



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112016017649-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 30/01/2015

**(45) Data de Concessão:** 30/01/2024

**(54) Título:** POLIPEPTÍDEO ISOLADO COMPREENDENDO SUBSTRATOS DE MATRIPTASE E DE ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO U E OUTRAS PORÇÕES CLIVÁVEIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O DITO POLIPEPTÍDEO, BEM COMO MÉTODOS PARA PRODUZIR E FABRICAR UM POLIPEPTÍDEO ISOLADO COMPREENDENDO UMA PORÇÃO CLIVÁVEL E USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DA DITA COMPOSIÇÃO NO TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO OU DOENÇA

**(51) Int.Cl.:** A61K 39/00; C07K 16/00; A61K 47/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 27/03/2014 US 61/971,009; 31/01/2014 US 61/934,619.

**(73) Titular(es):** CYTOMX THERAPEUTICS, INC..

**(72) Inventor(es):** STEPHEN JAMES MOORE; MARGARET THY LUN NGUYEN; DANIEL R. HOSTETTER; OLGA VASILJEVA.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2015013776 de 30/01/2015

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/116933 de 06/08/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 29/07/2016

**(57) Resumo:** SUBSTRATOS PARA MATRIPTASE E PARA ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO U E OUTRAS PORÇÕES CLIVÁVEIS E SEUS MÉTODOS DE USO. A invenção refere-se em geral a polipeptídeos que incluem uma porção clivável que é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e ativador do plasminogênio U (uPA), a anticorpos ativáveis e outras moléculas maiores que incluem a porção clivável que é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e ativador do plasminogênio U, e a métodos para produzir e utilizar esses polipeptídeos que incluem uma porção clivável que é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e ativador do plasminogênio U em uma variedade de indicações terapêuticas, diagnósticas e profiláticas.

"POLIPEPTÍDEO ISOLADO COMPREENDENDO SUBSTRATOS DE MATRIPTASE E DE ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO U E OUTRAS PORÇÕES CLIVÁVEIS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O DITO POLIPEPTÍDEO, BEM COMO MÉTODOS PARA PRODUIR E FABRICAR UM POLIPEPTÍDEO ISOLADO COMPREENDENDO UMA PORÇÃO CLIVÁVEL E USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DA DITA COMPOSIÇÃO NO TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO OU DOENÇA"

#### REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS

[001]Este pedido de patente reivindica o benefício da prioridade deste ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 61/934 619, depositado em 31 de janeiro de 2014, e ao Pedido de Patente U.S. Provisório Nº 61/971 009, depositado em 27 de março de 2014, cujos conteúdos são aqui incorporados, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

#### CAMPO DA TÉCNICA

[002]A invenção refere-se em geral a polipeptídeos que incluem uma porção clivável, que é substrato para ao menos uma protease selecionada a partir de matriptase e ativador do plasminogênio U (uPA), a anticorpos ativáveis e outras moléculas maiores que incluem a porção clivável que é substrato para ao menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e a métodos para produzir e utilizar esses polipeptídeos que incluem uma porção clivável que é substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, em uma variedade de indicações terapêuticas, diagnósticas e profiláticas.

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003]As proteases são enzimas que clivam as ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos. Algumas proteases são conhecidas por quebrarem ligações peptídicas específicas com base na presença de uma determinada sequência de



aminoácidos dentro de uma proteína. As proteases ocorrem naturalmente em todos os organismos e estão envolvidas em uma variedade de reações fisiológicas desde a simples degradação até vias altamente reguladas. Contudo, muitas condições patológicas estão associadas com a expressão e/ou a atividade desregulada de proteases. Sendo assim, é possível que a proteólise inadequada tenha uma participação importante no desenvolvimento e na progressão do câncer, bem como em doenças cardiovasculares, inflamatórias, neurodegenerativas, transmitidas por eucariontes, bactérias e vírus e parasitárias.

[004]Consequentemente, há necessidade de identificar novos substratos para proteases e utilizar esses substratos em uma variedade de indicações terapêuticas, diagnósticas e profiláticas.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005]A invenção provê sequências de aminoácidos que incluem uma porção clivável (CM) que é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase (também referida neste relatório descritivo como MT-SP1, matriptase-1 e termos semelhantes que indicam a matriptase) e ativador do plasminogênio U (também referido neste relatório descritivo como uPA, uroquinase, ativador do plasminogênio tipo uroquinase e termos semelhantes que indicam o uPA). Essas CMs são úteis em uma variedade de indicações terapêuticas, diagnósticas e profiláticas.

[006]Em algumas modalidades, a CM está ligada ou de outra forma anexada a um anticorpo. Por exemplo, a CM é utilizada para ligar um ou mais agentes ao anticorpo ou a seu fragmento de ligação a antígeno que se liga a um dado alvo, de tal modo que a CM é clivada quando exposta à protease, ou seja, matriptase e/ou uPA, e o agente é liberado do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno. Os alvos exemplares incluem, entre outros, os alvos mostrados na Tabela 1. Os anticorpos anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno ou seus fragmentos de ligação a antígeno incluem, entre outros, os alvos mostrados na Tabela 2. Em algumas

modalidades, o anticorpo no estado não clivado possui o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: Agente-CM-(Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno) ou (Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno)-CM-Agente. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende um peptídeo de ligação entre o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno e a CM. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o agente conjugado.

[007]Em algumas modalidades, o anticorpo compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2), em que o anticorpo no estado não clivado possui o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: Agente-LP1-CM-LP2--(Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno) ou (Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno)-LP2-CM-LP1-Agente. Em algumas modalidades, os dois peptídeos de ligação não precisam ser idênticos entre si.

[008]Em algumas modalidades, pelo menos um entre LP1 ou LP2, compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por  $(GS)_n$ ,  $(GGS)_n$ ,  $(GSGGS)_n$  (SEQ ID NO: 385) e  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 386), onde  $n$  é um número inteiro pelo menos igual a um.

[009]Em algumas modalidades, pelo menos um entre LP1 ou LP2, compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por GGSG (SEQ ID NO: 387), GGSGG (SEQ ID NO: 388), GSGSG (SEQ ID NO: 389), GSGGG (SEQ ID NO: 390), GGGSG (SEQ ID NO: 391) e GSSSG (SEQ ID NO: 392).

[0010]Em algumas modalidades, LP1 compreende a sequência de aminoácidos GSSGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 393), GSSGSGGSGG (SEQ ID NO: 394), GSSGSGGSGGS (SEQ ID NO: 395), GSSGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 396), GSSGSGGSG (SEQ ID NO: 397) ou GSSGSGGSGS (SEQ ID NO: 398).

[0011]Em algumas modalidades, LP2 compreende a sequência de aminoácidos GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 399), GSSGT (SEQ ID NO: 400) ou GSSG (SEQ

ID NO: 401).

[0012]Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno possui uma constante de dissociação no equilíbrio próxima ou inferior a 100 nM para a ligação ao alvo.

[0013]Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação a liga-se especificamente a um alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento imunologicamente ativo que se liga ao alvo é um anticorpo monoclonal, anticorpo de domínio, cadeia única, fragmento Fab, um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, 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, tal anticorpo ou seu fragmento imunologicamente ativo que se liga ao alvo é um anticorpo monoclonal de camundongo, de outro roedor, quimérico, humanizado ou totalmente humano.

[0014]Em algumas modalidades, a protease, ou seja, matriptase e/ou uPA está co-localizada com o alvo em um tecido, e a protease cliva a CM no anticorpo quando o anticorpo é exposto à protease.

[0015]Em algumas modalidades, a CM é um polipeptídeo com até 15 aminoácidos de comprimento.

[0016]Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos matriptase. Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos uPA. Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos a matriptase e uPA.

[0017]Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA, e é resistente à clivagem por pelo menos outra protease. Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA, e é resistente à clivagem por pelo menos a plasmina. Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA, e é resistente à clivagem por pelo menos o ativador do plasminogênio tecidual (tPA).

[0018]Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA e inclui uma sequência motivo que é reconhecida pela matriptase e/ou por uPA, desde

que, para qualquer dada sequência motivo da invenção:

(i) a CM não compreenda qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos TGRGPSWV (SEQ ID NO: 402), SARGPSRW (SEQ ID NO: 403) ou TARGPSFK (SEQ ID NO: 404); e a CM não compreenda uma sequência de aminoácidos de consenso com base nessas sequências de aminoácidos, tal como, por exemplo, TARGPSW (SEQ ID NO: 405);

(ii) a CM não compreenda qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 406), GGWHTGRN (SEQ ID NO: 407), HTGRSGAL (SEQ ID NO: 408) ou PLTGRSGG (SEQ ID NO: 409); e a CM não compreenda uma sequência de aminoácidos de consenso com base nessas sequências de aminoácidos, tal como, por exemplo, LTGRSGA (SEQ ID NO: 410); e/ou

(iii) a CM não compreenda qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos AARGPAIH (SEQ ID NO: 411), RGPAFNPM (SEQ ID NO: 412), SSRGPAYL (SEQ ID NO: 413) ou RGPATPIM (SEQ ID NO: 414); e a CM não compreenda uma sequência de aminoácidos de consenso com base nessas sequências de aminoácidos, tal como, por exemplo, RGPA (SEQ ID NO: 415).

[0019]Em algumas modalidades, a sequência motivo é substrato para pelo menos matriptase e inclui uma sequência *core* (central) de consenso para CM mostrada nas Tabelas 8A-8J abaixo. Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui um subgênero, ou seja, um subconjunto da sequência *core* de consenso para CM que são mostradas nas Tabelas 8A-8J abaixo.

Tabela 8A. Sequência *core* 1 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 1 de consenso para CM	Subgênero de <i>core</i> 1 de consenso para CM
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> (SEQ ID NO: 1), em que: X <sub>1</sub> é A, G, H, K, L, N, P, R, S ou V; X <sub>2</sub> é A, H, L, M, P, Q, R, S ou V; X <sub>3</sub> é A, E, F, G, I, L, P, R, S, T ou V;	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> (SEQ ID NO: 2), em que X <sub>1</sub> é A, G, P, R, S ou V; X <sub>2</sub> é A, L, M, P, S ou V; X <sub>3</sub> é G, L ou P; X <sub>4</sub> é R; e X <sub>5</sub> é A, G, R, S ou V

Core 1 de consenso para CM	Subgênero de core 1 de consenso para CM
X <sub>4</sub> é A, I, K, N, R, T ou W; e X <sub>5</sub> é A, G, I, L, M, Q, R, S ou V	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> (SEQ ID NO: 3), em que X <sub>1</sub> é A, P, R, S ou V; X <sub>2</sub> é A, L, M, S ou V; X <sub>3</sub> é P; X <sub>4</sub> é R; e X <sub>5</sub> é A, G, S ou V
	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> (SEQ ID NO: 4), em que: X <sub>1</sub> é A, P ou R; X <sub>2</sub> é A, S ou V; X <sub>3</sub> é P; X <sub>4</sub> é R; e X <sub>5</sub> é S ou V
	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> (SEQ ID NO: 5), em que: X <sub>1</sub> é A, P ou R; X <sub>2</sub> é A ou S; X <sub>3</sub> é P; X <sub>4</sub> é R; e X <sub>5</sub> é S

Tabela 8B. Sequência core 2 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 2 de consenso para CM	Subgênero de core 2 de consenso para CM
X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> (SEQ ID NO: 6), em que: X <sub>10</sub> é A, L, P, R, S, T ou V; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é D ou R; X <sub>13</sub> é A, G, L, M, S, T, V ou W; e X <sub>14</sub> é F, G, M, P ou V	X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> (SEQ ID NO: 7), em que: X <sub>10</sub> é A, R, S ou T; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é D ou R; X <sub>13</sub> é L ou V; e X <sub>14</sub> é F ou P
	X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> (SEQ ID NO: 8), em que: X <sub>10</sub> é A, S ou T; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é R; X <sub>13</sub> é L ou V; e X <sub>14</sub> é F ou P
	X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> (SEQ ID NO: 9), em que: X <sub>10</sub> é S ou T; X <sub>11</sub> é R; X <sub>12</sub> é R; X <sub>13</sub> é L ou V; e X <sub>14</sub> é P

Tabela 8C. Sequência core 3 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 3 de consenso para CM	Subgênero de core 3 de consenso para CM
X <sub>20</sub> X <sub>21</sub> X <sub>22</sub> X <sub>23</sub> X <sub>24</sub> (SEQ ID NO: 10), em que: X <sub>20</sub> é E, G, P, R, S, V ou W;	X <sub>20</sub> X <sub>21</sub> X <sub>22</sub> X <sub>23</sub> X <sub>24</sub> (SEQ ID NO: 11), em que: X <sub>20</sub> é G, P, R, S ou V; X <sub>21</sub> é P ou V; X <sub>22</sub> é L ou R; X <sub>23</sub> é G; e X <sub>24</sub> é G ou R

Core 3 de consenso para CM	Subgênero de core 3 de consenso para CM
<p>X<sub>21</sub> é A, G, L, M, P, S ou V;</p> <p>X<sub>22</sub> é A, I, L ou R;</p> <p>X<sub>23</sub> é A, G, I ou P; e</p> <p>X<sub>24</sub> é G ou R</p>	<p>X<sub>20</sub>X<sub>21</sub>X<sub>22</sub>X<sub>23</sub>X<sub>24</sub> (SEQ ID NO: 12), em que:</p> <p>X<sub>20</sub> é P ou R; X<sub>21</sub> é P; X<sub>22</sub> é L; X<sub>23</sub> é G; e X<sub>24</sub> é R</p>

Tabela 8D. Sequência core 4 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 4 de consenso para CM	Subgênero de core 4 de consenso para CM
<p>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub> (SEQ ID NO: 13), em que:</p> <p>X<sub>26</sub> é A, G, H, L, R ou S;</p> <p>X<sub>27</sub> é D, H, N, R, S, T ou W;</p> <p>X<sub>28</sub> é A, N, P, R, S, T ou V;</p> <p>X<sub>29</sub> é F, G, L, M, P, Q, R, S ou Y; e</p> <p>X<sub>30</sub> é I, G, L, P, S, V ou W</p>	<p>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub> (SEQ ID NO: 14), em que:</p> <p>X<sub>26</sub> é A, G, H, L, R ou S; X<sub>27</sub> é D, H, R ou T; X<sub>28</sub> é A, P, R, S, T ou V; X<sub>29</sub> é F, G, L, M, P ou S; e X<sub>30</sub> é G, L, P, S, V ou W</p>
	<p>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub> (SEQ ID NO: 15), em que:</p> <p>X<sub>26</sub> é G, L ou S; X<sub>27</sub> é R ou T; X<sub>28</sub> é A, P ou S; X<sub>29</sub> é F, G, M ou S; e X<sub>30</sub> é G, P, S, V ou W</p>
	<p>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub> (SEQ ID NO: 16), em que:</p> <p>X<sub>26</sub> é G, L ou S; X<sub>27</sub> é R; X<sub>28</sub> é A ou S; X<sub>29</sub> é G ou M; e X<sub>30</sub> é G, P, S ou W</p>
	<p>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub> (SEQ ID NO: 17), em que: X<sub>26</sub> é L; X<sub>27</sub> é R; X<sub>28</sub> é A ou S; X<sub>29</sub> é G; e X<sub>30</sub> é W</p>

Tabela 8E. Sequência core 5 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 5 de consenso para CM	Subgênero de core 5 de consenso para CM
<p>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub> (SEQ ID NO: 18), em que:</p> <p>X<sub>36</sub> é G, K, L, S, V ou W;</p>	<p>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub> (SEQ ID NO: 19), em que: X<sub>36</sub> é G, L, S, V ou W; X<sub>37</sub> é G, Q, R ou S; X<sub>38</sub> é R; X<sub>39</sub> é G, S ou V; e X<sub>40</sub> é A, G, L, S e V</p>

Core 5 de consenso para CM	Subgênero de core 5 de consenso para CM
<p>X<sub>37</sub> é G, I, P, Q, R ou S;</p> <p>X<sub>38</sub> é R;</p> <p>X<sub>39</sub> é G, K, R, S ou V; e</p> <p>X<sub>40</sub> é A, C, G, L, M, P, S, V ou Y</p>	<p>X<sub>36</sub>X<sub>37</sub>X<sub>38</sub>X<sub>39</sub>X<sub>40</sub> (SEQ ID NO: 20), em que: X<sub>36</sub> é V; X<sub>37</sub> é S; X<sub>38</sub> é R; X<sub>39</sub> é S; e X<sub>40</sub> é A e V</p>

Tabela 8F. Sequência core 6 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 6 de consenso para CM	Subgênero de core 6 de consenso para CM
<p>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 21), em que:</p> <p>X<sub>42</sub> é A, E, G, I, L, M, R ou S;</p> <p>X<sub>43</sub> é A, G, K, L, N, R, S ou V;</p> <p>X<sub>44</sub> é F, H, L, R ou Y;</p> <p>X<sub>45</sub> é A, F, G, H, P ou S; e</p> <p>X<sub>46</sub> é F, G, M, N, P, R, S ou V</p>	<p>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 22), em que: X<sub>42</sub> é A, E, G, L, M, R ou S; X<sub>43</sub> é G, K, L, N, R, S ou V; X<sub>44</sub> é R ou Y; X<sub>45</sub> é A, F, G, P ou S; e X<sub>46</sub> é F, G, M, P, R, S ou V</p>
	<p>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 23), em que: X<sub>42</sub> é A, E, G, M ou S; X<sub>43</sub> é G, L, S ou V; X<sub>44</sub> é R ou Y; X<sub>45</sub> é A, G, P ou S; e X<sub>46</sub> é F, G, M, P, R, S ou V</p>
	<p>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 24), em que: X<sub>42</sub> é A, G ou S; X<sub>43</sub> é L, S ou V; X<sub>44</sub> é R; X<sub>45</sub> é A; e X<sub>46</sub> é M ou P</p>
	<p>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 25), em que: X<sub>42</sub> é A; X<sub>43</sub> é L, S ou V; X<sub>44</sub> é R; X<sub>45</sub> é A; e X<sub>46</sub> é M ou P</p>

Tabela 8G. Sequência core 7 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 7 de consenso para CM	Subgênero de core 7 de consenso para CM
<p>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub> (SEQ ID NO: 26), em que:</p> <p>X<sub>50</sub> é A, E, K, L, P, S, T, V, W ou Y;</p> <p>X<sub>51</sub> é A, I, L, P, R, S, V ou Y;</p>	<p>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub> (SEQ ID NO: 27), em que: X<sub>50</sub> é E, P, S, V ou W; X<sub>51</sub> é A, P, R, S, V ou Y; X<sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V; X<sub>53</sub> é G, K, L ou R; e X<sub>54</sub> é Q ou R</p>

Core 7 de consenso para CM	Subgênero de core 7 de consenso para CM
<p>X<sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V;  X<sub>53</sub> é G, K, L ou R; e  X<sub>54</sub> é Q ou R</p>	<p>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub> (SEQ ID NO: 28), em que:  X<sub>50</sub> é P ou V; X<sub>51</sub> é A, P ou R; X<sub>52</sub> é E, G, P ou V; X<sub>53</sub> é G ou R; e X<sub>54</sub> é R</p>
	<p>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub> (SEQ ID NO: 29), em que:  X<sub>50</sub> é P ou V; X<sub>51</sub> é A ou R; X<sub>52</sub> é G ou V; X<sub>53</sub> é G ou R; e X<sub>54</sub> é R</p>
	<p>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub> (SEQ ID NO: 30), em que:  X<sub>50</sub> é P ou V; X<sub>51</sub> é A; X<sub>52</sub> é G ou V; X<sub>53</sub> é R; e X<sub>54</sub> é R</p>

Tabela 8H. Sequência core 8 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 8 de consenso para CM	Subgênero de core 8 de consenso para CM
<p>X<sub>57</sub>X<sub>58</sub>X<sub>59</sub>X<sub>60</sub>X<sub>61</sub> (SEQ ID NO: 31), em que:  X<sub>57</sub> é A, G, I, K, P, S ou T;  X<sub>58</sub> é R ou T;  X<sub>59</sub> é H, M ou S;  X<sub>60</sub> é F, M ou R; e  X<sub>61</sub> é A, G, I, L, P, Q, R, S, V ou W</p>	<p>X<sub>57</sub>X<sub>58</sub>X<sub>59</sub>X<sub>60</sub>X<sub>61</sub> (SEQ ID NO: 32), em que:  X<sub>57</sub> é A, G, I, K, S ou T; X<sub>58</sub> é R; X<sub>59</sub> é S; X<sub>60</sub> é F, M ou R; e X<sub>61</sub> é A, I, L, R ou W</p>
	<p>X<sub>57</sub>X<sub>58</sub>X<sub>59</sub>X<sub>60</sub>X<sub>61</sub> (SEQ ID NO: 33), em que:  X<sub>57</sub> é G ou K; X<sub>58</sub> é R; X<sub>59</sub> é S; X<sub>60</sub> é M; e X<sub>61</sub> é A, L, R ou W</p>
	<p>X<sub>57</sub>X<sub>58</sub>X<sub>59</sub>X<sub>60</sub>X<sub>61</sub> (SEQ ID NO: 34), em que: X<sub>57</sub> é G; X<sub>58</sub> é R; X<sub>59</sub> é S; X<sub>60</sub> é M; e X<sub>61</sub> é A ou L</p>

Tabela 8I. Sequência core 9 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 9 de consenso para CM	Subgênero de core 9 de consenso para CM
<p>X<sub>67</sub>X<sub>68</sub>X<sub>69</sub>X<sub>70</sub>X<sub>71</sub> (SEQ ID NO: 35), em que:  X<sub>67</sub> é I, L ou S;</p>	<p>X<sub>67</sub>X<sub>68</sub>X<sub>69</sub>X<sub>70</sub>X<sub>71</sub> (SEQ ID NO: 36), em que: X<sub>67</sub> é I ou L; X<sub>68</sub> é A, G, P ou V; X<sub>69</sub> é R; X<sub>70</sub> é A, M, P, R, S ou T; e X<sub>71</sub> é G, K, L, R, S ou V</p>



Core 9 de consenso para CM	Subgênero de core 9 de consenso para CM
X <sub>68</sub> é A, G, K, P, R ou V; X <sub>69</sub> é L, R ou S; X <sub>70</sub> é A, K, M, P, R, S ou T; e X <sub>71</sub> é F, G, H, I, K, L, M, P, R, S ou V	X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> (SEQ ID NO: 37), em que: X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A, G, P ou V; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A, M, P, R ou S; e X <sub>71</sub> é G, K, L, S ou V
	X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> (SEQ ID NO: 38), em que: X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A, G ou P; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A ou S; e X <sub>71</sub> é G ou L
	X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> (SEQ ID NO: 39), em que: X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A ou P; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A; e X <sub>71</sub> é G ou L

Tabela 8J. Sequência core 10 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core 10 de consenso para CM	Subgênero de core 10 de consenso para CM
X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> (SEQ ID NO: 40), em que: X <sub>74</sub> é E, L, Q, S, T ou V; X <sub>75</sub> é L, R ou S; X <sub>76</sub> é H, K ou R; X <sub>77</sub> é A, M, R ou S; e X <sub>78</sub> é G, L, M, R, S ou W	X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> (SEQ ID NO: 41), em que: X <sub>74</sub> é E, L, T ou V; X <sub>75</sub> é R ou S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é M, R ou S; e X <sub>78</sub> é G, L, M, S ou W
	X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> (SEQ ID NO: 42), em que: X <sub>74</sub> é E, T ou V; X <sub>75</sub> é R ou S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é M ou R; e X <sub>78</sub> é G, L, M, S ou W
	X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> (SEQ ID NO: 43), em que: X <sub>74</sub> é E ou V; X <sub>75</sub> é S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é R; e X <sub>78</sub> é L, S ou W
	X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> (SEQ ID NO: 44), em que: X <sub>74</sub> é E; X <sub>75</sub> é S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é R; e X <sub>78</sub> é L ou W

[0020]Em algumas modalidades, a sequência motivo é substrato para pelo menos matriptase e inclui uma sequência expandida de consenso com base em uma das sequências core expandidas de consenso para CM que são mostradas nas

Tabelas 8A-8J. Em algumas modalidades, a sequência expandida de consenso é uma sequência de consenso mostrada nas Tabelas 9A-9J-3 abaixo.

Tabela 9A. Sequência *core* expandida 1 de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 1 de consenso para CM	Subgênero de <i>core</i> expandida 1 de consenso para CM
<p>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 45), em que:</p> <p>X<sub>1</sub> é A, G, H, K, L, N, P, R, S ou V;</p> <p>X<sub>2</sub> é A, H, L, M, P, Q, R, S ou V;</p> <p>X<sub>3</sub> é A, E, F, G, I, L, P, R, S, T ou V;</p> <p>X<sub>4</sub> é A, I, K, N, R, T ou W;</p> <p>X<sub>5</sub> é A, G, I, L, M, Q, R, S ou V; e</p> <p>X<sub>6</sub> é F, G, H, L, M, R, S ou W</p>	<p>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 46), em que:</p> <p>X<sub>1</sub> é A, G, P, R, S ou V; X<sub>2</sub> é A, L, M, P, S ou V; X<sub>3</sub> é G, L ou P; X<sub>4</sub> é R; X<sub>5</sub> é A, G, R, S ou V; e X<sub>6</sub> é F, G, H, L, M, S ou W</p>
	<p>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 47), em que:</p> <p>X<sub>1</sub> é A, P, R, S ou V; X<sub>2</sub> é A, L, M, S ou V; X<sub>3</sub> é P; X<sub>4</sub> é R; X<sub>5</sub> é A, G, S ou V; e X<sub>6</sub> é F, G, H, M, S ou W</p>
	<p>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 48), em que:</p> <p>X<sub>1</sub> é A, P ou R; X<sub>2</sub> é A, S ou V; X<sub>3</sub> é P; X<sub>4</sub> é R; X<sub>5</sub> é S ou V; e X<sub>6</sub> é F, G, H, M ou S</p>
	<p>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 49), em que:</p> <p>X<sub>1</sub> é A, P ou R; X<sub>2</sub> é A ou S; X<sub>3</sub> é P; X<sub>4</sub> é R; X<sub>5</sub> é S; e X<sub>6</sub> é F, G, H ou S</p>

Tabela 9B-1. Sequência *core* expandida 2A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 2A de consenso para CM	Subgênero da <i>core</i> expandida 2A de consenso de consenso para CM
<p>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub> (SEQ ID NO: 50), em que:</p> <p>X<sub>9</sub> é A, E, G, L, P, Q, S, T ou V;</p>	<p>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub> (SEQ ID NO: 51), em que: X<sub>9</sub> é E, G, L, P, Q ou S; X<sub>10</sub> é A, R, S ou T; X<sub>11</sub> é K ou R; X<sub>12</sub> é D ou R; X<sub>13</sub> é L ou V; e X<sub>14</sub> é F ou P</p>

Core expandida 2A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 2A de consenso de consenso para CM
X <sub>10</sub> é A, L, P, R, S, T ou V; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é D ou R;	X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> (SEQ ID NO: 52), em que: X <sub>9</sub> é E, L, P ou Q; X <sub>10</sub> é A, S ou T; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é R; X <sub>13</sub> é L ou V; e X <sub>14</sub> é F ou P
X <sub>13</sub> é A, G, L, M, S, T, V ou W; e X <sub>14</sub> é F, G, M, P ou V	X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> (SEQ ID NO: 53), em que: X <sub>9</sub> é E, P ou Q; X <sub>10</sub> é S ou T; X <sub>11</sub> é R; X <sub>12</sub> é R; X <sub>13</sub> é L ou V; e X <sub>14</sub> é P

Tabela 9B-2. Sequência core expandida 2B de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 2B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 2B de consenso para CM
X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> (SEQ ID NO: 54), em que: X <sub>10</sub> é A, L, P, R, S, T ou V; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é D ou R; X <sub>13</sub> é A, G, L, M, S, T, V ou W; X <sub>14</sub> é F, G, M, P ou V; e X <sub>15</sub> é G, L, M, N, P, S, V ou Y	X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> (SEQ ID NO: 55), em que: X <sub>10</sub> é A, R, S ou T; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é D ou R; X <sub>13</sub> é L ou V; X <sub>14</sub> é F ou P; e X <sub>15</sub> é G, L, S ou V X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> (SEQ ID NO: 56), em que: X <sub>10</sub> é A, S ou T; X <sub>11</sub> é K ou R; X <sub>12</sub> é R; X <sub>13</sub> é L ou V; X <sub>14</sub> é F ou P; e X <sub>15</sub> é G, L, S ou V X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> (SEQ ID NO: 57), em que: X <sub>10</sub> é S ou T; X <sub>11</sub> é R; X <sub>12</sub> é R; X <sub>13</sub> é L ou V; X <sub>14</sub> é P; e X <sub>15</sub> é L ou V

Tabela 9B-3. Sequência core expandida 2C de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 2C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 2C de consenso para CM
<p><math>X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}</math> (SEQ ID NO: 58), em que:</p> <p><math>X_9</math> é A, E, G, L, P, Q, S, T ou V;  <math>X_{10}</math> é A, L, P, R, S, T ou V;  <math>X_{11}</math> é K ou R;  <math>X_{12}</math> é D ou R;  <math>X_{13}</math> é A, G, L, M, S, T, V ou W;  <math>X_{14}</math> é F, G, M, P ou V; e  <math>X_{15}</math> é G, L, M, N, P, S, V ou Y</p>	<p><math>X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}</math> (SEQ ID NO: 59), em que:</p> <p><math>X_9</math> é E, G, L, P, Q ou S; <math>X_{10}</math> é A, R, S ou T; <math>X_{11}</math> é K ou R; <math>X_{12}</math> é D ou R; <math>X_{13}</math> é L ou V; <math>X_{14}</math> é F ou P; e <math>X_{15}</math> é G, L, S ou V</p>
	<p><math>X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}</math> (SEQ ID NO: 60), em que: <math>X_9</math> é E, L, P ou Q; <math>X_{10}</math> é A, S ou T; <math>X_{11}</math> é K ou R; <math>X_{12}</math> é R; <math>X_{13}</math> é L ou V; <math>X_{14}</math> é F ou P; e <math>X_{15}</math> é G, L, S ou V</p>
	<p><math>X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}</math> (SEQ ID NO: 61), em que:</p> <p><math>X_9</math> é E, P ou Q; <math>X_{10}</math> é S ou T; <math>X_{11}</math> é R; <math>X_{12}</math> é R; <math>X_{13}</math> é L ou V; <math>X_{14}</math> é P; e <math>X_{15}</math> é L ou V</p>

