido como "vc-MMAE". Em algumas modalidades, o agente está ligado ao AB usando um ligante peptídico maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD) ligado ao AB usando um ligante peptídico de maleimida bis-PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil e esta construção de carga útil do ligante peptídico é referida neste documento como "PEG2-vc-MMAD". As estruturas de vc-MMAD, vc-MMAE e PEG2-vc-MMAD são mostradas abaixo:

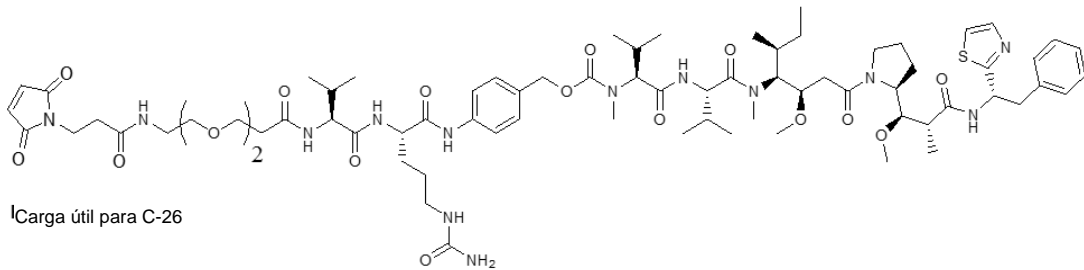
vc-MMAD:



vc-MMAE:

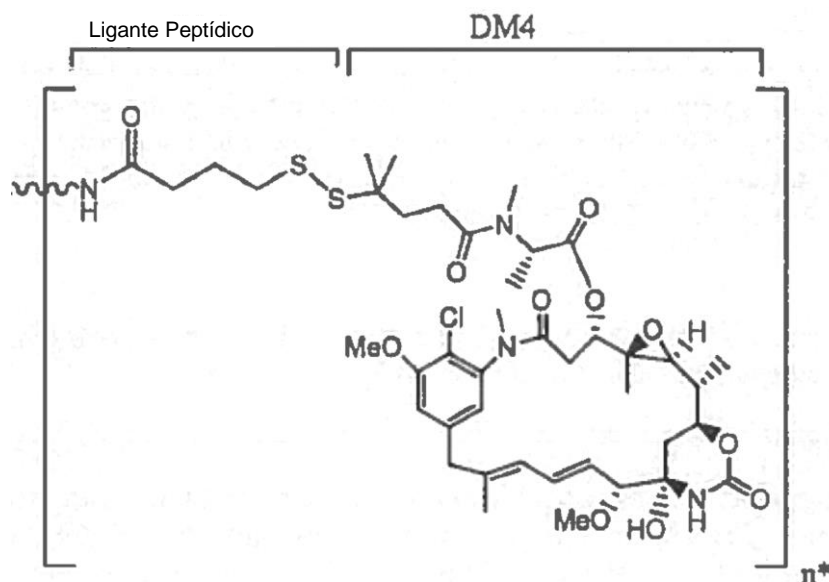


PEG2-vc-MMAD:



[00168] Em uma modalidade exemplificativa, o agente é conjugado ao AA via lisina. Em uma modalidade exemplificativa, um SPDB-DM4 é vinculado a um anticorpo ativável através do grupo épsilon-amino de uma lisina no AA, por exemplo. O grupo épsilon-amino da lisina.

[00169] Em uma modalidade exemplificativa, o agente é DM4 e o ligante peptídico-DM é o seguinte:



[00170] 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 deste (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.

[00171] 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 sulfidríla do AB, ou (c) vincular a grupos amino do AB, ou (d) vincular a grupos de carboxilato do AB.

[00172] Em algumas modalidades, a carga útil da MMAD é conjugada ao AB por meio de um ligante peptídico. Em algumas modalidades, a carga útil do MMAD é conjugada com uma cisteína no AB via um ligante peptídico. Em algumas modalidades, a carga útil do MMAD é conjugada com uma lisina no AB através de um ligante peptídico. Em algumas modalidades, a carga útil do MMAD é conjugada com outro resíduo do AB por via de um ligante

peptídico, tais como os resíduos divulgados neste documento. Em algumas modalidades, o ligante peptídico é um ligante peptídico contendo tiol. Em certas modalidades, o ligante peptídico é um ligante peptídico 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 peptídicos mostrados nas Tabelas 6 e 7. Em algumas modalidades, a carga útil AA e MMAD são ligadas por meio de um ligante peptídico maleimida caproil-valina-citrulina. Em algumas modalidades, a carga útil AA e MMAD são ligadas por meio de um ligante peptídico maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, a carga útil de AA e MMAD é ligada via um ligante peptídico maleimida caproil-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil. Em algumas modalidades, a carga útil AA e MMAD são ligadas via um ligante peptídico PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonil. Em algumas modalidades, a carga útil do MMAD é conjugada ao AB usando a tecnologia de redução e conjugação parcial divulgada neste documento.

[00173] Em algumas modalidades, o componente polietileno glicol (PEG) de um ligante peptídico 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 deste, um grupo carboxila ou derivado deste, ou ambos um grupo amino ou derivado deste e um grupo carboxila ou derivado deste.

[00174] Em algumas modalidades, o componente PEG de um

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

[00175] As toxinas enzimaticamente ativas ou fragmentos das mesmas que podem ser usadas incluem cadeia A de 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 modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e o tricotecenos. Uma variedade de radionuclídeos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re .

[00176] Os conjugados do anticorpo e do agente citotóxico são feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteínas bifuncionais, tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (como adipimidato de dimetil HCl), ésteres ativos (tais como, suberato de disuccinimidil), aldeídos (tais como o glutaraldeído), compostos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoil)-hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (tais como bis-(p-diazoniumbenzoil)-

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

[00177] 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)	Spongistatina 5
Desmetil auristatina E (DMAE)	Spongistatina 7
Auristatina F	Halistatina 1
Auristatina monometil F (MMAF)	Halistatina 2
Desmetil auristatina F (DMAF)	Halistatina 3
Derivados de auristatina, por exemplo, amidas deste	Briostatinas modificadas
Tiristina Auristatina	Halocomstatinas
Auristatina quinolina	Pirrolobenzimidazóis (PBI)
Dolastatinas	Cibrostatina6
Derivados da dolastatina	Doxaliforme
Dolastatina 16 DmJ	Análogos das antraciclinas

Dolastatina 16 Dpv	
Maitansinoides, por exemplo DM-1; DM-4	
Derivados de maitansinoides	Análogo de Cemadotina (CemCH2-SH)
Duocarmicina	Variante da toxina A de Pseudomonas (PE38)
Derivados de duocarmicina	Variante da toxina A de Pseudomonas (ZZ-PE38)
Alfa-amanitina	ZJ-101
Antraciclinas	OSW-1
Doxorrubicina	Derivados 4-nitrobenziloxicarbonil da O6-benzilguanina
Daunorrubicina	Inibidores da topoisomerase
Briostatina	Hemiasterlina
Camptotecina	Cefalotaxina
Derivados de camptotecina	Homoharringtonina
Camptotecina 7 substituída	Dímero de pirrolobenzodiazepina (PBDs)
10, 11-Difluorometilenodioxycamptotecina	Pirrolobenzodiazepenos funcionalizados
Combretastatina	Caliqueamicina
Debromoaplisiatoxina	Podofilotoxinas
Kahalalide-F	Taxanos
Discodermolida	Alcaloides da vinca
Ecteinasidinas	

	<u>REAGENTES CONJUGÁVEIS DE DETECÇÃO</u>
	Fluoresceína e derivados desta
	Isotiocianato de fluorescência (FITC)
<u>ANTIVIRAIS</u>	<u>RADIOFARMACÊUTICOS</u>
Aciclovir	^{125}I
Vira A	^{131}I
Symmetrel	^{89}Zr
	^{111}In
<u>ANTIFÚNGICOS</u>	^{123}I
Nistatina	^{131}I
	^{99m}Tc
<u>ANTI-NEOPLÁSTICOS ADICIONAIS</u>	^{201}Tl
Adriamicina	^{133}Xe
Cerubidina	^{11}C
Bleomicina	^{62}Cu
Alkeran	^{18}F
Velban	^{68}Ga
Oncovin	^{13}N
Fluorouracil	^{15}O
Metotrexato	^{38}K
Thiotepa	^{82}Rb
Bisantreno	^{99m}Tc (Tecnécio)
Novantrone	
Tioguanina	
Procarabizina	
Citarabina	
	<u>METAIS PESADOS</u>

<u>ANTI-BACTERIAIS</u>	Bário
Aminoglicosídeos	Ouro
Estreptomicina	Platina
Neomicina	
Kanamicina	<u>ANTI-MICOPLASMAS</u>
Amicacina	Tilosina
Gentamicina	Espectinomicina
Tobramicina	
Estreptomicina B	
Espectinomicina	
Ampicilina	
Sulfanilamida	
Polimixina	
Cloranfenicol	

[00178] Os versados na técnica reconhecerão que uma grande variedade de frações possíveis pode ser acoplada aos anticorpos resultantes ou a outras moléculas da invenção. (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).

[00179] 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 apenas nos sítios dos aminoácidos não naturais.

Composições e Métodos para Gerar Anticorpos Ativáveis Conjugados

[00180] 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, um ou mais pontos de conjugação são átomos de nitrogênio, tal como o grupo amino épsilon da lisina.

[00181] 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 sulfeto intercadeia, mas não átomos de enxofre envolvidos em ligações dissulfeto intracadeias. Em algumas modalidades, um ou mais pontos de conjugação são átomos de enxofre da cisteína ou outros resíduos de aminoácidos contendo um átomo de enxofre. Tais resíduos podem ocorrer naturalmente na estrutura do anticorpo ou podem ser incorporados ao anticorpo por mutagênese dirigida ao sítio, conversão química ou incorporação incorreta de aminoácidos não naturais.

[00182] 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 na MM, e é fornecido um fármaco reativo com tióis livres. O método geralmente inclui parcialmente reduzir ligações dissulfeto intercadeia no AA com um agente redutor, tal como, por exemplo, TCEP; e conjugado 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 contactado 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.

[00183] 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 geralmente 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. Os sítios de conjugação são selecionados de modo a permitir a colocação desejada de um agente para permitir que a conjugação ocorra no sítio 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 um intervalo 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.

[00184] 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 geralmente inclui reduzir parcialmente o AB com um agente redutor para formar pelo menos dois tióis de 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.

[00185] O reagente contendo tiol pode ser, por exemplo, cisteína ou N-acetil cisteína. 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.

[00186] A invenção também fornece anticorpos anti-CD166 ativáveis parcialmente reduzidos 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) deste 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 a CM é um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma protease. Em algumas modalidades, a MM é acoplada ao AB por via 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 terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM. Em algumas modalidades, o agente redutor é TCEP.

[00187] 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) deste 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 via 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 terminal N ao terminal C da seguinte maneira: MM-CM-AB ou AB-CM-MM. Em algumas modalidades, o agente redutor é TCEP.

[00188] 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 sítio. Em algumas modalidades, o A 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 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 de intercadeia no AB.

[00189] O acoplamento pode ser realizado por qualquer reação química que ligará as duas moléculas, visto que o anticorpo e a outra fração mantenham suas respectivas atividades. Esta ligação pode incluir muitos mecanismos químicos, por exemplo ligação covalente, ligação por afinidade, intercalação, ligação por coordenadas e complexação. Em algumas modalidades, a ligação é, no entanto, ligação covalente. A ligação covalente pode ser alcançada tanto 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 invenção para outras moléculas. Por exemplo, agentes de acoplamento representativos podem incluir compostos orgânicos tais como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldeído, diazobenzenos e hexametilendiaminas. Esta listagem não tem a intenção de ser exaustiva com as várias classes de agentes de acoplamento conhecidos na técnica, mas, em vez disso, é um exemplo dos agentes de acoplamento mais comuns. (Ver Killen e Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); e Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987).

[00190] Em algumas modalidades, além das composições e métodos fornecidos neste documento, o AA conjugado também pode ser modificado para conjugação específica do sítio 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

fornece 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 do AA.

[00191] Os ligantes peptídicos adequados são descritos na literatura. (*Consultar*, 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 US 5,030,719, que descreve o uso do derivado de acetil-hidrazida halogenado acoplada a um anticorpo por meio de um ligante peptídico oligopeptídeo. Em algumas modalidades, ligantes peptídicos adequados incluem: (i) EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida cloridrato); (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G)); (iii) SPDP (succinimidil-6[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato (Pierce Chem. Co., Nº de catálogo 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6[3-(2-piridilditio)propionamida]hexanoato (Pierce Chem. Co. Nº de catálogo 2165-G); e (v) sulfo-NHS (N-hidroxissulfosuccinimida: Pierce Chem. Co., Nº de catálogo 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).

[00192] Os ligantes peptídicos descritos acima contêm componentes que possuem atributos diferentes, levando, assim, a conjugados com propriedades físico-químicas diferentes. Por exemplo, ésteres sulfo-NHS de carboxilatos alquílicos são mais estáveis que ésteres sulfo-NHS de

carboxilatos aromáticos. Os ligantes contendo NHS-éster são menos solúveis que os ésteres sulfo-NHS. Adicionalmente, o ligante peptídico SMPT contém uma ligação dissulfeto estereoquimicamente impedida e pode formar conjugados com estabilidade aumentada. Ligações dissulfeto são, em geral, menos estáveis que outras ligações, visto que a ligação dissulfeto é clivada *in vitro*, resultando em menos conjugado disponível. O sulfo-NHS, em particular, pode aprimorar a estabilidade de acoplamentos de carbodiimida. Os acoplamentos de carbodiimida (tal como o EDC) quando usados em conjunto com o sulfo-NHS, formam ésteres que são mais resistentes à hidrólise do que a reação de acoplamento de carbodiimida isoladamente. Em uma modalidade exemplificativa, o ligante peptídico é SPDB. Em outra modalidade exemplificativa, o ligante peptídico é o agente SPDB é DM4.

[00193] Em algumas modalidades, os ligados são cliváveis. Em algumas modalidades, os ligantes peptídicos não são cliváveis. Em algumas modalidades, dois ou mais ligantes peptídicos estão presentes. Os dois ou mais ligantes peptídicos são todos iguais, isto é, cliváveis ou não cliváveis, ou os dois ou mais ligantes peptídicos são diferentes, isto é, pelo menos um clivável e pelo menos um não clivável.

[00194] A presente divulgação utiliza vários métodos para ligar agentes aos ABs: (a) ligação às frações de carboidratos do AB, ou (b) ligação aos grupos sulfidríla do AB, ou (c) ligação aos grupos amino do AB, ou (d) ligação a grupos carboxilato do AB. De acordo com a divulgação, os ABs podem ser ligados covalentemente a um agente através de um ligante peptídico intermediário com pelo menos dois grupos reativos, um para reagir com AB e outro para reagir com o agente. O ligante peptídico, 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 de AB. Adicionalmente, a ligação do ligante peptídico ao agente pode não destruir a atividade do agente. Os ligantes peptídicos adequados

para a reação com anticorpos oxidados ou fragmentos de anticorpo oxidado incluem aqueles que contêm uma amina selecionada do grupo que consiste nos grupos de amina primária, amina secundária, hidrazina, hidrazida, hidrazida, hidroxilamina, fenil-hidrazina, semicarbazida e tiosemicarbazida. Tais grupos funcionais reativos podem existir como parte da estrutura do ligante peptídico ou podem ser introduzidos por modificação química adequada de ligantes peptídicos que não contêm tais grupos.

[00195] De acordo com a presente divulgação, ligantes peptídicos adequados para ligação aos ABs reduzidos incluem aqueles que possuem certos grupos reativos capazes de reagir 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, maleimidias e grupos do tipo descrito por Mitra e Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

[00196] De acordo com a presente divulgação, ligantes peptídicos adequados para conexão aos Abs não oxidados nem reduzidos incluem aqueles que possuem certos grupos funcionais capazes de reagir com os grupos amino primários presentes em resíduos de lisina não modificados no Ab. Tais grupos reativos incluem, mas não estão limitados a, ésteres carboxílicos ou carbônicos de NHS, ésteres carbônicos ou carbônicos de sulfonhídrico, ésteres carbônicos ou 4-nitrofenilcarboxílicos, ésteres pentafluorofenilcarboxílicos ou carbônicos, acilimidazóis, isocianatos e isotiocianatos.