Tabela 9C-1. Sequência core expandida 3A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 3A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 3A de consenso para CM
<p><math>X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 62), em que:</p> <p><math>X_{19}</math> é D, G, K, S, T ou V;  <math>X_{20}</math> é E, G, P, R, S, V ou W;  <math>X_{21}</math> é A, G, L, M, P, S ou V;  <math>X_{22}</math> é A, I, L ou R;  <math>X_{23}</math> é A, G, I ou P; e  <math>X_{24}</math> é G ou R</p>	<p><math>X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 63), em que:</p> <p><math>X_{19}</math> é G, K ou S; <math>X_{20}</math> é G, P, R, S ou V; <math>X_{21}</math> é P ou V; <math>X_{22}</math> é L ou R; <math>X_{23}</math> é G; e <math>X_{24}</math> é G ou R</p>
	<p><math>X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 64), em que:</p> <p><math>X_{19}</math> é G ou S; <math>X_{20}</math> é P ou R; <math>X_{21}</math> é P; <math>X_{22}</math> é L; <math>X_{23}</math> é G; <math>X_{24}</math> é R</p>

Tabela 9C-2. Sequência core expandida 3B de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 3B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 3B de consenso para CM
<p><math>X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 65), em que:</p> <p><math>X_{18}</math> é C, G, I, L ou S;</p> <p><math>X_{19}</math> é D, G, K, S, T ou V;</p> <p><math>X_{20}</math> é E, G, P, R, S, V ou W;</p> <p><math>X_{21}</math> é A, G, L, M, P, S ou V;</p> <p><math>X_{22}</math> é A, I, L ou R;</p> <p><math>X_{23}</math> é A, G, I ou P; e</p> <p><math>X_{24}</math> é G ou R</p>	<p><math>X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 66), em que: <math>X_{18}</math> é C, G ou S; <math>X_{19}</math> é G, K ou S; <math>X_{20}</math> é G, P, R, S ou V; <math>X_{21}</math> é P ou V; <math>X_{22}</math> é L ou R; <math>X_{23}</math> é G; e <math>X_{24}</math> é G ou R</p>
	<p><math>X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 67), em que: <math>X_{18}</math> é C, G ou S; <math>X_{19}</math> é G ou S; <math>X_{20}</math> é P ou R; <math>X_{21}</math> é P; <math>X_{22}</math> é L; <math>X_{23}</math> é G; <math>X_{24}</math> é R</p>

Tabela 9C-3. Sequência core expandida 3C de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 3C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 3C de consenso para CM
<p><math>X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 68), em que:</p> <p><math>X_{17}</math> é G ou S;</p> <p><math>X_{18}</math> é C, G, I, L ou S;</p> <p><math>X_{19}</math> é D, G, K, S, T ou V;</p> <p><math>X_{20}</math> é E, G, P, R, S, V ou W;</p> <p><math>X_{21}</math> é A, G, L, M, P, S ou V;</p> <p><math>X_{22}</math> é A, I, L ou R;</p> <p><math>X_{23}</math> é A, G, I ou P; e</p> <p><math>X_{24}</math> é G ou R</p>	<p><math>X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 69), em que: <math>X_{17}</math> é G ou S; <math>X_{18}</math> é C, G ou S; <math>X_{19}</math> é G, K ou S; <math>X_{20}</math> é G, P, R, S ou V; <math>X_{21}</math> é P ou V; <math>X_{22}</math> é L ou R; <math>X_{23}</math> é G; e <math>X_{24}</math> é G ou R</p>
	<p><math>X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}</math> (SEQ ID NO: 70), em que: <math>X_{17}</math> é G ou S; <math>X_{18}</math> é C, G ou S; <math>X_{19}</math> é G ou S; <math>X_{20}</math> é P ou R; <math>X_{21}</math> é P; <math>X_{22}</math> é L; <math>X_{23}</math> é G; <math>X_{24}</math> é R</p>

Tabela 9D-1. Sequência core expandida 4A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 4A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 4A de consenso para CM
<p><math>X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}</math> (SEQ ID NO: 71), em que:</p> <p><math>X_{25}</math> é G, M, R ou S;</p> <p><math>X_{26}</math> é A, G, H, L, R ou S;</p> <p><math>X_{27}</math> é D, H, N, R, S, T ou W;</p> <p><math>X_{28}</math> é A, N, P, R, S, T ou V;</p> <p><math>X_{29}</math> é F, G, L, M, P, Q, R, S ou Y; e</p> <p><math>X_{30}</math> é I, G, L, P, S, V ou W</p>	<p><math>X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}</math> (SEQ ID NO: 72), em que:</p> <p><math>X_{25}</math> é G, M, R ou S; <math>X_{26}</math> é A, G, H, L, R ou S; <math>X_{27}</math> é D, H, R ou T; <math>X_{28}</math> é A, P, R, S, T ou V; <math>X_{29}</math> é F, G, L, M, P ou S; e <math>X_{30}</math> é G, L, P, S, V ou W</p>
	<p><math>X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}</math> (SEQ ID NO: 73), em que:</p> <p><math>X_{25}</math> é G, M, R ou S; <math>X_{26}</math> é G, L ou S; <math>X_{27}</math> é R ou T; <math>X_{28}</math> é A, P ou S; <math>X_{29}</math> é F, G, M ou S; e <math>X_{30}</math> é G, P, S, V ou W</p>
	<p><math>X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}</math> (SEQ ID NO: 74), em que:</p> <p><math>X_{25}</math> é G, M, R ou S; <math>X_{26}</math> é G, L ou S; <math>X_{27}</math> é R; <math>X_{28}</math> é A ou S; <math>X_{29}</math> é G ou M; e <math>X_{30}</math> é G, P, S ou W</p>
	<p><math>X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}</math> (SEQ ID NO: 75), em que:</p> <p><math>X_{25}</math> é M; <math>X_{26}</math> é L; <math>X_{27}</math> é R; <math>X_{28}</math> é A ou S; <math>X_{29}</math> é G; e <math>X_{30}</math> é W</p>

Tabela 9D-2. Sequência core expandida 4B de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 4B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 4B de consenso para CM
<p><math>X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}</math> (SEQ ID NO: 76), em que:</p> <p><math>X_{25}</math> é G, M, R ou S;</p> <p><math>X_{26}</math> é A, G, H, L, R ou S;</p> <p><math>X_{27}</math> é D, H, N, R, S, T ou W;</p>	<p><math>X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}</math> (SEQ ID NO: 77), em que: <math>X_{25}</math> é G, M, R ou S; <math>X_{26}</math> é A, G, H, L, R ou S; <math>X_{27}</math> é D, H, R ou T; <math>X_{28}</math> é A, P, R, S, T ou V; <math>X_{29}</math> é F, G, L, M, P ou S; <math>X_{30}</math> é G, L, P, S, V ou W; e <math>X_{31}</math> é G, P, R ou S</p>

Core expandida 4B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 4B de consenso para CM
<p>X<sub>28</sub> é A, N, P, R, S, T ou V;  X<sub>29</sub> é F, G, L, M, P, Q, R, S ou Y;  X<sub>30</sub> é I, G, L, P, S, V ou W; e  X<sub>31</sub> é G, P, R ou S</p>	<p>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub> (SEQ ID NO: 78), em que: X<sub>25</sub> é G, M, R ou S; X<sub>26</sub> é G, L ou S; X<sub>27</sub> é R ou T; X<sub>28</sub> é A, P ou S; X<sub>29</sub> é F, G, M ou S; X<sub>30</sub> é G, P, S, V ou W; e X<sub>31</sub> é G, R ou S</p>
	<p>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub> (SEQ ID NO: 79), em que: X<sub>25</sub> é G, M, R ou S; X<sub>26</sub> é G, L ou S; X<sub>27</sub> é R; X<sub>28</sub> é A ou S; X<sub>29</sub> é G ou M; X<sub>30</sub> é G, P, S ou W; e X<sub>31</sub> é G, R ou S</p>
	<p>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub> (SEQ ID NO: 80), em que: X<sub>25</sub> é M; X<sub>26</sub> é L; X<sub>27</sub> é R; X<sub>28</sub> é A ou S; X<sub>29</sub> é G; X<sub>30</sub> é W; e X<sub>31</sub> é R</p>

Tabela 9D-3. Sequência core expandida 4C de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 4C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 4C de consenso para CM
<p>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO: 81), em que:  X<sub>25</sub> é G, M, R ou S;  X<sub>26</sub> é A, G, H, L, R ou S;  X<sub>27</sub> é D, H, N, R, S, T ou W;  X<sub>28</sub> é A, N, P, R, S, T ou V;  X<sub>29</sub> é F, G, L, M, P, Q, R, S ou Y;  X<sub>30</sub> é I, G, L, P, S, V ou W;  X<sub>31</sub> é G, P, R ou S; e  X<sub>32</sub> é G, L, R, S ou V</p>	<p>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO: 82), em que: X<sub>25</sub> é G, M, R ou S; X<sub>26</sub> é A, G, H, L, R ou S; X<sub>27</sub> é D, H, R ou T; X<sub>28</sub> é A, P, R, S, T ou V; X<sub>29</sub> é F, G, L, M, P ou S; X<sub>30</sub> é G, L, P, S, V ou W; X<sub>31</sub> é G, P, R ou S; e X<sub>32</sub> é G, L, R, S ou V</p>
	<p>X<sub>25</sub>X<sub>26</sub>X<sub>27</sub>X<sub>28</sub>X<sub>29</sub>X<sub>30</sub>X<sub>31</sub>X<sub>32</sub> (SEQ ID NO: 83), em que: X<sub>25</sub> é G, M, R ou S; X<sub>26</sub> é G, L ou S; X<sub>27</sub> é R ou T; X<sub>28</sub> é A, P ou S; X<sub>29</sub> é F, G, M ou S; X<sub>30</sub> é G, P, S, V ou W; X<sub>31</sub> é G, R ou S; e X<sub>32</sub> é G, L, S ou V</p>

Core expandida 4C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 4C de consenso para CM
	X <sub>25</sub> X <sub>26</sub> X <sub>27</sub> X <sub>28</sub> X <sub>29</sub> X <sub>30</sub> X <sub>31</sub> X <sub>32</sub> (SEQ ID NO: 84), em que: X <sub>25</sub> é G, M, R ou S; X <sub>26</sub> é G, L ou S; X <sub>27</sub> é R; X <sub>28</sub> é A ou S; X <sub>29</sub> é G ou M; X <sub>30</sub> é G, P, S ou W; X <sub>31</sub> é G, R ou S; e X <sub>32</sub> é G, L, S ou V
	X <sub>25</sub> X <sub>26</sub> X <sub>27</sub> X <sub>28</sub> X <sub>29</sub> X <sub>30</sub> X <sub>31</sub> X <sub>32</sub> (SEQ ID NO: 85), em que: X <sub>25</sub> é M; X <sub>26</sub> é L; X <sub>27</sub> é R; X <sub>28</sub> é A ou S; X <sub>29</sub> é G; X <sub>30</sub> é W; X <sub>31</sub> é R; e X <sub>32</sub> é G, L ou S

Tabela 9E-1. Sequência core expandida 5A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 5A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 5A de consenso para CM
X <sub>35</sub> X <sub>36</sub> X <sub>37</sub> X <sub>38</sub> X <sub>39</sub> X <sub>40</sub> (SEQ ID NO: 86), em que: X <sub>35</sub> é A, E, G, H, I, L, N, P, S ou V; X <sub>36</sub> é G, K, L, S, V ou W; X <sub>37</sub> é G, I, P, Q, R ou S; X <sub>38</sub> é R; X <sub>39</sub> é G, K, R, S ou V; e X <sub>40</sub> é A, C, G, L, M, P, S, V ou Y	X <sub>35</sub> X <sub>36</sub> X <sub>37</sub> X <sub>38</sub> X <sub>39</sub> X <sub>40</sub> (SEQ ID NO: 87), em que: X <sub>35</sub> é G, I, S ou V X <sub>36</sub> é G, L, S, V ou W; X <sub>37</sub> é G, Q, R ou S; X <sub>38</sub> é R; X <sub>39</sub> é G, S ou V; e X <sub>40</sub> é A, G, L, S ou V
	X <sub>35</sub> X <sub>36</sub> X <sub>37</sub> X <sub>38</sub> X <sub>39</sub> X <sub>40</sub> (SEQ ID NO: 88), em que: X <sub>35</sub> é G, I, S ou V X <sub>36</sub> é V; X <sub>37</sub> é S; X <sub>38</sub> é R; X <sub>39</sub> é S; e X <sub>40</sub> é A ou V
	X <sub>35</sub> X <sub>36</sub> X <sub>37</sub> X <sub>38</sub> X <sub>39</sub> X <sub>40</sub> (SEQ ID NO: 89), em que: X <sub>35</sub> é I; X <sub>36</sub> é V; X <sub>37</sub> é S; X <sub>38</sub> é R; X <sub>39</sub> é S; e X <sub>40</sub> é A ou V

Tabela 9E-2. Sequência core expandida 5B de consenso para CM clivável pela matriptase



Core expandida 5B de consenso para CM core	Subgênero da core expandida 5B de consenso para CM
<p><math>X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 90), em que:</p> <p><math>X_{34}</math> é A, G, K, M, P, Q, S, V ou Y;</p> <p><math>X_{35}</math> é A, E, G, H, I, L, N, P, S ou V;</p> <p><math>X_{36}</math> é G, K, L, S, V ou W;</p> <p><math>X_{37}</math> é G, I, P, Q, R ou S;</p> <p><math>X_{38}</math> é R;</p> <p><math>X_{39}</math> é G, K, R, S ou V; e</p> <p><math>X_{40}</math> é A, C, G, L, M, P, S, V ou Y</p>	<p><math>X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 91), em que: <math>X_{34}</math> é A, G, K, S, V ou Y; e <math>X_{35}</math> é G, I, S ou V <math>X_{36}</math> é G, L, S, V ou W; <math>X_{37}</math> é G, Q, R ou S; <math>X_{38}</math> é R; <math>X_{39}</math> é G, S ou V; e <math>X_{40}</math> é A, G, L, S ou V</p>
	<p><math>X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 92), em que: <math>X_{34}</math> é G, S, V ou Y; <math>X_{35}</math> é G, I, S ou V <math>X_{36}</math> é V; <math>X_{37}</math> é S; <math>X_{38}</math> é R; <math>X_{39}</math> é S; e <math>X_{40}</math> é A ou V</p>
	<p><math>X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 93), em que: <math>X_{34}</math> é Y; <math>X_{35}</math> é I; <math>X_{36}</math> é V; <math>X_{37}</math> é S; <math>X_{38}</math> é R; <math>X_{39}</math> é S; e <math>X_{40}</math> é A ou V</p>

Tabela 9E-3. Sequência core expandida 5C de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 5C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 5C de consenso para CM
<p><math>X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 94), em que:</p> <p><math>X_{33}</math> é G, K, P, Q, S ou T;</p> <p><math>X_{34}</math> é A, G, K, M, P, Q, S, V ou Y;</p> <p><math>X_{35}</math> é A, E, G, H, I, L, N, P, S ou V;</p> <p><math>X_{36}</math> é G, K, L, S, V ou W;</p> <p><math>X_{37}</math> é G, I, P, Q, R ou S;</p> <p><math>X_{38}</math> é R;</p> <p><math>X_{39}</math> é G, K, R, S ou V; e</p> <p><math>X_{40}</math> é A, C, G, L, M, P, S, V ou Y</p>	<p><math>X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 95), em que: <math>X_{33}</math> é G, P, Q, S ou T; <math>X_{34}</math> é A, G, K, S, V ou Y; e <math>X_{35}</math> é G, I, S ou V <math>X_{36}</math> é G, L, S, V ou W; <math>X_{37}</math> é G, Q, R ou S; <math>X_{38}</math> é R; <math>X_{39}</math> é G, S ou V; e <math>X_{40}</math> é A, G, L, S ou V</p>
	<p><math>X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 96), em que: <math>X_{33}</math> é G, Q ou S; <math>X_{34}</math> é G, S, V ou Y; <math>X_{35}</math> é G, I, S ou V <math>X_{36}</math> é V; <math>X_{37}</math> é S; <math>X_{38}</math> é R; <math>X_{39}</math> é S; e <math>X_{40}</math> é A ou V</p>
	<p><math>X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}</math> (SEQ ID NO: 97), em que: <math>X_{33}</math> é G, Q ou S; <math>X_{34}</math> é Y; <math>X_{35}</math> é I; <math>X_{36}</math> é V; <math>X_{37}</math> é S; <math>X_{38}</math> é R; <math>X_{39}</math> é S; e <math>X_{40}</math> é A ou V</p>

Tabela 9F. Sequência *core* expandida 6 de consenso para CM *core* clivável pela matriptase

Core expandida 6 de consenso para CM	Subgênero da <i>core</i> expandida 6 de consenso para CM
<p>X<sub>41</sub>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 98), em que:</p> <p>X<sub>41</sub> é G, K, P, R, S ou T;</p> <p>X<sub>42</sub> é A, E, G, I, L, M, R ou S;</p> <p>X<sub>43</sub> é A, G, K, L, N, R, S ou V;</p> <p>X<sub>44</sub> é F, H, L, R ou Y;</p> <p>X<sub>45</sub> é A, F, G, H, P ou S; e</p> <p>X<sub>46</sub> é F, G, M, N, P, R, S ou V</p>	<p>X<sub>41</sub>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 99), em que:</p> <p>X<sub>41</sub> é G, K, R, S ou T; X<sub>42</sub> é A, E, G, L, M, R ou S; X<sub>43</sub> é G, K, L, N, R, S ou V; X<sub>44</sub> é R ou Y; X<sub>45</sub> é A, F, G, P ou S; e X<sub>46</sub> é F, G, M, P, R, S ou V</p>
	<p>X<sub>41</sub>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 100), em que:</p> <p>X<sub>41</sub> é G, R, S ou T; X<sub>42</sub> é A, E, G, M ou S; X<sub>43</sub> é G, L, S ou V; X<sub>44</sub> é R ou Y; X<sub>45</sub> é A, G, P ou S; e X<sub>46</sub> é F, G, M, P, R, S ou V</p>
	<p>X<sub>41</sub>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 101), em que:</p> <p>X<sub>41</sub> é G, R ou S; X<sub>42</sub> é A, G ou S; X<sub>43</sub> é L, S ou V; X<sub>44</sub> é R; X<sub>45</sub> é A; e X<sub>46</sub> é M ou P</p>
	<p>X<sub>41</sub>X<sub>42</sub>X<sub>43</sub>X<sub>44</sub>X<sub>45</sub>X<sub>46</sub> (SEQ ID NO: 102), em que:</p> <p>X<sub>41</sub> é G, R ou S; X<sub>42</sub> é A; X<sub>43</sub> é L, S ou V; X<sub>44</sub> é R; X<sub>45</sub> é A; e X<sub>46</sub> é M ou P</p>

Tabela 9G-1. Sequência *core* expandida 7A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 7A de consenso para CM	Subgênero da <i>core</i> expandida 7A de consenso para CM
<p>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub>X<sub>55</sub> (SEQ ID NO: 103), em que:</p> <p>X<sub>50</sub> é A, E, K, L, P, S, T, V, W ou Y;</p> <p>X<sub>51</sub> é A, I, L, P, R, S, V ou Y;</p>	<p>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub>X<sub>55</sub> (SEQ ID NO: 104), em que:</p> <p>X<sub>50</sub> é E, P, S, V ou W; X<sub>51</sub> é A, P, R, S, V ou Y;</p> <p>X<sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V; X<sub>53</sub> é G, K, L ou R; X<sub>54</sub> é Q ou R; e X<sub>55</sub> é A, G, H, M, R ou S</p>

Core expandida 7A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 7A de consenso para CM
<p>X<sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V;  X<sub>53</sub> é G, K, L ou R;  X<sub>54</sub> é Q ou R; e  X<sub>55</sub> é A, G, H, M, R ou S</p>	X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> (SEQ ID NO: 105), em que: X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A, P ou R; X <sub>52</sub> é E, G, P ou V; e X <sub>53</sub> é G ou R; X <sub>54</sub> é R; X <sub>55</sub> é G, M ou S
	X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> (SEQ ID NO: 106), em que: X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A ou R; X <sub>52</sub> é G ou V; X <sub>53</sub> é G ou R; X <sub>54</sub> é R; e X <sub>55</sub> é M ou S
	X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> (SEQ ID NO: 107), em que: X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A; X <sub>52</sub> é G ou V; X <sub>53</sub> é R; X <sub>54</sub> é R; e X <sub>55</sub> é M ou S

Tabela 9G-2. Sequência core expandida 7B de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 7B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 7B de consenso para CM
<p>X<sub>49</sub>X<sub>50</sub>X<sub>51</sub>X<sub>52</sub>X<sub>53</sub>X<sub>54</sub>X<sub>55</sub> (SEQ ID NO: 108), em que:  X<sub>49</sub> é E, G, K, P, Q, S, T ou V;  X<sub>50</sub> é A, E, K, L, P, S, T, V, W ou Y;  X<sub>51</sub> é A, I, L, P, R, S, V ou Y;  X<sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V;  X<sub>53</sub> é G, K, L ou R;  X<sub>54</sub> é Q ou R; e  X<sub>55</sub> é A, G, H, M, R ou S</p>	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> (SEQ ID NO: 109), em que: X <sub>49</sub> é G, K, P, Q, S ou V; X <sub>50</sub> é E, P, S, V ou W; X <sub>51</sub> é A, P, R, S, V ou Y; X <sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V; X <sub>53</sub> é G, K, L ou R; X <sub>54</sub> é Q ou R; e X <sub>55</sub> é A, G, H, M, R ou S
	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> (SEQ ID NO: 110), em que: X <sub>49</sub> é G, P, S ou V; X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A, P ou R; X <sub>52</sub> é E, G, P ou V; X <sub>53</sub> é G ou R; X <sub>54</sub> é R; e X <sub>55</sub> é G, M ou S

Core expandida 7B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 7B de consenso para CM
	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> (SEQ ID NO: 111), em que: X <sub>49</sub> é G, P, S ou V; X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A ou R; X <sub>52</sub> é G ou V; X <sub>53</sub> é G ou R; X <sub>54</sub> é R; e X <sub>55</sub> é M ou S
	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> (SEQ ID NO: 112), em que: X <sub>49</sub> é G, S ou V; X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A; X <sub>52</sub> é G ou V; X <sub>53</sub> é R; X <sub>54</sub> é R; e X <sub>55</sub> é M ou S

Tabela 9G-3. Sequência core expandida 7C de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 7C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 7C de consenso para CM
X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> X <sub>56</sub> (SEQ ID NO: 113), em que: X <sub>49</sub> é E, G, K, P, Q, S, T ou V; X <sub>50</sub> é A, E, K, L, P, S, T, V, W ou Y; X <sub>51</sub> é A, I, L, P, R, S, V ou Y; X <sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V; X <sub>53</sub> é G, K, L ou R; X <sub>54</sub> é Q ou R; X <sub>55</sub> é A, G, H, M, R ou S; e X <sub>56</sub> é F, G, L, M, P, S ou W	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> X <sub>56</sub> (SEQ ID NO: 114), em que: X <sub>49</sub> é G, K, P, Q, S ou V; X <sub>50</sub> é E, P, S, V ou W; X <sub>51</sub> é A, P, R, S, V ou Y; X <sub>52</sub> é E, G, H, L, P ou V; X <sub>53</sub> é G, K, L ou R; X <sub>54</sub> é Q ou R; X <sub>55</sub> é A, G, H, M, R ou S; e X <sub>56</sub> é G, L, M, P, S ou W
	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> X <sub>56</sub> (SEQ ID NO: 115), em que: X <sub>49</sub> é G, P, S ou V; X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A, P ou R; X <sub>52</sub> é E, G, P ou V; X <sub>53</sub> é G ou R; X <sub>54</sub> é R; X <sub>55</sub> é G, M ou S; e X <sub>56</sub> é G, L, M, P, S ou W
	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> X <sub>56</sub> (SEQ ID NO: 116), em que: X <sub>49</sub> é G, P, S ou V; X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A ou R; X <sub>52</sub> é G ou V; X <sub>53</sub> é G ou R; X <sub>54</sub> é R; X <sub>55</sub> é M ou S; e X <sub>56</sub> é G, L, P, S ou W

Core expandida 7C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 7C de consenso para CM
	X <sub>49</sub> X <sub>50</sub> X <sub>51</sub> X <sub>52</sub> X <sub>53</sub> X <sub>54</sub> X <sub>55</sub> X <sub>56</sub> (SEQ ID NO: 117), em que: X <sub>49</sub> é G, S ou V; X <sub>50</sub> é P ou V; X <sub>51</sub> é A; X <sub>52</sub> é G ou V; X <sub>53</sub> é R; X <sub>54</sub> é R; X <sub>55</sub> é M ou S; e X <sub>56</sub> é G, L ou S

Tabela 9H-1. Sequência core expandida 8A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 8A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 8A de consenso para CM
X <sub>57</sub> X <sub>58</sub> X <sub>59</sub> X <sub>60</sub> X <sub>61</sub> X <sub>62</sub> (SEQ ID NO: 118), em que: X <sub>57</sub> é A, G, I, K, P, S ou T; X <sub>58</sub> é R ou T; X <sub>59</sub> é H, M ou S; X <sub>60</sub> é F, M ou R; X <sub>61</sub> é A, G, I, L, P, Q, R, S, V ou W; e X <sub>62</sub> é A, G, L, M, P, Q, R, S, T, V ou W	X <sub>57</sub> X <sub>58</sub> X <sub>59</sub> X <sub>60</sub> X <sub>61</sub> X <sub>62</sub> (SEQ ID NO: 119), em que: X <sub>57</sub> é A, G, I, K, S ou T; X <sub>58</sub> é R; X <sub>59</sub> é S; X <sub>60</sub> é F, M ou R; X <sub>61</sub> é A, I, L, R ou W; e X <sub>62</sub> é G, L, M, P, Q, R, S ou V
	X <sub>57</sub> X <sub>58</sub> X <sub>59</sub> X <sub>60</sub> X <sub>61</sub> X <sub>62</sub> (SEQ ID NO: 120), em que: X <sub>57</sub> é G ou K; X <sub>58</sub> é R; X <sub>59</sub> é S; X <sub>60</sub> é M; X <sub>61</sub> é A, L, R ou W; e X <sub>62</sub> é G, L, M, P, R ou S
	X <sub>57</sub> X <sub>58</sub> X <sub>59</sub> X <sub>60</sub> X <sub>61</sub> X <sub>62</sub> (SEQ ID NO: 121), em que: X <sub>57</sub> é G; X <sub>58</sub> é R; X <sub>59</sub> é S; X <sub>60</sub> é M; X <sub>61</sub> é A ou L; e X <sub>62</sub> é G, L, M, R ou S
	X <sub>57</sub> X <sub>58</sub> X <sub>59</sub> X <sub>60</sub> X <sub>61</sub> X <sub>62</sub> (SEQ ID NO: 122), em que: X <sub>57</sub> é G; X <sub>58</sub> é R; X <sub>59</sub> é S; X <sub>60</sub> é M; X <sub>61</sub> é A ou L; e X <sub>62</sub> é L ou M

Tabela 9H-2. Sequência core expandida 8B de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 8B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 8B de consenso para CM
<p><math>X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}</math> (SEQ ID NO: 123), em que:</p> <p><math>X_{57}</math> é A, G, I, K, P, S ou T;</p> <p><math>X_{58}</math> é R ou T;</p> <p><math>X_{59}</math> é H, M ou S;</p> <p><math>X_{60}</math> é F, M ou R;</p> <p><math>X_{61}</math> é A, G, I, L, P, Q, R, S, V ou W;</p> <p><math>X_{62}</math> é A, G, L, M, P, Q, R, S, T, V ou W; e</p> <p><math>X_{63}</math> é A, G, K, M, P, R, S, W ou Y</p>	<p><math>X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}</math> (SEQ ID NO: 124), em que:</p> <p><math>X_{57}</math> é A, G, I, K, S ou T; <math>X_{58}</math> é R; <math>X_{59}</math> é S; <math>X_{60}</math> é F, M ou R; <math>X_{61}</math> é A, I, L, R ou W; <math>X_{62}</math> é G, L, M, P, Q, R, S ou V; e <math>X_{63}</math> é A, G, P, R, S, W ou Y</p>
	<p><math>X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}</math> (SEQ ID NO: 125), em que:</p> <p><math>X_{57}</math> é G ou K; <math>X_{58}</math> é R; <math>X_{59}</math> é S; <math>X_{60}</math> é M; <math>X_{61}</math> é A, L, R ou W; <math>X_{62}</math> é G, L, M, P, R ou S; e <math>X_{63}</math> é A, G, P, R, S ou W</p>
	<p><math>X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}</math> (SEQ ID NO: 126), em que:</p> <p><math>X_{57}</math> é G; <math>X_{58}</math> é R; <math>X_{59}</math> é S; <math>X_{60}</math> é M; <math>X_{61}</math> é A ou L; <math>X_{62}</math> é G, L, M, R ou S; e <math>X_{63}</math> é A, G, P, R ou S</p>
	<p><math>X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}</math> (SEQ ID NO: 127), em que:</p> <p><math>X_{57}</math> é G; <math>X_{58}</math> é R; <math>X_{59}</math> é S; <math>X_{60}</math> é M; <math>X_{61}</math> é A ou L; <math>X_{62}</math> é L ou M; e <math>X_{63}</math> é G, P ou S</p>

Tabela 9H-3. Sequência core expandida 8C de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 8C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 8C de consenso para CM
<p><math>X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}</math> (SEQ ID NO: 128), em que:</p> <p><math>X_{57}</math> é A, G, I, K, P, S ou T;</p> <p><math>X_{58}</math> é R ou T;</p> <p><math>X_{59}</math> é H, M ou S;</p>	<p><math>X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}</math> (SEQ ID NO: 129), em que: <math>X_{57}</math> é A, G, I, K, S ou T; <math>X_{58}</math> é R; <math>X_{59}</math> é S; <math>X_{60}</math> é F, M ou R; <math>X_{61}</math> é A, I, L, R ou W; <math>X_{62}</math> é G, L, M, P, Q, R, S ou V; <math>X_{63}</math> é A, G, P, R, S, W ou Y; e <math>X_{64}</math> é F, G, L, P ou S</p>