[00197] De acordo com a presente divulgação, ligantes peptídicos adequados para ligação a Abs não oxidados nem reduzidos incluem aqueles que possuem certos grupos funcionais capazes de reagir com os grupos 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 adicionado ou sulfo-NHS, e outros agentes desidratantes utilizados para a formação de carboxamida. Nesses casos, os grupos funcionais presentes nos ligantes peptídicos adequados incluiriam aminas primárias e secundárias, hidrazinas, hidroxilaminas e hidrazidas.

[00198] O agente pode ser ligado ao ligante peptídico antes ou depois que o ligante peptídico é anexado ao AB. Em certas aplicações, pode ser desejável produzir primeiro um intermediário do AB-ligante peptídico no qual o ligante peptídico esteja livre de um agente associado. Dependendo da aplicação em particular, um agente específico pode então ser covalentemente conectado ao vinculador. Em algumas modalidades, o AB é primeiro conectado à MM, CM e ligantes peptídicos associados e depois conectados ao ligante peptídico para fins de conjugação.

[00199] *Ligantes peptídicos ramificados*: Em modalidades específicas, são utilizados ligantes peptídicos ramificados que têm vários sítios para conexão de agentes. Para vários ligantes peptídicos de sítios, uma única conexão covalente a um AB resultaria em um intermediário de AB-ligante peptídico capaz de ligar um agente em vários sítios. Os sítios podem ser grupos aldeído ou sulfidrilas ou qualquer sítio químico ao qual os agentes possam ser conectados.

[00200] Em algumas modalidades, uma atividade específica mais alta (ou uma razão mais alta de agentes para AB) pode ser alcançada pela conexão de um único sítio de ligante peptídico em uma pluralidade de sítios no AB. Esta pluralidade de sítios pode ser introduzida no AB por um dos dois métodos. Primeiro, pode-se gerar vários grupos aldeído e/ou grupos sulfidrilas no mesmo AB. Segundo, pode-se conectar a um aldeído ou sulfidrilas do AB um "ligante peptídico ramificado" tendo vários sítios funcionais para conexão subsequente a ligantes peptídicos. Os sítios funcionais do ligante peptídico ramificado ou do ligante peptídico de múltiplos sítios podem ser grupos aldeído ou sulfidrilas ou podem ser qualquer sítio químico ao qual os ligantes peptídicos

possam ser conectados. Atividades específicas ainda mais altas podem ser obtidas combinando essas duas abordagens, ou seja, conectando vários ligantes peptídicos de sítios em vários sítios no AB.

[00201] *Ligantes peptídicos cliváveis*: ligantes peptídicos suscetíveis à clivagem por enzimas do sistema de complemento, tal como, não 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 através de um ligante peptídico suscetível à clivagem por complemento. O anticorpo é selecionado de uma classe que pode ativar o complemento. O conjugado anticorpo-agente, 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 peptídico 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 peptídicos 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.

[00202] Exemplos não limitativos de sequências de ligantes peptídicos cliváveis são fornecidos na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências de Ligantes Peptídicos Exemplificativa para Conjugação

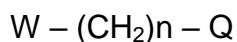
Tipos de Sequências Cliváveis	Sequência de Aminoácidos
<u>Sequências cliváveis de plasmina</u>	
Pró-uroquinase	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 89)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 90)
TGF β	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 91)

Plasminogênio	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 92)
Estafilocinase	SSSFDKGGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 93)
	SSSFDKGGKYKRGDDA (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 colagenase</u>	
Colágeno da pele da panturrilha (cadeia α 1 (I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 99)
Colágeno da pele da panturrilha (cadeia α 2 (I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 100)
Colágeno da cartilagem bovina (cadeia α 1 (II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 101)
Colágeno hepático humano (cadeia α 1 (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)

$\alpha_1I_3(2J)$ de camundongo	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 111)
$\alpha_1I_3(27J)$ 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)

[00203] Além disso, os agentes podem ser ligados via ligações dissulfeto (por exemplo, as ligações dissulfeto em uma molécula de cisteína) ao AB. Uma vez que muitos tumores liberam naturalmente altos níveis de glutatona (um agente redutor), isso pode reduzir as ligações dissulfeto com a liberação subsequente do agente no sítio da distribuição. Em algumas modalidades, o agente redutor que modificaria uma CM também modificaria o ligante peptídico do anticorpo ativável conjugado.

[00204] *Espaçadores e Elementos Cliváveis*: Em algumas modalidades, pode ser necessário construir o ligante peptídico de maneira a otimizar o espaçamento entre o agente e o AB do anticorpo ativável. Isso pode ser realizado usando um ligante peptídico da estrutura geral:



em que

W é --NH--CH₂-- ou --CH₂--;

Q é um aminoácido, peptídeo; e

n é um inteiro de 0 a 20.

[00205] Em algumas modalidades, o ligante peptídico 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 à enzima responsável pela clivagem. Alguns dos ligadores ramificados descritos acima podem servir como elementos espaçadores.

[00206] Ao longo desta discussão, deve ser entendido que a conexão do ligante peptídico ao agente (ou do elemento espaçador ao elemento clivável ou do elemento clivável ao agente) não precisa ser um modo particular de conexão ou reação. Qualquer reação que forneça um produto com estabilidade e compatibilidade biológica adequadas é aceitável.

[00207] *Complemento Sérico e Seleção de Ligantes Peptídicos*: 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 mantém a capacidade de se ligar ao antígeno e ativar a cascata do complemento. Assim, de acordo com esta modalidade da presente divulgação, um agente está em junção com uma extremidade do ligante peptídico clivável ou elemento clivável e a outra extremidade do grupo ligante peptídico é conectada a um sítio específico no AB. Por exemplo, se o agente tiver um grupo hidróxi ou um grupo amino, ele pode ser conectado ao terminal carboxi de um peptídeo, aminoácido ou outro ligante peptídico adequadamente escolhido por meio de uma ligação éster ou amida, respectivamente. Por exemplo, esses agentes podem ser conectados ao peptídeo ligante por meio de uma reação de carbodiimida. Se o agente contiver grupos funcionais que interfeririam na conexão ao ligante peptídico, esses grupos funcionais interferentes poderão ser bloqueados antes da conexão e desbloqueados quando o conjugado ou intermediário do produto for produzido. O terminal oposto ou amino do ligante peptídico é então usado diretamente ou após modificação adicional para ligação a um AB que é capaz de ativar o complemento.

[00208] Os ligantes peptídicos (ou elementos espaçadores dos ligantes peptídicos) podem ter qualquer comprimento desejado, uma extremidade a qual pode ser covalentemente conectada a sítios específicos no AB do anticorpo ativável. A outra extremidade do elemento ligante ou espaçador pode estar ligada a um ligante peptídico de aminoácido ou peptídeo.

[00209] Assim, quando estes conjugados se ligam ao antígeno na presença de complemento, a ligação amida ou éster que conecta o agente ao ligante peptídico será clivado, resultando na liberação do agente em sua forma ativa. Esses conjugados, quando administrados a um sujeito, realizarão a distribuição e a liberação do agente no sítio alvo e são particularmente eficazes para a distribuição *in vivo* de agentes farmacêuticos, antibióticos, antimetabólitos, agentes antiproliferativos e similares, conforme apresentado, mas não limitado a àquelas da Tabela 1.

[00210] *Ligantes peptídicos para liberação sem ativação do complemento*: ainda em outra aplicação de distribuição direcionada, a liberação do agente sem ativação do complemento é desejada uma vez que a ativação da cascata do complemento acabará por lisar a célula alvo. Portanto, essa abordagem é útil quando a distribuição e a liberação do agente devem ser realizadas sem matar a célula alvo. Esse é a meta quando se deseja a distribuição de mediadores celulares, como hormônios, enzimas, corticosteroides, neurotransmissores, genes ou enzimas nas células alvo. Estes conjugados podem ser preparados conectando o agente a um AB que não é capaz de ativar o complemento através de um ligante peptídico que é levemente suscetível à clivagem por proteases séricas. Quando este conjugado é administrado a um indivíduo, os complexos antígeno-anticorpo se formarão rapidamente, enquanto a clivagem do agente ocorrerá lentamente, resultando assim na liberação do composto no sítio alvo.

[00211] *Reticuladores bioquímicos*: Em algumas modalidades, o AA pode ser conjugado com um ou mais agentes terapêuticos usando certos reticuladores bioquímicos. Os reagentes de união cruzada formam pontes moleculares que enlaçam grupos funcionais de duas moléculas diferentes. Para unir duas proteínas diferentes de uma maneira passo a passo, podem ser utilizados reticuladores heterobifuncionais que eliminam a formação de homopolímeros indesejados.

[00212] Os ligantes peptídicos de peptidil cliváveis por proteases lisossômicas também são úteis, por exemplo, Val-Cit, Val-Ala ou outros dipeptídeos. Além disso, podem ser utilizados ligantes peptídicos lábeis a ácidos cliváveis no ambiente de baixo pH do lisossomo, por exemplo: éter bis-sialílico. Outros ligantes peptídicos adequados incluem substratos lábeis a catepsina, particularmente aqueles que mostram função ideal a um pH ácido.

[00213] Exemplos de reticuladores heterobifuncionais exemplificativos são referenciados na Tabela 3.

Tabela 3: Reticuladores Heterobifuncionais Exemplificativos

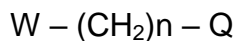
<u>RETICULADORES HETERO-BIFUNCIONAIS</u>			
Ligante peptídico	Reativo em relação a	Vantagens e Aplicações	Reticulação Pós Comprimento do Braço Espaçador (Angstroms)
SMPT	Aminas primárias	Maior estabilidade	11,2 Å
	Sulfidrilas		
SPDP	Aminas primárias	Tiolização	6,8 Å
	Sulfidrilas	Reticulação clivável	
LC-SPDP	Aminas primárias	Braço espaçador estendido	15,6 Å
	Sulfidrilos		
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primárias	Braço espaçador extensor	15,6 Å
	Sulfidrilos	Solúvel em água	
SMCC	Aminas primárias	Grupo reativo à	11,6 Å

		maleimida estável	
	Sulfidrilos	Conjugação enzima-anticorpo	
		Conjugação de proteínas carreadora do hapteno	
Sulfo-SMCC	Aminas primárias	Grupo reativo à maleimida estável	11,6 Å
	Sulfidrilos	Solúvel em água	
		Conjugação enzima-anticorpo	
MBS	Aminas primárias	Conjugação enzima-anticorpo	9,9 Å
	Sulfidrilos	Conjugação de proteínas carreadora do hapteno	
Sulfo-MBS	Aminas primárias	Solúvel em água	9,9 Å
	Sulfidrilos		
SIAB	Aminas primárias	Conjugação enzima-anticorpo	10,6 Å
	Sulfidrilos		
Sulfo-SIAB	Aminas primárias	Solúvel em água	10,6 Å
	Sulfidrilos		
SMPB	Aminas primárias	Braço espaçador estendido	14,5 Å
	Sulfidrilos	Conjugação enzima-anticorpo	

Sulfo-SMPB	Aminas primárias	Braço espaçador estendido	14,5 Å
	Sulfidrilo	Solúvel em água	
EDE/Sulfo-NHS	Aminas primárias	Conjugação de proteínas carreadoras do hapteno	0
	Grupos carboxílicos		
ABH	Carboidratos	Reage com grupos de açúcar	11,9 Å
	não seletiva		

[00214] *Ligantes peptídicos 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 conseguido conectando um agente a um AB, diretamente ou através de um ligante peptídico não clivável.

[00215] Esses ligantes peptídicos não cliváveis podem incluir aminoácidos, peptídeos, D-aminoácidos ou outros compostos orgânicos que podem ser modificados para incluir grupos funcionais que podem subsequentemente ser utilizados em ligação a ABs pelos métodos descritos neste documento. Fórmula geral-A para um ligante peptídico orgânico pode ser



em que

W é --NH--CH₂-- ou --CH₂--;

Q é um aminoácido, peptídeo; e

n é um inteiro de 0 a 20.

[00216] *Conjugados não cliváveis*: Em algumas modalidades, um composto pode ser conectado aos ABs que não ativam o complemento. Ao usar os ABs que são incapazes de ativação do complemento, essa conexão

pode ser realizada usando ligantes peptídicos suscetíveis à clivagem pelo complemento ativado ou usando ligantes peptídicos que não são suscetíveis à clivagem pelo complemento ativado.

[00217] Os anticorpos descritos 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 U.S. Pat. N. 4,485,045 e 4,544,545. Os lipossomas com tempo de circulação aumentado são divulgados na Patente U.S. Nº 5,013,556.

[00218] Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase inversa 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 invenção 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 dissulfeto.

Anticorpos ativáveis multiespecíficos

[00219] Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-CD166 e/ou anticorpo ativável conjugado anti-CD166 é monoespecífico.

[00220] 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 anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado é formulado como parte de uma molécula pró-biespecífica T Cell Engager (BITE). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD166 ativável e/ou anticorpo anti-CD166 ativável conjugado é

formulado como parte de uma célula T modificada pelo receptor de antígeno pró-quimérico (CAR) ou outro receptor manipulado.

[00221] Em algumas modalidades, o AA ou fragmento de ligação ao antígeno deste é incorporado em um AA multiespecífico ou fragmento de ligação ao antígeno deste, 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 deste é incorporado em um anticorpo biespecífico ou seu fragmento de ligação ao antígeno, em que pelo menos um braço do AA biespecífico se liga especificamente ao CD166.

[00222] 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, a 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 no normal, isto é, tecido saudável e, quando ativados, exibem ligação a um alvo que é pelo menos comparável ao correspondente, anticorpo multiespecífico não modificado.

[00223] Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos são projetados para envolver células efetoras imunes, também referidos neste documento como células efetoras imunes que envolvem anticorpos ativáveis multiespecíficos. 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 engatam um antígeno de superfície em um leucócito, como em uma célula T, em uma célula natural killer (NK), em uma célula mononuclear mieloide, em um macrófago e/ou em outra célula efetora do sistema imunológico. Em algumas modalidades, a célula efetora imunológica é um leucócito. Em algumas modalidades, a célula efetora imunológica é uma célula T. Em algumas formas modalidades, a célula efetora é uma célula NK. Em algumas modalidades, a célula efetora imunológica é uma célula mononuclear, tal 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 de forma intercambiável.

[00224] Em algumas modalidades, as células efetoras imunes que envolvem AAs multiespecíficos da divulgação incluem um anticorpo alvo ou um fragmento de ligação ao antígeno que se liga ao CD166 e um anticorpo que envolve células efetoras imunes ou uma porção de ligação ao antígeno, em que pelo menos um dos anticorpos ou antígenos alvo o fragmento de ligação deste e/ou o anticorpo que engata a célula imunológica efetora ou a porção de ligação ao antígeno desta é mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve a célula efetora imune ou fragmento de ligação ao antígeno desta inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) deste que liga um primeiro alvo de envolvimento da célula efetora imune, em que o AB1 está ligado a uma fração de mascaramento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 de ligar o primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno deste inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo

anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) deste que se liga ao CD166, onde 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 efetora imune ou fragmento de ligação ao antígeno desta inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) deste que liga um primeiro alvo de envolvimento da célula efetora imune, em que o AB1 está conectado a uma fração de mascaramento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 de se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno deste inclui um segundo anticorpo ou fragmento deste que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) deste 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 controla a célula efetora não imune 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 a célula efetora imunológica é um scFv. Em algumas modalidades, o anticorpo alvo de 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 imunológica é um leucócito. Em algumas modalidades, a célula efetora imunológica é uma célula T. Em algumas modalidades, a célula efetora é uma célula NK. Em algumas modalidades, a célula efetora imunológica é uma célula mononuclear mieloide.