Core expandida 8C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 8C de consenso para CM
<p>X<sub>60</sub> é F, M ou R;</p> <p>X<sub>61</sub> é A, G, I, L, P, Q, R, S, V ou W;</p> <p>X<sub>62</sub> é A, G, L, M, P, Q, R, S, T, V ou W;</p> <p>X<sub>63</sub> é A, G, K, M, P, R, S, W ou Y; e</p> <p>X<sub>64</sub> é F, G, I, L, P, Q, S ou Y</p>	<p>X<sub>57</sub>X<sub>58</sub>X<sub>59</sub>X<sub>60</sub>X<sub>61</sub>X<sub>62</sub>X<sub>63</sub>X<sub>64</sub> (SEQ ID NO: 130), em que: X<sub>57</sub> é G ou K; X<sub>58</sub> é R; X<sub>59</sub> é S; X<sub>60</sub> é M; X<sub>61</sub> é A, L, R ou W; X<sub>62</sub> é G, L, M, P, R ou S; X<sub>63</sub> é A, G, P, R, S ou W; e X<sub>64</sub> é F, G, L, P ou S</p>
	<p>X<sub>57</sub>X<sub>58</sub>X<sub>59</sub>X<sub>60</sub>X<sub>61</sub>X<sub>62</sub>X<sub>63</sub>X<sub>64</sub> (SEQ ID NO: 131), em que: X<sub>57</sub> é G; X<sub>58</sub> é R; X<sub>59</sub> é S; X<sub>60</sub> é M; X<sub>61</sub> é A ou L; X<sub>62</sub> é G, L, M, R ou S; X<sub>63</sub> é A, G, P, R ou S; e X<sub>64</sub> é F, G, P ou S</p>
	<p>X<sub>57</sub>X<sub>58</sub>X<sub>59</sub>X<sub>60</sub>X<sub>61</sub>X<sub>62</sub>X<sub>63</sub>X<sub>64</sub> (SEQ ID NO: 132), em que: X<sub>57</sub> é G; X<sub>58</sub> é R; X<sub>59</sub> é S; X<sub>60</sub> é M; X<sub>61</sub> é A ou L; X<sub>62</sub> é L ou M; X<sub>63</sub> é G, P ou S; e X<sub>64</sub> é G, P ou S</p>

Tabela 9I-1. Sequência core expandida 9A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 9A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 9A de consenso para CM
<p>X<sub>67</sub>X<sub>68</sub>X<sub>69</sub>X<sub>70</sub>X<sub>71</sub>X<sub>72</sub> (SEQ ID NO: 133), em que:</p> <p>X<sub>67</sub> é I, L ou S;</p> <p>X<sub>68</sub> é A, G, K, P, R ou V;</p> <p>X<sub>69</sub> é L, R ou S;</p> <p>X<sub>70</sub> é A, K, M, P, R, S ou T;</p> <p>X<sub>71</sub> é F, G, H, I, K, L, M, P, R, S ou V;</p> <p>e</p>	<p>X<sub>67</sub>X<sub>68</sub>X<sub>69</sub>X<sub>70</sub>X<sub>71</sub>X<sub>72</sub> (SEQ ID NO: 134), em que: X<sub>67</sub> é I ou L; X<sub>68</sub> é A, G, P ou V; X<sub>69</sub> é R; X<sub>70</sub> é A, M, P, R, S ou T; X<sub>71</sub> é G, K, L, R, S ou V; e X<sub>72</sub> é F, G, I, L, M, S ou V</p>
	<p>X<sub>67</sub>X<sub>68</sub>X<sub>69</sub>X<sub>70</sub>X<sub>71</sub>X<sub>72</sub> (SEQ ID NO: 135), em que: X<sub>67</sub> é L; X<sub>68</sub> é A, G, P ou V; X<sub>69</sub> é R; X<sub>70</sub> é A, M, P, R ou S; X<sub>71</sub> é G, K, L, S ou V; e X<sub>72</sub> é F, G, I, L, S ou V</p>

Core expandida 9A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 9A de consenso para CM
X <sub>72</sub> é F, G, I, L, M, P, R, S, T, V, W ou Y	X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> (SEQ ID NO: 136), em que: X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A, G ou P; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A ou S; X <sub>71</sub> é G ou L; e X <sub>72</sub> é I ou L
	X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> (SEQ ID NO: 137), em que: X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A ou P; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A; X <sub>71</sub> é G ou L; e X <sub>72</sub> é I ou L

Tabela 9I-2. Sequência core expandida 9B de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 9B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 9B de consenso para CM
X <sub>66</sub> X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> (SEQ ID NO: 138), em que: X <sub>66</sub> é G, K, P, Q, R, S ou T; X <sub>67</sub> é I, L ou S; X <sub>68</sub> é A, G, K, P, R ou V; X <sub>69</sub> é L, R ou S; X <sub>70</sub> é A, K, M, P, R, S ou T; X <sub>71</sub> é F, G, H, I, K, L, M, P, R, S ou V; e X <sub>72</sub> é F, G, I, L, M, P, R, S, T, V, W ou Y	X <sub>66</sub> X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> (SEQ ID NO: 139), em que: X <sub>66</sub> é G, P, R, S ou T; X <sub>67</sub> é I ou L; X <sub>68</sub> é A, G, P ou V; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A, M, P, R, S ou T; X <sub>71</sub> é G, K, L, R, S ou V; e X <sub>72</sub> é F, G, I, L, M, S ou V
	X <sub>66</sub> X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> (SEQ ID NO: 140), em que: X <sub>66</sub> é G, P, R ou S; X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A, G, P ou V; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A, M, P, R ou S; X <sub>71</sub> é G, K, L, S ou V; e X <sub>72</sub> é F, G, I, L, S ou V
	X <sub>66</sub> X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> (SEQ ID NO: 141), em que: X <sub>66</sub> é P; X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A, G ou P; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A ou S; X <sub>71</sub> é G ou L; e X <sub>72</sub> é I ou L
	X <sub>66</sub> X <sub>67</sub> X <sub>68</sub> X <sub>69</sub> X <sub>70</sub> X <sub>71</sub> X <sub>72</sub> (SEQ ID NO: 142), em que: X <sub>66</sub> é P; X <sub>67</sub> é L; X <sub>68</sub> é A ou P; X <sub>69</sub> é R; X <sub>70</sub> é A; X <sub>71</sub> é G ou L; e X <sub>72</sub> é I ou L

Tabela 9I-3. Sequência core expandida 9C de consenso para CM clivável pela



## matriptase

Core expandida 9C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 9C de consenso para CM
<p><math>X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}</math> (SEQ ID NO: 143), em que:</p> <p><math>X_{65}</math> é A, G, I, K, P, R, S ou V;  <math>X_{66}</math> é G, K, P, Q, R, S ou T;  <math>X_{67}</math> é I, L ou S;  <math>X_{68}</math> é A, G, K, P, R ou V;  <math>X_{69}</math> é L, R ou S;  <math>X_{70}</math> é A, K, M, P, R, S ou T;  <math>X_{71}</math> é F, G, H, I, K, L, M, P, R, S ou V;  e  <math>X_{72}</math> é F, G, I, L, M, P, R, S, T, V, W ou Y</p>	<p><math>X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}</math> (SEQ ID NO: 144), em que: <math>X_{65}</math> é G, K, P, R, S ou V; <math>X_{66}</math> é G, P, R, S ou T; <math>X_{67}</math> é I ou L; <math>X_{68}</math> é A, G, P ou V; <math>X_{69}</math> é R; <math>X_{70}</math> é A, M, P, R, S ou T; <math>X_{71}</math> é G, K, L, R, S ou V; e <math>X_{72}</math> é F, G, I, L, M, S ou V</p>
	<p><math>X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}</math> (SEQ ID NO: 145), em que: <math>X_{65}</math> é G, P, R ou S; <math>X_{66}</math> é G, P, R ou S; <math>X_{67}</math> é L; <math>X_{68}</math> é A, G, P ou V; <math>X_{69}</math> é R; <math>X_{70}</math> é A, M, P, R ou S; <math>X_{71}</math> é G, K, L, S ou V; e <math>X_{72}</math> é F, G, I, L, S ou V</p>
	<p><math>X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}</math> (SEQ ID NO: 146), em que: <math>X_{65}</math> é G, P, R ou S; <math>X_{66}</math> é P; <math>X_{67}</math> é L; <math>X_{68}</math> é A, G ou P; <math>X_{69}</math> é R; <math>X_{70}</math> é A ou S; <math>X_{71}</math> é G ou L; e <math>X_{72}</math> é I ou L</p>
	<p><math>X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}</math> (SEQ ID NO: 147), em que: <math>X_{65}</math> é R; <math>X_{66}</math> é P; <math>X_{67}</math> é L; <math>X_{68}</math> é A ou P; <math>X_{69}</math> é R; <math>X_{70}</math> é A; <math>X_{71}</math> é G ou L; e <math>X_{72}</math> é I ou L</p>

Tabela 9J-1. Sequência core expandida 10A de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 10A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 10A de consenso para CM
<p><math>X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}</math> (SEQ ID NO: 148), em que:</p> <p><math>X_{73}</math> é G, H, N, P, R, S, T ou V;  <math>X_{74}</math> é E, L, Q, S, T ou V;</p>	<p><math>X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}</math> (SEQ ID NO: 149), em que:</p> <p><math>X_{73}</math> é G, N, P, S, T ou V; <math>X_{74}</math> é E, L, T ou V; <math>X_{75}</math> é R ou S; <math>X_{76}</math> é K ou R; <math>X_{77}</math> é M, R ou S; <math>X_{78}</math> é G, L, M, S ou W; e <math>X_{79}</math> é A, G, I, M, P, S ou V</p>

Core expandida 10A de consenso para CM	Subgênero da core expandida 10A de consenso para CM
<p>X<sub>75</sub> é L, R ou S;  X<sub>76</sub> é H, K ou R;  X<sub>77</sub> é A, M, R ou S;  X<sub>78</sub> é G, L, M, R, S ou W; e  X<sub>79</sub> é A, G, I, M, N, P, S, V ou Y</p>	<p>X<sub>73</sub>X<sub>74</sub>X<sub>75</sub>X<sub>76</sub>X<sub>77</sub>X<sub>78</sub>X<sub>79</sub> (SEQ ID NO: 150), em que: X<sub>73</sub> é G, N, P, S ou V; X<sub>74</sub> é E, T ou V; X<sub>75</sub> é R ou S; X<sub>76</sub> é K ou R; X<sub>77</sub> é M ou R; X<sub>78</sub> é G, L, M, S ou W; e X<sub>79</sub> é A, G, I, M, P, S ou V</p>
	<p>X<sub>73</sub>X<sub>74</sub>X<sub>75</sub>X<sub>76</sub>X<sub>77</sub>X<sub>78</sub>X<sub>79</sub> (SEQ ID NO: 151), em que: X<sub>73</sub> é G, P, S ou V; X<sub>74</sub> é E ou V; X<sub>75</sub> é S; X<sub>76</sub> é K ou R; X<sub>77</sub> é R; X<sub>78</sub> é L, S ou W; e X<sub>79</sub> é G, I, M, P, S ou V</p>
	<p>X<sub>73</sub>X<sub>74</sub>X<sub>75</sub>X<sub>76</sub>X<sub>77</sub>X<sub>78</sub>X<sub>79</sub> (SEQ ID NO: 152), em que: X<sub>73</sub> é G, P ou S; X<sub>74</sub> é E; X<sub>75</sub> é S; X<sub>76</sub> é K ou R; X<sub>77</sub> é R; X<sub>78</sub> é L ou W; e X<sub>79</sub> é M</p>

Tabela 9J-2. Sequência core expandida 10B de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 10B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 10B de consenso para CM
<p>X<sub>74</sub>X<sub>75</sub>X<sub>76</sub>X<sub>77</sub>X<sub>78</sub>X<sub>79</sub>X<sub>80</sub> (SEQ ID NO: 153), em que:  X<sub>74</sub> é E, L, Q, S, T ou V;  X<sub>75</sub> é L, R ou S;  X<sub>76</sub> é H, K ou R;  X<sub>77</sub> é A, M, R ou S;  X<sub>78</sub> é G, L, M, R, S ou W;  X<sub>79</sub> é A, G, I, M, N, P, S, V ou Y; e</p>	<p>X<sub>74</sub>X<sub>75</sub>X<sub>76</sub>X<sub>77</sub>X<sub>78</sub>X<sub>79</sub>X<sub>80</sub> (SEQ ID NO: 154), em que: X<sub>74</sub> é E, L, T ou V; X<sub>75</sub> é R ou S; X<sub>76</sub> é K ou R; X<sub>77</sub> é M, R ou S; X<sub>78</sub> é G, L, M, S ou W; X<sub>79</sub> é A, G, I, M, P, S ou V; e X<sub>80</sub> é G, I, L, N, P, S ou V</p>
	<p>X<sub>74</sub>X<sub>75</sub>X<sub>76</sub>X<sub>77</sub>X<sub>78</sub>X<sub>79</sub>X<sub>80</sub> (SEQ ID NO: 155), em que: X<sub>74</sub> é E, T ou V; X<sub>75</sub> é R ou S; X<sub>76</sub> é K ou R; X<sub>77</sub> é M ou R; X<sub>78</sub> é G, L, M, S ou W; X<sub>79</sub> é A, G, I, M, P, S ou V; e X<sub>80</sub> é G, I, L, N, P, S ou V</p>

Core expandida 10B de consenso para CM	Subgênero da core expandida 10B de consenso para CM
X <sub>80</sub> é G, I, L, N, P, S, V ou W	X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (SEQ ID NO: 156), em que: X <sub>74</sub> é E ou V; X <sub>75</sub> é S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é R; X <sub>78</sub> é L, S ou W; X <sub>79</sub> é G, I, M, P, S ou V; e X <sub>80</sub> é G, L, N, P, S ou V
	X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (SEQ ID NO: 157), em que: X <sub>74</sub> é E; X <sub>75</sub> é S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é R; X <sub>78</sub> é L ou W; X <sub>79</sub> é M; e X <sub>80</sub> é G, P ou S

Tabela 9J-3. Sequência core expandida 10C de consenso para CM clivável pela matriptase

Core expandida 10C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 10C de consenso para CM
X <sub>73</sub> X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (SEQ ID NO: 158), em que: X <sub>73</sub> é G, H, N, P, R, S, T ou V; X <sub>74</sub> é E, L, Q, S, T ou V; X <sub>75</sub> é L, R ou S X <sub>76</sub> é H, K ou R; X <sub>77</sub> é A, M, R ou S; X <sub>78</sub> é G, L, M, R, S ou W; X <sub>79</sub> é A, G, I, M, N, P, S, V ou Y; e X <sub>80</sub> é G, I, L, N, P, S, V ou W	X <sub>73</sub> X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (SEQ ID NO: 159), em que: X <sub>73</sub> é G, N, P, S, T ou V; X <sub>74</sub> é E, L, T ou V; X <sub>75</sub> é R ou S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é M, R ou S; X <sub>78</sub> é G, L, M, S ou W; X <sub>79</sub> é A, G, I, M, P, S ou V; e X <sub>80</sub> é G, I, L, N, P, S ou V
	X <sub>73</sub> X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (SEQ ID NO: 160), em que: X <sub>73</sub> é G, N, P, S ou V; X <sub>74</sub> é E, T ou V; X <sub>75</sub> é R ou S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é M ou R; X <sub>78</sub> é G, L, M, S ou W; X <sub>79</sub> é A, G, I, M, P, S ou V; e X <sub>80</sub> é G, I, L, N, P, S ou V
	X <sub>73</sub> X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (SEQ ID NO: 161), em que: X <sub>73</sub> é G, P, S ou V; X <sub>74</sub> é E ou V; X <sub>75</sub> é S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é R; X <sub>78</sub> é L, S ou W; X <sub>79</sub> é G, I, M, P, S ou V; e X <sub>80</sub> é G, L, N, P, S ou V

Core expandida 10C de consenso para CM	Subgênero da core expandida 10C de consenso para CM
	X <sub>73</sub> X <sub>74</sub> X <sub>75</sub> X <sub>76</sub> X <sub>77</sub> X <sub>78</sub> X <sub>79</sub> X <sub>80</sub> (SEQ ID NO: 162), em que: X <sub>73</sub> é G, P ou S; X <sub>74</sub> é E; X <sub>75</sub> é S; X <sub>76</sub> é K ou R; X <sub>77</sub> é R; X <sub>78</sub> é L ou W; X <sub>79</sub> é M; e X <sub>80</sub> é G, P ou S

[0021]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 1 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos AAPRS (SEQ ID NO: 163). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 1 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos AAPRSF (SEQ ID NO: 164).

[0022]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 2 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos SRRVP (SEQ ID NO: 165). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 2 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por QSRRVP (SEQ ID NO: 166), QTRRVVP (SEQ ID NO: 167), SRRVPL (SEQ ID NO: 168), SRRVPV (SEQ ID NO: 169), QSRRVPL (SEQ ID NO: 170), QSRRVPV (SEQ ID NO: 171), QTRRVPL (SEQ ID NO: 172) e QTRRVVPV (SEQ ID NO: 173).

[0023]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QSRRVP (SEQ ID NO: 166). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QTRRVVP (SEQ ID NO: 167). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SRRVPL (SEQ ID NO: 168). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SRRVPV (SEQ ID NO: 169). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QSRRVPL (SEQ ID NO: 170). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QSRRVPV (SEQ ID NO: 171). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QTRRVPL (SEQ ID NO: 172). Em algumas modalidades, a CM

compreende a sequência de aminoácidos QTRRVPV (SEQ ID NO: 173).

[0024]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 3 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos PPLGR (SEQ ID NO: 174). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 3 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por GPPLGR (SEQ ID NO: 175), SPPLGR (SEQ ID NO: 176), CGPPLGR (SEQ ID NO: 177), CSPPLGR (SEQ ID NO: 178), GGPPLGR (SEQ ID NO: 179), GSPPLGR (SEQ ID NO: 180), SGPPLGR (SEQ ID NO: 181), SSPPLGR (SEQ ID NO: 182), GCGPPLGR (SEQ ID NO: 183), GCSPPLGR (SEQ ID NO: 184), GGGPPLGR (SEQ ID NO: 185), GGSPPLGR (SEQ ID NO: 186), GSGPPLGR (SEQ ID NO: 187), GSSPPLGR (SEQ ID NO: 188), SCGPPLGR (SEQ ID NO: 189), SCSPPLGR (SEQ ID NO: 190), SGGPPLGR (SEQ ID NO: 191), SGSPPLGR (SEQ ID NO: 192), SSGPPLGR (SEQ ID NO: 193) e SSSPPLGR (SEQ ID NO: 194).

[0025]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPPLGR (SEQ ID NO: 175). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SPPLGR (SEQ ID NO: 176). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos CGPPLGR (SEQ ID NO: 177). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos CSPPLGR (SEQ ID NO: 178). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GGPPLGR (SEQ ID NO: 179). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GSPPLGR (SEQ ID NO: 180). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SGPPLGR (SEQ ID NO: 181). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SSPPLGR (SEQ ID NO: 182). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GCGPPLGR (SEQ ID NO: 183). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GCSPPLGR (SEQ ID NO: 184). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GGGPPLGR (SEQ ID NO:

185). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GGSPPLGR (SEQ ID NO: 186). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GSGPPLGR (SEQ ID NO: 187). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GSSPPLGR (SEQ ID NO: 188). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SCGPPLGR (SEQ ID NO: 189). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SCSPLGR (SEQ ID NO: 190). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SGGPPLGR (SEQ ID NO: 191). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SGSPPLGR (SEQ ID NO: 192). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SSGPPLGR (SEQ ID NO: 193). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SSSPPLGR (SEQ ID NO: 194).

[0026]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 4 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LRSGW (SEQ ID NO: 195). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 4 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por MLRSGW (SEQ ID NO: 196), MLRSGWR (SEQ ID NO: 197), MLRSGWRG (SEQ ID NO: 198), MLRSGWRL (SEQ ID NO: 199) e MLRSGWRS (SEQ ID NO: 200).

[0027]Em algumas modalidades, a CM compreende A sequência de aminoácidos MLRSGW, (SEQ ID NO: 196). Em algumas modalidades, a CM compreende A sequência de aminoácidos MLRSGWR (SEQ ID NO: 197). Em algumas modalidades, a CM compreende A sequência de aminoácidos MLRSGWRG (SEQ ID NO: 198). Em algumas modalidades, a CM compreende A sequência de aminoácidos MLRSGWRL (SEQ ID NO: 199). Em algumas modalidades, a CM compreende A sequência de aminoácidos MLRSGWRS (SEQ ID NO: 200).

[0028]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 5 de

consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos VSRSA (SEQ ID NO: 201). Em algumas modalidades, a CM compreende a uma sequência *core* expandida 5 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por IVSRSA (SEQ ID NO: 202), YIVSRSA (SEQ ID NO: 203) e QYIVSRSA (SEQ ID NO: 204).

[0029]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos IVSRSA (SEQ ID NO: 202). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos YIVSRSA (SEQ ID NO: 203). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QYIVSRSA (SEQ ID NO: 204).

[0030]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 6 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos ALRAP (SEQ ID NO: 205). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 6 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos RALRAP (SEQ ID NO: 206).

[0031]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 7 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos PAGRR (SEQ ID NO: 207). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 7 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por PAGRRS (SEQ ID NO: 208), PAGRRSL (SEQ ID NO: 209), VPAGRRS (SEQ ID NO: 210) e VPAGRRSL (SEQ ID NO: 211).

[0032]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PAGRRS (SEQ ID NO: 208). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PAGRRSL (SEQ ID NO: 209). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VPAGRRS (SEQ ID NO: 210). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VPAGRRSL (SEQ ID NO: 211).

[0033]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 8 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos GRSML (SEQ ID NO: 212). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core*

expandida 8 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por GRSMML (SEQ ID NO: 213), GRSMMLM (SEQ ID NO: 214), GRSMMLLG (SEQ ID NO: 215), GRSMMLLP (SEQ ID NO: 216), GRSMMLLS (SEQ ID NO: 217), GRSMMLMG (SEQ ID NO: 218), GRSMMLMP (SEQ ID NO: 219), GRSMMLMS (SEQ ID NO: 220), GRSMMLLGG (SEQ ID NO: 221), GRSMMLLPG (SEQ ID NO: 222), GRSMMLLSG (SEQ ID NO: 223), GRSMMLMGG (SEQ ID NO: 224), GRSMMLMPG (SEQ ID NO: 225), GRSMMLMSG (SEQ ID NO: 226), GRSMMLLGP (SEQ ID NO: 227), GRSMMLLPP (SEQ ID NO: 228), GRSMMLLSP (SEQ ID NO: 229), GRSMMLMGP (SEQ ID NO: 230), GRSMMLMPP (SEQ ID NO: 231), GRSMMLMSP (SEQ ID NO: 232), GRSMMLLGS (SEQ ID NO: 233), GRSMMLLPS (SEQ ID NO: 234), GRSMMLLSS (SEQ ID NO: 235), GRSMMLMGS (SEQ ID NO: 236), GRSMMLMPS (SEQ ID NO: 237) e GRSMMLMSS (SEQ ID NO: 238).

[0034]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMML (SEQ ID NO: 213). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLM (SEQ ID NO: 214). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLG (SEQ ID NO: 215). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLP (SEQ ID NO: 216). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLS (SEQ ID NO: 217). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMG (SEQ ID NO: 218). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMP (SEQ ID NO: 219). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMS (SEQ ID NO: 220). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLGG (SEQ ID NO: 221). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLPG (SEQ ID NO: 222). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLSG (SEQ ID NO: 223). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos



GRSMLMGG (SEQ ID NO: 224). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMPG (SEQ ID NO: 225). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMSG (SEQ ID NO: 226). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLLGP (SEQ ID NO: 227). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLLPP (SEQ ID NO: 228). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLLSP (SEQ ID NO: 229). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMGP (SEQ ID NO: 230). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMPP (SEQ ID NO: 231). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMSP (SEQ ID NO: 232). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLLGS (SEQ ID NO: 233). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLLPS (SEQ ID NO: 234). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLLSS (SEQ ID NO: 235). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMGS (SEQ ID NO: 236). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMPS (SEQ ID NO: 237). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMLMSS (SEQ ID NO: 238).

[0035]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 9 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LARAG (SEQ ID NO: 239). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 9 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por LARAGI (SEQ ID NO: 240), LARAGL (SEQ ID NO: 241), PLARAGI (SEQ ID NO: 242), PLARAGL (SEQ ID NO: 243), RPLARAGI (SEQ ID NO: 244) e RPLARAGL (SEQ ID NO: 245).

[0036]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de

aminoácidos LARAGI (SEQ ID NO: 240). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LARAGL (SEQ ID NO: 241). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PLARAGI (SEQ ID NO: 242). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PLARAGL (SEQ ID NO: 243). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLARAGI (SEQ ID NO: 244). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLARAGL (SEQ ID NO: 245).

[0037]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 10 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos ESRRW (SEQ ID NO: 246). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 10 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por ESRRWM (SEQ ID NO: 247), ESRRWMP (SEQ ID NO: 248) e PESRRWMP (SEQ ID NO: 249).

[0038]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos ESRRWM (SEQ ID NO: 247). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos ESRRWMP (SEQ ID NO: 248). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PESRRWMP (SEQ ID NO: 249).

[0039]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por ILPRSPAF (SEQ ID NO: 250), VAGRSMRP (SEQ ID NO: 251), VVPEGRRS (SEQ ID NO: 252), QGRAITFI (SEQ ID NO: 253), VLSKQMSF (SEQ ID NO: 254), LKGRSYYY (SEQ ID NO: 255), KRMPVQFL (SEQ ID NO: 256), PQHRIVSF (SEQ ID NO: 257), YKKFVGSL (SEQ ID NO: 258), HMMQYARH (SEQ ID NO: 259), IPFSWSRF (SEQ ID NO: 260), LSQARWRK (SEQ ID NO: 261), DISHWRRS (SEQ ID NO: 262), RKTQVHWW (SEQ ID NO: 263), RFYRNQFF (SEQ ID NO: 264), RSLVFAPI (SEQ ID NO: 265), RSPSRLKC (SEQ ID NO: 266) e RKMPNITV (SEQ ID NO: 267).

[0040]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de

aminoácidos ILPRSPAF (SEQ ID NO: 250). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VAGRSMRP (SEQ ID NO: 251). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VVPEGRRS (SEQ ID NO: 252). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QGRAITFI (SEQ ID NO: 253). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VLSKQMSF (SEQ ID NO: 254). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LKGRSYYY (SEQ ID NO: 255). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KRMPVQFL (SEQ ID NO: 256). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PQHRIVSF (SEQ ID NO: 257). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos YKKFVGSL (SEQ ID NO: 258). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos HMMQYARH (SEQ ID NO: 259). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos IPFSWSRF (SEQ ID NO: 260). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSQARWRK (SEQ ID NO: 261). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DISHWRRS (SEQ ID NO: 262). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RKTQVHWW (SEQ ID NO: 263\_). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RFYRNQFF (SEQ ID NO: 264). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RSLVFAPI (SEQ ID NO: 265). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RSPSRLKC (SEQ ID NO: 266). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RKMPNITV (SEQ ID NO: 267).

[0041]Em algumas modalidades, a CM inclui uma sequência motivo que é substrato para pelo menos uPA e/ou matriptase e inclui uma sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 10A-10J abaixo. Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui um subgênero, ou seja, um subconjunto da sequência *core* de

consenso para CM mostrada nas Tabelas 10A-10D abaixo.