[00225] Em algumas modalidades, os AAs multiespecíficos que envolvem a célula T da divulgação incluem um anticorpo alvo CD166 ou um fragmento de ligação ao antígeno deste e um anticorpo que envolve células T ou uma porção de ligação ao antígeno deste, em que pelo menos um dos anticorpos alvo CD166 ou fragmento de ligação ao antígeno alvo deste e/ou o

anticorpo que envolve a célula T ou a porção de ligação ao antígeno desta é mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve a célula t ou fragmento de ligação ao antígeno desta inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) deste 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 reduz a capacidade do AB1 de ligar ao primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno deste inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) deste que se liga ao CD166, onde 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 deste inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) deste 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 reduz a capacidade do AB1 de se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno deste inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) deste que se liga 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 o CD166.

[00226] Em algumas modalidades de uma célula efetora imunológica que envolve o anticorpo ativável multiespecífico, 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, mas não estão limitados a, CD3, CD27, CD28, CD137 (também conhecido 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 inibidores incluem, mas não estão limitados a, KIRs expressos em BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 e 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 efetoras imunes, como, mas não limitado a, B7-1, B7-2, B7H3, PDL1, PDL2 ou TNFSF9.

[00227] Em algumas modalidades, o AA multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CD3 (CD3 ϵ , também referido neste documento como CD3e e CD3) e um anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno deste, em que pelo menos um dos anti-CD3 ϵ O scFv e/ou o anticorpo alvo ou a porção de ligação ao antígeno deste são mascarados. Em algumas modalidades, o CD3 ϵ scFv inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB1) deste que se liga a CD3 ϵ , em que o AB1 está ligado a uma fração de mascaramento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 de se ligar CD3 ϵ . Em algumas modalidades, o anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno deste inclui um segundo anticorpo ou fragmento deste que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) deste que se liga ao CD166, onde 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 CD3 ϵ scFv inclui um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste (AB1) que liga CD3 ϵ , em que o AB1 está conectado a uma fração de

mascamamento (MM1), de modo que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 de se ligar ao CD3 ϵ , e o anticorpo alvo ou fragmento de ligação ao antígeno deste inclui um segundo anticorpo ou fragmento deste que inclui um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) deste que se liga 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 o CD166.

[00228] Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados aos antígenos múltiplos e/ou AAs direcionados a vários antígenos incluem pelo menos um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste que liga um primeiro alvo e/ou primeiro epítipo e um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste que liga um segundo alvo e/ou um segundo epítipo. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados aos antígenos múltiplos e/ou AAs direcionados aos vários antígenos ligam dois ou mais alvos diferentes. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados aos antígenos múltiplos e/ou AAs direcionados aos antígenos múltiplos ligam dois ou mais epítipos diferentes no mesmo alvo. Em algumas modalidades, os anticorpos de direcionamento de antígenos múltiplos e/ou AAs de direcionamento de antígenos múltiplos ligam uma combinação de dois ou mais alvos diferentes e dois ou mais epítipos diferentes no mesmo alvo.

[00229] 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 domínios scFv é acoplado a uma 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.

[00230] Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fundido com o terminal carboxila da cadeia pesada de um anticorpo ativável por IgG, com o terminal carboxila da cadeia leve de um anticorpo ativável por IgG ou com os terminais carboxila dos pesados e leves cadeias de um anticorpo ativável por IgG. Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fundido ao terminal amino da cadeia pesada de um anticorpo ativável por IgG, ao terminal amino da cadeia leve de um anticorpo ativável por IgG ou aos terminais amino dos terminais pesados e leves cadeias de um anticorpo ativável por IgG. Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fundido com qualquer combinação de um ou mais terminais carboxila e um ou mais terminais amino de um anticorpo ativável por IgG. Em algumas modalidades, uma fração de mascaramento (MM) unido 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) unido 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) unida 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.

[00231] 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-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 ligante que conecta a CM (CM) e o anticorpo; L3 é um peptídeo ligante que conecta os domínios variáveis do scFv; L4 é um peptídeo ligante 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 epítopo.

[00232] Em algumas modalidades de uma anticorpo ativável multiespecífico que envolve a célula T, um antígeno é CD166 e outro antígeno é tipicamente um receptor inibitório ou estimulador (também referido no presente documento como ativando) ou inibitório presente na superfície de uma célula T, célula natural killer (NK), célula mononuclear mieloide, macrófago e/ou outras células efetoras 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 efetoras imunes.

[00233] Em algumas modalidades, o anticorpo alvo é um anticorpo anti-CD166 divulgado no presente documento. Em algumas modalidades, o anticorpo alvo pode estar na forma de um anticorpo ativável. Em algumas modalidades, os scFv (s) podem estar na forma de um Pro-scFv (ver, por

exemplo, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

[00234] Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a CD3 ϵ e compreende ou é derivado de um anticorpo ou fragmento deste 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).

[00235] Em algumas modalidades, o anti-CTLA-4 scFv inclui a sequência de aminoácidos:

Anti-CTLA-4 scFv

GGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS
 QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISR
 LEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGT
 QVQLVQTGGGVVQPGRSLRLSCAASGTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSL
 YWYFDLWGRGTLTVSSAS (SEQ ID NO: 117)

[00236] 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 idêntico à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 117.

[00237] Em algumas modalidades, o anti-CD3 ϵ scFv inclui a sequência de aminoácidos:

Anti-CD3 ϵ scFv

GGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS
 GYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSS
 STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGG
 GGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTS
 PKRWIYDTSKLAGSVPAAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSN
 PFTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 118)

[00238] Em algumas modalidades, o anti-CD3 ϵ 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: 118.

[00239] Em algumas modalidades, o scFv é específico para ligar 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 de 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.

[00240] 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 fragmento desta. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AA multiespecífico por meio de um ligante peptídico. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB através de um ligante peptídico clivável. Em algumas modalidades, o ligante peptídico é um ligante peptídico não clivável. Em algumas modalidades, o agente é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o agente é um agente danificador de ácido nucleico, tal como um alquilador de DNA ou intercalador de DNA, ou outro agente danificador de DNA. Em certas modalidades, o ligante peptídico é um ligante peptídico 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 derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou 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 derivado de maitansinoide ou maitansinoide. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em

algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou derivado desta. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrolobenzodiazepina. Em algumas modalidades, o agente é um dímero de pirrolobenzodiazepina.

[00241] Em algumas modalidades, o AA multiespecífico também inclui uma fração detectável. Em algumas modalidades, a fração detectável é um agente de diagnóstico.

[00242] 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.

[00243] 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 um vetor.

[00244] 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.

[00245] 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) deste que se liga especificamente a um primeiro alvo ou primeiro epítipo e um segundo

anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno (AB2) deste que liga um segundo alvo ou um segundo epítopo, 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 acoplado 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 colocalizada 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 normal, isto é, tecido saudável e, quando ativados, exibem ligação a um 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.

[00246] 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 multiespecífico AA 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 do 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.

[00247] 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 vincula 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 via 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 biespecíficas, AB1 é acoplado via 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 via CM1 a MM1, AB2 é acoplado via 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.

Compostos Ativáveis Tendo Frações Estéricas Não Ligantes ou Parceiros de Ligação para Frações Estéricas Não Ligantes

[0248] 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 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 significa 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 desinibido, 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 convencional de anticorpos.

[0249] Em algumas modalidades, os AAs fornecem toxicidade reduzida e/ou efeitos colaterais adversos que poderiam, de outro modo, resultar da ligação dos sítios nos sítios no tratamento e/ou sítios não diagnósticos se o AB não fosse mascarado ou, de outro modo, inibido de se ligar a este sítio.

[0250] Os AAs anti-CD166 que incluem uma fração estérica não ligante (NB) podem ser produzidos usando os métodos estabelecidos na Publicação PCT N° WO 2013/192546, cujo conteúdo é incorporado neste documento por referência na sua totalidade.

Produção de Anticorpos Ativáveis

[0251] 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.

[0252] 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 posicionado 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 de clivagem, a 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.

[0253] 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

CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTCAAACCCACCCAG
 ACCCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACG
 GCATGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAAT
 GGCTGGCCAACATCTGGTGGTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCAGCC
 TGAAGTCCCGGCTGACCATCACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGT
 GCTGACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGC
 GTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCTACTGGGGCCAG
 GGCACACTGGTGACAGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCTCCGTG
 TTCCCTCTGGCCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCC
 TGGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCT
 GGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGC
 TGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTC
 CAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC
 TCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAG
 ACCCACACCTGTCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCT
 TCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCC
 GGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACC
 CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
 CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCACCTACCGGGTGGT
 GTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTA
 CAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGAC

CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACT
 GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG
 TCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
 AACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGAC
 TCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC
 GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC
 TGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAG

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**

CAGATCACCTGAAAGAGTCCGGCCCCACCCTGGTCAAACCCACCCAG
 ACCCTGACCCTGACATGCACCTTCTCCGGCTTCAGCCTGTCCACCTACG
 GCATGGGCGTGGGCTGGATCAGGCAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAAT
 GGCTGGCCAACATCTGGTGGTCCGAGGACAAGCACTACTCCCCAGCC
 TGAAGTCCCGGCTGACCATACCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGT
 GCTGACAATCACAAACGTGGACCCCGTGGACACCGCCACCTACTACTGC
 GTGCAGATCGACTACGGCAACGACTACGCCTTCACCTACTGGGGCCAG
 GGCACACTGGTGACAGTGTCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCTCCGTG
 TTCCCTCTGGCCCCTTCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCC
 TGGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCT
 GGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACCTTCCCTGCCGTGC
 TGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTC
 CAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC
 TCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAG
 ACCCACACCTGTCCCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCT
 TCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCC
 GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACC

CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
 CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGT
 GTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTA
 CAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGAC
 CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACACT
 GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG
 TCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCC
 AACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGAC
 TCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC
 GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC
 TGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC

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][CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGC
 CTGGGAGTCCTGTTCCAGCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGT
 GGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGCCTGTCCGGCAGATCTGACAACCA
 CGGCGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTGTCCCTGCCCCGT
 GACTCCTGGCGAGCCTGCCTCCATCTCCTGCCGGTCCTCCAAGTCCCTG
 CTGCACTCCAACGGCATCACCTACCTGTAAGTATCTGCAGAAGCCCG
 GCCAGTCCCCTCAGCTGCTGATCTACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGG
 CGTGCCCGACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACCCT
 GAAGATCTCCCGGGTGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGC
 CCAGAACCTGGAAGTACCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGA
 AATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCTCC
 GACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCTGAAC

AACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC
CTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAG
GACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACT
ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGA
GCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGCT

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

CTGTGTCACCCTGCTGTGCTGTCTGCCTGGGAGTCCTGTTCCAGCGGC
GGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCACCTGGC
GGCCTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCGTGATG
ACCCAGTCCCCCCTGTCCCTGCCCGTGACTCCTGGCGAGCCTGCCTCC
ATCTCCTGCCGGTCCTCCAAGTCCCTGCTGCACTCCAACGGCATCACCT
ACCTGTACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTCAGCTGCTGAT
CTACCAGATGTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCCGACAGATTCTCCGG
CTCTGGCTCCGGCACCGACTTACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAAGC
CGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCGCCCAGAACCTGGAAGTGCCCTA
CACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGC
TCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGC
ACCGCCTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCC
AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAG
GAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCT
CCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG
CCTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCT
TCAACCGGGGCGAGTGCT

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

CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC

Uso Terapêutico de Anticorpos Ativáveis e Anticorpos Ativáveis
Conjugados

[0254] 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 sinalização mediada por CD166 e/ou CD166.

[0255] 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.

[0256] 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.

[0257] 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.

[0258] 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 terapêuticamente 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.

[0259] 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 aberrante e/ou atividade de CD166 em um sujeito.

[0260] 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.

[0261] 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.

[0262] 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, entre outros, adenocarcinoma, câncer do duto biliar (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 orofaringe; 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.

[0263] 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.

[0264] 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.

[0265] 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.

[0266] 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.

[0267] 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 epidermoide de cabeça e pescoço (HNSCC) e câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC).

[0268] Conforme fornecido neste documento, o sujeito a ser tratado é um mamífero, como um primata humano, 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 humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um animal doméstico. Em algumas modalidades, o sujeito é um animal sob os cuidados de um veterinário.

[0269] 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 terapia

anti-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.

[0270] 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.

[0271] 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 do regime contendo gencitabina, antes de ser tratado com o AA da presente divulgação.

[0272] 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 extrauterina ou avançada, antes de ser tratado com o AA da presente divulgação.

[0273] 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 (germinativa ou somática) que não é o câncer de mama (BRCA) ou tem um status mutacional desconhecido no BRCA e apresenta carcinoma de ovário resistente à platina ou resistente 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.

[0274] 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.

[0275] 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.

[0276] 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 córneo 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 importante (que requer anestesia geral) dentro de 3 meses antes da administração.

[0277] 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 uma de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, como exame físico e/ou análise de fluidos corporais, por exemplo, análise de sangue, urina e/ou fezes, para avaliar o estado de saúde.

[0278] 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

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 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 adicional, *ou seja*, pior.

[0279] 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 estão associadas à expressão e/ou atividade aberrante de CD166. Em algumas modalidades, as células 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 uma de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, como exame físico e/ou análise de fluidos corporais, por exemplo, análise de sangue, urina e/ou fezes, para avaliar o estado de saúde.

[0280] 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 normais 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 uma de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, como exame físico e/ou análise de fluidos corporais, por exemplo, análise de sangue, urina e/ou fezes, para avaliar o estado de saúde.

[0281] 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.

[0282] 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.

[0283] 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. Os 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.

[0284] Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(ais) é(são) um agente(s) quimioterapêutico(s), como um agente quimioterapêutico selecionado do grupo que consiste em docetaxel, paclitaxel, abraxano (ou seja, paclitaxel conjugado à albumina), doxorrubicina, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, irinotecano, e gencitabina.

[0285] Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(ais) é(são) um inibidor de checkpoint, um inibidor de quinase, um agente que visa inibidores no microambiente do tumor e/ou uma célula T ou agonista de NK.

Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(ais) é(são) terapia de radiação, isoladamente ou em combinação com outro(s) agente(s) adicional(ais), como um agente quimioterapêutico ou antineoplásico. Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(ais) é(são) uma vacina, um oncovírus e/ou um agente ativador de DC, como, a título de exemplo não limitativo, um agonista do receptor tipo toll (TLR) e/ou α -CD40. Em algumas modalidades, o(s) agente(s) adicional(ais) é um anticorpo direcionado a tumores concebido para eliminar o tumor via ADCC ou por conjugação direta a uma toxina (por exemplo, um conjugado de anticorpo-fármaco (ADC)).

[0286] 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 de quinase é selecionado do grupo que consiste em inibidores de B-RAFi, MEKi e Btk, como o ibrutinibe. Em algumas modalidades, o inibidor de quinase é o crizotinibe. Em algumas modalidades, o inibidor de microambiente tumoral é selecionado 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 mielóide ou uma célula reguladora T. Em algumas modalidades, o agonista é selecionado do grupo que consiste em Ox40, GITR, CD137, ICOS, CD27 e HVEM.

[0287] Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de CTLA-4. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de LAG-3. Em certas 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. Em algumas modalidades, o inibidor é um inibidor de Btk. Em algumas modalidades, o inibidor é ibrutinibe. Em algumas

modalidades, o inibidor é o crizotinibe. 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 mielóide. Em algumas modalidades, o inibidor é uma célula T reguladora.

[0288] 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.

[0289] 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.

[0290] 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.

[0291] 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 antimetabólito, 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 antimetabólito, 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, bevacizumab), um anticorpo biespecífico ou um anticorpo multiespecífico. Em algumas modalidades, o agente adicional é um inibidor de proteossoma, como bortezomibe ou carfilzomibe. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente imunomodulador, como lenolidomide 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.

[0292] 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 a antígeno deste, outro anticorpo conjugado ou fragmento de ligação ao antígeno deste, outro AA ou fragmento de ligação a antígeno deste e/ou outro AA conjugado ou fragmento de ligação a 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.

[0293] 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.