Tabela 10A. Sequência *core* 11 de consenso para CM clivável por uPA e/ou

Matriptase

Core 11 de consenso para CM	Subgênero de <i>core</i> 11 de consenso para CM
<p>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> (SEQ ID NO: 268), em que:</p> <p>X<sub>87</sub> é D, I, L, R, S ou V;</p> <p>X<sub>88</sub> é C, G, H, I, K, N, R, S, T ou Y;</p> <p>X<sub>89</sub> é D, G ou S;</p> <p>X<sub>90</sub> é R;</p> <p>X<sub>91</sub> é F ou S;</p> <p>X<sub>92</sub> é A, D, G, H, I, L, T ou V;</p> <p>X<sub>93</sub> é H, I, N, R, S ou T; e</p> <p>X<sub>94</sub> é H, L, M, R, V ou Y</p>	<p>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> (SEQ ID NO: 269), em que: X<sub>87</sub> é D, L, S ou V; X<sub>88</sub> é C, G, N, R, S ou T; X<sub>89</sub> é D, G ou S; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é F ou S; X<sub>92</sub> é A, G, I, L, T ou V; X<sub>93</sub> é H, I, N ou S; e X<sub>94</sub> é H, M, R ou Y</p>
	<p>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> (SEQ ID NO: 270), em que: X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é G, H, K, N, S ou T; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A ou D; X<sub>93</sub> é N ou R; e X<sub>94</sub> é H ou Y</p>
	<p>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> (SEQ ID NO: 271), em que: X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é G, H, N ou S; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A ou D; X<sub>93</sub> é N; e X<sub>94</sub> é H</p>
	<p>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> (SEQ ID NO: 272), em que: X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é S; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A ou D; X<sub>93</sub> é N; e X<sub>94</sub> é H</p>
	<p>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> (SEQ ID NO: 273), em que: X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é G ou S; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A; X<sub>93</sub> é N; e X<sub>94</sub> é H</p>

Tabela 10B. Sequência *core* 12 de consenso para CM clivável por uPA e/ou Ma-

triptase

Core 12 de consenso para CM	Subgênero de <i>core</i> 12 de consenso para CM
<p>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> (SEQ ID NO: 274), em que:</p> <p>X<sub>99</sub> é D, I, L, R, S ou V;</p> <p>X<sub>100</sub> é C, G, H, I, K, N, R, S, T ou Y;</p>	<p>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> (SEQ ID NO: 275), em que: X<sub>99</sub> é L; X<sub>100</sub> é N, S ou T; X<sub>101</sub> é G; X<sub>102</sub> é R; X<sub>103</sub> é S; X<sub>104</sub> é A, D ou H; X<sub>105</sub> é N ou R; e X<sub>106</sub> é H, L, V ou Y</p>

Core 12 de consenso para CM	Subgênero de core 12 de consenso para CM
<p>X<sub>101</sub> é D, G ou S;  X<sub>102</sub> é R;  X<sub>103</sub> é F ou S;  X<sub>104</sub> é A, D, G, H, I, L, T ou V;  X<sub>105</sub> é H, I, N, R, S ou T; e  X<sub>106</sub> é H, L, M, R, V ou Y</p>	X <sub>99</sub> X <sub>100</sub> X <sub>101</sub> X <sub>102</sub> X <sub>103</sub> X <sub>104</sub> X <sub>105</sub> X <sub>106</sub> (SEQ ID NO: 276), em que: X <sub>99</sub> é L ou V; X <sub>100</sub> é G, H, K, N, S ou T; X <sub>101</sub> é G; X <sub>102</sub> é R; X <sub>103</sub> é S; X <sub>104</sub> é A ou D; X <sub>105</sub> é N ou R; e X <sub>106</sub> é H ou Y
	X <sub>99</sub> X <sub>100</sub> X <sub>101</sub> X <sub>102</sub> X <sub>103</sub> X <sub>104</sub> X <sub>105</sub> X <sub>106</sub> (SEQ ID NO: 277), em que: X <sub>99</sub> é L ou V; X <sub>100</sub> é G, H, N ou S; X <sub>101</sub> é G; X <sub>102</sub> é R; X <sub>103</sub> é S; X <sub>104</sub> é A ou D; X <sub>105</sub> é N; e X <sub>106</sub> é H
	X <sub>99</sub> X <sub>100</sub> X <sub>101</sub> X <sub>102</sub> X <sub>103</sub> X <sub>104</sub> X <sub>105</sub> X <sub>106</sub> (SEQ ID NO: 278), em que: X <sub>99</sub> é L ou V; X <sub>100</sub> é S; X <sub>101</sub> é G; X <sub>102</sub> é R; X <sub>103</sub> é S; X <sub>104</sub> é A ou D; X <sub>105</sub> é N; e X <sub>106</sub> é H
	X <sub>99</sub> X <sub>100</sub> X <sub>101</sub> X <sub>102</sub> X <sub>103</sub> X <sub>104</sub> X <sub>105</sub> X <sub>106</sub> (SEQ ID NO: 279), em que: X <sub>99</sub> é L; X <sub>100</sub> é N ou S; X <sub>101</sub> é G; X <sub>102</sub> é R; X <sub>103</sub> é S; X <sub>104</sub> é A ou D; X <sub>105</sub> é N ou R; e X <sub>106</sub> é H

Tabela 10C. Sequência core 31 de consenso para CM clivável por uPA e/ou

## Matriptase

Core 13 de consenso para CM	Subgênero de core 13 de consenso para CM
X <sub>111</sub> X <sub>112</sub> X <sub>113</sub> X <sub>114</sub> X <sub>115</sub> X <sub>116</sub> X <sub>117</sub> X <sub>118</sub> (SEQ ID NO: 280), em que: X <sub>111</sub> é C, G, H, L, P, R, S, T ou V; X <sub>112</sub> é I, L, M, N, S, T, V ou Y;	X <sub>111</sub> X <sub>112</sub> X <sub>113</sub> X <sub>114</sub> X <sub>115</sub> X <sub>116</sub> X <sub>117</sub> X <sub>118</sub> (SEQ ID NO: 281), em que: X <sub>111</sub> é C ou R; X <sub>112</sub> é I, S ou Y; X <sub>113</sub> é G ou R; X <sub>114</sub> é R ou S; X <sub>115</sub> é F, P ou S; X <sub>116</sub> é D, G ou H; X <sub>117</sub> é H ou N; e X <sub>118</sub> é H

Core 13 de consenso para CM	Subgênero de core 13 de consenso para CM
<p>X<sub>113</sub> é A, D, E, G, K, R ou V;  X<sub>114</sub> é A, C, G, H, L, R, S, T ou V;  X<sub>115</sub> é C, F, P, S, T, V ou Y;  X<sub>116</sub> é A, D, E, G, H, N, T, V ou Y;  X<sub>117</sub> é D, E, H, K, N, Q, R, S, T; e  X<sub>118</sub> é H, L, N, R, S, V ou Y</p>	<p>X<sub>111</sub>X<sub>112</sub>X<sub>113</sub>X<sub>114</sub>X<sub>115</sub>X<sub>116</sub>X<sub>117</sub>X<sub>118</sub> (SEQ ID NO: 282), em que: X<sub>111</sub> é R; X<sub>112</sub> é I; X<sub>113</sub> é G; X<sub>114</sub> é R; X<sub>115</sub> é S; X<sub>116</sub> é D ou H; X<sub>117</sub> é N; e X<sub>118</sub> é H</p>

Tabela 10D. Sequência core 14 de consenso para CM clivável por uPA e/ou

## Matriptase

Core 14 de consenso para CM	Subgênero de core 14 de consenso para CM
<p>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub>  (SEQ ID NO: 283), em que:  X<sub>123</sub> é L, R, T ou V;  X<sub>124</sub> é E, G, I, N, R ou S;  X<sub>125</sub> é G;  X<sub>126</sub> é R;  X<sub>127</sub> é P ou S;  X<sub>128</sub> é A, G ou Y;  X<sub>129</sub> é E, K, N ou Y; e  X<sub>130</sub> é P, Q ou S</p>	<p>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub> (SEQ ID NO: 284), em que: X<sub>123</sub> é L ou T; X<sub>124</sub> é E, R ou S; X<sub>125</sub> é G; X<sub>126</sub> é R; X<sub>127</sub> é P ou S; X<sub>128</sub> é A, G ou Y; X<sub>129</sub> é E ou N; e X<sub>130</sub> é P, Q ou S</p>
	<p>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub> (SEQ ID NO: 285), em que: X<sub>123</sub> é L, T ou V; X<sub>124</sub> é R ou S; X<sub>125</sub> é G; X<sub>126</sub> é R; X<sub>127</sub> é S; X<sub>128</sub> é A ou G; X<sub>129</sub> é K, N ou Y; e X<sub>130</sub> é P</p>
	<p>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub> (SEQ ID NO: 286), em que: X<sub>123</sub> é L ou T; X<sub>124</sub> é S; X<sub>125</sub> é G; X<sub>126</sub> é R; X<sub>127</sub> é S; X<sub>128</sub> é A ou G; X<sub>129</sub> é N; e X<sub>130</sub> é P</p>

[0042]Em algumas modalidades, a sequência motivo é substrato para pelo menos uPA e/ou matriptase e inclui uma sequência expandida de consenso com base em uma das sequências core de consenso para CM mostradas nas Tabelas 10A-10D. Em algumas modalidades, a sequência expandida de consenso é uma sequência de consenso mostrada nas Tabelas 11A-11D abaixo.

Tabela 11A. Sequência core expandida 11 de consenso para CM clivável por

## uPA e/ou matriptase

Core expandida 11 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 11 de consenso para CM
<p>X<sub>85</sub>X<sub>86</sub>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub>  X<sub>95</sub>X<sub>96</sub> (SEQ ID NO: 287), em que:</p> <p>X<sub>85</sub> é A, D, G, K, L, N, R, S, T ou V;  X<sub>86</sub> é A, G, K, M, P, Q, R, S ou T;  X<sub>87</sub> é D, I, L, R, S ou V;  X<sub>88</sub> é C, G, H, I, K, N, R, S, T ou Y;  X<sub>89</sub> é D, G ou S;  X<sub>90</sub> é R;  X<sub>91</sub> é F ou S;  X<sub>92</sub> é A, D, G, H, I, L, T ou V;  X<sub>93</sub> é H, I, N, R, S ou T;  X<sub>94</sub> é H, L, M, R, V ou Y;  X<sub>95</sub> é E, G, K, N, Q, R ou V; e  X<sub>96</sub> é A, G, K, L, Q, R ou S</p>	<p>X<sub>85</sub>X<sub>86</sub>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> X<sub>95</sub>X<sub>96</sub> (SEQ ID NO: 288), em que:</p> <p>X<sub>85</sub> é A, D, G, K, N, S ou V; X<sub>86</sub> é A, G, K, M, R, S ou T; X<sub>87</sub> é D, L, S ou V; X<sub>88</sub> é C, G, N, R, S ou T; X<sub>89</sub> é D, G ou S; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é F ou S; X<sub>92</sub> é A, G, I, L, T ou V; X<sub>93</sub> é H, I, N ou S; X<sub>94</sub> é H, M, R ou Y; X<sub>95</sub> é E, G, K ou R; e X<sub>96</sub> é K, R ou S</p>
	<p>X<sub>85</sub>X<sub>86</sub>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> X<sub>95</sub>X<sub>96</sub> (SEQ ID NO: 289), em que:</p> <p>X<sub>85</sub> é A, D, G, N, R ou T; X<sub>86</sub> é G, K, P, R, S ou T; X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é G, H, K, N, S ou T; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A ou D; X<sub>93</sub> é N ou R; X<sub>94</sub> é H ou Y; X<sub>95</sub> é E, K, N, Q ou R; e X<sub>96</sub> é A, K ou R</p>
	<p>X<sub>85</sub>X<sub>86</sub>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> X<sub>95</sub>X<sub>96</sub> (SEQ ID NO: 290), em que:</p> <p>X<sub>85</sub> é A, D, G ou R; X<sub>86</sub> é K, P, R ou T; X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é G, H, N ou S; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A ou D; X<sub>93</sub> é N; X<sub>94</sub> é H; X<sub>95</sub> é K, N ou R; e X<sub>96</sub> é A, K ou R</p>
	<p>X<sub>85</sub>X<sub>86</sub>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> X<sub>95</sub>X<sub>96</sub> (SEQ ID NO: 291), em que:</p> <p>X<sub>85</sub> é A ou D; X<sub>86</sub> é K, P ou R; X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é S; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A ou D; X<sub>93</sub> é N; X<sub>94</sub> é H; X<sub>95</sub> é K ou R; e X<sub>96</sub> é K ou R</p>

Core expandida 11 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 11 de consenso para CM
	<p>X<sub>85</sub>X<sub>86</sub>X<sub>87</sub>X<sub>88</sub>X<sub>89</sub>X<sub>90</sub>X<sub>91</sub>X<sub>92</sub>X<sub>93</sub>X<sub>94</sub> X<sub>95</sub>X<sub>96</sub> (SEQ ID NO: 292), em que:</p> <p>X<sub>85</sub> é D, G ou N; X<sub>86</sub> é K, R ou S; X<sub>87</sub> é L ou V; X<sub>88</sub> é G ou S; X<sub>89</sub> é G; X<sub>90</sub> é R; X<sub>91</sub> é S; X<sub>92</sub> é A; X<sub>93</sub> é N; X<sub>94</sub> é H; X<sub>95</sub> é K; e X<sub>96</sub> é K</p>

Tabela 11B. Sequência core expandida 12 de consenso para CM clivável por uPA e/ou matriptase

Core expandida 12 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 12 de consenso para CM
<p>X<sub>97</sub>X<sub>98</sub>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> X<sub>107</sub>X<sub>108</sub> (SEQ ID NO: 293), em que:</p> <p>X<sub>97</sub> é A, D, G, K, L, N, R, S, T ou V;  X<sub>98</sub> é A, G, K, M, P, Q, R, S ou T;  X<sub>99</sub> é D, I, L, R, S ou V;  X<sub>100</sub> é C, G, H, I, K, N, R, S, T ou Y;  X<sub>101</sub> é D, G ou S;  X<sub>102</sub> é R;  X<sub>103</sub> é F ou S;  X<sub>104</sub> é A, D, G, H, I, L, T ou V;  X<sub>105</sub> é H, I, N, R, S ou T;</p>	<p>X<sub>97</sub>X<sub>98</sub>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> X<sub>107</sub>X<sub>108</sub> (SEQ ID NO: 294), em que: X<sub>97</sub> é D, G, K ou R; X<sub>98</sub> é G, P ou R; X<sub>99</sub> é L; X<sub>100</sub> é N, S ou T; X<sub>101</sub> é G; X<sub>102</sub> é R; X<sub>103</sub> é S; X<sub>104</sub> é A, D ou H; X<sub>105</sub> é N ou R; X<sub>106</sub> é H, L, V ou Y; X<sub>107</sub> é E, G, K, N, Q ou R; e X<sub>108</sub> é A, G, K, L, Q ou R</p>
<p>X<sub>97</sub>X<sub>98</sub>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> X<sub>107</sub>X<sub>108</sub> (SEQ ID NO: 295), em que: X<sub>97</sub> é A, D, G, N, R ou T; X<sub>98</sub> é G, K, P, R, S ou T; X<sub>99</sub> é L ou V; X<sub>100</sub> é G, H, K, N, S ou T; X<sub>101</sub> é G; X<sub>102</sub> é R; X<sub>103</sub> é S; X<sub>104</sub> é A ou D; X<sub>105</sub> é N ou R; X<sub>106</sub> é H ou Y; X<sub>107</sub> é E, K, N, Q ou R; e X<sub>108</sub> é A, K ou R</p>	



Core expandida 12 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 12 de consenso para CM
<p>X<sub>106</sub> é H, L, M, R, V ou Y;  X<sub>107</sub> é E, G, K, N, Q, R ou V; e  X<sub>108</sub> é A, G, K, L, Q, R ou S</p>	<p>X<sub>97</sub>X<sub>98</sub>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> X<sub>107</sub>X<sub>108</sub>  (SEQ ID NO: 296), em que: X<sub>97</sub> é A, D, G ou R; X<sub>98</sub> é K, P, R ou T; X<sub>99</sub> é L ou V; X<sub>100</sub> é G, H, N ou S; X<sub>101</sub> é G; X<sub>102</sub> é R; X<sub>103</sub> é S; X<sub>104</sub> é A ou D; X<sub>105</sub> é N; X<sub>106</sub> é H; X<sub>107</sub> é K, N ou R; e X<sub>108</sub> é A, K ou R</p>
	<p>X<sub>97</sub>X<sub>98</sub>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> X<sub>107</sub>X<sub>108</sub>  (SEQ ID NO: 297), em que: X<sub>97</sub> é A ou D; X<sub>98</sub> é K, P ou R; X<sub>99</sub> é L ou V; X<sub>100</sub> é S; X<sub>101</sub> é G; X<sub>102</sub> é R; X<sub>103</sub> é S; X<sub>104</sub> é A ou D; X<sub>105</sub> é N; X<sub>106</sub> é H; X<sub>107</sub> é K ou R; e X<sub>108</sub> é K ou R</p>
	<p>X<sub>97</sub>X<sub>98</sub>X<sub>99</sub>X<sub>100</sub>X<sub>101</sub>X<sub>102</sub>X<sub>103</sub>X<sub>104</sub>X<sub>105</sub>X<sub>106</sub> X<sub>107</sub>X<sub>108</sub>  (SEQ ID NO: 298), em que: X<sub>97</sub> é G ou R; X<sub>98</sub> é P; X<sub>99</sub> é L; X<sub>100</sub> é N ou S; X<sub>101</sub> é G; X<sub>102</sub> é R; X<sub>103</sub> é S; X<sub>104</sub> é A ou D; X<sub>105</sub> é N ou R; X<sub>106</sub> é H; X<sub>107</sub> é K, Q ou R; e X<sub>108</sub> é A, K ou R</p>

Tabela 11C. Sequência core expandida 13 de consenso para CM clivável por uPA e/ou matriptase

Core expandida 13 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 13 de consenso para CM
<p>X<sub>109</sub>X<sub>110</sub>X<sub>111</sub>X<sub>112</sub>X<sub>113</sub>X<sub>114</sub>X<sub>115</sub>X<sub>116</sub>X<sub>117</sub>  X<sub>118</sub>X<sub>119</sub>X<sub>120</sub> (SEQ ID NO: 299), em que:  X<sub>109</sub> é A, D, G, H, I, K, N, R, S, T ou Y;</p>	<p>X<sub>109</sub>X<sub>110</sub>X<sub>111</sub>X<sub>112</sub>X<sub>113</sub>X<sub>114</sub>X<sub>115</sub>X<sub>116</sub>X<sub>117</sub>X<sub>118</sub>X<sub>119</sub>X<sub>120</sub> (SEQ ID NO: 300), em que: X<sub>109</sub> é N; X<sub>110</sub> é H ou R; X<sub>111</sub> é C ou R; X<sub>112</sub> é I, S ou Y; X<sub>113</sub> é G ou R; X<sub>114</sub> é R ou S; X<sub>115</sub> é F, P ou S; X<sub>116</sub> é D, G ou H; X<sub>117</sub> é H ou N; X<sub>118</sub> é H; X<sub>119</sub> é E, K, R ou V; e X<sub>120</sub> é A, G, Q, R ou W</p>

Core expandida 13 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 13 de consenso para CM
<p>X<sub>110</sub> é D, G, H, L, N, Q, R ou Y;</p> <p>X<sub>111</sub> é C, G, H, L, P, R, S, T ou V;</p> <p>X<sub>112</sub> é I, L, M, N, S, T, V ou Y;</p> <p>X<sub>113</sub> é A, D, E, G, K, R ou V;</p> <p>X<sub>114</sub> é A, C, G, H, L, R, S, T ou V;</p> <p>X<sub>115</sub> é C, F, P, S, T, V ou Y;</p> <p>X<sub>116</sub> é A, D, E, G, H, N, T, V ou Y;</p> <p>X<sub>117</sub> é D, E, H, K, N, Q, R, S, T;</p> <p>X<sub>118</sub> é H, L, N, R, S, V ou Y;</p> <p>X<sub>119</sub> é E, G, K, L, N, Q, R, S, V ou W; e</p> <p>X<sub>120</sub> é A, E, G, K, L, N, P, Q, R ou W</p>	<p>X<sub>109</sub>X<sub>110</sub>X<sub>111</sub>X<sub>112</sub>X<sub>113</sub>X<sub>114</sub>X<sub>115</sub>X<sub>116</sub>X<sub>117</sub>X<sub>118</sub>X<sub>119</sub>X<sub>120</sub>          (SEQ ID NO: 301), em que: X<sub>109</sub> é N; X<sub>110</sub> é H; X<sub>111</sub> é R; X<sub>112</sub> é I; X<sub>113</sub> é G; X<sub>114</sub> é R; X<sub>115</sub> é S; X<sub>116</sub> é D ou H; X<sub>117</sub> é N; X<sub>118</sub> é H; X<sub>119</sub> é R; e X<sub>120</sub> é G ou R</p>

Tabela 11D. Sequência core expandida 14 de consenso para CM clivável por uPA e/ou matriptase

Core expandida 14 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 14 de consenso para CM
<p>X<sub>121</sub>X<sub>122</sub>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>          X<sub>130</sub>X<sub>131</sub>X<sub>132</sub> (SEQ ID NO: 302), em que:</p> <p>X<sub>121</sub> é A, D, G, M, N, P, R ou T;</p> <p>X<sub>122</sub> é A, H, K, P, R ou S;</p> <p>X<sub>123</sub> é L, R, T ou V;</p>	<p>X<sub>121</sub>X<sub>122</sub>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub>X<sub>131</sub>X<sub>132</sub>          (SEQ ID NO: 303), em que: X<sub>121</sub> é M, N, P, R ou T; X<sub>122</sub> é A, P ou S; X<sub>123</sub> é L ou T; X<sub>124</sub> é E, R ou S; X<sub>125</sub> é G; X<sub>126</sub> é R; X<sub>127</sub> é P ou S; X<sub>128</sub> é A, G ou Y; X<sub>129</sub> é E ou N; X<sub>130</sub> é P, Q ou S; X<sub>131</sub> é E, K, R; e X<sub>132</sub> é E, G ou R</p>

Core expandida 14 de consenso para CM	Subgênero de core expandida 14 de consenso para CM
<p>X<sub>124</sub> é E, G, I, N, R ou S;</p> <p>X<sub>125</sub> é G;</p> <p>X<sub>126</sub> é R;</p> <p>X<sub>127</sub> é P ou S;</p> <p>X<sub>128</sub> é A, G ou Y;</p>	<p>X<sub>121</sub>X<sub>122</sub>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub>X<sub>131</sub>X<sub>132</sub> (SEQ ID NO: 304), em que: X<sub>121</sub> é G, N ou T; X<sub>122</sub> é A, P ou S; X<sub>123</sub> é L, T ou V; X<sub>124</sub> é R ou S; X<sub>125</sub> é G; X<sub>126</sub> é R; X<sub>127</sub> é S; X<sub>128</sub> é A ou G; X<sub>129</sub> é K, N ou Y; X<sub>130</sub> é P; X<sub>131</sub> é K ou R; e X<sub>132</sub> é D, G ou H</p>
<p>X<sub>129</sub> é E, K, N ou Y;</p> <p>X<sub>130</sub> é P, Q ou S;</p> <p>X<sub>131</sub> é E, K ou R; e</p> <p>X<sub>132</sub> é D, E, G, H ou R</p>	<p>X<sub>121</sub>X<sub>122</sub>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub>X<sub>131</sub>X<sub>132</sub> (SEQ ID NO: 305), em que: X<sub>121</sub> é T; X<sub>122</sub> é P ou S; X<sub>123</sub> é L ou T; X<sub>124</sub> é S; X<sub>125</sub> é G; X<sub>126</sub> é R; X<sub>127</sub> é S; X<sub>128</sub> é A ou G; X<sub>129</sub> é N; X<sub>130</sub> é P; X<sub>131</sub> é K ou R; e X<sub>132</sub> é G ou H</p>
	<p>X<sub>121</sub>X<sub>122</sub>X<sub>123</sub>X<sub>124</sub>X<sub>125</sub>X<sub>126</sub>X<sub>127</sub>X<sub>128</sub>X<sub>129</sub>X<sub>130</sub>X<sub>131</sub>X<sub>132</sub> (SEQ ID NO: 306), em que: X<sub>121</sub> é T; X<sub>122</sub> é S; X<sub>123</sub> é L ou T; X<sub>124</sub> é S; X<sub>125</sub> é G; X<sub>126</sub> é R; X<sub>127</sub> é S; X<sub>128</sub> é A ou G; X<sub>129</sub> é N; X<sub>130</sub> é P; X<sub>131</sub> é R; e X<sub>132</sub> é G</p>

[0043]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 11 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307) ou LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 11 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309), DRLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 310) ou NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311).

[0044]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos

DRLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 310). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311).

[0045] Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LNGRSDNH (SEQ ID NO: 313). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 12 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307), LNGRSDNH (SEQ ID NO: 313) e LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314). Em algumas modalidades, a sequência *core* expandida 12 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos é selecionada a partir do grupo constituído por DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309), DRLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 310), GPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 320), GPLNGRSDNHKK (SEQ ID NO: 321), GPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 322), GPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 323), GPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 324), GPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 325), GPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 326), GPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 327), GPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 328), RPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 329), RPLNGRSDNHKK (SEQ ID NO: 330), RPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 331), RPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 332), RPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 333), RPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 334), RPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 335), RPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 336), RPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 337), GPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 338), GPLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 339), GPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 340), GPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 341), GPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 342), GPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 343), GPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 344), GPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 345), GPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 346), RPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 347), RPLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 348), RPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 349), RPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 350), RPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 351),

RPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 352), RPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 353), RPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 354), RPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 355) e KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 356).

[0046]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DRLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 310). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 320). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHKK (SEQ ID NO: 321). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 322). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 323). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 324). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 325). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 326). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 327). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 328). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 329). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHKK (SEQ ID NO: 330). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 331). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 332). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 333). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 334). Em algumas modalidades, a CM compreende

a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 335). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 336). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 337). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 338). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 339). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 340). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 341). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 342). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 343). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 344). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 345). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 346). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 347). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 348). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 349). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 350). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 351). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 352). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 353). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 354). Em algumas

modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 355). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 356).

[0047]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 13 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos RIGRSDNH (SEQ ID NO: 357) ou RLGRSDNN (SEQ ID NO: 358). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 13 de consenso para a CM compreendendo a sequência de aminoácidos NHRIGRSDNHRR (SEQ ID NO: 359) ou TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 360).

[0048]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RIGRSDNH (SEQ ID NO: 357). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RLGRSDNN (SEQ ID NO: 358). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NHRIGRSDNHRR (SEQ ID NO: 359). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 360).

[0049]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 14 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por TSGRSANP (SEQ ID NO: 361), TSGRSGNP (SEQ ID NO: 362), LSGRSANP (SEQ ID NO: 363) e LSGRSGNP (SEQ ID NO: 364). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 14 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 365), TSTSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 366), TSLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 367) e TSLSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 368).

[0050]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSGRSANP (SEQ ID NO: 361). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSGRSGNP (SEQ ID NO: 362). Em algumas

modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSANP (SEQ ID NO: 363). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSGNP (SEQ ID NO: 364). Em algumas modalidades. Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos a CM compreende a sequência de aminoácidos TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 365). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSTSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 366). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 367). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos e TSLSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 368).

[0051]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por LSGRSENH (SEQ ID NO: 369), SIARSDNL (SEQ ID NO: 370), LSGRSVTQ (SEQ ID NO: 371), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308), LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314), LYGRSENN (SEQ ID NO: 374), RLGRSDNN (SEQ ID NO: 375), TSGRSANP (SEQ ID NO: 376), NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 377), PPSIARSDNLAN (SEQ ID NO: 378), TGLSGRSVTQTS (SEQ ID NO: 379), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311), KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 381), KNLYGRSENNGN (SEQ ID NO: 382), TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 383) e TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 384).

[0052]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSENH (SEQ ID NO: 369). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SIARSDNL (SEQ ID NO: 370). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSVTQ (SEQ ID NO: 371). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LYGRSENN (SEQ ID NO: 374). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RLGRSDNN



(SEQ ID NO: 375). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSGRSANP (SEQ ID NO: 376). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 377). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PPSIARSDNLAN (SEQ ID NO: 378). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TGLSGRSVTQTS (SEQ ID NO: 379). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 381). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KNLYGRSENNGN (SEQ ID NO: 382). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 383). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 384).

[0053]Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos duas proteases. Em algumas modalidades, pelo menos uma protease é matriptase ou uPA e pelo menos uma protease é selecionada a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7.

Tabela 7: Proteases e/ou enzimas exemplares

ADAMS, ADAMTS, p. ex., ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM17/TACE	Cisteína proteinases, p. x., Cruzipaina Legumaina Otubain-2  KLKs, p. ex.,  KLK4	Serina proteases, p. ex., Proteína C ativada Catepsina A Catepsina G Quimase Proteases de fatores de coagulação (p. ex., FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
---	---	---

ADAMDEC1	KLK5	
ADAMTS1	KLK6	Elastase
ADAMTS4	KLK7	Granzima B
ADAMTS5	KLK8	Guanidino benzoatase
	KLK10	HtrA1
Aspartato proteases, p. ex.,	KLK11	Elastase neutrofílica hu- mana
BACE	KLK13	Lactoferrina
Renina	KLK14	Marapsina
		NS3/4A
Aspártico catepsinas, p. ex.	Metaloproteinases, p. ex.,	PACE4
Catepsina D	Meprina	Plasmina
Catepsina E	Neprilisina	PSA
	PSMA	tPA
Caspases, p. ex.,	BMP-1	Trombina
Caspase 1		Triptase
Caspase 2	MMPs, p. ex.,	uPA
Caspase 3	MMP1	
Caspase 4	MMP2	Serina proteases
Caspase 5	MMP3	Transmembrana tipo II (TTSPs), p. ex.
Caspase 6	MMP7	DESC1
Caspase 7	MMP8	DPP-4
Caspase 8	MMP9	FAP
Caspase 9	MMP10	Hepsina
Caspase 10	MMP11	Matriptase-2
Caspase 14	MMP12	MT-SP1/matriptase

	MMP13	TMPRSS2
Cisteína catepsinas, p. ex.,	MMP14	TMPRSS3
Catepsina B	MMP15	TMPRSS4
Catepsina C	MMP16	
Catepsina K	MMP17	
Catepsina L	MMP19	
Catepsina S	MMP20	
Catepsina V/L2	MMP23	
Catepsina X/Z/P	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

[0054]Em algumas modalidades, o anticorpo está anexado pelo menos a uma primeira CM e uma segunda CM. Em algumas modalidades, a primeira CM e a segunda CM são polipeptídeos com no máximo 15 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, a primeira CM e a segunda CM no anticorpo no estado não clivado possuem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: Agente-CM1-CM2-(Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno), (Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno)-CM2-CM1-Agente, Agente-CM2-CM1-(Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno) ou (Anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno)-CM1-CM2-Agente. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um peptídeo de ligação entre o agente e CM1. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um peptídeo de ligação e CM2 e o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um peptídeo de ligação entre o agente e CM1 e um peptídeo de ligação entre CM2 e o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um peptídeo de ligação entre o agente e CM1 e um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui

um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2 e um peptídeo de ligação entre CM2 e o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o anticorpo inclui um peptídeo de ligação entre o agente e CM1, um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2 e um peptídeo de ligação entre CM2 e o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno.

[0055]Em algumas modalidades, o anticorpo inclui pelo menos uma primeira CM que inclui um substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e uma segunda CM que inclui uma sequência de substrato. Os substratos exemplares para a segunda CM (CM2) incluem, entre outros, substratos cliváveis por uma ou mais das enzimas ou proteases listadas na Tabela 7.

[0056]Em algumas modalidades, a CM2 é selecionada para o uso com uma protease específica. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir do grupo constituído por uma metaloprotease da matriz (MMP), uma elastase neutrofílica, uPA (também referida como ativador do plasminogênio U), legumafina, matriptase, trombina, uma cisteína protease como uma catépsina, ADAM17, BMP-1, HtrA1 e uma TMPRSS como TMPRSS3 ou TMPRSS4.

[0057]Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma elastase neutrofílica. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uPA. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para legumafina. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para matriptase. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para trombina. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma cisteína protease. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma catépsina. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para ADAM17. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para BMP-1. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para HtrA1. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma TMPRSS. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para TMPRSS3. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para TMPRSS4.

[0058] Por exemplo, a CM2 adequada é clivada por pelo menos uma protease e inclui a sequência TGRGPSWV (SEQ ID NO: 402); SARGPSRW (SEQ ID NO: 403); TARGPSFK (SEQ ID NO: 404); TARGPSW (SEQ ID NO: 405); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 406); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 407); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 408); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 409); AARGPAIH (SEQ ID NO: 411); RGPAFNPM (SEQ ID NO: 412); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 413); RGPATPIM (SEQ ID NO: 414); RGPA (SEQ ID NO: 415); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 416); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 417); VHMP LGFLGP (SEQ ID NO: 418); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 419); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 126); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 420); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 421); PLGL (SEQ ID NO: 422); GPRSFG (SEQ ID NO: 423) e/ou GPRSFG (SEQ ID NO: 424).

[0059] Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos TGRGPSWV (SEQ ID NO: 402). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SARGPSRW (SEQ ID NO: 403). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos TARGPSFK (SEQ ID NO: 404). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos TARGPSW (SEQ ID NO: 405). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 406). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GGWHTGRN (SEQ ID NO: 407). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos HTGRSGAL (SEQ ID NO: 408). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos PLTGRSGG (SEQ ID NO: 409). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos AARGPAIH (SEQ ID NO: 411). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos RGPAFNPM (SEQ ID NO: 412). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SSRGPAYL (SEQ ID NO: 413). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos RGPATPIM (SEQ ID NO: 414). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos RGPA (SEQ ID NO:

415). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 416). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 417). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos VHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 418). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SPLTGRSG (SEQ ID NO: 419). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 420). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SGGPLGVR (SEQ ID NO: 421). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos PLGL (SEQ ID NO: 422). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GPRSFG (SEQ ID NO: 423). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GPRSFG (SEQ ID NO: 424).

[0060]Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos uma MMP. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos uma MMP listada na Tabela 7. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para MMP9. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para MMP14. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para duas ou mais MMPs. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos MMP9 ou MMP14. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para duas ou mais MMPs. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos MMP9 e MMP14.

[0061]Em algumas modalidades, CM2 é substrato para uma MMP e inclui a sequência ISSGLLSS (SEQ ID NO: 425); QNQALRMA (SEQ ID NO: 426); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 427); STFPFGMF (SEQ ID NO: 428); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 429); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 430); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 431); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 432); WATPRPMR (SEQ ID NO: 433); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 434); LKAAPRWA (SEQ ID NO: 435); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 436); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 437); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 438); SPLPLRVP (SEQ ID

NO: 439); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 440); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 441); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 442); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 443), PAGLWLDL (SEQ ID NO: 444); e/ou ISSGLSS (SEQ ID NO: 445).

[0062]Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são a mesma protease, e a primeira CM e a segunda CM são substratos diferentes para a enzima. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são proteases diferentes. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem estão co-localizados no tecido-alvo. Em algumas modalidades, a primeira CM e a segunda CM são clivadas por pelo menos um agente de clivagem no tecido-alvo.

[0063]Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio (*non-prime side*) do sítio de clivagem da protease; ou seja, a CM compreende pelo menos os aminoácidos de P1 e P2 e, em algumas modalidades, compreende os aminoácidos de P1, P2 e P3 e, em algumas modalidades, compreende os aminoácidos de P1, P2, P3 e P4. Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio e o sítio principal do sítio de clivagem da protease. Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio, mas lhe falta pelo menos parte do sítio principal do sítio de clivagem da protease. Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio, mas lhe falta o sítio principal do sítio de clivagem da protease. Tal CM pode estar ligada diretamente ou mediante um ligador a um anticorpo ou outra molécula, como aqui descrito, tal como, entre outras, uma porção de detecção.

[0064]Em algumas modalidades, o agente conjugado ao anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno é um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o agente é um agente antineoplásico. Em algumas modalidades, o agente é uma toxina ou seu fragmento. Neste relatório descritivo, um fragmento de uma toxina é um fragmento que retém a atividade tóxica. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador clivável. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB

via um ligador que inclui ao menos uma sequência de substrato clivável como aqui descrita. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador não clivável. Em algumas modalidades, o agente é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o agente é um agente que danifica ácidos nucleicos, como um alquilante do DNA ou intercalante do DNA ou outro agente que danifica o DNA. Em algumas modalidades, o agente é um agente selecionado a partir do grupo listado listada na Tabela 3. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoides. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrol-benzodiazepina.

[0065]Em algumas modalidades, o agente é um agente anti-inflamatório.

[0066]Em algumas modalidades, o anticorpo também inclui uma porção detectável. Em algumas modalidades, a porção detectável é um agente diagnóstico.

[0067]Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado e/ou anticorpo conjugado ativável inclui uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável inclui um agente de imagem, um agente de contraste, uma enzima, uma marcação fluorescente, um cromóforo, um corante, um ou mais íons de metal ou uma marcação baseada em ligante. Em algumas modalidades, o agente de imagem compreende um radioisótopo. Em algumas modalidades, o radioisótopo é índio ou tecnécio. Em algumas modalidades, o agente de contraste compreende iodo, gadolínio ou óxido de ferro. Em algumas modalidades, a enzima compreende peroxidase do rábano, fosfatase alcalina ou  $\beta$ -galactosidase. Em algumas modalidades, a marcação



fluorescente compreende proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente azul (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha modificada (mRFP), proteína fluorescente vermelha tdímero2 (RFP tdímero2), HCRED ou um derivado do európio. Em algumas modalidades, a marcação luminescente compreende um derivado de N-metilacrídio. Em algumas modalidades, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor<sup>®</sup>, como Alex Fluor<sup>®</sup> 680 ou Alexa Fluor<sup>®</sup> 750. Em algumas modalidades, a marcação baseada em ligante compreende biotina, avidina, estreptavidina ou um ou mais haptenos.

[0068]Em algumas modalidades, o anticorpo contém naturalmente uma ou mais ligações dissulfeto. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno pode ser construído para incluir uma ou mais ligações dissulfeto.

[0069]Em algumas modalidades, o anticorpo e/ou anticorpo conjugado é monoespecífico. Em algumas modalidades, o anticorpo e/ou anticorpo conjugado é multiespecífico, p. ex., a título de exemplo não limitante, biespecífico ou trifuncional. Em algumas modalidades, o anticorpo e/ou anticorpo conjugado é formulado como parte de uma molécula pró-anticorpo ativador de células T biespecíficas (*pro-Bispecific T Cell Engager*, pro-BITE). Em algumas modalidades, o anticorpo e/ou anticorpo conjugado é formulado como parte de um pró-receptor quimérico de antígeno (pró-CAR) modificado de células T ou de outro construído.

[0070]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é monoespecífico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é multiespecífico, aqui referidos como anticorpos ativáveis multiespecíficos e/ou anticorpos conjugados ativáveis multiespecíficos. Neste relatório descritivo, termos como “anticorpo ativável” e todas as suas variações gramaticais, a menos que observado de outra forma, destinam-se a abranger, entre outras, modalidades em que o anticorpo ativável é um anticorpo ativável multiespecífico da invenção. Neste relatório descritivo, termos como “anticorpo conjugado ativável” e

todas as suas variações gramaticais, a menos que observado de outra forma, destinam-se a abranger, entre outras, modalidades em que o anticorpo conjugado ativável é um anticorpo conjugado ativável multiespecífico da invenção. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico e/ou anticorpo conjugado ativável multiespecífico é biespecífico ou trifuncional.

[0071]Em algumas modalidades, os anticorpos conjugados aqui descritos são utilizados em conjunto com um ou mais agentes adicionais ou uma combinação de agentes adicionais. Os agentes adicionais adequados incluem as terapias farmacêuticas e/ou as terapias cirúrgicas atuais para uma aplicação desejada, tal como, câncer. Por exemplo, os anticorpos conjugados podem ser utilizados em conjunto com um agente quimioterápico ou antineoplásico adicional.

[0072]Os substratos para matriptase e/ou uPA da invenção são úteis também em anticorpos ativáveis. Os anticorpos ativáveis aqui descritos em estado ativado ligam-se a um determinado alvo e incluem (i) um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB) que se liga especificamente ao alvo; (ii) uma porção de mascaramento (MM) que inibe a ligação do AB ao alvo em estado não clivado; e (c) uma porção clivável (CM) acoplado ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e/ou uPA.

[0073]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável no estado não clivado possui o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: MM-CM-AB ou AB-CM-MM.

[0074]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende um peptídeo de ligação entre a MM e a CM.

[0075]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

[0076]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2), em que o

anticorpo ativável no estado não clivado possui o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: MM-LP1-CM-LP2-AB ou AB-LP2-CM-LP1-MM.

[0077]Em algumas modalidades, os dois peptídeos de ligação não precisam ser idênticos entre si.

[0078]Em algumas modalidades, pelo menos um entre LP1 ou LP2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por  $(GS)_n$ ,  $(GGS)_n$ ,  $(GSGGS)_n$  (SEQ ID NO: 385) e  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 386), onde  $n$  é um número inteiro pelo menos igual a um.

[0079]Em algumas modalidades, pelo menos um entre LP1 ou LP2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por GSGG (SEQ ID NO: 387), GGSGG (SEQ ID NO: 388), GSGSG (SEQ ID NO: 389), GSGGG (SEQ ID NO: 390), GGSGG (SEQ ID NO: 391) e GSSSG (SEQ ID NO: 392).

[0080]Em algumas modalidades, LP1 compreende a sequência de aminoácidos GSSGGSGGSGGSG (SEQ ID NO: 393), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 394), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 395), GSSGGSGGSGGSGGGS (SEQ ID NO: 396), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO: 397) ou GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 398).

[0081]Em algumas modalidades, LP2 compreende a sequência de aminoácidos GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 399), GSSGT (SEQ ID NO: 400) ou GSSG (SEQ ID NO: 401).

[0082]Em algumas modalidades, o AB possui uma constante de dissociação no equilíbrio próxima ou inferior a 100 nM para a ligação ao alvo.

[0083]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a um alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento imunologicamente ativo que se liga ao alvo é um anticorpo monoclonal, anticorpo de domínio, de cadeia única, fragmento Fab, fragmento  $F(ab')_2$ , scFv, scab, dAb, anticorpo de cadeia pesada de domínio único ou anticorpo de cadeia leve de domínio único. Em algumas modalidades, tal anticorpo

ou seu fragmento imunologicamente que se liga ao alvo é um anticorpo monoclonal de camundongo, de outro roedor, quimérico, humanizado ou totalmente humano.

[0084]Em algumas modalidades, a MM possui uma constante de dissociação no equilíbrio para a ligação ao AB que é superior à constante de dissociação no equilíbrio do AB ao alvo.

[0085]Em algumas modalidades, a MM possui uma constante de dissociação no equilíbrio para a ligação ao AB que não é maior do que a constante de dissociação no equilíbrio do AB ao alvo.

[0086]Em algumas modalidades, a MM não interfere nem compete com o AB pela ligação alvo em estado clivado.

[0087]Em algumas modalidades, a MM é um polipeptídeo com entre 2 e 40 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, a MM é um polipeptídeo com até cerca de 40 aminoácidos de comprimento.

[0088]Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica da MM é diferente daquela de qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica da MM é no máximo 50% idêntica à de qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a sequência polipeptídica da MM é no máximo 40%, 30%, 25%, 20%, 15% ou 10% idêntica à de qualquer parceiro de ligação natural do AB.

[0089]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar a seu alvo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos duas vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0090]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar a seu alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos três vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0091]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar a seu alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos cinco vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0092]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar a seu alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos 10 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0093]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar a seu alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos 20 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0094]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar ao alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos 40 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0095]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar ao alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos 100 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0096]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar ao alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos 1000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0097]Em algumas modalidades, o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do AB para se ligar ao alvo tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida ao alvo é pelo menos 10.000 vezes maior do que a  $K_d$

do AB quando não acoplado à MM dirigida ao alvo.

[0098]Em algumas modalidades, a protease, ou seja, matriptase e/ou uPA, está colocalizada com o alvo em um tecido, e a protease cliva a CM no anticorpo ativável quando o anticorpo ativável é exposto à protease.

[0099]Em algumas modalidades, na presença do alvo, a MM reduz a capacidade do AB para se ligar ao alvo em pelo menos 90% quando a CM não é clivada, em comparação a quando a CM é clivada, ao ser analisado *in vitro* utilizando um ensaio de deslocamento de alvo, tal como, por exemplo, o ensaio descrito nas Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2009/025846 e WO 2010/081173.

[00100]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos duas vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado (ou seja, quando o anticorpo ativável está no estado clivado), o AB liga-se ao alvo.

[00101]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos cinco vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado (ou seja, quando o anticorpo ativável está no estado clivado), o AB liga-se ao alvo.

[00102]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos dez vezes maior do que constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado (ou seja, quando o anticorpo ativável está no estado clivado), o AB liga-se ao alvo.

[00103]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos 20 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado (ou seja, quando o anticorpo ativável está no estado clivado), o AB liga-se ao alvo.

[00104]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos 40 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se ao alvo.

[00105]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos 50 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se ao alvo.

[00106]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos 100 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se ao alvo.

[00107]Em algumas modalidades, a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável ao alvo é reduzida para que ocorra com uma constante de dissociação no equilíbrio pelo menos 200 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação ao alvo do AB não modificado, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se ao alvo.

[00108]Em algumas modalidades, a CM é um polipeptídeo com até 15

aminoácidos de comprimento.

[00109]Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos matriptase. Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos uPA. Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos matriptase e uPA.

[00110]Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA, e é resistente à clivagem por pelo menos outra protease. Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA, e é resistente à clivagem por pelo menos plasmina. Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA, e é resistente à clivagem por pelo menos o ativador do plasminogênio tecidual (tPA).

[00111]Em algumas modalidades, a CM é substrato para matriptase e/ou uPA e inclui uma sequência motivo que é reconhecida por matriptase e/ou uPA, desde que, para qualquer dada sequência motivo da invenção:

(i) a CM não compreenda qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos TGRGPSWV (SEQ ID NO: 402), SARGPSRW (SEQ ID NO: 403) ou TARGPSFK (SEQ ID NO: 404); e a CM não compreenda uma sequência de aminoácidos de consenso com base nessas sequências de aminoácidos, tal como, por exemplo, TARGPSW (SEQ ID NO: 405);

(ii) a CM não compreenda qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 406), GGWHTGRN (SEQ ID NO: 407), HTGRSGAL (SEQ ID NO: 408) ou PLTGRSGG (SEQ ID NO: 409); e a CM não compreenda uma sequência de aminoácidos de consenso com base nessas sequências de aminoácidos, tal como, por exemplo, LTGRSGA (SEQ ID NO: 410); e/ou

(iii) a CM não compreenda qualquer uma das seguintes sequências de aminoácidos AARGPAIH (SEQ ID NO: 411), RGPAFNPM (SEQ ID NO: 412), SSRGPAYL (SEQ ID NO: 413) ou RGPATPIM (SEQ ID NO: 414); e a CM não compreenda a sequência de aminoácidos de consenso com base nessas sequências de aminoácidos, tal como, por exemplo, RGPA (SEQ ID NO: 415).



[00112]Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui uma sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 8A-8J. Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui um subgênero, ou seja, um subconjunto da sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 8A-8J.

[00113]Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui uma sequência expandida de consenso com base em uma das sequências *core* de consenso para CM mostradas nas Tabelas 8A-8J. Em algumas modalidades, a sequência expandida de consenso é uma sequência de consenso mostrada nas Tabelas 9A-9J-3.

[00114]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 1 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos AAPRS (SEQ ID NO: 163). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 1 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos AAPRSF (SEQ ID NO: 164).

[00115]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 2 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos SRRVP (SEQ ID NO: 165). Em algumas modalidades, a CM compreende a uma sequência *core* expandida 2 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por QSRRVP (SEQ ID NO: 166), QTRRVP (SEQ ID NO: 167), SRRVPL (SEQ ID NO: 168), SRRVPV (SEQ ID NO: 169), QSRRVPL (SEQ ID NO: 170), QSRRVPV (SEQ ID NO: 171), QTRRVPL (SEQ ID NO: 172) e QTRRVPV (SEQ ID NO: 173).

[00116]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QSRRVP (SEQ ID NO: 166). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QTRRVP (SEQ ID NO: 167). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SRRVPL (SEQ ID NO: 168). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SRRVPV (SEQ ID NO: 169). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos

QSRRVPL (SEQ ID NO: 170). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QSRRVPV (SEQ ID NO: 171). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QTRRVPL (SEQ ID NO: 172). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QTRRVVPV (SEQ ID NO: 173).

[00117]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 3 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos PPLGR (SEQ ID NO: 174). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 3 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por GPPLGR (SEQ ID NO: 175), SPPLGR (SEQ ID NO: 176), CGPPLGR (SEQ ID NO: 177), CSPPLGR (SEQ ID NO: 178), GGPPLGR (SEQ ID NO: 179), GSPPLGR (SEQ ID NO: 180), SGPPLGR (SEQ ID NO: 181), SSPPLGR (SEQ ID NO: 182), GCGPPLGR (SEQ ID NO: 183), GCSPPLGR (SEQ ID NO: 184), GGGPPLGR (SEQ ID NO: 185), GGSPPLGR (SEQ ID NO: 186), GSGPPLGR (SEQ ID NO: 187), GSSPPLGR (SEQ ID NO: 188), SCGPPLGR (SEQ ID NO: 189), SCSPLGR (SEQ ID NO: 190), SGGPPLGR (SEQ ID NO: 191), SGSPPLGR (SEQ ID NO: 192), SSGPPLGR (SEQ ID NO: 193) e SSSPPLGR (SEQ ID NO: 194).

[00118]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPPLGR (SEQ ID NO: 175). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SPPLGR (SEQ ID NO: 176). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos CGPPLGR (SEQ ID NO: 177). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos CSPPLGR (SEQ ID NO: 178). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GGPPLGR (SEQ ID NO: 179). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GSPPLGR (SEQ ID NO: 180). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SGPPLGR (SEQ ID NO: 181). Em

algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SSPPLGR (SEQ ID NO: 182). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GCGPPLGR (SEQ ID NO: 183). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GCSPPLGR (SEQ ID NO: 184). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GGGPPLGR (SEQ ID NO: 185). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GGSPPLGR (SEQ ID NO: 186). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GSGPPLGR (SEQ ID NO: 187). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GSSPPLGR (SEQ ID NO: 188). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SCGPPLGR (SEQ ID NO: 189). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SCSPLGR (SEQ ID NO: 190). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SGGPPLGR (SEQ ID NO: 191). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SGSPPLGR (SEQ ID NO: 192). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SSGPPLGR (SEQ ID NO: 193). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SSSPPLGR (SEQ ID NO: 194).

[00119]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 4 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LRSGW (SEQ ID NO: 195). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 4 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por MLRSGW, (SEQ ID NO: 196), MLRSGWR, (SEQ ID NO: 197), MLRSGWRG, (SEQ ID NO: 198), MLRSGWRL, (SEQ ID NO: 199) e MLRSGWRS (SEQ ID NO: 200).

[00120]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos MLRSGW, (SEQ ID NO: 196). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos MLRSGWR (SEQ ID NO: 197). Em algumas modalidades,

a CM compreende a sequência de aminoácidos MLRSGWRG (SEQ ID NO: 198). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos MLRSGWRL (SEQ ID NO: 199). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos MLRSGWRS (SEQ ID NO: 200).

[00121]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 5 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos VSRSA (SEQ ID NO: 201). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 5 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por IVSRSA (SEQ ID NO: 202), YIVSRSA (SEQ ID NO: 203) e QYIVSRSA (SEQ ID NO: 204).

[00122]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos IVSRSA (SEQ ID NO: 202). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos YIVSRSA (SEQ ID NO: 203). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QYIVSRSA (SEQ ID NO: 204).

[00123]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 6 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos ALRAP (SEQ ID NO: 205). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 6 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos RALRAP (SEQ ID NO: 206).

[00124]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 7 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos PAGRR (SEQ ID NO: 207). Em algumas modalidades, a CM compreende a uma sequência *core* expandida 7 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por PAGRRS (SEQ ID NO: 208), PAGRRSL (SEQ ID NO: 209), VPAGRRS (SEQ ID NO: 210) e VPAGRRSL (SEQ ID NO: 211).

[00125]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PAGRRS (SEQ ID NO: 208). Em algumas modalidades, a CM compreende a

sequência de aminoácidos PAGRRSL (SEQ ID NO: 209). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VPAGRRS (SEQ ID NO: 210). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VPAGRRSL (SEQ ID NO: 211).

[00126]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 8 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos GRSMML (SEQ ID NO: 212). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 8 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por GRSMML (SEQ ID NO: 213), GRSMMLM (SEQ ID NO: 214), GRSMMLLG (SEQ ID NO: 215), GRSMMLLP (SEQ ID NO: 216), GRSMMLLS (SEQ ID NO: 217), GRSMMLMG (SEQ ID NO: 218), GRSMMLMP (SEQ ID NO: 219), GRSMMLMS (SEQ ID NO: 220), GRSMMLLGG (SEQ ID NO: 221), GRSMMLLPG (SEQ ID NO: 222), GRSMMLLSG (SEQ ID NO: 223), GRSMMLMGG (SEQ ID NO: 224), GRSMMLMPG (SEQ ID NO: 225), GRSMMLMSG (SEQ ID NO: 226), GRSMMLLGP (SEQ ID NO: 227), GRSMMLLPP (SEQ ID NO: 228), GRSMMLLSP (SEQ ID NO: 229), GRSMMLMGP (SEQ ID NO: 230), GRSMMLMPP (SEQ ID NO: 231), GRSMMLMSP (SEQ ID NO: 232), GRSMMLLGS (SEQ ID NO: 233), GRSMMLLPS (SEQ ID NO: 234), GRSMMLLSS (SEQ ID NO: 235), GRSMMLMGS (SEQ ID NO: 236), GRSMMLMPS (SEQ ID NO: 237) e GRSMMLMSS (SEQ ID NO: 238).

[00127]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMML (SEQ ID NO: 213). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLM (SEQ ID NO: 214). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLG (SEQ ID NO: 215). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLP (SEQ ID NO: 216). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLLS (SEQ ID NO: 217). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMG (SEQ ID NO: 218). Em algumas modalidades,

a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMP (SEQ ID NO: 219). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMS (SEQ ID NO: 220). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLGG (SEQ ID NO: 221). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLPG (SEQ ID NO: 222). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLSG (SEQ ID NO: 223). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMG (SEQ ID NO: 224). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMPG (SEQ ID NO: 225). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMSG (SEQ ID NO: 226). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLGP (SEQ ID NO: 227). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLPP (SEQ ID NO: 228). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLSP (SEQ ID NO: 229). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMPG (SEQ ID NO: 230). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMPP (SEQ ID NO: 231). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLMSP (SEQ ID NO: 232). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLGS (SEQ ID NO: 233). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLPS (SEQ ID NO: 234). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLSS (SEQ ID NO: 235). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLGS (SEQ ID NO: 236). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLPS (SEQ ID NO: 237). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GRSMMLSS (SEQ ID NO: 238).

[00128]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core 9*

de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LARAG (SEQ ID NO: 239). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 9 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por LARAGI (SEQ ID NO: 240), LARAGL (SEQ ID NO: 241), PLARAGI (SEQ ID NO: 242), PLARAGL (SEQ ID NO: 243), RPLARAGI (SEQ ID NO: 244) e RPLARAGL (SEQ ID NO: 245).

[00129]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LARAGI (SEQ ID NO: 240). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LARAGL (SEQ ID NO: 241). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PLARAGI (SEQ ID NO: 242). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PLARAGL (SEQ ID NO: 243). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLARAGI (SEQ ID NO: 244). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLARAGL (SEQ ID NO: 245).

[00130]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 10 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos ESRRW (SEQ ID NO: 246). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 10 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por ESRRWM (SEQ ID NO: 247), ESRRWMP (SEQ ID NO: 248) e PESRRWMP (SEQ ID NO: 249).

[00131]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos ESRRWM (SEQ ID NO: 247). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos ESRRWMP (SEQ ID NO: 248). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PESRRWMP (SEQ ID NO: 249).

[00132]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por ILPRSPAF (SEQ ID NO: 250), VAGRSMRP (SEQ ID NO: 251), VVPEGRRS (SEQ ID NO: 252), QGRAITFI (SEQ ID

NO: 253), VLSKQMSF (SEQ ID NO: 254), LKGRSYYY (SEQ ID NO: 255), KRMPVQFL (SEQ ID NO: 256), PQHRIVSF (SEQ ID NO: 257), YKKFVGSL (SEQ ID NO: 258), HMMQYARH (SEQ ID NO: 259), IPFSWSRF (SEQ ID NO: 260), LSQARWRK (SEQ ID NO: 261), DISHWRRS (SEQ ID NO: 262), RKTQVHWW (SEQ ID NO: 263), RFYRNQFF (SEQ ID NO: 264), RSLVFAPI (SEQ ID NO: 265), RSPSRLKC (SEQ ID NO: 266) e RKMPNITV (SEQ ID NO: 267).

[00133]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos ILPRSPAF (SEQ ID NO: 250). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VAGRSMRP (SEQ ID NO: 251). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VVPEGRRS (SEQ ID NO: 252). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos QGRAITFI (SEQ ID NO: 253). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos VLSKQMSF (SEQ ID NO: 254). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LKGRSYYY (SEQ ID NO: 255). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KRMPVQFL (SEQ ID NO: 256). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PQHRIVSF (SEQ ID NO: 257). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos YKKFVGSL (SEQ ID NO: 258). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos HMMQYARH (SEQ ID NO: 259). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos IPFSWSRF (SEQ ID NO: 260). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSQARWRK (SEQ ID NO: 261). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DISHWRRS (SEQ ID NO: 262). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RKTQVHWW (SEQ ID NO: 263\_). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RFYRNQFF (SEQ ID NO: 264). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RSLVFAPI (SEQ ID NO: 265). Em algumas modalidades, a



CM compreende a sequência de aminoácidos RSPSRLKC (SEQ ID NO: 266). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RKMPNITV (SEQ ID NO: 267).

[00134]Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui uma sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 10A-10D. Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui um subgênero, ou seja, um subconjunto da sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 10A-10D.

[00135]Em algumas modalidades, a sequência motivo inclui uma sequência expandida de consenso com base em uma das sequências *core* de consenso para CM mostradas nas Tabelas 10A-10D. Em algumas modalidades, a sequência expandida de consenso é uma sequência de consenso mostrada nas Tabelas 11A-11D.

[00136]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 11 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307) ou LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 11 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309), DRLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 310) ou NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311).

[00137]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DRLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 310). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311).

[00138]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LNGRSDNH (SEQ ID NO: 313). Em algumas

modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 12 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos LSGRSANH (SEQ ID NO: 307), LNGRSDNH (SEQ ID NO: 313) e LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 12 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309), DRLSGRSDNHHK (SEQ ID NO: 310), GPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 320), GPLNGRSDNHHK (SEQ ID NO: 321), GPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 322), GPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 323), GPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 324), GPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 325), GPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 326), GPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 327), GPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 328), RPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 329), RPLNGRSDNHHK (SEQ ID NO: 330), RPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 331), RPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 332), RPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 333), RPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 334), RPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 335), RPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 336), RPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 337), GPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 338), GPLSGRSDNHHK (SEQ ID NO: 339), GPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 340), GPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 341), GPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 342), GPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 343), GPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 344), GPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 345), GPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 346), RPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 347), RPLSGRSDNHHK (SEQ ID NO: 348), RPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 349), RPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 350), RPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 351), RPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 352), RPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 353), RPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 354), RPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 355) e KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 356).

[00139]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de

aminoácidos DRLSGRSANHHK (SEQ ID NO: 309). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos DRLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 310). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 320). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHKK (SEQ ID NO: 321). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 322). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 323). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 324). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 325). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 326). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 327). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 328). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHKA (SEQ ID NO: 329). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHKK (SEQ ID NO: 330). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHKR (SEQ ID NO: 331). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHQA (SEQ ID NO: 332). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHQK (SEQ ID NO: 333). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHQR (SEQ ID NO: 334). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHRA (SEQ ID NO: 335). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHRK (SEQ ID NO: 336). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLNGRSDNHRR (SEQ ID NO: 337). Em algumas

modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 338). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 339). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 340). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 341). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 342). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 343). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 344). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 345). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos GPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 346). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHKA (SEQ ID NO: 347). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHKK (SEQ ID NO: 348). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHKR (SEQ ID NO: 349). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHQA (SEQ ID NO: 350). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHQK (SEQ ID NO: 351). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHQR (SEQ ID NO: 352). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHRA (SEQ ID NO: 353). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHRK (SEQ ID NO: 354). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RPLSGRSDNHRR (SEQ ID NO: 355). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 356).

[00140]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 13

de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos RIGRSDNH (SEQ ID NO: 357) ou RLGRSDNN (SEQ ID NO: 358). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 13 de consenso para CM compreendendo a sequência de aminoácidos NHRIGRSDNHRR (SEQ ID NO: 359) ou TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 360).

[00141]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RIGRSDNH (SEQ ID NO: 357). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RLGRSDNN (SEQ ID NO: 358). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NHRIGRSDNHRR (SEQ ID NO: 359). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 360).

[00142]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* 14 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por TSGRSANP (SEQ ID NO: 361), TSGRSGNP (SEQ ID NO: 362), LSGRSANP (SEQ ID NO: 363) e LSGRSGNP (SEQ ID NO: 364). Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência *core* expandida 14 de consenso para CM compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 365), TSTSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 366), TSLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 367) e TSLSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 368).

[00143]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSGRSANP (SEQ ID NO: 361). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSGRSGNP (SEQ ID NO: 362). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSANP (SEQ ID NO: 363). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSGNP (SEQ ID NO: 364). Em algumas modalidades. Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos a CM compreende a sequência de

aminoácidos TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 365). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSTSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 366). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 367). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos e TSLSGRSGNPRG (SEQ ID NO: 368).

[00144]Em algumas modalidades, a CM compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por LSGRSENH (SEQ ID NO: 369), SIARSDNL (SEQ ID NO: 370), LSGRSVTQ (SEQ ID NO: 371), LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308), LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314), LYGRSENN (SEQ ID NO: 374), RLGRSDNN (SEQ ID NO: 375), TSGRSANP (SEQ ID NO: 376), NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 377), PPSIARSDNLAN (SEQ ID NO: 378), TGLSGRSVTQTS (SEQ ID NO: 379), NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311), KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 381), KNLYGRSENNGN (SEQ ID NO: 382), TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 383) e TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 384).