[0294] Será apreciado que a administração de entidades terapêuticas, em conformidade com a divulgação, será administrada com carreadores adequados, excipientes e outros agentes que são incorporados nas formulações para fornecer transferência, transmissão, tolerância adequadas e similares. 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. Essas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, geleias, ceras, óleos, lipídios, vesículas contendo lipídios (catiônicos ou aniônicos) (tais como Lipofectin™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões óleo-em-água e água-em-óleo, emulsões 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. *Vide* 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 a químicos farmacêuticos.

[0295] 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 em que 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 neoplasia hematológica em que 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 frequentemente desempenha funções 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 (isto é, 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 de câncer. 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.

[0296] 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.

[0297] 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; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, Nova York.

[0298] Em algumas modalidades nas quais os 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 concebidas moléculas peptídicas que mantenham a capacidade de se ligarem à sequência proteica alvo. Tais peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por tecnologia de DNA recombinante. (*Vide, por exemplo*, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). A formulação também pode conter mais de um composto ativo conforme necessário para a indicação específica sendo tratada, por exemplo, em algumas modalidades, aquelas com atividades complementares que não prejudiquem umas às outras. Em algumas modalidades, ou adicionalmente, a composição pode compreender um agente

que aumenta a sua função, tal como, por exemplo, um agente citotóxico, citocina, agente quimioterapêutico ou agente inibidor do crescimento. Tais moléculas estão devidamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para a finalidade almejada.

[0299] 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.

[0300] As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é prontamente conseguido pela filtração através de membranas de filtração estéreis.

[0301] As preparações de liberação prolongada podem ser preparadas. Os exemplos adequados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, matrizes estas que estão na forma de artigos moldados, *por exemplo*, películas ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) ou álcool polivinílico, polilactidas (Patente U.S. Nº 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etilenoacetato 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 polímeros, tais como etilenoacetato de vinil e ácido láctico-ácido glicólico, permitam a liberação de moléculas por mais de 100 dias, determinados hidrogéis liberam proteínas por períodos mais curtos.

Usos Diagnósticos

[0302] 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 a MM é um peptídeo que inibe a ligação do AB a CD166 e em que a 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, a MM interfere na ligação específica do AB a CD166 e, quando o AB está em um estado ativado e clivado, a 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.

[0303] 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, a marcação detectável é posicionada 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 compreendendo uma marcação detectável.

[0304] 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-metilacrílico. Em algumas modalidades desses métodos, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor[®], 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.

[0305] 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.

[0306] 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*.

[0307] 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 com resultado positivo tanto para o alvo (por exemplo, CD166) quanto para uma protease que cliva o substrato na CM (CM) do AA anti-CD166 sendo testado nesses métodos são identificados como candidatos adequados para o tratamento este AA anti-CD166 compreendendo uma 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 com resultado negativo para um ou ambos os alvos (*por exemplo*, CD166) e a protease que quebra 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 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 uma 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 teve resultado de teste positivo. AB, MM e/ou CM adequados incluem qualquer um dos AB, MM e/ou CM divulgados neste

documento.

[0308] 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", no que se refere a sonda ou anticorpo, destina-se a englobar a marcação direta da sonda ou anticorpo pelo acoplamento (*ou seja*, ligando fisicamente) uma substância detectável para a sonda ou anticorpo, bem como marcação indireta da sonda ou anticorpo pela reatividade com outro reagente que é diretamente marcado. Os exemplos de marcação indireta incluem detecção de um anticorpo primário usando um anticorpo secundário com marcação fluorescente e marcado na extremidade de uma sonda de DNA com biotina de modo que ele possa ser detectado com estreptavidina com marcação fluorescente. O termo "amostra biológica" pretende incluir tecidos, células e fluidos biológicos isolados de um sujeito, bem como tecidos, células e fluidos presentes em 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 detecção de uma proteína de analito incluem ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), Western blots, imunoprecipitações, coloração imunoquímica e imunofluorescência. As técnicas *in vitro* para detecção de um DNA genômico de analito incluem hibridizações de Southern. Os procedimentos para a realização de imunoensaios 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 proteico anti-analito marcado. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com uma marcação radioativa cuja presença e localização em um sujeito pode ser detectada por técnicas de geração de imagens padrão.

[0309] 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.

[0310] 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.

[0311] Um anticorpo ativável e/ou um AA conjugado da divulgação também é útil na detecção de um alvo em amostras de sujeitos e, conseqüentemente, 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.

[0312] 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.

[0313] 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. Essa amostra é, *por exemplo*, uma amostra de soro de um sujeito suspeito de ter níveis de antígeno circulante considerados como diagnóstico de uma patologia. Depois de enxaguar a amostra ou padrão de teste, 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 da marcação 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.

[0314] 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 encenar uma doença em um sujeito com base nos níveis de expressão do antígeno alvo. Para uma dada doença, são coletadas 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, é designada um intervalo de concentrações do antígeno que pode ser considerada característica de cada estágio.

[0315] Um AA e/ou um AA conjugado também podem ser usados em métodos de diagnóstico e/ou imagem. Em algumas modalidades, esses métodos são métodos *in vitro*. Em algumas modalidades, esses métodos são métodos *in vivo*. Em algumas modalidades, esses métodos são métodos *in situ*. Em algumas modalidades, esses 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 alvo ao qual o anticorpo ativado se liga.

[0316] Por exemplo, a CM pode ser selecionado para ser substrato para pelo menos uma protease encontrada no sítio de um tumor, no sítio de uma infecção viral ou bacteriana em um sítio biologicamente (*por exemplo*, como em um abscesso, em um órgão e similares) e similares. O AB pode ser aquele que liga um antígeno alvo. Usando métodos conforme divulgados neste documento, ou quando apropriado, métodos familiares a um versado na técnica, uma marcação detectável (*por exemplo*, uma marcação fluorescente ou marcação radioativa ou traçador radioativo) pode ser conjugado com um AB ou outra região de um anticorpo e/ou anticorpo ativável. As marcações detectáveis adequadas são discutidas 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 da doença é aumentada em relação aos tecidos que não

são da doença.

[0317] 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, onde 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 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 extinta ou outra marcação que não é detectável até que ocorra a clivagem. O ensaio pode ser realizado por, por exemplo, ao 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, então lavada 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.

[0318] Tais métodos de detecção podem ser adaptados para também fornecer a detecção da presença ou ausência de um alvo que seja capaz de ligar o AB dos AAs quando clivados. Portanto, 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.

[0319] 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 imagem *in situ* é uma técnica que permite a localização da atividade proteolítica e do alvo em amostras biológicas, como culturas de células ou seções de tecidos. Usando esta técnica, é possível confirmar a ligação a um determinado alvo e a atividade proteolítica com base na presença de uma marcação detectável (por exemplo, uma marcação fluorescente).

[0320] Essas técnicas são úteis com qualquer célula ou tecido congelado derivado de um sítio da doença (*por exemplo*, tecido tumoral) ou tecidos saudáveis. Essas técnicas também são úteis com amostras de células ou tecidos frescos.

[0321] Nessas técnicas, um AA é marcado com uma marcação detectável. A marcação detectável pode ser um corante fluorescente (por exemplo, um fluoróforo, isotiocianato de fluorescência (FITC), isotiocianato de rodamina (TRITC), uma marcação Alexa Fluor®), um corante infravermelho próximo (NIR) (por exemplo, nanocristais Qdot®), um metal coloidal, hapteno, marcação radioativa, biotina e reagente de amplificação, como estreptavidina ou enzima (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina).

[0322] A detecção da marcação 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, Número da Publicação Internacional WO 2010/129609, publicado 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 a marcação detectável pode ser competido(a) com o alvo não marcado. Em algumas modalidades, AA não marcado pode ser usado, com detecção por um anticorpo secundário marcado ou sistema de detecção mais complexo.

[0323] As 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 sítio da doença contém o alvo e contém uma protease específica para a CM do anticorpo ativável.

[0324] 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 específico da protease no anticorpo ativável.

[0325] 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 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 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, 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 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo compreendendo uma marcação detectável.

[0326] A divulgação também fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou 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 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo compreendendo uma marcação detectável.

[0327] 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 AA compreendem 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo compreendendo uma marcação detectável.

[0328] 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 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 a ao alvo e em um estado ativado e clivado, a MM não interfere ou compete com ligação específica do AB

ao alvo; e em que a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo compreendendo uma marcação detectável.

[0329] 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 para o qual uma terapêutica agente é conjugado) descrito neste documento para uso em 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.

[0330] A divulgação também fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra (i) entrando em contato com um sujeito ou amostra biológica com um AA na presença do alvo e (ii) medindo 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 para o 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, a marcação detectável é anexada à fração de mascaramento. Em algumas modalidades, a marcação detectável é fixada ao terminal N da CM do sítio de clivagem da 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 compreendendo uma marcação detectável.

[0331] 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 em contato com um sujeito ou amostra biológica com um AA na presença do alvo e 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 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 para o 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, a marcação detectável é anexada à fração de mascaramento. Em algumas modalidades, a marcação detectável é fixada ao

terminal N da CM do sítio de clivagem da 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 compreendendo uma marcação detectável.

[0332] 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 descritos neste documento para uso em 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.

[0333] A divulgação fornece métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem e o alvo em um sujeito ou uma amostra por (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 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 número detectável reduzido o nível 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 marcação 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 para o 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo compreendendo uma marcação detectável.

[0334] 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 em 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 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 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 marcação 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%.

[0335] 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 marcação 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 para o 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo compreendendo uma marcação detectável.

[0336] 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 em contato com um sujeito ou biológico amostra 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 posicionado em uma porção do AA que é liberada após a clivagem da CM, em que um nível detectável da marcação 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 da marcação 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 marcação 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%.

[0337] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AA 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-metilacrílico. Em algumas modalidades desses métodos, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor[®], 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.

[0338] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades desses métodos e kits, 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.

[0339] 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*.

[0340] Em algumas modalidades, a imagem *in situ* e/ou a imagem *in vivo* são úteis em métodos para identificar quais sujeitos tratar. Por exemplo, na imagem *in situ*, os AAs são usados para realizar a triagem de amostras do sujeito para identificar aqueles que têm protease(s) e alvo(s) apropriados(s) no local apropriado, *por exemplo*, no sítio do tumor.

[0341] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in situ* é usada para identificar ou refinar uma população sujeita adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos com teste positivo para o alvo (por exemplo, o alvo) e uma protease que quebra o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no sítio da doença) são identificados como adequados candidatos ao tratamento com um AA que compreende essa CM. Da mesma forma, os sujeitos que testam negativo para um ou ambos os alvos (*por exemplo*, o alvo) e a protease que quebra 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 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 sítio de doença). Em algumas modalidades, o sujeito é então administrado uma quantidade terapeuticamente eficaz do AA para a qual o sujeito testou positivo.

[0342] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in vivo* é usada para identificar ou refinar uma população sujeita adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos com teste positivo para o alvo (por exemplo, o alvo) e uma protease que quebra o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no sítio da doença) são identificados como adequados candidatos ao tratamento com um AA que compreende essa CM. Da mesma forma, os sujeitos com resultado negativo podem ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, esses 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 sítio de doença). Em algumas modalidades, o sujeito é então administrado uma quantidade terapeuticamente eficaz do AA para a qual o sujeito testou positivo.

[0343] Em algumas modalidades dos métodos e kits, o método ou kit é usado para identificar ou refinar uma população de sujeitos adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos que apresentam resultado positivo tanto para o alvo (por exemplo, o alvo) quanto para uma protease que quebra 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 apresentam resultado negativo para ambos os alvos (*por exemplo*, o alvo) e a protease que quebra 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 que apresentam resultado 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 sítio de doença). Em algumas modalidades, os sujeitos que apresentam resultado 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 apresentam resultado 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, esses sujeitos que apresentam resultado 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 sítio 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável é posicionada 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 uma marcação detectável. Em algumas modalidades, o reagente secundário é um anticorpo compreendendo uma marcação detectável.

[0344] Em algumas modalidades, um método ou kit é usado para identificar ou refinar uma população de sujeitos adequada para tratamento com um AA alvo anti-alvo e/ou AA conjugado (por exemplo, AA ao qual um agente

terapêutico é conjugado) da divulgação, seguido por tratamento, administrando esse AA e/ou AA conjugado a um sujeito em necessidade deste. Por exemplo, os sujeitos que apresentam resultados positivos tanto para os alvos (por exemplo, o alvo) quanto para uma protease que quebra 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 o sujeito é então administrado uma quantidade terapêuticamente 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 quebra 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 adequado e/ou AA conjugado para tratamento seja identificado (*por exemplo*, um AA e/ou AA conjugado compreendendo uma CM que é clivada pelo sujeito no sítio da doença). Em algumas modalidades, o sujeito é então administrado uma quantidade terapêuticamente eficaz do AA e/ou AA conjugado para a qual o sujeito apresentou resultado positivo.

[0345] 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 de LP1 e LP2 não precisa ser o mesmo ligante. Em algumas modalidades desses métodos e kits, um ou ambos de LP1 e LP2 compreendem um polímero de glicina-serina. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um de 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 de pelo menos um. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um de LP1 e LP2 compreende uma sequência de aminoácidos com a fórmula (GGS) n, em que n é um número inteiro de pelo menos um. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um de 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).

[0346] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AB compreende uma sequência de anticorpo ou de fragmento de anticorpo selecionada das sequências de anticorpos reativas cruzadas apresentadas neste documento. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AB compreende um fragmento Fab, um scFv ou um anticorpo de cadeia única (scAb).

[0347] Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de clivagem é uma protease que é colocalizada no sujeito ou na 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 em o 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.

[0348] 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.

[0349] A predisposição de um sujeito ou órgão a um ou mais dos distúrbios mencionados acima pode ser determinada usando marcações genótípicas, sorológicas ou bioquímicas.

[0350] 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.

[0351] 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.

[0352] 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 entrar em contato com o anticorpo e/ou AA imobilizado com uma amostra de sujeito, 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.

[0353] 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. Essa amostra é, *por exemplo*, uma amostra de soro de um sujeito suspeito de ter níveis de antígeno circulante considerados como diagnóstico de uma patologia. Depois de enxaguar a amostra ou padrão de teste, 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 da marcação 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.

[0354] 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 encenar uma doença em um sujeito com base nos níveis de expressão do antígeno alvo. Para uma dada doença, são coletadas 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, é designada um intervalo de concentrações do antígeno que pode ser considerada característica de cada estágio.

[0355] Os anticorpos, anticorpos conjugados, AAs e AAs conjugados também podem ser usados em métodos de diagnóstico e/ou geração de imagens. Em algumas modalidades, esses métodos são métodos *in vitro*. Em algumas modalidades, esses métodos são métodos *in vivo*. Em algumas modalidades, esses métodos são métodos *in situ*. Em algumas modalidades, esses 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 alvo ao qual o anticorpo ativado se liga.

[0356] Por exemplo, a CM pode ser selecionada para ser um substrato de protease para uma protease encontrada no sítio de um tumor, no sítio de uma infecção viral ou bacteriana em um sítio biologicamente (*por exemplo*, como em um abscesso, em um órgão e similares) e similares. O AB pode ser aquele que liga um antígeno alvo. Usando métodos familiares a um versado na técnica, uma marcação detectável (*por exemplo*, uma marcação fluorescente ou marcação radioativa ou traçador radioativo) pode ser conjugado com um AB ou outra região de um anticorpo ativável. As marcações detectáveis adequadas são discutidas 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 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 da doença é aumentada em relação aos tecidos que não são da doença.

[0357] 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, onde 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 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 extinta ou outra marcação que não é detectável até que ocorra a clivagem. O ensaio pode ser realizado por, por exemplo, ao 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, então lavada 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.

[0358] Tais métodos de detecção podem ser adaptados para também fornecer a detecção da presença ou ausência de um alvo que seja capaz de ligar o AB dos AAs quando clivados. Portanto, 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.

[0359] 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 imagem *in situ* é uma técnica que permite a localização da atividade proteolítica e do alvo em amostras biológicas, como culturas de células ou seções de tecidos. Usando esta técnica, é possível confirmar a ligação a um determinado alvo e a atividade proteolítica com base na presença de uma marcação detectável (por exemplo, uma marcação fluorescente).

[0360] Essas técnicas são úteis com qualquer célula ou tecido congelado derivado de um sítio da doença (*por exemplo*, tecido tumoral) ou tecidos saudáveis. Essas técnicas também são úteis com amostras de células ou tecidos frescos.

[0361] Nessas técnicas, um AA é marcado com uma marcação detectável. A marcação detectável pode ser um corante fluorescente (por exemplo, isotiocianato de fluorescência (FITC), isotiocianato de rodamina (TRITC), um corante infravermelho próximo (NIR) (por exemplo, nanocristais Qdot®), um metal coloidal, hapteno, marcação radioativa, biotina e reagente de amplificação, como estreptavidina ou enzima (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre ou fosfatase alcalina).

[0362] A detecção da marcação 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, Número da Publicação Internacional WO 2010/129609, publicado 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 a marcação detectável pode ser competido(a) com o alvo não marcado. Em algumas modalidades, AA não marcado pode ser usado, com detecção por um anticorpo secundário marcado ou sistema de detecção mais complexo.

[0363] As 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 sítio da doença contém o alvo e contém uma protease específica para a CM do anticorpo ativável.

[0364] 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 específico da protease no anticorpo ativável.

[0365] Em algumas modalidades, a imagem *in situ* e/ou a imagem *in vivo* são úteis em métodos para identificar quais sujeitos tratar. Por exemplo, na imagem *in situ*, os AAs são usados para realizar a triagem de amostras do sujeito para identificar aqueles que têm protease(s) e alvo(s) apropriados(s) no local apropriado, *por exemplo*, no sítio do tumor.

[0366] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in situ* é usada para identificar ou refinar uma população sujeita adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos com teste positivo para o alvo e uma protease que quebra o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no sítio da doença) são identificados como adequados candidatos ao tratamento com um AA que compreende essa CM. Da mesma forma, os sujeitos que apresentam resultados negativos para um ou ambos os alvos e a protease que quebra o substrato na CM no AA sendo testado usando esses métodos são identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia (*isto é*,

não adequados para o tratamento com o AA sendo testado). Em algumas modalidades, esses 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 sítio de doença).

[0367] Em algumas modalidades, a geração de imagens *in vivo* é usada para identificar ou refinar uma população sujeita adequada para tratamento com um AA da divulgação. Por exemplo, os sujeitos com teste positivo para o alvo e uma protease que quebra o substrato na CM (CM) do AA que está sendo testado (por exemplo, acumulam anticorpos ativados no sítio da doença) são identificados como adequados candidatos ao tratamento com um AA que compreende essa CM. Da mesma forma, os sujeitos com resultado negativo são identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia (*ou seja*, não adequados para o tratamento com o AA sendo testado). Em algumas modalidades, esses 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 sítio de doença).

Composições Farmacêuticas

[0368] Os AAs e os AAs conjugados da divulgação (também referidas neste documento como "compostos ativos"), e derivados, fragmentos, análogos e homólogos do mesmo, podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração. Tais composições compreendem tipicamente o AA e/ou AA conjugado e um carreador farmacêuticamente aceitável. Conforme usado neste documento, o termo "transportador farmacêuticamente aceitável" pretende 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. Os carreadores

adequados são descritos na edição mais recente de Remington's Pharmaceutical Sciences, um texto de referência padrão na área, o qual é incorporado neste documento por referência. Os exemplos adequados desses carreadores ou diluentes incluem, mas não estão limitados a água, solução salina, soluções de Ringer, solução de dextrose, e 5% de albumina de sérica humana. Os lipossomas e veículos não aquosos, tais como óleos fixados, também podem ser usados. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é amplamente conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, cuja utilização nas composições é contemplada. Compostos ativos complementares podem também ser incorporados nas composições.

[0369] Uma composição farmacêutica da divulgação é formulada para ser compatível com sua via pretendida de administração. Os exemplos de vias de administração incluem parenteral, *por exemplo*, intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (*por exemplo*, por inalação), transdérmica (*por exemplo*, tópica), transmucosa e retal. Em uma modalidade exemplificativa, a via de administração é intravenosa.

[0370] As soluções ou suspensões usadas para aplicação parental, intradérmica, ou subcutânea ou podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril, tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes, tais como ácido etilendiaminotetracético (EDTA); tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajustamento da tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como o ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser incluída em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou de plástico.

[0371] As composições farmacêuticas adequadas para uso

injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para a administração intravenosa, os carreadores adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) ou tampão salino fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida à medida que exista fácil seringabilidade. 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 transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliálcool (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes) e misturas adequadas destes. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser alcançada por diversos agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e semelhantes. Em algumas modalidades, será desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada pela inclusão, na composição, de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[0372] As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido pela esterilização do filtrado. Em geral, as dispersões são preparadas ao incorporar o composto ativo em um excipiente estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. 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.

[0373] Composições orais incluem, em geral, um diluente inerte ou um transportador comestível. Podem ser colocadas em cápsulas de gelatina ou comprimidos em tabletes. Para a finalidade de administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usado na forma de comprimidos, edulcorantes ou cápsulas. Composições orais também podem ser preparadas usando um transportador fluido para uso como um enxague bucal, em que o composto no transportador fluido é aplicado através de via oral, bochechado e expectorado ou engolido. Agentes de ligação farmacologicamente compatíveis, e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e afins podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes ou compostos de natureza similar: um ligante como celulose microcristalina, goma adragante ou gelatina; um excipiente como amido ou lactose, um agente de desintegração como ácido algínico, Primogel ou amido de milho; um lubrificante como estearato de magnésio ou Sterotes; deslizante como dióxido de silício coloidal; um agente edulcorante como sacarose ou sacarina; ou agente aromatizante como menta, salicilato de metil ou aromatizante laranja.

[0374] Para a administração por inalação, os compostos são distribuídos na forma de um pulverizador de aerossol a partir de um recipiente pressurizado ou dispensador que contém um propulsor adequado, *por exemplo*, um gás como dióxido de carbono ou um nebulizador.

[0375] A administração sistêmica também pode ser por meios transmucosos ou por meios transdérmicos. Para a administração transdérmica, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Tais penetrantes são, em geral, conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, derivados do ácido fusídico,

detergentes e sais biliares. Administração transmucosa pode ser realizada com o uso de pulverizações nasais ou supositórios. Para administração transdérmica, os compostos ativos são formulados em unguentos, pomadas, géis ou cremes, tal como geralmente conhecido na técnica.

[0376] Os compostos também podem ser preparados sob a 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.

[0377] Em uma modalidade, os compostos ativos são preparados com veículos que irão proteger o composto contra a eliminação rápida do organismo, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes e sistemas de administração de microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para preparação de tais formulações serão evidentes aos 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 transportadores farmacologicamente aceitáveis. Estes podem ser preparados de acordo com os métodos conhecidos pelos versados na técnica, por exemplo, conforme descrito na Patente U.S. Nº 4,522,811.

[0378] É especialmente vantajoso formular composições orais ou parenterais em forma de unidade de dosagem para facilitar a administração e a uniformidade da dosagem. Forma da unidade de dosagem conforme utilizada neste documento refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o transportador farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem da

presente divulgação é ditada por e diretamente dependentes das características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e as limitações inerentes à técnica da criação de composições de tal composto ativo para o tratamento de indivíduos.

[0379] As composições farmacêuticas podem ser incluídas em um recipiente, pacote, ou dispensador juntamente com instruções para administração.

Dosagem

[0380] 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 ao AA conjugado em uma dose de cerca de 0,25 mg/kg a cerca de 6 mg/kg. Em uma modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 0,25 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 0,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 1 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 2 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 3 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 4 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 6 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 0,25 mg/kg a cerca de 0,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 1 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 0,75 mg/kg a cerca de 1,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA

ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 1 mg/kg a cerca de 2 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 2,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 2 mg/kg a cerca de 3 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 2,5 mg/kg a cerca de 3,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 3 mg/kg a cerca de 4 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 3,5 mg/kg a cerca de 4,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 5,5 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado o AA ou o AA conjugado a uma dose de cerca de 5 mg/kg a cerca de 6 mg/kg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 10 mg a cerca de 200 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 500 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 10 mg a cerca de 25 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 20 mg a cerca de 50 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 75 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 100 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 60 mg a cerca de 150 mg. Em uma outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 80 mg a cerca de 200 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou

ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 100 mg a cerca de 250 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 120 mg a cerca de 300 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 140 mg a cerca de 350 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 160 mg a cerca de 400 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 180 mg a cerca de 450 mg. Em outra modalidade, ao sujeito é administrado ao AA ou ao AA conjugado em uma dose fixa de cerca de 200 mg a cerca de 500 mg.

[0381] Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado um AA conjugado com base no peso do sujeito.

[0382] 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.

[0383] 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 na diferença entre o peso corporal real do sujeito dado e um peso corporal ideal predeterminado (IBW) para sujeitos masculinos e femininos, conforme o sujeito. Em algumas modalidades, o peso corporal ideal do sujeito dado 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 masculino e feminino são sujeitos humanos. Em

algumas modalidades, o AIBW dos sujeitos humanos é de cerca de 40 kg a cerca de 100 kg.

[0384] 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.

[0385] Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado o AA ou ao AA conjugado uma vez ao dia. Em algumas modalidades, ao sujeito é administrado o AA ou ao 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.

[0386] A invenção será descrita adicionalmente 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

[0387] 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 na sua totalidade.

[0388] Os conjugados de fármacos ativáveis para anticorpos anti-CD166 (AADC) (representados na FIG. 1) demonstram atividade antitumoral em modelos de camundongos com tumores de xenoenxerto 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 4 e

tabela 5.

Tabela 4

Tipo de câncer	Prevalência da expressão de CD166 (IHC $\geq 2+$), %	Prevalência da negatividade de CD166 (IHC $< 1+$), %	Número de casos examinados
Biliar (colangiocarcinoma)	56,5	11,9	177
Mama	87,1	1,7	533
Endometrial	75,2	6,0	315
Cabeça e pescoço	81,1	0,8	122
Pulmão	71,0	8,2	465
Próstata	98,3	0,8	119
Ovário	70,5	3,9	129

Tabela 5

Expressão de CD166 em tecidos humanos saudáveis por IHC

Tipo de Tecido	Expressão de CD166 humano	Tipo de Tecido	Expressão de CD166 humano
Glândula adrenal	-/+	Nervo	+ /++
Medula Óssea	-/+	Ovário	- /++
Mama	+ /++	Pâncreas	++ /+++
Cérebro, Telencéfalo	-/+	Próstata	++ /+++
Cérebro, Cerebelo	-/+	Pele	+ /++
Cérvice	+ /++	Intestino delgado	+ /+++
Cólon	++	Baço	+ /++
Esôfago	+ /++	Estômago	+++
Olho	+	Músculo Estriado/Esquelético	-/+
Coração	+	Testículos	- /++
Rim	+ /+++	Tireoide	++ /+++

Laringe	+ / ++	Timo	+
Fígado	++	Útero	+ / +++
Pulmão	+ / ++		

[0389] 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 xenoenxerto 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

[0390] Neste estudo, os objetivos principais de segurança, 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.

[0391] Os pontos de extremidade 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 das AADCs, incluindo a análise de AADCs intactas, AADCs totais, DM4 total conjugado com AADC, DM4 livre e S-metil DM4; e (7) incidência de formação de anticorpos antifármacos.

[0392] Os pontos de extremidade 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.

[0393] 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 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 480 e a sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 246.

[0394] O estudo inclui sujeitos com carcinoma da 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 anticorpo anti-CD166 ativável fármaco por via intravenosa a cada 21 dias, e o estudo prossegue nas duas partes a seguir, Parte A e Parte B. O desenho do estudo também está representado na FIG. 6.

[0395] Na Parte A (Escalonamento da Dose) ($n \leq 50$), a titulação acelerada da dose do ADCC anti-CD166 administrado é seguida por um desenho tradicional 3 +3. Um desenho 3 +3 é descrito da seguinte forma: 3 sujeitos são tratados com uma primeira dose de um AADC anti-CD166 e observados 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 o MTD e termina em uma coorte de desenho de intervalo de probabilidade de toxicidade modificada 2 (mTPI-2) tratada no MTD para determinar o RP2D.

[0396] 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, $n \leq 98$).

[0397] 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.

[0398] 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 6.

Tabela 6

Parte A	<ul style="list-style-type: none"> • 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 • Concorda em fornecer tecido tumoral (aquisição arquivística, nova ou recente) antes do início do AADC anti-CD166 • Expectativa de vida de ≥ 3 meses
Parte B	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ul style="list-style-type: none"> • Os sujeitos com carcinoma da mama que expressam receptor de estrogênio (ER +) deveriam ter recebido terapia anti-hormonal e experimentado progressão da doença • O TNBC recebeu ≥ 2 linhas de terapia anteriores
Carcinoma da próstata resistente à castração	<ul style="list-style-type: none"> • Recebeu ≥ 1 terapia anterior
Colangiocarcinoma	<ul style="list-style-type: none"> • Falhou ≥ 1 linha anterior do regime contendo gencitabina
Carcinoma endometrial	<ul style="list-style-type: none"> • Recebeu ≥ 1 regime contendo platina para doença extrauterina ou avançada
Carcinoma epitelial de ovário	<ul style="list-style-type: none"> • Sujeitos com mutação que não seja de câncer de mama (BRCA) (linhagem germinativa ou somática) ou sujeitos com status mutacional de BRCA desconhecido

	<p>devem ter carcinoma ovariano resistente à platina ou refratário à platina</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sujeitos com mutações no BRCA devem ser refratários ou inelegíveis para inibidores da PARP
HNSCC	<ul style="list-style-type: none"> • Recebeu ≥ 1 regime contendo platina e inibidor de PD-1 / PD-L1, se aprovado para indicação e localidade do sujeito
NSCLC	<ul style="list-style-type: none"> • Regime que recebeu ≥ 1 de platina • Um inibidor de checkpoint deveria ter sido administrado, se aprovado para indicação do sujeito em sua localidade.
Critérios de exclusão	<ul style="list-style-type: none"> • Transtorno córneo 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 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.

[0399] 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. As amostras de tecido de arquivo ou de biópsia fresca são fornecidas na referência para os participantes da Parte A. Na Parte B, as biópsias pré 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 um 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 do 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.

[0400] Vários métodos adicionais para avaliar a ativação e atividade do conjugado de anticorpo anti-CD166 ativável por fármacos 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

Intactos em Amostras Biológicas

[0401] Este exemplo descreve a capacidade de detectar o anticorpo ativável anti-CD166 intacto 7614.6-3001-HuCD166 em amostras de tumor de plasma e xenoenxerto de camundongos administrados com 7614.6-3001-HuCD166.

[0402] 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 da cadeia pesada da SEQ ID NO: 480 e a sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 246.

[0403] A quantificação do 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 nus foram implantados por via subcutânea com células 5x10⁶ H292 em meio isento de soro, misturado 1: 1 com Matrigel™. Os ratinhos contendo 200-500 mm² de xenoenxertos H292 foram doseados com 5 mpk 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. Os homogenatos de tumor foram preparados em Tampão de Lise da Thermo Scientific Pierce™ IP (Número de catálogo 87788) com adicional Kit Coquetel de Inibidor de

Protease de uso Único da Thermo Scientific Halt™ (Número de 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

[0404] Este exemplo descreve a capacidade de detectar anticorpo ativável anti-CD166 ativado e intacto, conjugado à toxina maitansinoide DM4 por meio de um ligante SPDB (combinação 55).

[0405] O exemplo usou um anticorpo ativável conjugado com DM4 do anticorpo ativável anti-CD166 referido neste documento como Combinação 55, que compreende a sequência da cadeia pesada da SEQ ID NO: 480 e a sequência da cadeia leve da SEQ ID NO: 246 conjugada com DM4 através de um ligante spdb.