[00145]Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSENH (SEQ ID NO: 369). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos SIARSDNL (SEQ ID NO: 370). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSVTQ (SEQ ID NO: 371). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LSGRSGNH (SEQ ID NO: 308). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LTGRSDRH (SEQ ID NO: 314). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos LYGRSENN (SEQ ID NO: 374). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos RLGRSDNN (SEQ ID NO: 375). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSGRSANP (SEQ ID NO: 376). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 377). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos PPSIARSDNLAN (SEQ

ID NO: 378). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TGLSGRSVTQTS (SEQ ID NO: 379). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 311). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KGLTGRSDRHQA (SEQ ID NO: 381). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos KNLYGRSENNGN (SEQ ID NO: 382). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TLRLGRSDNNKN (SEQ ID NO: 383). Em algumas modalidades, a CM compreende a sequência de aminoácidos TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 384).

[00146]Em algumas modalidades, a CM é substrato para pelo menos duas proteases. Em algumas modalidades, pelo menos uma protease é selecionada a partir de matriptase e uPA, e pelo menos uma protease é selecionada a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7.

[00147]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui pelo menos uma primeira CM e uma a segunda CM. Em algumas modalidades, a primeira CM e a segunda CM são polipeptídeos com no máximo 15 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, a primeira CM e a segunda CM no anticorpo ativável possuem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue, no estado não clivado: MM-CM1-CM2-AB, AB-CM2-CM1-MM, MM-CM2-CM1-AB ou AB-CM1-CM2-MM. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um peptídeo de ligação entre MM e CM1. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um peptídeo de ligação entre CM2 e AB. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um peptídeo de ligação entre MM e CM1 e um peptídeo de ligação entre CM2 e AB. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um peptídeo de ligação entre MM e CM1 e um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2 e um peptídeo de

ligação entre CM2 e AB. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui um peptídeo de ligação entre MM e CM1, um peptídeo de ligação entre CM1 e CM2 e um peptídeo de ligação entre CM2 e AB.

[00148]Em algumas modalidades, a CM2 é selecionada para o uso com uma protease específica. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir do grupo constituído por um metaloprotease da matriz (MMP), uma elastase neutrofílica, uPA, legumaina, matriptase, trombina, uma cisteína protease, como uma catepsina, ADAM17, BMP-1, HtrA1 e um TMPRSS como TMPRSS3 ou TMPRSS4.

[00149]Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma elastase neutrofílica. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uPA. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para legumaina. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para matriptase. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para trombina. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma cisteína protease. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma catepsina. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para ADAM17. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para BMP-1. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para HtrA1. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para uma TMPRSS. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para TMPRSS3. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para TMPRSS4.

[00150]Por exemplo, a CM2 adequada é clivada por pelo menos uma protease e inclui a sequência TGRGPSWV (SEQ ID NO: 402); SARGPSRW (SEQ ID NO: 403); TARGPSFK (SEQ ID NO: 404); TARGPSW (SEQ ID NO: 405); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 406); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 407); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 408); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 409); AARGPAIH (SEQ ID NO: 411); RGPAFNPM (SEQ ID NO: 412); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 413); RGPATPIM (SEQ ID NO: 414); RGPA (SEQ ID NO: 415); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 416); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 417);



VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 418); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 419); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 126); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 420); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 421); PLGL (SEQ ID NO: 422); GPRSFG (SEQ ID NO: 423) e/ou GPRSFG (SEQ ID NO: 424).

[00151]Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos TGRGPSWV (SEQ ID NO: 402). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SARGPSRW (SEQ ID NO: 403). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos TARGPSFK (SEQ ID NO: 404). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos TARGPSW (SEQ ID NO: 405). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 406). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GGWHTGRN (SEQ ID NO: 407). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos HTGRSGAL (SEQ ID NO: 408). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos PLTGRSGG (SEQ ID NO: 409). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos AARGPAIH (SEQ ID NO: 411). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos RGPAFNPM (SEQ ID NO: 412). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SSRGPAYL (SEQ ID NO: 413). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos RGPATPIM (SEQ ID NO: 414). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos RGPA (SEQ ID NO: 415). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 416). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 417). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 418). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SPLTGRSG (SEQ ID NO: 419). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 420). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos SGGPLGVR (SEQ ID NO: 421). Em algumas

modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos PLGL (SEQ ID NO: 422). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GPRSFGL (SEQ ID NO: 423). Em algumas modalidades, a CM2 compreende a sequência de aminoácidos GPRSFG (SEQ ID NO: 424).

[00152]Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos uma MMP. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos uma MMP listada na Tabela 7. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para MMP9. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para MMP14. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para duas ou mais MMPs. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos MMP9 ou MMP14. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para duas ou mais MMPs. Em algumas modalidades, a CM2 é substrato para pelo menos MMP9 e MMP14.

[00153]Em algumas modalidades, CM2 é substrato para uma MMP e inclui a sequência ISSGLLSS (SEQ ID NO: 425); QNQALRMA (SEQ ID NO: 426); AQNLLGMV (SEQ ID NO: 427); STFPFGMF (SEQ ID NO: 428); PVGYTSSL (SEQ ID NO: 429); DWLYWPGI (SEQ ID NO: 430); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 431); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 432); WATPRPMR (SEQ ID NO: 433); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 434); LKAAPRWA (SEQ ID NO: 435); GPSHLVLT (SEQ ID NO: 436); LPGGLSPW (SEQ ID NO: 437); MGLFSEAG (SEQ ID NO: 438); SPLPLRVP (SEQ ID NO: 439); RMHLRSLG (SEQ ID NO: 440); LAAPLGLL (SEQ ID NO: 441); AVGLLAPP (SEQ ID NO: 442); LLAPSHRA (SEQ ID NO: 443), PAGLWLDP (SEQ ID NO: 444); e/ou ISSGLSS (SEQ ID NO: 445).

[00154]Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são a protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e a primeira CM e a segunda CM são substratos diferentes para a enzima. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são proteases diferentes, em que pelo menos uma protease é selecionada a partir de

matriptase e uPA. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem estão colocados no tecido-alvo. Em algumas modalidades, a primeira CM e a segunda CM são clivadas por pelo menos um agente de clivagem selecionado a partir de matriptase e uPA no tecido-alvo.

[00155]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é exposto e é clivado por uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, tal que, no estado ativado ou clivado, o anticorpo ativado inclui uma sequência de aminoácidos de cadeia leve que contém pelo menos uma parte da sequência de LP2 e/ou CM após a protease ter clivado a CM.

[00156]Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio do sítio de clivagem da protease; ou seja, a CM compreende pelo menos os aminoácidos de P1 e P2 e, em algumas modalidades, compreende os aminoácidos de P1, P2 e P3 e, em algumas modalidades, compreende os aminoácidos de P1, P2, P3 e P4. Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio e o sítio principal do sítio de clivagem da protease. Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio, mas lhe falta pelo menos parte do sítio principal do sítio de clivagem da protease. Em algumas modalidades, a CM compreende o subsítio, mas lhe falta o sítio principal do sítio de clivagem da protease. Tal CM pode ser ligada diretamente ou mediante um ligador a um anticorpo ou outra molécula, como aqui descrito, tal como, entre outros, uma porção de detecção.

[00157]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável 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 seu fragmento. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador. Em algumas modalidades, o ligador é um ligador clivável. Em algumas modalidades, o agente é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o agente é um agente que danifica ácidos nucleicos, como

um alquilante do DNA ou intercalante do DNA ou outro agente que danifica o DNA. Em algumas modalidades, o ligador é um ligador clivável. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador que inclui pelo menos uma sequência de substrato clivável por MMP. Em algumas modalidades, o agente é um agente selecionado a partir do grupo listado na Tabela 3. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoide. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrol-benzodiazepina.

[00158]Em algumas modalidades, o agente é um agente anti-inflamatório.

[00159]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável também inclui uma porção detectável. Em algumas modalidades, a porção detectável é um agente diagnóstico.

[00160]Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado inclui uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável inclui um agente de imagem, um agente de contraste, uma enzima, uma marcação fluorescente, um cromóforo, um corante, um ou mais íons de metal ou uma marcação baseada em ligante. Em algumas modalidades, o agente de imagem compreende um radioisótopo. Em algumas modalidades, o radioisótopo é índio ou tecnécio. Em algumas modalidades, o agente de contraste compreende iodo, gadolínio ou óxido de ferro. Em algumas modalidades, a enzima compreende peroxidase do rábano, fosfatase alcalina ou  $\beta$ -galactosidase. Em algumas modalidades, a marcação fluorescente compreende proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente azul (CFP), proteína

fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha modificada (mRFP), proteína fluorescente vermelha tdímero2 (RFP tdímero2), HCRED ou um derivado do európio. Em algumas modalidades, a marcação luminescente compreende um derivado de N-metilacrídio. Em algumas modalidades, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor®, como Alex Fluor® 680 ou Alexa Fluor® 750. Em algumas modalidades, a marcação baseada em ligante compreende biotina, avidina, estreptavidina ou um ou mais haptenos.

[00161]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável também inclui um peptídeo de sinalização. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinalização é conjugado ao anticorpo ativável via um espaçador. Em algumas modalidades, o espaçador é conjugado ao anticorpo ativável na ausência de um peptídeo de sinalização. Em algumas modalidades, o espaçador é unido diretamente à MM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o espaçador é unido diretamente à MM do anticorpo ativável no arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal: espaçador-MM-CM-AB. Um exemplo de espaçador unido diretamente ao N-terminal da MM do anticorpo ativável é QGQSGQ (SEQ ID NO: 446). Em algumas modalidades, o espaçador inclui pelo menos a sequência de aminoácidos QGQSGQ (SEQ ID NO: 446).

[00162]Em algumas modalidades, o AB do anticorpo ativável contém naturalmente uma ou mais ligações dissulfeto. Em algumas modalidades, o AB pode ser construído para incluir uma ou mais ligações dissulfeto.

[00163]Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é mais longa do que aquela do anticorpo correspondente; p. ex., a pK do anticorpo ativável é mais longa do que aquela do anticorpo correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é semelhante àquela do anticorpo correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 15 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 12 dias quando

administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 11 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 10 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 9 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 8 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 7 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 6 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 5 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 4 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 3 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 2 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 24 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 20 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 18 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 16 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 14 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 12 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 10 horas quando administrado a um organismo. Em

algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 8 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 6 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 4 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 3 horas quando administrado a um organismo.

[00164]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é monoespecífico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é multiespecífico, p. ex., a título de exemplo não limitante, biespecífico ou trifuncional. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é formulado como parte de uma molécula pró-anticorpo *Bispecific T Cell Engager* (BITE). Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é formulado como parte de um pró-receptor quimérico de antígeno (CAR) modificado de células T ou outro receptor construído.

[00165]A invenção também provê composições e métodos que incluem um anticorpo ativável, abrangendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB), que se liga especificamente a um dado alvo, em que o AB está acoplado a uma porção de mascaramento (MM) que diminui a capacidade do AB para se ligar a seu alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui ainda uma porção clivável (CM) que é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e uPA. As composições e métodos aqui providos possibilitam a ligação de um ou mais agentes a um ou mais resíduos de cisteína no AB sem comprometer a atividade (p. ex., a atividade de mascaramento, ativação ou ligação) do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, as composições e métodos aqui providos possibilitam a ligação de um ou mais agentes a um ou mais resíduos de cisteína no AB sem reduzir ou de outra forma perturbar uma ou mais ligações dissulfeto dentro da MM. As composições e

métodos aqui providos produzem um anticorpo ativável que é conjugado a um ou mais agentes, p. ex., qualquer um de uma variedade de agentes terapêuticos, diagnósticos e/ou profiláticos, por exemplo, em algumas modalidades, sem que qualquer um dos agentes fique conjugado à MM do anticorpo ativável. As composições e métodos aqui providos produzem anticorpos conjugados ativáveis, nos quais a MM retém a capacidade para mascarar de modo eficiente e eficaz o AB do anticorpo ativável em estado não clivado. As composições e métodos aqui providos produzem anticorpos conjugados ativáveis, nos quais o anticorpo ativável é ainda ativado, ou seja, clivado, na presença de uma protease, ou seja, matriptase e/ou uPA, que pode clivar a CM.

[00166]Os anticorpos ativáveis possuem ao menos um ponto de conjugação para um agente, porém, nos métodos e composições aqui providos, menos do que todos os pontos possíveis de conjugação estão disponíveis para conjugação a um agente. 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 entre cadeias. Em algumas modalidades, um ou mais pontos de conjugação são átomos de enxofre envolvidos em ligações sulfeto entre cadeias, mas não átomos de enxofre envolvidos em ligações dissulfeto intracadeia. Em algumas modalidades, um ou mais pontos de conjugação são átomos de enxofre de cisteína ou de outros resíduos de aminoácido contendo um átomo de enxofre. Tais resíduos podem ocorrer naturalmente na estrutura do anticorpo ou serem incorporados no anticorpo por mutagênese sítio-dirigida, conversão química ou erro na incorporação de aminoácidos não naturais.

[00167]Além disso, são providos métodos para preparar um conjugado de um anticorpo ativável contendo uma ou mais ligações dissulfeto entre cadeias no AB e uma ou mais ligações dissulfeto intracadeia na MM, sendo provido um fármaco reativo com tióis livres. O método em geral inclui reduzir parcialmente as ligações dissulfeto



entre cadeias no anticorpo ativável com um agente redutor, como, por exemplo, TCEP; e conjugar o fármaco reativo com tióis livres ao anticorpo ativável parcialmente reduzido. Neste relatório descritivo, o termo redução parcial refere-se a situações em que um anticorpo ativável é contatado com um agente redutor e menos do que todas as ligações dissulfeto, p. ex., menos do que todos os possíveis sítios 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 possíveis sítios de conjugação são reduzidos.

[00168]Em algumas modalidades, é provido um método para reduzir e conjugar um agente, p. ex., um fármaco, a um anticorpo ativável resultando em seletividade no posicionamento do agente. O método em geral inclui reduzir parcialmente o anticorpo ativável com um agente redutor tal que quaisquer sítios de conjugação na porção de mascaramento ou em outra parte não AB do anticorpo ativável não sejam reduzidas, e conjugar o agente a tióis entre cadeias no AB. O(s) sítio(s) de conjugação é/são selecionado(s) de modo que permita o posicionamento desejado de um agente e que ocorra a conjugação em um sítio desejado. O agente redutor é, por exemplo, TCEP. As condições da reação de redução, tais como, por exemplo, a razão de agente redutor para anticorpo ativável, a extensão da incubação, a temperatura durante a incubação, o pH da solução da reação redutora, etc., são determinadas identificando as condições que produzem um anticorpo conjugado ativável no qual a MM retém a capacidade para mascarar de modo eficiente e eficaz o AB do anticorpo ativável em estado não clivado. A razão de agente de redução para anticorpo ativável variará dependendo do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a razão de agente redutor para anticorpo ativável estará em uma faixa entre 20:1 e 1:1, entre 10:1 e 1:1, entre 9:1 e 1:1, entre 8:1 e 1:1, entre 7:1 e 1:1, entre 6:1 e 1:1, entre 5:1 e 1:1, entre 4:1 e 1:1, entre 3:1 e 1:1, entre 2:1 e 1:1, entre 20:1 e 1:1,5, entre 10:1 e 1:1,5, entre 9:1 e 1:1,5, entre 8:1 e 1:1,5, entre 7:1 e 1:1,5, entre 6:1 e 1:1,5, entre 5:1 e 1:1,5, entre 4:1

e 1:1,5, entre 3:1 e 1:1,5, entre 2:1 e 1:1,5, entre 1,5:1 e 1:1,5 ou entre 1:1 e 1:1,5. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 5:1 e 1:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 5:1 e 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 4:1 e 1:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 4:1 e 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 8:1 e 1:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 2,5:1 e 1:1.

[00169]Em algumas modalidades, é provido um método para reduzir as ligações dissulfeto entre cadeias no AB de um anticorpo ativável e conjugar um agente, p. ex., um agente contendo tiol tal como um fármaco, aos tióis resultantes entre cadeias e localizar seletivamente agente(s) no AB. O método em geral inclui reduzir parcialmente o AB com um agente redutor para formar pelo menos dois tióis entre cadeias sem formar quaisquer possíveis tióis intracadeia no anticorpo ativável; e conjugar o agente aos tióis entre cadeias do AB parcialmente reduzido. Por exemplo, o AB do anticorpo ativável é reduzido parcialmente por quase 1 hora a aproximadamente 37 °C, com uma razão desejada de agente redutor:anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a razão de agente redutor para anticorpo ativável estará em uma faixa entre 20:1 e 1:1, entre 10:1 e 1:1, entre 9:1 e 1:1, entre 8:1 e 1:1, entre 7:1 e 1:1, entre 6:1 e 1:1, entre 5:1 e 1:1, entre 4:1 e 1:1, entre 3:1 e 1:1, entre 2:1 e 1:1, entre 20:1 e 1:1,5, entre 10:1 e 1:1,5, entre 9:1 e 1:1,5, entre 8:1 e 1:1,5, entre 7:1 e 1:1,5, entre 6:1 e 1:1,5, entre 5:1 e 1:1,5, entre 4:1 e 1:1,5, entre 3:1 e 1:1,5, entre 2:1 e 1:1,5, entre 1,5:1 e 1:1,5 ou entre 1:1 e 1:1,5. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 5:1 e 1:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 5:1 e 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 4:1 e 1:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 4:1 e 1,5:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 8:1 e 1:1. Em algumas modalidades, a razão situa-se em uma faixa entre 2,5:1 e 1:1.

[00170]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 anticorpo ativável reduzido pode ser purificado antes da conjugação, utilizando, por exemplo, cromatografia em coluna, diálise ou diafiltração. Em algumas modalidades, o anticorpo reduzido não é purificado após a redução parcial e antes da conjugação.

[00171]A invenção também provê anticorpos ativáveis parcialmente reduzidos, nos quais pelo menos uma ligação dissulfeto entre cadeias no anticorpo ativável foi reduzida com um agente redutor sem perturbar quaisquer ligações dissulfeto intracadeia no anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação antígeno (AB) que se liga especificamente ao alvo, uma porção de mascaramento (MM) que inibe a ligação do AB do anticorpo ativável em estado não clivado ao alvo e uma porção clivável (CM) acoplada ao AB, em que a CM é um polipeptídeo que funciona como substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e uPA. Em algumas modalidades, a MM é acoplada ao AB via a CM. Em algumas modalidades, uma ou mais ligações dissulfeto intracadeia do anticorpo ativável não são perturbadas pelo agente redutor. Em algumas modalidades, um ou mais ligações dissulfeto intracadeia da MM dentro do anticorpo ativável não são perturbadas pelo agente redutor. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável no estado não clivado possui o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: MM-CM-AB ou AB-CM-MM. Em algumas modalidades, o agente redutor é TCEP.

[00172]A invenção também provê anticorpos conjugados ativáveis que incluem um anticorpo ativável ligado à carga útil de monometil auristatina D (MMAD), em que o anticorpo ativável inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB) que se liga especificamente a um alvo, uma porção de mascaramento (MM) que inibe a ligação do AB do anticorpo ativável em estado não clivado ao alvo e uma porção clivável (CM) acoplada ao AB, e a CM é um polipeptídeo que funciona como substrato

para pelo menos uma MMP protease.

[00173]Em algumas modalidades, o MMAD-anticorpo conjugado ativável pode ser conjugado utilizando qualquer um de diversos métodos para anexar agentes a ABs: (a) ligação às porções carboidrato do AB, (b) ligação a grupos sulfidril do AB, (c) ligação a grupos amino do AB ou (d) ligação a grupos carboxilato do AB.

[00174]Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada ao AB via um ligador. Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada a uma cisteína no AB via um ligador. Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada a uma lisina no AB via um ligador. Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada a outro resíduo do AB via um ligador, tal como aqueles resíduos aqui descritos. Em algumas modalidades, o ligador é um ligador contendo tiol. Em algumas modalidades, o ligador é um ligador clivável. Em algumas modalidades, o ligador é um ligador não clivável. Em algumas modalidades, o ligador é selecionado a partir do grupo constituído pelos ligadores mostrados nas Tabelas 5 e 6. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e a carga útil de MMAD são unidos via um ligador caproil maleimida-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e a carga útil de MMAD são unidos via um ligador maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e a carga útil de MMAD são unidos via um ligador caproil maleimida-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonila. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável e a carga útil de MMAD são unidos via um ligador maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonila. Em algumas modalidades, a carga útil de MMAD é conjugada ao AB utilizando a tecnologia de redução parcial e conjugação ora descrita.

[00175]A invenção também provê polipeptídeos e outras moléculas maiores que incluem uma ou mais sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas. A título de exemplo não limitante, as sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui

apresentadas e/ou as sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas são úteis em composições de pró-fármaco e seus métodos de uso. Essas sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas são úteis também em sondas e outros agentes de detecção e seus métodos de uso. Por exemplo, as sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou as sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas podem ser utilizadas em conjunto com derivados de flúor e outros supressores (*quenchers*) para produzir agentes de detecção, como agentes de imagem e/ou outros agentes diagnósticos. Os técnicos no assunto reconhecerão que as sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou as sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas são úteis em qualquer composição e/ou método na técnica que utiliza um substrato que seja clivável pela matriptase e/ou uPA.

[00176]Em algumas modalidades, os substratos para matriptase e/ou uPA da invenção são utilizados em moléculas maiores, por exemplo, polipeptídeos isolados que incluem pelo menos uma porção adicional (M) selecionada a partir do grupo constituído por (i) pelo menos uma porção que esteja localizada no amino (N) terminalmente à CM ( $M_N$ ), ou seja, em uma localização dentro da molécula maior que está situada mais perto do N-terminal da molécula maior do que a CM; (ii) pelo menos uma porção que esteja localizada na carboxila (C) terminalmente à CM ( $M_C$ ), ou seja, em uma localização dentro da molécula maior que está situada mais perto do C-terminal da molécula maior do que a CM; e (iii) combinações destes. Em algumas modalidades, a molécula maior inclui pelo menos uma  $M_N$  e pelo menos uma  $M_C$ .

[00177]A título de exemplos não limitantes, as  $M_N$  adequadas para uso nas moléculas maiores da invenção incluem pelo menos uma das seguintes: uma porção de mascaramento, um anticorpo, uma proteína, um agente terapêutico, um agente antineoplásico, um agente tóxico, um fármaco, uma porção detectável, um agente

diagnóstico, um *tag* (etiqueta) de afinidade e combinações destes.

[00178]A título de exemplos não limitantes, as Mc adequadas para uso nas moléculas maiores da invenção incluem pelo menos uma das seguintes: uma porção de mascaramento, um anticorpo, uma proteína, um agente terapêutico, um agente antineoplásico, um agente tóxico, um fármaco, uma porção detectável, um agente diagnóstico, um *tag* de afinidade e combinações destes.

[00179]A invenção também provê uma molécula de ácido nucleico isolado co-dificadora de uma molécula contendo CM da invenção, p. ex., um polipeptídeo contendo CM como, p. ex., uma sonda contendo CM, um anticorpo e/ou um anticorpo ativável ora descrito, bem como vetores que incluem sequências de ácidos nucleicos isolados. A invenção provê métodos para produzir polipeptídeos contendo CM pelo cultivo de uma célula em condições que levam à expressão do polipeptídeo contendo CM, em que a célula compreende tal vetor. A invenção provê métodos para produzir um anticorpo e/ou anticorpo ativável cultivando uma célula em condições que levam à expressão do anticorpo e/ou anticorpo ativável, em que a célula compreende tal vetor.

[00180]A invenção provê um método para fabricar um polipeptídeo contendo CM da invenção que se liga a um dado alvo, compreendendo (a) cultivar uma célula compreendendo uma construção de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo contendo CM em condições que levam à expressão do polipeptídeo, (i) em que o polipeptídeo inclui uma porção clivável (CM) e (ii) em que a CM é um polipeptídeo que funciona como substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA,; e (b) recuperar o polipeptídeo. Esses métodos podem também incluir a etapa adicional de (c) conjugar o polipeptídeo recuperado a um ou mais agentes adicionais.

[00181]A invenção provê um método para fabricar um anticorpo conjugado da invenção que se liga a um dado alvo, compreendendo (a) cultivar uma célula compreendendo uma construção de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo contendo CM

em condições que levam à expressão do anticorpo, (i) em que o anticorpo inclui uma porção clivável (CM) e (ii) em que a CM é um polipeptídeo que funciona como substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA,; (b) recuperar o anticorpo; e (c) conjugar o anticorpo recuperado a um ou mais agentes adicionais.

[00182]A invenção também provê um método para fabricar os anticorpos ativáveis da invenção que se liga, em estado ativado, a um dado alvo, compreendendo (a) cultivar uma célula compreendendo uma construção de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo contendo CM em condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável compreende uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) e um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB) que se liga especificamente ao alvo, (i) em que a CM é um polipeptídeo que funciona como substrato para uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA,; e (ii) em que a CM está posicionada no anticorpo ativável tal que, em estado não clivado, a MM interfere com a ligação específica do AB ao alvo e, em estado clivado, a MM não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo; e (b) recuperar o anticorpo ativável.

[00183]A invenção também provê métodos para produzir moléculas não polipeptídicas contendo CM, incluindo, a título de exemplos não limitantes, pró-fármacos, sondas não peptídicas, etc. Essas moléculas não polipeptídicas contendo CM podem ser criadas utilizando qualquer uma de várias técnicas reconhecidas no assunto, incluindo métodos padrões de síntese química e/ou conjugação.

[00184]A invenção provê métodos para prevenir, retardar a progressão, tratar, aliviar um sintoma ou de outra forma melhorar uma doença relacionada ao alvo em um sujeito, administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável aqui descritos a um sujeito com necessidade deste.

[00185]A invenção provê métodos para prevenir, retardar a progressão, tratar, aliviar um sintoma ou de outra forma melhorar a inflamação e/ou um transtorno inflamatório em um sujeito, administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável aqui descritos a um sujeito com necessidade deste. A invenção também provê métodos para prevenir, retardar a progressão, tratar, aliviar um sintoma ou de outra forma melhorar o câncer em um sujeito, administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável aqui descritos a um sujeito com necessidade deste. A invenção também provê métodos para prevenir, retardar a progressão, tratar, aliviar um sintoma ou de outra forma melhorar uma doença autoimune em um sujeito, administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável aqui descritos a um sujeito com necessidade deste.

[00186]Um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável utilizado em qualquer uma das modalidades desses métodos e usos pode ser administrado em qualquer estágio da doença. Por exemplo, tal anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável pode ser administrado a um paciente sofrendo de câncer em qualquer estágio, de precoce a metastático. Neste relatório descritivo, os termos sujeito e paciente são usados alternadamente.

[00187]Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero, como um humano, primata não humano, animal de companhia (p. ex., gato, cão, cavalo), animal agrícola, animal de trabalho ou animal de zoológico. Em algumas modalidades, o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um animal de companhia. Em algumas modalidades, o sujeito é um animal a cuidados de um veterinário.

[00188]O anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e suas formulações terapêuticas são administrados a um sujeito sofrendo ou



suscetível a uma doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade anormal do alvo. Um sujeito sofrendo ou suscetível a uma doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade anormal do alvo é identificado utilizando qualquer um de vários métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, sujeitos sofrendo de câncer ou de outra condição neoplásica são identificados qualquer um de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, tais como, exame físico e análise do sangue, da urina e/ou e das fezes para avaliar as condições de saúde. Por exemplo, sujeitos sofrendo de inflamação e/ou um transtorno inflamatório são identificados qualquer um de uma variedade de testes clínicos e/ou laboratoriais, tais como, exame físico e/ou análise de líquidos corporais, p. ex., do sangue, da urina e/ou das fezes para avaliar as condições de saúde.

[00189]A administração de um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável a um paciente sofrendo de uma doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade anormal do alvo é considerada bem sucedida se qualquer um de uma variedade de objetivos laboratoriais ou clínicos for alcançado. Por exemplo, a administração de um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável a um paciente sofrendo de uma doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade anormal do alvo é considerada bem sucedida se um ou mais dos sintomas associados com a doença ou transtorno forem aliviados, reduzidos, inibidos ou se não progredirem mais, ou seja, se não agravar o estado. A administração de um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável a um paciente sofrendo de uma doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade anormal do alvo é considerada bem sucedida se a doença ou transtorno entrar em remissão ou não progredir mais, ou seja, se não agravar o estado.

[00190]Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é administrado durante e/ou depois do tratamento

em combinação com um ou mais agentes adicionais como, por exemplo, um agente anti-inflamatório, um agente imunossupressor, e/ou um agente quimioterápico. Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e o(s) agente(s) adicional(is) e/são administrados simultaneamente. Por exemplo, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e o(s) agente(s) adicional(is) podem ser formulados em uma composição única ou administrados em duas ou mais composições separadas. Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e o(s) agente(s) adicional(is) são administrados sequencialmente, ou o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados e o agente adicional são administrados em momentos diferentes durante um regime de tratamento. Por exemplo, o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados são administrados antes da administração do agente adicional, o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados são administrados subsequentemente à administração do agente adicional, ou o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados e o agente adicional são administrados de modo alternado. Neste relatório descritivo, o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados e o agente adicional são administrados em doses únicas ou em doses múltiplas.

[00191]Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável é administrado durante e/ou depois do tratamento em combinação com um ou mais agentes adicionais tais como, a título de exemplo não limitante, um agente anti-inflamatório, um agente imunossupressor, um agente quimioterápico, como um agente alquilante, um antimetabólitos, um agente antimicrotúbulos, um inibidor da topoisomerase, um antibiótico citotóxico, e/ou qualquer outro agente que danifique ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o agente adicional é um taxano, como paclitaxel (p. ex., Abraxane®). Em algumas modalidades, o agente adicional é um antimetabólitos, como gencitabina. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente alquilante, como quimioterapia à base de platina, por

exemplo, carboplatina ou cisplatina. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente direcionado, como um inibidor de quinases, p. ex., sorafenibe ou erlotinibe. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente direcionado, como outro anticorpo, p. ex., um anticorpo monoclonal (p. ex., bevacizumabe), um anticorpo biespecífico ou um anticorpo multiespecífico. Em algumas modalidades, o agente adicional é um inibidor do proteassoma, como bortezomibe ou carfilzomibe. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente imunomodulador, como lenolidomida ou IL-2. Em algumas modalidades, o agente adicional é radiação. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente considerado padrão de cuidados pelos técnicos no assunto. Em algumas modalidades, o agente adicional é um agente quimioterápico bem conhecido pelos técnicos no assunto.