[0406] O anticorpo ativável conjugado anti-CD166 foi ativado com 80 µg/ml de matriptase (Número de Catálogo de Sistemas R&D 3946-SE) ou 80 µg/ml de MMP14 (Número de Catálogo de Sistemas de R&D 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) (Número de Catálogo de 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) a partir de anticorpos ativáveis conjugados intactos.

[0407] Enquanto a invenção foi descrita em conjunto com sua descrição detalhada, a descrição anterior se destina a ilustrar e não a limitar o escopo da invenção, o qual está definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo

das reivindicações a seguir.

Exemplo 5. Evidência de Resposta Parcial no Sujeito Após Tratamento com Anticorpo Ativável Anti-CD166

[0408] Este exemplo demonstra que a administração de anticorpo ativável anti-CD166 intacto conjugado à toxina maitansinoide DM4 por meio de um ligante SPDB (Combinação 55) resulta em uma resposta parcial em um sujeito.

[0409] Neste exemplo, o sujeito apresentou carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC), exibindo apenas lesões-alvo e sem lesões não alvo na triagem inicial. Não foi observado que o sujeito desenvolvesse 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 ligante SPDB (combinação 55) a cada três (3) semanas. A dosagem administrada do anticorpo ativável conjugado foi baseada no peso corporal ideal ajustado do sujeito.

[0410] O sujeito experimentou uma mudança de -31,7% na carga tumoral, da triagem inicial (41 mm) para a visita ao 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 (31,5 mm). Portanto, o sujeito experimentou uma resposta parcial desde a triagem inicial com base na classificação RECIST v1.1.

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

[0411] Este exemplo demonstra a farmacocinética do anticorpo ativável anti-CD166 total e intacto conjugado à toxina maitansinoide DM4 por meio de um ligante SPDB (combinação 55) após administração a sujeitos humanos.

[0412] No segmento de escalonamento da 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 citotóxico de DM4.

[0413] 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 1^a rodada do medicamento), o estudo foi planejado de modo que amostras de sangue sejam 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 concebido de modo que as amostras de sangue sejam 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 julgamento, durante a visita do sujeito.

[0414] Conforme mostrado nas Figs. 9A-9E, os resultados exemplificativos da análise de PK 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 ou conjugadas a DM4 após a administração da Combinação 55 na dosagem indicada (com base no AIBW) a sujeitos humanos.

[0415] Os dados PK 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 médio $t_{1/2}$ variou de 3,71 a 8,57 dias. Após administração de doses múltiplas, a taxa de acumulação da concentração plasmática mínima (C_{min}) (Dose 3: Dose 1) para o anticorpo ativável anti-CD166 intacto não excedeu 1,34 e não apresentou tendência com a dose.

[0416] 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} .

MODALIDADES ILUSTRATIVAS

[0417] A invenção pode ser definida por referência às seguintes

modalidades enumeradas ilustrativas:

[0418] **Modalidade 1.** Método para tratar, aliviar um sintoma, ou retardar a progressão de um câncer em um sujeito, o método compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente a um sujeito em necessidade, em que o AA compreende:

a. 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 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 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;

[0419] e/ou, declarado alternativamente, a Modalidade 1 é um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para uso no tratamento, alívio de um sintoma ou retardo na progressão de um 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 ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 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 de SEQ ID NO: 76, e em que AA é para administração em um quantidade terapeuticamente eficaz para um sujeito em necessidade.

[0420] **Modalidade 2.** 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 pulmonar de células não pequenas.

[0421] **Modalidade 3.** Método para inibir ou reduzir o 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, em que o AA compreende:

a. 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 compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 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.

[0422] e/ou, declarado alternativamente, a Modalidade 3 é um anticorpo ativável (AA) conjugado com um agente para uso na inibição ou

redução do crescimento, proliferação ou 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 ao CD166 de mamífero, em que o AB compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 480 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; e

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

[0423] **Modalidade 4.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 3, 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 pulmonar de células não pequenas.

[0424] **Modalidade 5.** Método, de acordo com a modalidade 3, em que as células são células da mama, células da próstata, células endometriais, células de ovário, células escamosas de cabeça ou pescoço, células do duto biliar, ou células do pulmão.

[0425] **Modalidade 6.** Método, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-5, em que o agente é um maitansinoide ou derivado deste.

[0426] **Modalidade 7.** Método, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-6, em que o agente é DM4.

[0427] **Modalidade 8.** Método, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-7, em que o DM4 é conjugado ao AA através de um ligante peptídico.

[0428] **Modalidade 9.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 8, em que o ligante peptídico compreende uma fração SPBD.

[0429] **Modalidade 10.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-9, em que o AB está ligado à CM.

[0430] **Modalidade 11.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-10, 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.

[0431] **Modalidade 12.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-11, em que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a MM e a CM.

[0432] **Modalidade 13.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-12, em que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

[0433] **Modalidade 14.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 12, em que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479.

[0434] **Modalidade 15.** 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.

[0435] **Modalidade 16.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 15, em que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos de 15.

[0436] **Modalidade 17.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-16, 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 terminal N ao terminal C da

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

[0437] **Modalidade 18.** Método, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-17, em que a cadeia leve está ligada a um espaçador em seu terminal N.

[0438] **Modalidade 19.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 18, em que o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305.

[0439] **Modalidade 20.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-19, em que a MM e a CM estão ligadas à cadeia leve.

[0440] **Modalidade 21.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 20, 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.

[0441] **Modalidade 22.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 21, 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.

[0442] **Modalidade 23.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-22, em que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 314.

[0443] **Modalidade 24.** Método, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-23, em que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 246.

[0444] **Modalidade 25.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-24, em que o sujeito tem pelo menos 18 anos de idade.

[0445] **Modalidade 26.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-25, em que o sujeito tem um status de desempenho de ECOG de 0-1.

[0446] **Modalidade 27.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-26, em que o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um câncer metastático ativo.

[0447] **Modalidade 28.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-26, em que o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um tumor sólido irressecável localmente avançado.

[0448] **Modalidade 29.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-28, em que o sujeito tem uma expectativa de vida de pelo menos 3 meses no momento da administração ou uso.

[0449] **Modalidade 30.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-29, em que o sujeito tem um carcinoma de mama.

[0450] **Modalidade 31.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 30, em que o carcinoma da mama é ER+.

[0451] **Modalidade 32.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 30-31, e recebeu terapia anti-hormonal prévia e experimentou progressão da doença.

[0452] **Modalidade 33.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 30, em que o sujeito tem um câncer de mama triplo negativo e foi submetido a pelo menos duas linhas de terapia prévias.

[0453] **Modalidade 34.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-29, em que o sujeito tem carcinoma de próstata resistente à castração.

[0454] **Modalidade 35.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 34, em que o sujeito recebeu pelo menos uma terapia anterior.

[0455] **Modalidade 36.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-29, em que o sujeito tem colangiocarcinoma.

[0456] **Modalidade 37.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 36, em que o sujeito falhou em pelo menos uma linha de regime contendo gencitabina prévia.

[0457] **Modalidade 38.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-29, em que o sujeito tem um carcinoma endometrial.

[0458] **Modalidade 39.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 38, em que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina para doença extrauterina ou avançada.

[0459] **Modalidade 40.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-29, em que o sujeito tem um carcinoma de ovário.

[0460] **Modalidade 41.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 40, em que o sujeito tem um carcinoma resistente à platina.

[0461] **Modalidade 42.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 40, em que o sujeito tem um carcinoma de ovário refratário à platina.

[0462] **Modalidade 43.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 40, em que o sujeito tem uma mutação BRCA e é refratário ou, de outro modo, inelegível para inibidores de PARP.

[0463] **Modalidade 44.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 40, em que o sujeito tem uma mutação não BRCA.

[0464] **Modalidade 45.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-29, em que o sujeito tem carcinoma de pequenas células de cabeça e pescoço (HNSCC).

[0465] **Modalidade 46.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 45, em que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

[0466] **Modalidade 47.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 45, em que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

[0467] **Modalidade 48.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-29, em que o sujeito tem câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC).

[0468] **Modalidade 49.** Método ou uso, de acordo com a

modalidade 48, em que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

[0469] **Modalidade 50.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 48, em que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de checkpoint.

[0470] **Modalidade 51.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 48, em que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

[0471] **Modalidade 52.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose de cerca de 0,25 mg/kg a cerca de 6 mg/kg.

[0472] **Modalidade 53.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 0,25 mg/kg.

[0473] **Modalidade 54.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 0,5 mg/kg.

[0474] **Modalidade 55.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 1 mg/kg.

[0475] **Modalidade 56.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 2 mg/kg.

[0476] **Modalidade 57.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 4 mg/kg.

[0477] **Modalidade 58.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 5 mg/kg.

[0478] **Modalidade 59.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 6 mg/kg.

[0479] **Modalidade 60.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 0,25 mg/kg a 0,5 mg/kg.

[0480] **Modalidade 61.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg.

[0481] **Modalidade 62.** Método ou uso, de acordo com a

modalidade 52, em que a dose é de cerca de 1 mg/kg a 2 mg/kg.

[0482] **Modalidade 63.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 2 mg/kg a 4 mg/kg.

[0483] **Modalidade 64.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 4 mg/kg a 5 mg/kg.

[0484] **Modalidade 65.** Método ou uso, de acordo com a modalidade 52, em que a dose é de cerca de 5 mg/kg a 6 mg/kg.

[0485] **Modalidade 66.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 10 mg a cerca de 200 mg.

[0486] **Modalidade 67.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 25 mg/kg a cerca de 500 mg/kg.

[0487] **Modalidade 68.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 10 mg/kg a cerca de 25 mg/kg.

[0488] **Modalidade 69.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg.

[0489] **Modalidade 70.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 30 mg/kg a cerca de 75 mg/kg.

[0490] **Modalidade 71.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 40 mg/kg a cerca de 100 mg/kg.

[0491] **Modalidade 72.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 50 mg/kg a cerca de 125 mg/kg.

[0492] **Modalidade 73.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a

uma dose fixa de cerca de 60 mg/kg a cerca de 150 mg/kg.

[0493] **Modalidade 74.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 80 mg/kg a cerca de 200 mg/kg.

[0494] **Modalidade 75.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 100 mg/kg a cerca de 250 mg/kg.

[0495] **Modalidade 76.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 120 mg/kg a cerca de 300 mg/kg.

[0496] **Modalidade 77.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 140 mg/kg a cerca de 350 mg/kg.

[0497] **Modalidade 78.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 160 mg/kg a cerca de 400 mg/kg.

[0498] **Modalidade 79.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 180 mg/kg a cerca de 450 mg/kg.

[0499] **Modalidade 80.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-51, em que o AA que é conjugado com um agente a uma dose fixa de cerca de 200 mg/kg a cerca de 500 mg/kg.

[0500] **Modalidade 81.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-80, em que o sujeito é administrado ao AA conjugado a um agente por via intravenosa, ou o AA é formulado para uso intravenoso.

[0501] **Modalidade 82.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 1-81, 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.

[0502] **Modalidade 83.** Método ou uso, de acordo com qualquer

uma das modalidades 52-65, 81 e 82, em que o AA conjugado é conjugado a um agente com uma dosagem baseada em seu peso corporal real.

[0503] **Modalidade 84.** Método ou uso, de acordo com qualquer uma das modalidades 52-65, 81 e 82, em que o AA é conjugado a um agente com uma dosagem baseada em seu peso corporal ideal ajustado.

OUTRAS MODALIDADES

[0504] Enquanto a invenção foi descrita em conjunto com sua descrição detalhada, a descrição anterior se destina a ilustrar e não a limitar o escopo da invenção, o qual está definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar, aliviar um sintoma, ou retardar a progressão de um câncer em um sujeito, sendo o método **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente a um sujeito em necessidade, 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 da SEQ ID NO: 480 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.

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 para inibir ou reduzir o crescimento, proliferação ou metástase de células que expressam CD166 em um sujeito, **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente a um sujeito em necessidade, 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 da SEQ ID NO: 480 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.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **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.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que as células são células da mama, células da próstata, células endometriais, células de ovário, células escamosas de cabeça ou pescoço, células do duto biliar, ou células do pulmão.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, **caracterizado** pelo fato de que o agente é um maitansinoide ou seu derivado.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, **caracterizado** pelo fato de que o agente é DM4.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, **caracterizado** pelo fato de que o DM4 é conjugado ao AA através de um ligante peptídico.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o ligante peptídico compreende uma fração SPBD.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, **caracterizado** pelo fato de que o AB está ligado à CM.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, **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.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, **caracterizado** pelo fato de que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a MM e a CM.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, **caracterizado** pelo fato de que o AA compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 479.

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 qualquer reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o peptídeo de ligação compreende a sequência de aminoácidos de 15.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-16, **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.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-17, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia leve está ligada a um espaçador em seu terminal N.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18,

caracterizado pelo fato de que o espaçador compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 305.

20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-19, **caracterizado** pelo fato de que a MM e a CM estão ligadas à cadeia leve.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **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.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **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.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-22, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 314.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-23, **caracterizado** pelo fato de que a cadeia leve do AA compreende a sequência da SEQ ID NO: 246.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-24, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem pelo menos 18 anos de idade

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-25, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um status de desempenho de ECOG de 0-1.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um câncer metastático ativo.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-26, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um diagnóstico histologicamente confirmado de um tumor sólido irressecável localmente avançado.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-28, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem uma expectativa de vida de pelo menos 3 meses no momento da administração.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um carcinoma de mama.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, **caracterizado** pelo fato de que o carcinoma de mama é ER+.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30-31, **caracterizado** pelo fato de que recebeu terapia anti-hormonal prévia e sofreu progressão da doença.

33. Método, de acordo com a reivindicação 30, **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.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma da próstata resistente à castração.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos uma terapia prévia.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem colangiocarcinoma.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito falhou em pelo menos uma linha de regime contendo gencitabina prévia.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma de endometrial.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina para doença extrauterina ou avançada.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma epitelial de ovário.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um carcinoma resistente à platina.

42. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem um carcinoma ovariano refratário à platina.

43. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem uma mutação BRCA e é refratário ou, de outro modo, inelegível para inibidores de PARP.

44. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem uma mutação não-BRCA.

45. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem carcinoma de cabeça e pescoço de pequenas células (HNSCC).

46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

47. Método, de acordo com a reivindicação 45, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-29, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito tem câncer

pulmonar de células não pequenas (NSCLC).

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um regime contendo platina.

50. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de checkpoint.

51. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito recebeu pelo menos um inibidor de PD-1/PD-L1.

52. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose de cerca de 0,25 mg/kg a cerca de 6 mg/kg.

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 0,25 mg/kg.

54. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 0,5 mg/kg.

55. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 1 mg/kg.

56. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 2 mg/kg.

57. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 4 mg/kg.

58. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 5 mg/kg.

59. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 6 mg/kg.

60. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 0,25 mg/kg a 0,5 mg/kg.

61. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg.

62. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 1 mg/kg a 2 mg/kg.

63. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 2 mg/kg a 4 mg/kg.

64. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 4 mg/kg a 5 mg/kg.

65. Método, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que a dose é de cerca de 5 mg/kg a 6 mg/kg.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 10 mg a cerca de 200 mg.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 25 mg a cerca de 500 mg.

68. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 10 mg a cerca de 25 mg.

69. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 20 mg a cerca de 50 mg.

70. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 30 mg a cerca de 75 mg.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 40 mg a cerca de 100 mg.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 50 mg a cerca de 125 mg.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 60 mg a cerca de 150 mg.

74. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 80 mg a cerca de 200 mg.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 100 mg a cerca de 250 mg.

76. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 120 mg a cerca de 300 mg.

77. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 140 mg a cerca de 350 mg.

78. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado

com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 160 mg a cerca de 400 mg.

79. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 180 mg a cerca de 450 mg.

80. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-51, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA que é conjugado a um agente em uma dose fixa de cerca de 200 mg a cerca de 500 mg.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-80, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente por via intravenosa.

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-81, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente por via intravenosa a cada 21 dias.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52-65, 81 e 82, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente com uma dosagem baseada em seu peso corporal real.

84. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52-65, 81 e 82, **caracterizado** pelo fato de que o sujeito é administrado com o AA conjugado a um agente com uma dosagem baseada em seu peso corporal ideal ajustado.

85. Anticorpo ativável (AA) conjugado a um agente para uso no tratamento, alívio de um sintoma ou retardo na progressão de um câncer em um sujeito, **caracterizado** pelo fato de 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 da SEQ ID NO: 480 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, e em que AA é para administração em uma quantidade terapeuticamente eficaz a um sujeito em necessidade.

86. Anticorpo ativável (AA) conjugado com um agente para uso na inibição ou redução do crescimento, proliferação ou metástase de células que expressam CD166 para o tratamento de câncer em um sujeito, **caracterizado** pelo fato de 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 da SEQ ID NO: 480 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, e em que o AA é para administração em uma quantidade terapeuticamente eficaz a um sujeito em necessidade.

FIG. 1

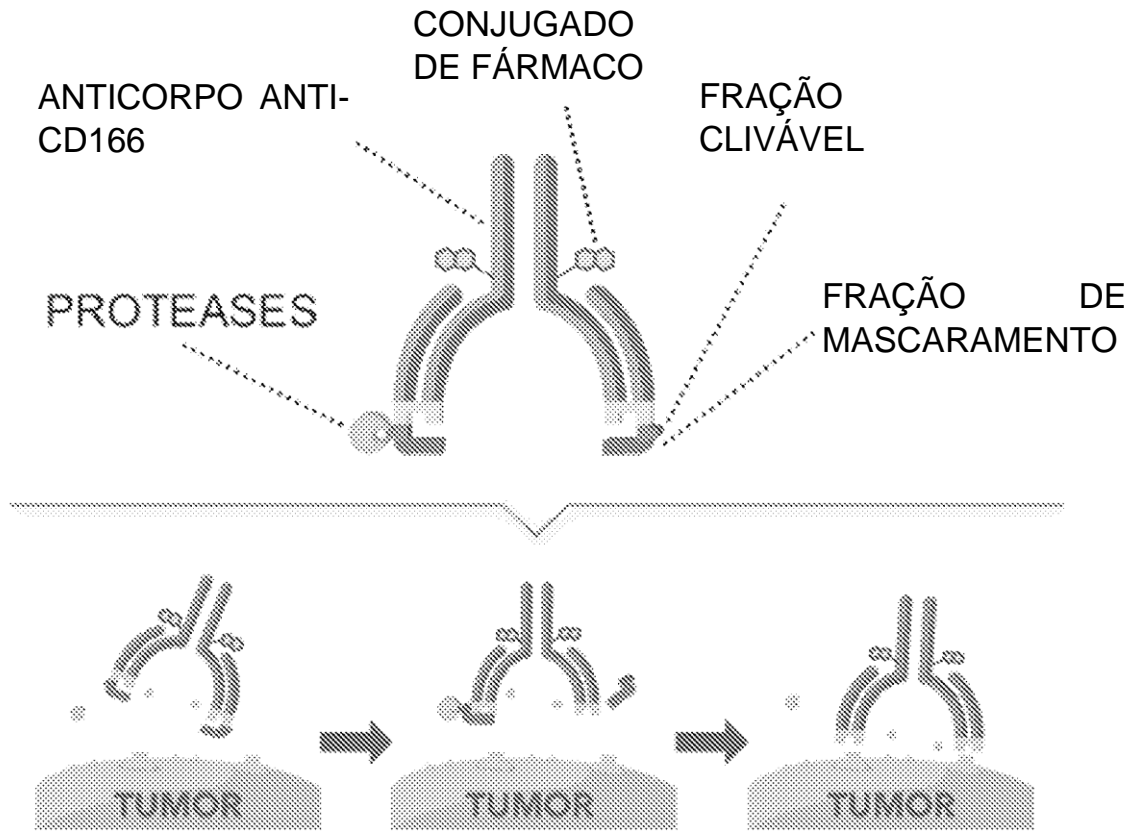


FIG. 2

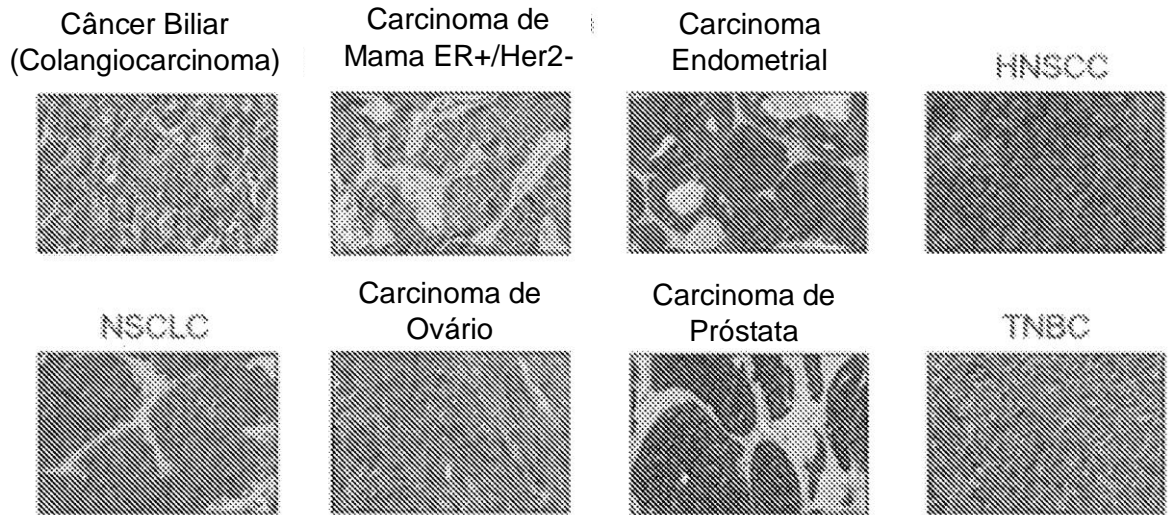
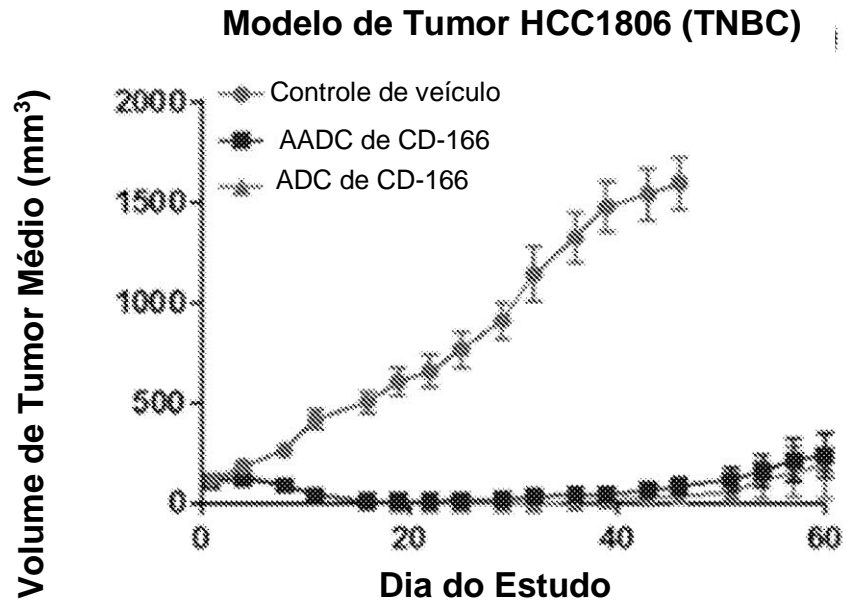


FIG. 3



CD166 IHC

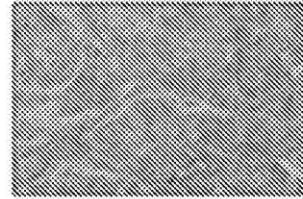


FIG. 4

Modelo de Tumor H292 (NSCLC)

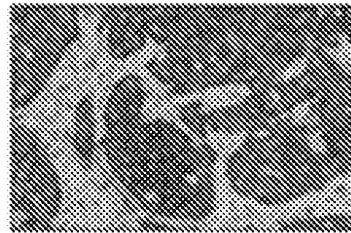
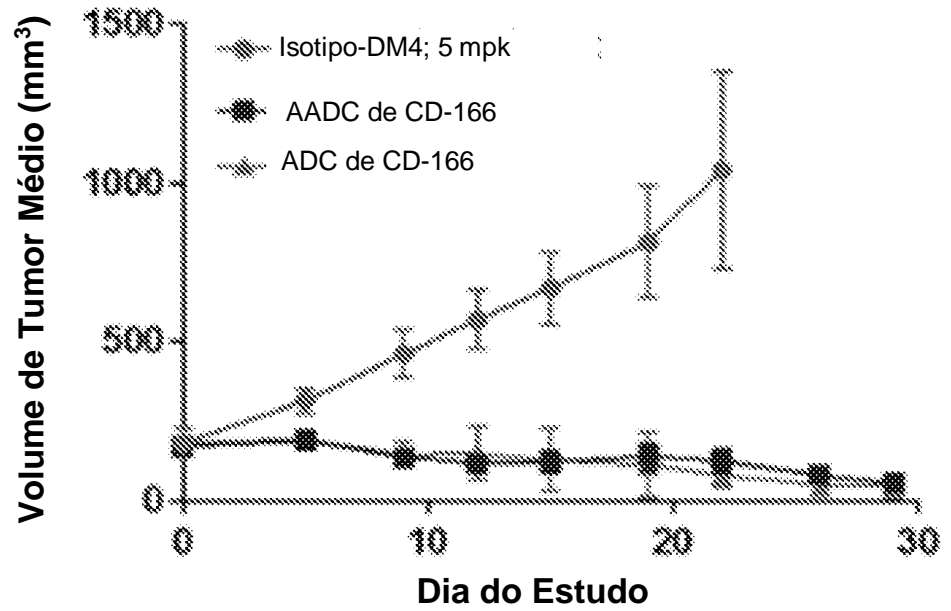


FIG. 5

Modelo de PDX de Ovário

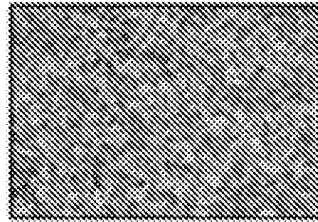
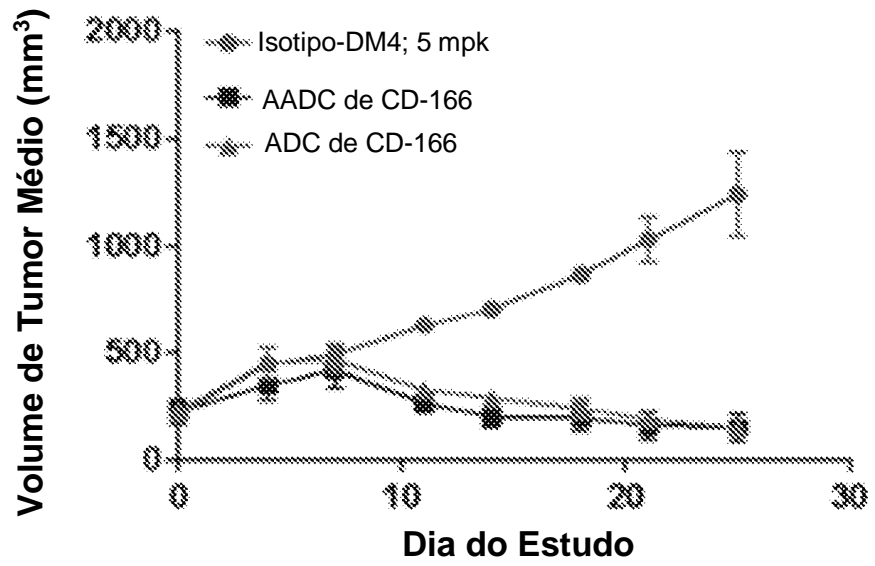