[00192]Em algumas modalidades, o agente adicional é um anticorpo, outro anticorpo conjugado, outro anticorpo ativável e/ou outro anticorpo conjugado ativável. Em algumas modalidades o agente adicional é um anticorpo, outro anticorpo conjugado, outro anticorpo ativável e/ou outro anticorpo conjugado ativável contra o mesmo alvo que o primeiro anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável. Em algumas modalidades o agente adicional é um anticorpo, outro anticorpo conjugado, outro anticorpo ativável e/ou outro anticorpo conjugado ativável contra um alvo diferente do alvo do primeiro anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou de um anticorpo conjugado ativável.

[00193]Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e o(s) agente(s) adicional(is) são administrados simultaneamente. Por exemplo, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e o(s) agente(s) adicional(is) podem ser formulados em uma composição única ou administrados em duas ou mais composições separadas. Em algumas modalidades, o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e o(s) agente(s) adicional(is) são administrados sequencialmente, ou o

anticorpo e/ou os anticorpos conjugados e o agente adicional são administrados em momentos diferentes durante um regime de tratamento. Por exemplo, o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados são administrados antes da administração do agente adicional, o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados são administrados subsequentemente à administração do agente adicional ou o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados e o agente adicional são administrados de modo alternado. Neste relatório descritivo, o anticorpo e/ou os anticorpos conjugados e o agente adicional são em doses únicas ou em doses múltiplas.

[00194]Em algumas modalidades, a CM está ligada ou de outra forma anexada a um anticorpo ativável que inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a um dado alvo acoplado a uma porção de mascaramento (MM), tal que o acoplamento da MM ao AB reduz a capacidade do anticorpo ou de seu fragmento de ligação a antígeno para se ligar ao alvo. Em algumas modalidades, a MM é acoplada via a CM. Os alvos exemplares incluem, entre outros, os alvos mostrados na Tabela 1. Os ABs exemplares incluem, entre outros, os alvos mostrados na Tabela 2. Os anticorpos ativáveis aqui providos estão estáveis na circulação, são ativados nos locais pretendidos para terapia e/ou diagnóstico, mas não no tecido normal, p. ex., sadio ou em outro tecido não visado para o tratamento e/ou diagnósticos e, quando ativados, exibem ligação ao alvo que é ao menos comparável à do anticorpo correspondente, não modificado.

[00195]A invenção também provê métodos e kits para utilizar os anticorpos conjugados, anticorpos ativáveis e/ou anticorpos conjugados ativáveis em uma variedade de indicações diagnósticas e/ou profiláticas.

[00196]Em algumas modalidades, a invenção provê métodos e kits para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem e um alvo de interesse em um sujeito ou uma amostra por meio de (i) contatar um sujeito ou amostra com um anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável compreende uma porção de

mascamamento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o anticorpo ativável, em estado não clivado, não ativado, compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; e (b) em que, em estado não clivado, não ativado, a MM interfere com a ligação específica do AB ao alvo e, em estado clivado, ativado, a MM não interfere nem compete com AB pela ligação específica ao alvo; e (ii) medir um nível de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra, em que um nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem e o alvo estão presentes no sujeito ou na amostra e em que nenhum nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na 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.

[00197]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual um agente terapêutico é conjugado. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00198]Em algumas modalidades desses métodos e kits, o anticorpo 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, uma marcação fluorescente, um cromóforo, um corante, um ou mais íons de metal ou uma marcação baseada em ligante. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de imagem 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 do rábano, fosfatase alcalina ou  $\beta$ -galactosidase. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação fluorescente compreende proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente azul (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha modificada (mRFP), proteína fluorescente vermelha tdímero2 (RFP tdímero2), HCRED ou um derivado do európio. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação luminescente compreende um derivado de N-metilacrídio. Em algumas modalidades desses métodos, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor®, como Alex Fluor® 680 ou Alexa Fluor® 750. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação baseada em ligante compreende biotina, avidina, estreptavidina ou um ou mais haptenos.

[00199]Em algumas modalidades desses métodos e kits, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades desses métodos, o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero não humano, como um primata não humano, animal de companhia (p. ex., gato, cão, cavalo), animal agrícola, animal de trabalho ou animal de zoológico. Em algumas modalidades, o sujeito é um roedor.

[00200]Em algumas modalidades desses métodos e kits, o método é um método *in vivo*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in situ*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *ex vivo*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in vitro*.

[00201]A invenção também provê métodos para detectar a presença ou

ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra por meio de (i) contatar um sujeito ou uma amostra biológica com uma sonda compreendendo uma porção clivável (CM) e uma marcação detectável que seja liberada ou ativada após a clivagem da CM; e (ii) medir um nível de marcação detectável no sujeito ou na amostra biológica. Quando tal liberação ou ativação aumenta a detecção da marcação (p. ex., estimula um sinal detectável), um nível detectável da marcação detectável no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está presente 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 ausente e/ou não está suficientemente presente no sujeito ou na amostra biológica em um nível detectável, tal que não se consegue detectar a clivagem pela protease da CM no sujeito ou na amostra biológica. Quando tal liberação ou ativação reduz a detecção da marcação, 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, tal que não se consegue detectar a clivagem pela protease da CM 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.

[00202]Em algumas modalidades desses métodos e kits, as sondas compreendendo CM incluem uma marcação detectável. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação detectável inclui um agente de imagem, um agente de contraste, uma enzima, uma marcação fluorescente, um cromóforo, um corante, um ou mais íons de metal ou uma marcação baseada em ligante. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de imagem 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 do rábano, fosfatase alcalina ou  $\beta$ -galactosidase. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação fluorescente compreende proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente azul (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha modificada (mRFP), proteína fluorescente vermelha tdímero2 (RFP tdímero2), HCRED, ou um derivado do európio. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação luminescente compreende um derivado de N-metilacrídio. Em algumas modalidades desses métodos, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor®, como Alex Fluor® 680 ou Alexa Fluor® 750. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação baseada em ligante compreende biotina, avidina, estreptavidina ou um ou mais haptenos.

[00203]Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in vivo*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in situ*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *ex vivo*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in vitro*.

[00204]Em algumas modalidades dos métodos e kits, o método é utilizado para identificar ou de outra forma refinar a população de pacientes adequados para o tratamento com um anticorpo ativável da invenção, seguido pelo tratamento administrando-se aquele anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável a um sujeito com necessidade desse tratamento. Por exemplo, pacientes com resultado positivo para o alvo e pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que cliva o substrato na porção clivável (CM) do anticorpo ativável testado utilizando esses métodos são identificados como candidatos adequados para o tratamento com tal anticorpo ativável compreendendo tal CM, e o paciente recebe então uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável que foi testado. Do mesmo modo, pacientes com resultado negativo para qualquer um ou ambos, o alvo e a protease, ou seja, matriptase e/ou uPA, que cliva o substrato na CM



no anticorpo ativável testado utilizando esses métodos, poderiam ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, tais pacientes podem ser testados com outros anticorpos ativáveis até que fosse identificado um anticorpo ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável compreendendo uma CM que seja clivada pelo paciente no local de doença). Em algumas modalidades, o paciente recebe então uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ativável e/ou conjugado para o qual o paciente obteve resultado positivo.

[00205]A invenção também provê polipeptídeos e outras moléculas maiores que incluem uma ou mais das sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou as sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas. A título de exemplo não limitante, sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas são úteis em composições de pró-fármaco e seus métodos de uso. Em algumas modalidades, o polipeptídeo compreende uma CM unida a um fármaco, como uma pequena molécula. Exemplos de fármacos são bem conhecidos na técnica. Essas sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas são também úteis em sondas e outros agentes de detecção e seus métodos de uso. Por exemplo, as sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou as sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas podem ser utilizadas em conjunto com derivados de flúor e outros supressores para produzir agentes de detecção, como agentes de imagem e/ou outros agentes diagnósticos. Os técnicos no assunto reconhecerão que as sequências de substrato cliváveis pela matriptase aqui apresentadas e/ou as sequências de substrato cliváveis pela uPA aqui apresentadas são úteis em qualquer composição e/ou método na técnica que utilizassem um substrato que seja clivável pela matriptase e/ou uPA.

[00206]Em algumas modalidades, os substratos para matriptase e/ou uPA da invenção são utilizados em moléculas maiores, por exemplo, polipeptídeos isolados que incluem ao menos uma porção adicional (M) selecionada a partir do grupo constituído por (i) pelo menos uma porção que esteja localizada no amino (N) terminalmente à CM ( $M_N$ ), ou seja, em uma localização dentro da molécula maior que esteja situada mais perto do N-terminal da molécula maior do que a CM; (ii) pelo menos uma porção que esteja localizada no carboxila (C) terminalmente à CM ( $M_C$ ), ou seja, em uma localização dentro da molécula maior que esteja situada mais perto do C-terminal da molécula maior do que a CM; e (iii) combinações destes. Em algumas modalidades, a molécula maior inclui pelo menos uma  $M_N$  e pelo menos uma  $M_C$ .

[00207]A título de exemplos não limitantes, as  $M_N$  adequadas para uso nas moléculas maiores da invenção incluem pelo menos um dos seguintes: uma porção de mascaramento, um anticorpo, uma proteína, um agente terapêutico, um agente antineoplásico, um agente tóxico, um fármaco, uma porção detectável, um agente diagnóstico, um *tag* de afinidade e combinações destes.

[00208]A título de exemplos não limitantes,  $M_C$  adequada para uso nas moléculas maiores da invenção incluem pelo menos uma das seguintes: uma porção de mascaramento, um anticorpo, uma proteína, um agente terapêutico, um agente antineoplásico, um agente tóxico, um fármaco, uma porção detectável, um agente diagnóstico, um *tag* de afinidade e combinações destes.

[00209]As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem incluir um anticorpo da invenção e um veículo. Essas composições farmacêuticas podem ser incluídas em kits, como, por exemplo, kits diagnósticos.

#### DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

[00210]A Figura 1 é uma série de gráficos representando a clivagem de um conjunto de SMP30 pela matriptase-1.

[00211]A Figura 2 é uma série de gráficos representando a clivagem de um

conjunto SMP17 pela matriptase-1 e a resistência à clivagem pela tPA.

[00212]A Figura 3 é uma série de gráficos representando a clivagem da sequência de substrato VAGRSMRP (SEQ ID NO: 251) pela matriptase-1.

[00213]As Figuras 4A e 4B são uma série de representações esquemáticas das plataformas de exibição de peptídeos, utilizadas nos exemplos de trabalho aqui fornecidos. A Figura 4A é uma representação esquemática da sequência da plataforma de exibição aqui designada como “Plataforma de Exibição CYTX-DP-XXXXXXXXX” ou “CYTX-DP-XXXXXXXXX” (SEQ ID NO: 694). A Figura 4B é uma representação esquemática da sequência da plataforma de exibição aqui designada como “Plataforma de Exibição SP-CYTX-DP-XXXXXXXXX” ou “SP-CYTX-DP-XXXXXXXXX” (SEQ ID NO: 695), onde SP-CYTX-DP-XXXXXXXXX é a plataforma CYTX-DP-XXXXXXXXX com um peptídeo de sinalização.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00214]A invenção provê sequências de aminoácidos que incluem uma porção clivável (CM) que é substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e ativador do plasminogênio U (uPA). Essas CMs são úteis em uma variedade de indicações terapêuticas, diagnósticas e profiláticas.

[00215]A invenção provê anticorpos que incluem um ou mais desses substratos cliváveis por matriptase e/ou substratos cliváveis por uPA. Por exemplo, esses substratos cliváveis por matriptase e/ou substratos cliváveis por uPA são úteis quando se conjugam anticorpos a um ou mais agentes adicionais para produzir anticorpos conjugados. Esses substratos cliváveis por matriptase e/ou substratos cliváveis por uPA são úteis em construções de anticorpos ativáveis.

[00216]Os anticorpos conjugados incluem um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a um alvo, e os anticorpos ativáveis incluem um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB) que se liga especificamente a um alvo. As classes exemplares de alvos de um anticorpo ou seu

fragmento de ligação a antígeno incluem, entre outras, receptores da superfície celular e as proteínas de ligação secretadas (p. ex., fatores de crescimento), enzimas solúveis, proteínas estruturais (p. Ex., colágeno, fibronectina) e os semelhantes. Em algumas modalidades, os anticorpos conjugados e/ou anticorpos ativáveis possuem um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga a um alvo extracelular, normalmente um alvo proteico extracelular. Em algumas modalidades, os anticorpos conjugados e/ou anticorpos ativáveis são projetados para captação celular e podem ser transferidos para o interior de uma célula.

[00217] Como exemplo não limitante, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno e/ou o AB de um anticorpo ativável é um parceiro de ligação para qualquer alvo listado na Tabela 1.

Tabela 1: Alvos exemplares

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
Integrina Alfa-4	CD56	DLK1	Hialuronidase	Lewis X	STEAP2
Integrina alfa-V	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
Alfa4beta1 integrina	CD70	DPP-4	IFN-alfa	LRP4	TAPA1
Integrina alfa-4 beta 7	CD71	DSG1	IFN-beta	LRRC26	TGF-beta
AGR2	CD74	EGFR	IFN-gama	MCSP	TIGIT
Anti-Lewis-Y		EGFRviii	IgE	Mesotelina	TIM-3
Receptor de apelina J	CD80	Receptor de endotelina B (ETBR)	Receptor de IgE (FcεRI)	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4

B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	Mucina-16 (MUC16, CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	Na/K ATPase	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	Elastase neutrófila	TLR8
Comple- mento C5	CD125	ERBB3	IL2	NGF	TLR9
C-242	CD132 (IL-2RG)	Proteína F do RSV	IL11	Nicastrina	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Receptores Notch	TNF-alfa
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR
Anidrase carbônica 9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12Rbeta1	Notch 2	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	Transfer- rina
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	Receptor de transfer- rina
CD11a	CEACAM5 (CEA)	Receptor de folato	IL18	OX-40	TRK-A

CD19	CEACAM6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	CLAUDIN-3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	uPAR
CD22	CLAUDIN-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (wsx1)	PDGFRalfa	VCAM-1
CD25	Colágeno	GITR	IL29	PDGFRbeta	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	Fosfatidil- serina	VEGF-D
CD38	CTGF	Receptores de GP IIb/IIIa	IL4R	P1GF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA	Receptor de insulina	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GPNMB	Ligantes Ja- gged	RAAG12	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	Esfingosina 1 fosfato	WISP-3
CD51	CYR61	hGH			

[00218] Como exemplo não limitante, o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno e/ou o AB de um anticorpo ativável é ou é derivado de um anticorpo listado

na Tabela 2.

Tabela 2: Fontes exemplares para Abs

Nome comercial do anticorpo (nome do anti-corpo)	Alvo
Avastin™ (bevacizumabe)	VEGF
Lucentis™ (ranibizumabe)	VEGF
Erbitux™ (cetuximabe)	EGFR
Vectibix™ (panitumumabe)	EGFR
Remicade™ (infliximabe)	TNF $\alpha$
Humira™ (adalimumabe)	TNF $\alpha$
Tysabri™ (natalizumabe)	Integrina $\alpha 4$
Simulect™ (basiliximabe)	IL2R
Soliris™ (eculizumabe)	Complemento C5
Raptiva™ (efalizumabe)	CD11a
Bexxar™ (tositumomabe)	CD20
Zevalin™ (ibritumomabe tiuxetano)	CD20
Rituxan™ (rituximabe)	CD20
Ocrelizumabe	CD20
Arzerra™ (ofatumumabe)	CD20
Obinutuzumabe	CD20
Zenapax™ (daclizumabe)	CD25
Adcetris™ (brentuximabe vedotina)	CD30
Myelotarg™ (gentuzumabe)	CD33
Mylotarg™ (gentuzumabe ozogamicina)	CD33
Campath™ (alantuzumabe)	CD52
ReoPro™ (abiximabe)	Receptor IIb/IIIa de glicoproteína
Xolair™ (omalizumabe)	IgE

Herceptin™ (trastuzumabe)	Her2
Kadcyla™ (trastuzumabe entansina)	Her2
Synagis™ (palivizumabe)	Proteína F do RSV
(ipilimumabe)	CTLA-4
(tremelimumabe)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(pertuzumabe)	Her2-neu
(ertumaxomabe)	CD3/Her2-neu
Orencia™ (abatacepte)	CTLA-4
(tanezumabe)	NGF
(bavituximabe)	Fosfatidilserina
(zalutumumabe)	EGFR
(mapatumumabe)	EGFR
(matuzumabe)	EGFR
(nimotuzumabe)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(edrecolomabe)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel™ (etanercepte)	TNF-R
Amevive™ (alefacepte)	1-92-LFA-3
Anril™, Kineret™ (ankinra)	IL-1Ra
GC1008	TGFbeta
	Notch, p. ex., Notch 1



	Jagged 1 ou Jagged 2
(adecatumumab)	EpCAM
(figitumumabe)	IGF1R
(tocilizumabe)	Receptor de IL-6
Stelara™ (ustequinumabe)	IL-12/IL-23
Prolia™ (denosumabe)	RANKL

[00219] Os anticorpos conjugados e/ou anticorpos ativáveis exemplares da invenção incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam ao receptor da interleucina 6 (IL-6R) e que incluem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que são, ou se derivam do anticorpo aqui referido como o anticorpo “Av1”, o qual se liga ao receptor da interleucina 6 (IL-6R). As sequências de aminoácidos para a cadeia pesada de Av1 e para a cadeia leve de Av1 são mostradas abaixo em SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 55, respectivamente.

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo Av1:

QVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIG  
YISYSGITTYNPSLKSRVTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLARTTAMD  
YWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP  
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK (SEQ ID NO: 447)

Sequência de aminoácidos da cadeia leve do anticorpo Av1:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS  
RLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQGNTLPYTFGQG TKVEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 448)

[00220]Os anticorpos conjugados e/ou anticorpos ativáveis exemplares da invenção incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam ao receptor da interleucina 6 (IL-6R) e que incluem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que são, ou se derivam, do anticorpo Av1 e uma porção de mascaramento. Os anticorpos conjugados e/ou anticorpos ativáveis exemplares da invenção incluem uma sequência de aminoácidos anexada ao N-terminal da cadeia leve de AV1. Essas sequências de aminoácidos N-terminais incluem, por exemplo, YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 449); QGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 450); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 451); QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 452); QGQSGQGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 453); ou QGQSGQMGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 454). Deverá também se reconhecer que tais sequências de aminoácidos podem ser anexadas ao N-terminal da cadeia pesada de AV1 ou ao C-terminal da cadeia pesada ou leve de AV1.

[00221]Os anticorpos ativáveis exemplares da invenção incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e que incluem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que são, ou se derivam, de um anticorpo selecionado a partir do grupo constituído pelo anticorpo aqui referido como o anticorpo “c225v5”, o anticorpo aqui referido como o anticorpo “c225v4” e o anticorpo aqui referido como o anticorpo “c225v6”, os quais se ligam todos ao EGFR. O anticorpo c225v5, o anticorpo c225v4 e o anticorpo c225v6 compartilham a mesma sequência de cadeia leve, aqui designada como “cadeia leve c225”. As sequências de aminoácidos para a cadeia pesada do anticorpo c225v5, do anticorpo c225v4 e do anticorpo c225v6 e a cadeia leve c225 são mostradas abaixo.

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo c225v5:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG

VIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEF  
 AYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
 PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMSHEALHNHYTQKS  
 LSLSPGK\* (SEQ ID NO: 455)

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo c225v4:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG  
 VIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEF  
 AYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
 PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMSHEALHNHYTQKS  
 LSLSPGK\* (SEQ ID NO: 456)

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo c225v6:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG  
 VIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEF  
 AYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
 PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMSHEALHNHYTQKS

LSLSPGK\* (SEQ ID NO: 457)

Sequência de aminoácidos da cadeia leve dos anticorpos c225:

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASE  
SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\* (SEQ ID  
NO: 458)

[00222]Os anticorpos ativáveis exemplares da invenção incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam ao EGFR, que incluem uma cadeia pesada e uma cadeia leve que são, ou se derivam, do anticorpo c225v5 e que incluem uma porção de mascaramento, um primeiro peptídeo de ligação, uma porção clivável e um segundo peptídeo de ligação. Em algumas modalidades, a cadeia pesada e/ou a cadeia leve incluem um peptídeo de sinalização. As sequências de aminoácidos da cadeia pesada e da cadeia leve para c225v5 sem o peptídeo de sinalização são mostradas acima em SEQ ID NO: 455 (cadeia pesada sem peptídeo de sinalização) e SEQ ID NO: 458 (cadeia leve sem peptídeo de sinalização). Em algumas modalidades, o anticorpo ativável anti-EGFR inclui uma combinação das sequências de aminoácidos mostradas em SEQ ID NO: 455, SEQ ID NO: 458 e/ou o ácido nucleico e as sequências de aminoácidos mostrados abaixo:

Sequência do ácido nucleico da cadeia pesada do anticorpo c225v5 com peptídeo de sinalização:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGT  
CACGAATTTCGCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCG  
AGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTAT  
GGCGTGCAATTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCG  
TGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGA  
GCATTAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAATGAACAGCCTGCA

AAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTATGATTA  
TGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCA  
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG  
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA  
CGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGC  
TGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC  
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA  
ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT  
GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC  
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG  
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA  
CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC  
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC  
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA  
CACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT  
GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG  
GCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG  
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG  
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 684)

Sublinhado: Peptídeo de sinalização

Sequência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo c225v5 com pep-  
tídeo de sinalização:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNY  
GVHWVRQSPGKGLEWLGVWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS  
QDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA

LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT  
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS  
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL  
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\* (SEQ ID NO: 685)

Sublinhado: Peptídeo de sinalização

Sequência do ácido nucleico da cadeia leve 3954-2787-c225 com peptídeo de  
sinalização:

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGT  
CACGAATTTCGCAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGG  
ACGGCCCATACGTCATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGG  
ATCCGGTACCTCCACCTCCGGCCGTTCCGCGAACCCGCGTGGTGGCAGTAGCG  
GTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGC  
GAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCA  
TTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGA  
GCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCAC  
CGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGATTATTAT  
TGCCAGCAGAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACCTGGA  
ACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA  
GCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC  
AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC  
CCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA  
GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC  
GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG  
AGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 686)

Sublinhado: Peptídeo de sinalização

Sequência de aminoácidos da cadeia leve 3954-2787-c225 com peptídeo de sinalização:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSQGQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGSGSGG  
SGSGSTSTSGRSANPRGGSSGTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH  
WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN  
NNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
SPVTKSFNRGEC\* (SEQ ID NO: 687)

Sublinhado: Peptídeo de sinalização

Sequência do ácido nucleico da cadeia leve 3954-2787-c225 (sem peptídeo de sinalização):

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGC  
CCATACGTCATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCG  
GTACCTCCACCTCCGGCCGTTCCGCGAACCCGCGTGGTGGCAGTAGCGGTACC  
CAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACG  
TGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTA  
TCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAA  
GCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTT  
ACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAG  
CAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAAGTAA  
ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT  
GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA  
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG  
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC  
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT  
CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT  
GTTAG (SEQ ID NO: 688)

Sequência de aminoácidos da cadeia leve 3954-2787-c225 (sem peptídeo de sinalização):

QQQSGQCISPRGCPDGPYVMYGSSGGSGGSGSGTSTSGRSANPRGGSS  
GTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGI  
PSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVF  
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY  
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\* (SEQ ID NO: 689)

[00223]Os anticorpos conjugados e/ou anticorpos ativáveis exemplares da invenção incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam a um alvo Jagged, p. ex., Jagged-1, Jagged-2 e/ou ambos, Jagged-1 e Jagged-2, e que incluem uma combinação de uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve que são, ou se derivam, das sequências variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve mostradas abaixo.

Sequência amino variável da cadeia leve Lc4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 459)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSA  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 460)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 461)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc5

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS



SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYHG  
QFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 462)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 463)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc7

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQ  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 464)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 465)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc8

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHIGRTNP  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 466)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc13

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 467)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc13

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 468)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc16

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 469)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPPYYG  
QFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 470)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc19

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 471)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc19

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFFGQ  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 472)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc21

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 473)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc21

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSA  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 474)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc24

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 475)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc24

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEEMGWQTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 476)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 477)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc26

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQM GWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSA  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 478)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc27

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 479)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc27

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQM GWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFYG  
QFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 480)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc28

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 481)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc28

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQM GWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPFFGQ

FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 482)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 483)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc30

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEEMGWQTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYAKSAAAFDYW  
GQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 484)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc31

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 485)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc31

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSA  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 486)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc32

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 487)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc32

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIDPEGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 488)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc37

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS

SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 489)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc37

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPHNG  
QFDYWGGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 490)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc39

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 491)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc39

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 492)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 493)

Sequência amino da cadeia pesada Hc40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQ  
FDYWGGGTLVTVSS (SEQ ID NO: 494)

Sequência amino variável da cadeia leve Lc47

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGQGGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 495)

Sequência amino variável da cadeia pesada Hc47

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIDEMGWQTEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 496)

Cadeia leve variável 4B2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTLDAPPQFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 497)

Cadeia pesada variável 4B2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSA  
FDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 498)

Cadeia leve variável 4D11

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 499)

Cadeia pesada variável 4D11

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAF  
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 500)

Cadeia leve variável 4E7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSLVAPLTFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 501)

Cadeia pesada variável 4E7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEEMGWQTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 502)

Cadeia leve variável 4E11

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQALDAPLMFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 503)

Cadeia pesada variável 4E11

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIEPMGQLTEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAF  
DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 504)

Cadeia leve variável 6B7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 505)

Cadeia pesada variável 6B7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIDEMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 506)

Cadeia leve variável 6F8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR  
(SEQ ID NO: 507)

Cadeia pesada variável 6F8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIDEMGWQTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDY  
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 508)

[00224]Os anticorpos conjugados e/ou anticorpos ativáveis exemplares da invenção incluem, por exemplo, anticorpos que se ligam a um alvo Jagged, p. ex., Jagged-1, Jagged-2 e/ou ambos, Jagged-1 e Jagged-2, e que incluem uma combinação

de uma região da cadeia pesada e uma região da cadeia leve que são, ou se derivam, das sequências de cadeia pesada e de cadeia leve mostradas abaixo.

Sequência de cadeia leve 4D11:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGQGKVEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID  
NO: 509)

Sequência de cadeia pesada 4D11:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAF  
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS  
LSLSPGK (SEQ ID NO: 510)

Sequência de cadeia pesada 4D11v2:

EVHLLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS  
SIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAF  
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS



LSLSPGK (SEQ ID NO: 511)

Sequência de cadeia leve 4D11v2:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS  
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTVVAPPLFGGQGTKVEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSTYLSSTLTLYKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID  
NO: 512)

[00225]Os anticorpos ativáveis aqui providos contêm pelo menos um anticorpo ou um fragmento do anticorpo (coletivamente referido como AB por toda a invenção) que se liga especificamente a um alvo, p. ex., um alvo humano, em que o AB é modificado por uma porção de mascaramento (MM).

[00226]Em algumas modalidades, a porção de mascaramento é selecionada para uso com um anticorpo específico ou fragmento do anticorpo. Por exemplo, as porções adequadas de mascaramento para uso com os anticorpos que se ligam EGFR abrangem MMs que incluem a sequência CISPRG (SEQ ID NO: 513). A título de exemplos não limitantes, a MM pode incluir uma sequência como CISPRGC (SEQ ID NO: 690) CISPRGCG (SEQ ID NO: 514); CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 515); CISPRGCPDGPYVM (SEQ ID NO: 516), CISPRGCEPGTYVPT (SEQ ID NO: 517) e CISPRGCPGQIWHPP (SEQ ID NO: 518). Outras porções adequadas de mascaramento incluem qualquer um dos mascaramentos específicos para EGFR descritos na Publicação PCT Nº WO 2010/081173, tais como, a título de exemplo não limitante, GSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 519); CISPRGCGGSSASQSGQGSHCLIPINMGAPSC (SEQ ID NO: 520); CNHHYFYTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 521); ADHVFWSYGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 522); CHHVVWGHCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 523); CPHFTTTSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 524); CNHHYHYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 525); CPHVSFGSCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 526);

CPYYTLSYCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 527); CNHVYFGTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 528); CNHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 529); CHHFTLTTCGCISPRGCPG (SEQ ID NO: 530); YNPCATPMCCISPRGCPG (SEQ ID NO: 531); CNHHYFYTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 532); CNHHYHYTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 533); CNHVYFGTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 534); CHHVYWGHC GCISPRGCG (SEQ ID NO: 535); CPHFTTTSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 536); CNHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 537); CHHFTLTTCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 538); CPYYTLSYCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 539); CPHVSFGSCGCISPRGCG (SEQ ID NO: 540); ADHVFWGSYGCISPRGCG (SEQ ID NO: 541); YNPCATPMCCISPRGCG (SEQ ID NO: 542); CHHVYWGHC GCISPRGCG (SEQ ID NO: 543); C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG (SEQ ID NO: 544); CISPRGCGQPIPSVK (SEQ ID NO: 545); CISPRGCTQPYHVS (SEQ ID NO: 546); e/ou CISPRGCNAVSGGLGS (SEQ ID NO: 547).