FIG. 6

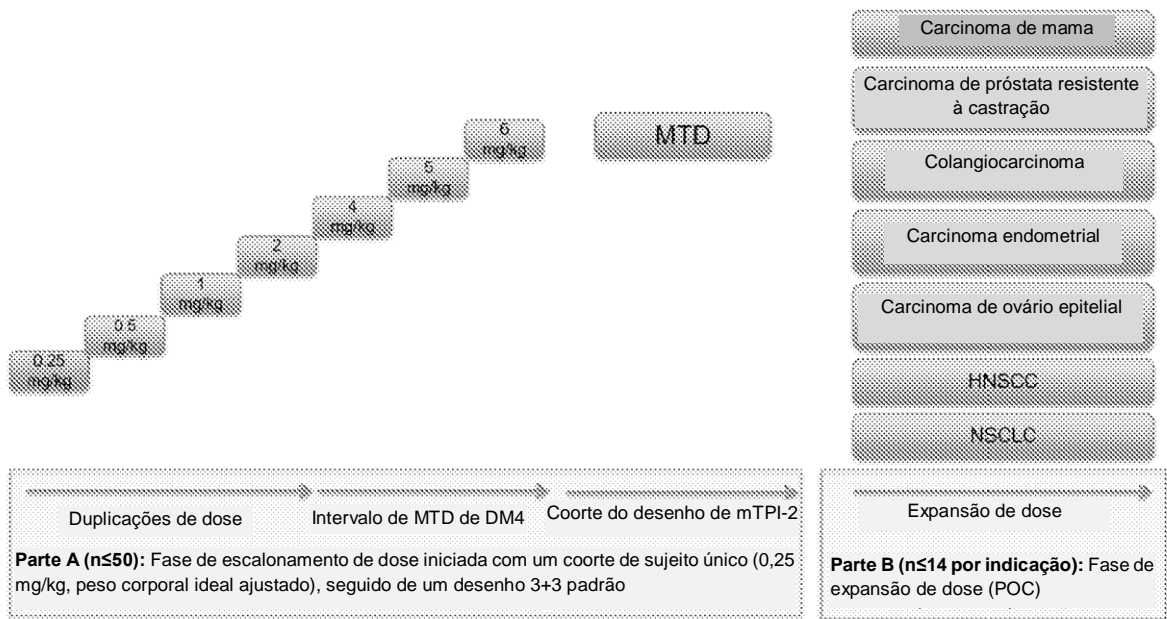


FIG. 7A-7B

7A

Plasma



7B

Tumor

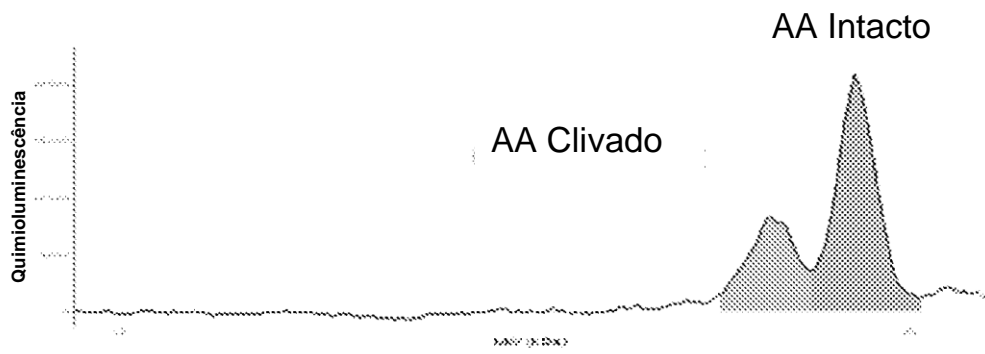


FIG. 8A-8B

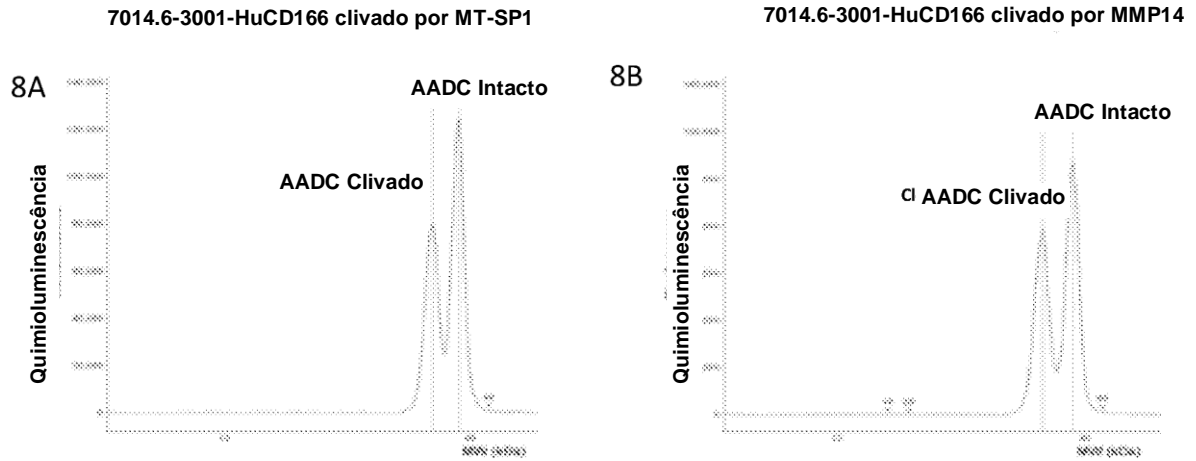


FIG. 9A

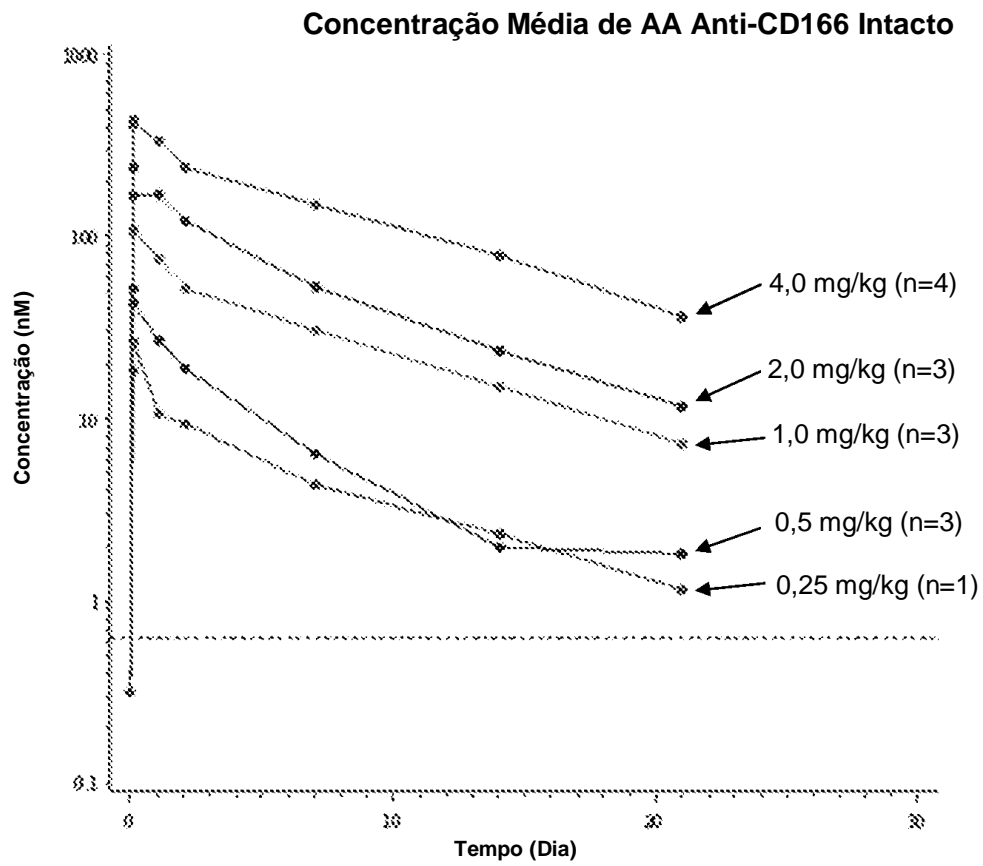


FIG. 9B

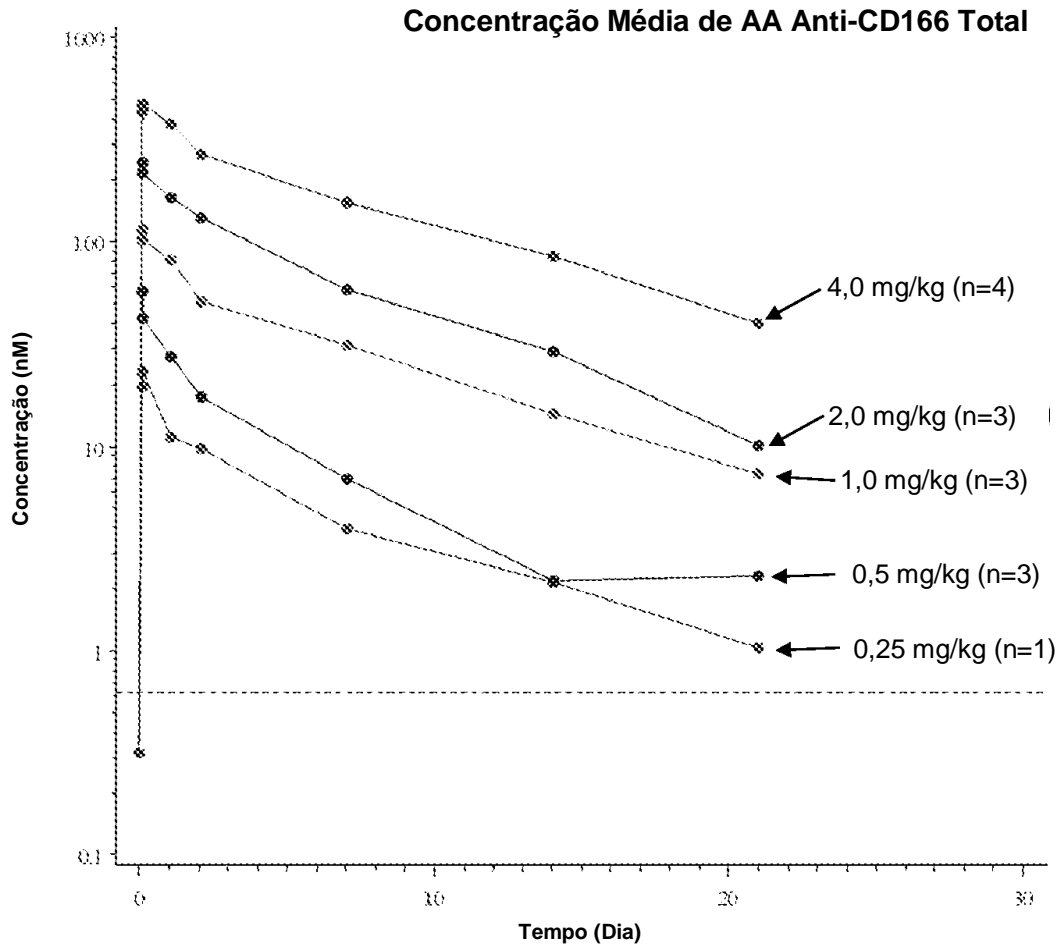


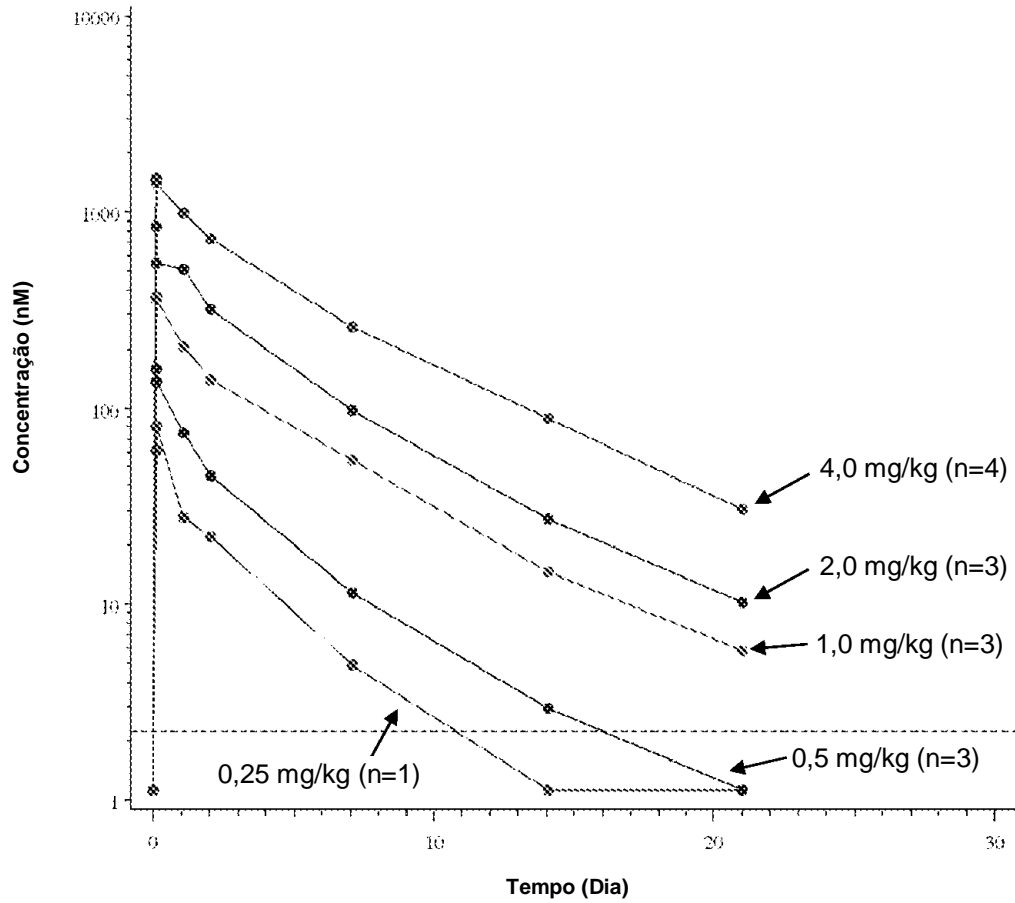
FIG. 9C Concentração Média de DM4 Conjugado

FIG. 9D

Concentração Média de DM4 Livre

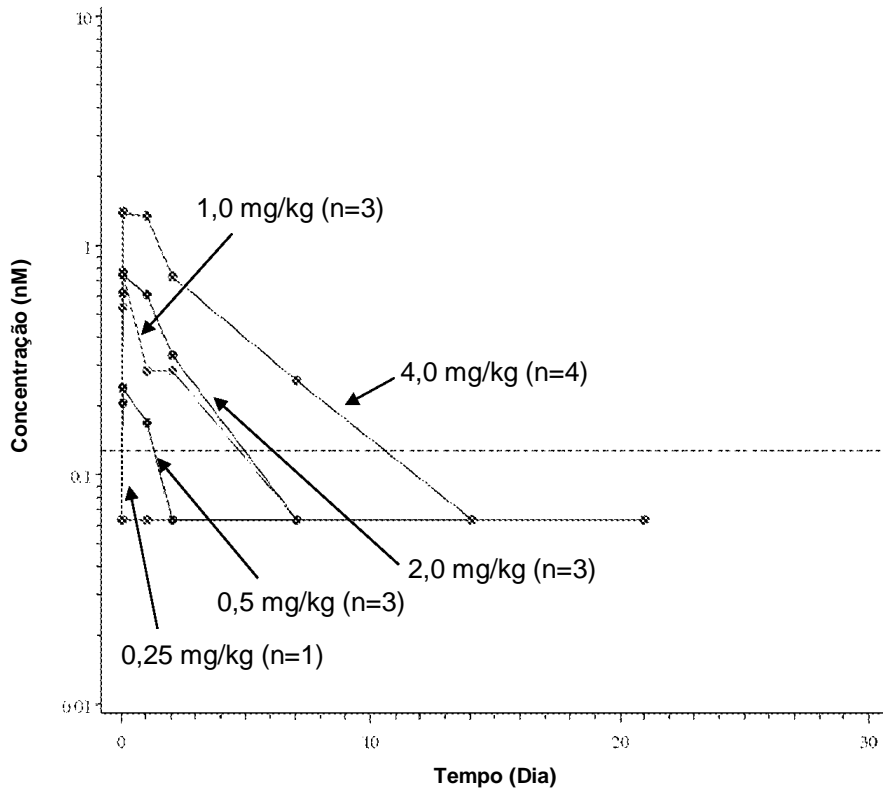
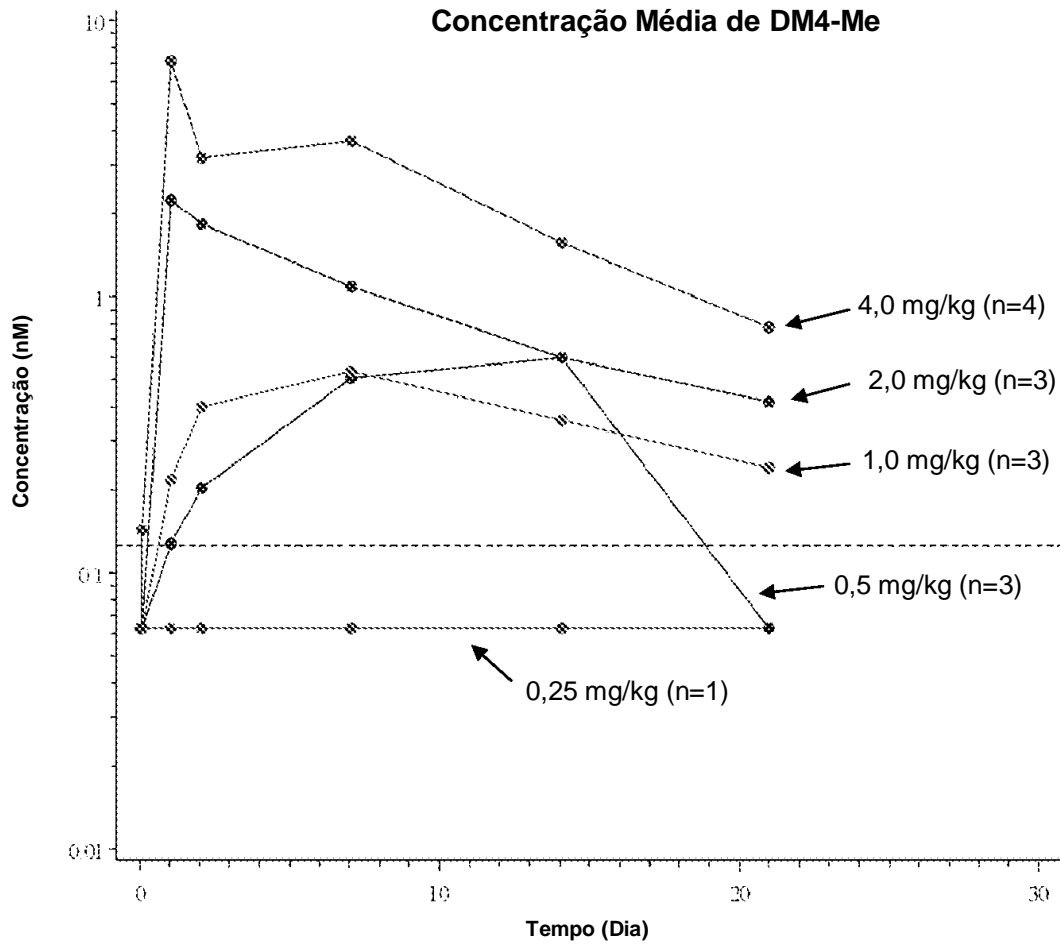


FIG. 9E



RESUMO

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

São fornecidos neste documento anticorpos ativáveis que 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.

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: 27/04/2020
- Hora de Geração do Código: 11:43:54
- Código de Controle:
 - Campo 1: 3BF5427096F63075
 - Campo 2: 64A379CD26C743BD