[00227]As porções adequadas de mascaramento para uso com os anticorpos que se ligam a um alvo Jagged, p. ex., Jagged 1 e/ou Jagged 2, abrangem, a título de exemplo não limitante, porções de mascaramento que incluem a uma sequência como QGQSGQCNIWLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 691); QGQSGQGQQWCNIWINGDCRGWNG (SEQ ID NO: 548); PWCMQRQDFLRCPQP (SEQ ID NO: 549); QLGLPAYMCTFECLR (SEQ ID NO: 550); CNLWVSGGDCGGLQG (SEQ ID NO: 551); SCSLWTSGSCLPHSP (SEQ ID NO: 552); YCLQLPHYMQAMCGR (SEQ ID NO: 553); CFLYSCTDVS YWNNT (SEQ ID NO: 554); PWCMQRQDYLRCPQP (SEQ ID NO: 555); CNLWISGGDCRGLAG (SEQ ID NO: 556); CNLWVSGGDCRGVQG (SEQ ID NO: 557); CNLWVSGGDCRGLRG (SEQ ID NO: 558); CNLWISGGDCRGLPG (SEQ ID NO: 559); CNLWVSGGDCRDAPW (SEQ ID NO: 560); CNLWVSGGDCRDLLG (SEQ ID NO: 561); CNLWVSGGDCRGLQG (SEQ ID NO: 562); CNLWLHGGDCRGWQG (SEQ ID NO: 563); CNIWLVLVGDCRGWQG (SEQ ID NO: 564); CTTWFCGGDCGVMRG

(SEQ ID NO: 565); CNIWGPSVDCGALLG (SEQ ID NO: 566); CNIWVNGGDCRSFEG (SEQ ID NO: 567); YCLNLPRYMQDMCWA (SEQ ID NO: 568); YCLALPHYMQADCAR (SEQ ID NO: 569); CFLYSCGDVSYWGSA (SEQ ID NO: 570); CYLYSCTDSAFWNNR (SEQ ID NO: 571); CYLYSCNDVSYWSNT (SEQ ID NO: 572); CFLYSCTDVSYW (SEQ ID NO: 573); CFLYSCTDVAYWNSA (SEQ ID NO: 574); CFLYSCTDVSYWGDT (SEQ ID NO: 575); CFLYSCTDVSYWGNS (SEQ ID NO: 576); CFLYSCTDVAYWNNT (SEQ ID NO: 577); CFLYSCGDVSYWGNPGLS (SEQ ID NO: 578); CFLYSCTDVAYWSGL (SEQ ID NO: 579); CYLYSCTDGSYWNST (SEQ ID NO: 580); CFLYSCSDVSYWGNI (SEQ ID NO: 581); CFLYSCTDVAYW (SEQ ID NO: 582); CFLYSCTDVSYWGST (SEQ ID NO: 583); CFLYSCTDVAYWGDT (SEQ ID NO: 584); GCNIWLNGGDCRGWVDPLQG (SEQ ID NO: 585); GCNIWLVGDCRGWIGDTNG (SEQ ID NO: 586); GCNIWLVGDCRGWIEDSNG (SEQ ID NO: 587); GCNIWANGGDCRGWIDNIDG (SEQ ID NO: 588); GCNIWLVGDCRGWLGEAVG (SEQ ID NO: 589); GCNIWLVGDCRGWLEEAVG (SEQ ID NO: 590); GGPALCNIWLNGGDCRGWSG (SEQ ID NO: 591); GAPVFCNIWLNGGDCRGWMG (SEQ ID NO: 592); GQQQWCNIWINGGDCRGWNG (SEQ ID NO: 593); GKSEFCNIWLNGGDCRGWIG (SEQ ID NO: 594); GTPGGCNIWANGGDCRGWEG (SEQ ID NO: 595); GASQYCNLWINGGDCRGWRG (SEQ ID NO: 596); GCNIWLVGDCRPFVVEGG (SEQ ID NO: 597); GCNIWAVGGDCRPFVDGG (SEQ ID NO: 598); GCNIWLNGGDCRAWVDTG (SEQ ID NO: 599); GCNIWIVGGDCRPFINDG (SEQ ID NO: 600); GCNIWLNGGDCRPVVFVG (SEQ ID NO: 601); GCNIWLSSGGDCRMFMNEG (SEQ ID NO: 602); GCNIWVNGGDCRSFVYSG (SEQ ID NO: 603); GCNIWLNGGDCRGWEASG (SEQ ID NO: 604); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 605); GCNIWLNGGDCRFTVASG (SEQ ID NO: 606); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (SEQ ID NO: 607); GFLENCNIWLNGGDCRTG (SEQ ID NO: 608); GIYENCNIWLNGGDCRMG (SEQ ID NO: 609); e/ou GIPDNCNIWINGGDCRYG (SEQ ID NO: 610).

[00228]As porções adequadas de mascaramento para uso com os anticorpos que se ligam um alvo da interleucina 6, p. ex., receptor da interleucina 6 (IL-6R), abrangem, a título de exemplo não limitante, porções de mascaramento que incluem uma sequência como QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 611); QGQSGQGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 612); QGQSGQMGPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 613); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 614); PGAFDIPFPAHWVPNT (SEQ ID NO: 615); ESSCVWNYVHIYMDC (SEQ ID NO: 616); YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 617); YRTCSWNYVGIFLDC (SEQ ID NO: 618); YGSCSWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 619); YGSCSWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 620); YGSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 621); YTSCNWNYSIFMDC (SEQ ID NO: 622); YPGCKWNYDRIFLDC (SEQ ID NO: 623); WRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 624); WSNCHWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 625); DRSCTWNYVRISYDC (SEQ ID NO: 626); SGSCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 627); SRSCIWNYAHIFLDC (SEQ ID NO: 628); SMSYCWQYERIFLDC (SEQ ID NO: 629); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 630); SGSCKWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 631); YKSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 632); YGSCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 633); FSSCNWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 634); WRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 635); YGSCQWNYVHIFLDC (SEQ ID NO: 636); YRSCNWNYSIFLDC (SEQ ID NO: 637); NMSCHWDYVHIFLDC (SEQ ID NO: 638); FGPCTWNYARISWDC (SEQ ID NO: 639); XXsCXWXYvhfXdc (SEQ ID NO: 640); MGVPAGCVWNYAHIFMDC (SEQ ID NO: 641); RDTGGQCRWDYVHIFMDC (SEQ ID NO: 642); AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 643); VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 644); DGGPAGCSWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 645); AVGPAGCWWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 646); CTWNYVHIFMDCGEGEGP (SEQ ID NO: 647); GGVPEGCTWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 648); AEVPAGCWWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 649); AGVPAGCTWNYVHIFMEC (SEQ ID NO: 650); SGASGGCKWNYVHIFMDC (SEQ ID NO: 651); TPGCRWNYVHIFMECEAL (SEQ ID

NO: 652); VGVPNGCVWNYAHIFMEC (SEQ ID NO: 653); PGAFDIPFPAHWVPNT (SEQ ID NO: 654); RGACDIPFPAHWIPNT (SEQ ID NO: 655); QGDFDIPFPAHWVPIT (SEQ ID NO: 656); XGafDIPFPAHWvPnT (SEQ ID NO: 657); RGDGNDSDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 658); SGVGRDRDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 659); WAGGNDCDIPFPAHWIPNT (SEQ ID NO: 660); WGDGMDVDIPFPAHWVPVT (SEQ ID NO: 661); AGSGNDSDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 662); ESRSGYADIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 663); e/ou RECGRCGDIPFPAHWVPRT (SEQ ID NO: 664).

[00229]Quando o AB é modificado com uma MM e está na presença do alvo, a ligação específica do AB a seu alvo é reduzida ou inibida, quando comparada à ligação específica do AB não modificado com uma MM ou a ligação específica do AB original ao alvo.

[00230]A  $K_d$  do AB modificado com uma MM dirigida ao alvo é pelo menos igual ou superior a 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 entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB não modificado com uma MM ou do AB original dirigida ao alvo. Por outro lado, a afinidade de ligação do AB modificado com uma MM dirigida ao alvo é pelo menos igual ou superior a 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000, 500.000, 1.000.000, 5.000.000, 10.000.000, 50.000.000, ou entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes

menor do que a afinidade de ligação do AB não modificado com uma MM ou do AB original dirigida ao alvo.

[00231]A constante de dissociação ( $K_d$ ) da MM dirigida ao AB é em geral superior à  $K_d$  do AB dirigida ao alvo. A  $K_d$  da MM dirigida 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 mesmo 10.000.000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB dirigida ao alvo. Por outro lado, a afinidade de ligação da MM dirigida ao AB é em geral menor do que a afinidade de ligação do AB dirigida ao alvo. A afinidade de ligação de MM dirigida 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 mesmo 10.000.000 vezes menor do que a afinidade de ligação do AB dirigida ao alvo.

[00232]Quando o AB é modificado com uma MM e está na presença do alvo, a ligação específica do AB a seu alvo é reduzida ou inibida, quando comparada à ligação específica do AB não modificado com uma MM ou a ligação específica do AB original ao alvo. Em comparação à ligação do AB não modificado com uma MM ou a ligação do AB original ao alvo, a capacidade do AB para se ligar ao 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 mesmo 100% 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 medida *in vivo* ou em um ensaio *in vitro*.

[00233]A MM inibe a ligação do AB ao alvo. A MM liga-se ao domínio de ligação a 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 a seu alvo. Nessas modalidades, quando o AB é modificado ou acoplado a uma MM e na presença de alvo, não há ligação ou substancialmente nenhuma ligação do AB ao alvo, ou no máximo 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, quando

comparada à ligação do AB não modificado com um MM, o AB original, ou do 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 por mais tempo quando medida *in vivo* ou em um ensaio *in vitro*.

[00234]Quando um AB é acoplado ou modificado por uma MM, a MM máscara ou reduz ou do contrário inibe a ligação específica do AB ao alvo. Quando AB é acoplado ou modificado por uma MM, tal acoplamento ou modificação pode ter como efeito uma alteração estrutural que reduz ou inibe a capacidade do AB para se ligar especificamente a seu alvo.

[00235]Um AB acoplado ou modificado com uma MM pode ser representado pelas fórmulas a seguir (na ordem de região amino (N) para região carboxila (C) terminal:

(MM)-(AB)

(AB)-(MM)

(MM)-L-(AB)

(AB)-L-(MM)

onde MM é uma porção de mascaramento, o AB é um anticorpo ou fragmento do anticorpo e L é um ligador. Em muitas modalidades, pode ser desejável inserir um ou mais ligadores, p. ex., ligadores flexíveis, na composição de modo a conferir flexibilidade.

[00236]Em certas modalidades, a MM não é um parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não contém homologia, ou substancialmente nenhuma, a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80% semelhante a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%,

45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 25% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 50% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 20% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 10% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB.

[00237]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis incluem um AB que é modificado por uma MM e também incluem uma ou mais porções cliváveis (CM). Tais anticorpos ativáveis exibem ligação ativável/alternável ao alvo do AB. Os anticorpos ativáveis em geral incluem um anticorpo ou fragmento do anticorpo (AB), modificado ou acoplado a uma porção de mascaramento (MM) e uma porção modificável ou clivável (CM). Em algumas modalidades, a CM contém uma sequência de aminoácidos que serve como substrato para pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e uPA.

[00238]Os elementos dos anticorpos ativáveis são arranjados de modo que a MM e a CM estejam posicionadas para que, em estado clivado (ou relativamente ativo) e na presença de um alvo, o AB liga-se a um alvo enquanto que, em estado não clivado (ou relativamente inativo) na presença do alvo, a ligação específica do AB a seu alvo é reduzida ou inibida. A ligação específica do AB a seu alvo pode ser reduzida em decorrência da inibição ou do mascaramento, pela MM, da capacidade de AB para se ligar especificamente a seu alvo.

[00239]A  $K_d$  do AB modificado com uma MM e uma CM dirigida ao alvo é 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 mais, ou entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000,



1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB não modificado com uma MM e uma CM do AB original dirigida ao alvo. Por outro lado, a afinidade de ligação do AB modificado com uma MM e uma CM dirigida ao alvo é 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, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes menor do que a afinidade de ligação do AB não modificado com uma MM e uma CM ou do AB original dirigida ao alvo.

[00240]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, selecionada a partir de matriptase e uPA,), a ligação específica do AB a seu alvo é reduzida ou inibida, em comparação à ligação específica do AB não modificado com uma MM e uma CM do AB original ao alvo. Em comparação à ligação do AB original ou à ligação de um AB não modificado com um MM e um CM a seu alvo, a capacidade de AB para se ligar ao 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 mesmo 100% 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 por mais tempo quando medida *in vivo* ou em um ensaio *in vitro*.

[00241]Neste relatório descritivo, o termo estado clivado refere-se à condição dos anticorpos ativáveis após a modificação da CM por pelo menos uma protease selecionada a partir de matriptase e uPA. O termo estado não clivado, neste relatório

descritivo, refere-se à condição dos anticorpos ativáveis na ausência de clivagem da CM por uma protease selecionada a partir de matriptase e uPA. Como discutido acima, o termo “anticorpos ativáveis”, neste relatório descritivo, refere-se a um anticorpo ativável em seu estado não clivado (nativo), bem como em seu estado clivado. Será evidente para o técnico no assunto que, em algumas modalidades, um anticorpo ativável clivado pode não dispor de uma MM pela clivagem da CM pela protease, resultando na liberação de pelo menos a MM (p. ex., quando a MM não estiver unida aos anticorpos ativáveis por uma ligação covalente (p. ex., uma ligação dissulfeto entre resíduos de cisteína)).

[00242]O uso de ativável ou alternável significa que o anticorpo ativável exibe um primeiro nível de ligação a um alvo quando em estado inibido, mascarado ou não clivado (ou seja, uma primeira conformação), e um segundo nível de ligação ao alvo no estado não inibido, não mascarado e/ou clivado (ou seja, uma segunda conformação), em que o segundo nível de ligação ao alvo é maior do que o primeiro nível de ligação. Em geral, o acesso ao alvo pelo AB do anticorpo ativável é maior na presença de um agente de clivagem capaz de clivar a CM, ou seja, uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, do que na ausência de tal agente de clivagem. Assim, quando o anticorpo ativável está no estado não clivado, o AB está inibido da ligação ao alvo e pode estar mascarado da ligação ao alvo (ou seja, a primeira conformação é tal que o AB não consegue se ligar ao alvo) e, no estado clivado, o AB não está inibido ou está desmascarado para se ligar ao alvo.

[00243]A CM e o AB dos anticorpos ativáveis são selecionados para que o AB represente uma porção de ligação para um dado alvo, e a CM representa um substrato para uma protease selecionada a partir de matriptase e uPA. Em algumas modalidades, a protease está colocalizada com o alvo em um sítio de tratamento ou sítio diagnóstico em um sujeito. Neste relatório descritivo, colocalizada refere-se a estar no mesmo sítio ou estar relativamente perto. Em algumas modalidades, uma protease

cliva uma CM produzindo um anticorpo ativado que se liga a um alvo localizado perto do sítio de clivagem. Os anticorpos ativáveis aqui descritos encontram uso particular quando, por exemplo, uma protease capaz de clivar um sítio na CM, ou seja, uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, está presente em níveis relativamente mais altos no tecido contendo o alvo de um sítio de tratamento ou sítio diagnósticos do que em tecido de sítios não em tratamento (por exemplo, em tecido sadio). Em algumas modalidades, uma CM da invenção é também clivada por uma ou mais outras proteases. Em algumas modalidades, uma ou mais outras proteases são que estão colocadas com o alvo e que são responsáveis pela clivagem da CM *in vivo*.

[00244]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis induzem toxicidade reduzida e/ou efeitos colaterais adversos que poderiam resultar da ligação do AB a sítios não em tratamento caso o AB não estivesse mascarado ou de outra forma inibido de se ligar ao alvo.

[00245]Em geral, pode-se projetar um anticorpo ativável selecionando um AB de interesse e construindo o restante do anticorpo ativável de modo que, quando restringido por sua conformação, a MM permite o mascaramento do AB ou reduzir a ligação do AB a seu alvo. Critérios para o desenho estrutural podem ser levados em conta para que proporcionem esse atributo funcional.

[00246]A presente invenção provê anticorpos ativáveis exibindo um fenótipo alternável de amplitude dinâmica desejada para a ligação ao alvo em uma conformação inibida versus uma conformação não inibida. Amplitude dinâmica geralmente se refere a uma razão entre (a) um nível detectado máximo de um parâmetro sob um primeiro conjunto de condições e (b) um valor detectado mínimo daquele parâmetro sob um segundo conjunto de condições. Por exemplo, no contexto de um anticorpo ativável, a amplitude dinâmica refere-se à razão entre (a) um nível detectado máximo da ligação de uma proteína-alvo a um anticorpo ativável na presença de pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, capaz de clivar a CM dos

anticorpos ativáveis e (b) um nível detectado mínimo da ligação de uma proteína-alvo a um anticorpo ativável na ausência da protease. A amplitude dinâmica de um anticorpo ativável pode ser calculada como a razão da constante de dissociação no equilíbrio de um tratamento com um agente de clivagem do anticorpo ativável (p. ex., enzima) para a constante de dissociação no equilíbrio do tratamento com agente de clivagem dos anticorpos ativáveis. Quanto maior a amplitude dinâmica de um anticorpo ativável, melhor o fenótipo alternável do anticorpo ativável. Anticorpos ativáveis com valores relativamente altos de amplitude dinâmica (p. ex., superiores a 1) exibem fenótipos alternantes mais desejáveis de tal modo que a ligação à proteína-alvo pelos anticorpos ativáveis ocorre em maior medida (p. ex., ocorre predominantemente) na presença de um agente de clivagem (p. ex., enzima) capaz de clivar a CM dos anticorpos ativáveis do que na ausência de um agente de clivagem.

[00247]Os anticorpos ativáveis podem ser providos em uma variedade de configurações estruturais. Abaixo, são fornecidas fórmulas exemplares para anticorpos ativáveis. Contempla-se especificamente que a ordem N-terminal para C-terminal do AB, MM e CM possa ser invertida em um anticorpo ativável. Contempla-se também especificamente que a CM e a MM possam se sobrepor na sequência de aminoácidos, p. ex., tal que uma CM esteja contida dentro da MM.

[00248]Por exemplo, anticorpos ativáveis podem ser representados pela fórmula a seguir (na ordem de região amino (N) terminal para região carboxila (C) terminal):

(MM)-(CM)-(AB)

(AB)-(CM)-(MM)

onde MM é uma porção de mascaramento, CM é uma porção clivável e AB é um anticorpo ou seu fragmento. Cabe notar que embora MM e CM estejam indicadas como componentes distintos nas fórmulas acima, em todas as modalidades exemplares (incluindo fórmulas) aqui reveladas, contempla-se que as sequências de

aminoácidos da MM e da CM puderam se sobrepor, p. ex., tal que uma CM está completa ou parcialmente contida dentro da MM. Além disso, as fórmulas acima fornecem sequências de aminoácidos adicionais que podem estar posicionadas em N-terminal ou C-terminal em relação aos elementos dos anticorpos ativáveis.

[00249]Em certas modalidades, a MM não é um parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM não contém homologia ou substancialmente nenhuma a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80% semelhante a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% ou 80% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 50% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 25% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 20% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB. Em algumas modalidades, a MM é no máximo 10% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB.

[00250]Em muitas modalidades, pode ser desejado inserir um ou mais ligadores, p. ex., ligadores flexíveis, na construção do anticorpo ativável para proporcionar flexibilidade a uma ou mais das junções MM-CM, a junção CM-AB, ou ambas. Por exemplo, o AB, MM, e/ou CM podem não conter um número suficiente de resíduos (p. ex., Gly, Ser, Asp, Asn, especialmente Gly e Ser, particularmente Gly) para proporcionar a flexibilidade desejada. Senso assim, o fenótipo alternável de tais construções de anticorpo ativável pode se beneficiar da introdução de um ou mais aminoácidos para fornecer um ligador flexível. Além disso, como descrito abaixo, quando o anticorpo ativável for provido em uma construção com restrições conformações, um ligador flexível pode ser inserido operacionalmente para facilitar a formação e

manutenção de uma estrutura cíclica no anticorpo ativável não clivado.

[00251] Por exemplo, em certas modalidades, um anticorpo ativável compreende uma das seguintes fórmulas (em que a fórmula abaixo representa uma sequência de aminoácidos no sentido N- para C-terminal ou no sentido C- para N-terminal):

(MM)-L1-(CM)-(AB)

(MM)-(CM)-L2-(AB)

(MM)-L1-(CM)-L2-(AB)

[00252] Em que MM, CM e AB são como definidos acima; em que L1 e L2 são independentemente e estão opcionalmente presentes ou ausentes, são ligadores flexíveis iguais ou diferentes que incluem pelo menos 1 aminoácido flexível (p. ex., Gly). Além disso, as fórmulas acima fornecem sequências de aminoácidos adicionais que podem ser posicionadas em N-terminal ou C-terminal em relação aos elementos dos anticorpos ativáveis. Os exemplos incluem, entre outros, porções de direcionamento (p. ex., um ligante para um receptor de uma célula presente em um tecido-alvo) e porções que prolongam a meia-vida sérica (p. ex., polipeptídeos que se ligam a proteínas séricas, como imunoglobulinas (p. ex., IgG) ou albumina sérica (p. ex., albumina sérica humana (HAS)).

[00253] A CM é clivada especificamente por pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, a uma taxa de aproximadamente  $0,001\text{-}1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  ou pelo menos 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 200; 250; 500; 750; 1000; 1250; ou  $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ . Em algumas modalidades, a CM é clivada especificamente a uma taxa de aproximadamente  $100.000 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ . Em algumas modalidades, a CM é clivada especificamente a uma taxa entre  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$  (ou seja, entre  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ).

[00254] Para a clivagem específica por uma enzima, é feito contato entre a enzima e a CM. Quando o anticorpo ativável compreendendo um AB acoplado a uma MM e uma CM está na presença do alvo e há atividade enzimática suficiente, a CM

pode ser clivada. Atividade enzimática suficiente pode referir-se à capacidade da enzima para fazer contato com a CM e efetuar a clivagem. Pode-se imaginar rapidamente que uma enzima pode estar nas vizinhanças da CM, mas não ser capaz de clivar por causa de outros fatores celulares ou modificação proteica da enzima.

[00255]Os ligadores adequados para uso em composições aqui descritas são em geral aqueles que proporcionam flexibilidade ao AB modificado ou aos anticorpos ativáveis e facilitam a inibição da ligação do AB ao alvo. Tais ligadores são geralmente referidos como ligadores flexíveis. Os ligadores adequados podem ser rapidamente selecionados e podem ser de qualquer comprimento diferente adequado, como de 1 aminoácido (p. ex., 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 ter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 aminoácidos de comprimento.

[00256]Os ligadores flexíveis exemplares incluem polímeros de glicina (G)<sub>n</sub>, polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 385) e (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 386), onde n é um número inteiro pelo menos igual a um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina e outros ligadores flexíveis conhecidos na técnica. Os polímeros de glicina e de glicina-serina são relativamente desestruturados e podem, portanto, servir como amarra neutra entre os componentes. A glicina acessa significativamente mais espaço phi-psi do que até mesmo a alanina, e tem muito menos restrições do que resíduos com cadeias laterais mais longas (vide Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Os ligadores flexíveis exemplares incluem, entre outros, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 387), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 388), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 389), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 390), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 391), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 392) e os semelhantes. O técnico no assunto reconhecerá que

o desenho de um anticorpos ativáveis pode incluir ligadores que são total ou parcialmente flexíveis, tal que o ligante pode incluir um ligante flexível, bem como uma ou mais porções que conferem uma estrutura menos flexível a uma estrutura desejada para os anticorpos ativáveis.

[00257]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis aqui descritos 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 um antineoplásico. Em tais modalidades, o agente é conjugado a uma porção carboidrato do anticorpo ativável, por exemplo, em algumas modalidades, quando a porção carboidrato está localizada fora da região de ligação a antígeno do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno no anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o agente é conjugado a um grupo sulfidrila do anticorpo ou do fragmento de ligação a antígeno no anticorpo ativável.

[00258]Em algumas modalidades, o agente é um agente citotóxico como uma toxina (p. ex., uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos) ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado).

[00259]Em algumas modalidades, o agente é uma porção detectável como, por exemplo, uma marcação ou outro marcador. Por exemplo, o agente é ou inclui um aminoácido radiomarcado, uma ou mais porções biotiniladas que podem ser detectadas por avidina marcada (p. ex., estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que possa 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, as porções detectáveis são anexadas por moléculas espaçadoras.

[00260]A invenção também diz respeito a imunoconjugados compreendendo

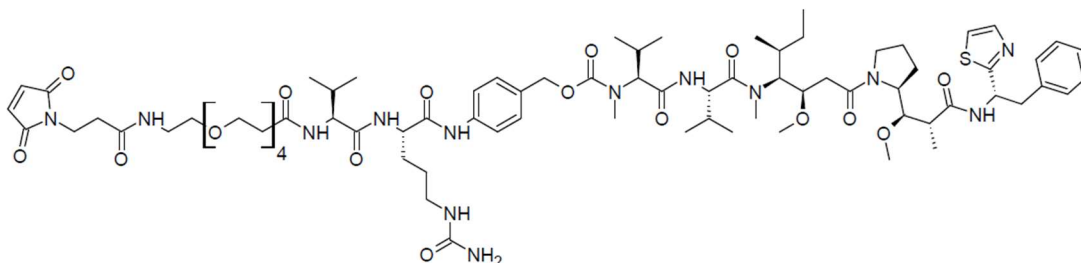


um anticorpo conjugado a um agente citotóxico como uma toxina (p. ex., uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou seus fragmentos) ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado). Os agentes citotóxicos adequados incluem, por exemplo, dolastatinas e seus derivados (p. ex., 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 a partir do grupo listado na Tabela 3. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoides. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrol-benzodiazepina.

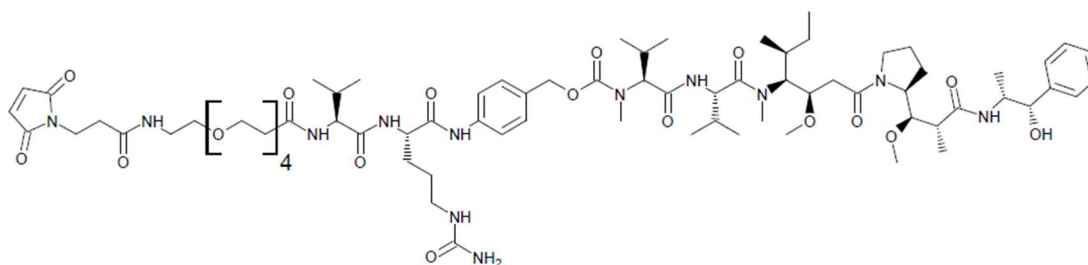
[00261]Em algumas modalidades, o agente é unido ao AB utilizando um ligador caproil maleimida-valina-citrulina ou um ligador maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é unido ao AB utilizando um ligador caproil maleimida-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é unido ao AB utilizando um ligador a maleimida PEG-valina-citrulina. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD) unido ao AB utilizando um ligador maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonila e, neste relatório descritivo, a construção da carga útil desse ligador é referida como “vc-MMAD.” Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE) unido ao AB utilizando um ligador maleimida PEG-valina-citrulina-para-aminobenziloxicarbonila e, neste relatório descritivo, a construção da carga útil desse ligador é referida como “vc-MMAE.” As estruturas de

vc-MMAD e vc-MMAE são mostradas abaixo:

vc-MMAD:



vc-MMAE:



[00262]As toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos que podem ser utilizados incluem a cadeia A da toxina diftérica, fragmentos ativos não ligantes da toxina diftérica, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A da ricina A, cadeia A da abrina, cadeia A da modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Uma variedade de radionuclídeos está disponível para a produção de anticorpos radioconjugados. Os exemplos incluem  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e  $^{186}\text{Re}$ .

[00263]Conjugados do anticorpo e agente citotóxico são produzidos utilizando uma variedade de agentes bifuncionais de acoplamento proteico como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres (como dimetil adipimidato HCL), ésteres ativos (como disuccinimidil suberato), aldeídos (como glutaraldeído), compostos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazônio (como bis-(p-diazônio-benzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (como 2,6-diisocianato de tolueno) e compostos bis-fluorados

ativos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). O ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminapentacético (MX-DTPA) marcado com carbono 14 é um agente quelante exemplar para a conjugação de radionuclídeo ao anticorpo (Vide WO94/11026).

[00264]A Tabela 3 lista alguns dos agentes farmacêuticos exemplares que podem ser empregados na presente invenção, porém, não significa que esta lista está completa.

Tabela 3: Agentes farmacêuticos exemplares para a conjugação

#### AGENTE CITOTÓXICOS

Auristatinas	Turbostatina
Auristatina E	Fenstatinas
Monometil auristatina D (MMAD)	Hidroxifenstatina
Daunorrubicina	Inibidores da topoisomerase
Briostatinas	Hemiasterlina
Monometil auristatina E (MMAE)	Espongistatina 5
Desmetil auristatina E (DMAE)	Espongistatina 7
Auristatina F	Halistatina 1
Monometil auristatina F (MMAF)	Halistatina 2
Desmetil auristatina F (DMAF)	Halistatina 3
Derivados de auristatina, p. ex., amidas	Briostatinas modificadas
Auristatina tiramina	Haloconstatinas
Auristatina quinolina	Pirrolobenzimidazóis (PBI)
Dolastatinas	Cibrostatina6
Derivados de dolastatina	Doxaliforme
Dolastatina 16 DmJ	Análogos de antraciclinas
Dolastatina 16 Dpv	

Maitansinoides, p. ex., DM-1; DM-4	
Derivados de maitansinoide	Análogo da cemadotina (CemCH <sub>2</sub> -SH)
	Variante da toxina A de <i>Pseudomonas</i>
Duocarmicina	(PE38)
	Variante da toxina A de <i>Pseudomonas</i>
Derivados de duocarmicina	(ZZ-PE38)
Alfa-amanitina	ZJ-101
Antraciclinas	OSW-1
Doxorrubicina	4-Nitrobenziloxycarbonil derivados de O6-benzilguanina
Camptotecina	Cefalotaxina
Derivados de camptotecina	Homo-harringtonina
Camptotecina 7-substituída	Dímeros de pirrol-benzodiazepina (PBDs)
10,11-Difluorometilenodioxycamptotecina	Pirrol-benzodiazepínicos funcionalizados
Combretastatinas	Caliqueamicinas
Debromoaplisiatoxina	Podofilotoxinas
Kahalalide-F	Taxanos
Discodermolida	Alcaloides da vinca
Ecteinasclidinas	
	Reagentes conjugáveis de detecção
Antivirais	Fluoresceína e seus derivados
Aciclovir	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
Vira A	
Symmetrel	Radiofarmacêuticos
	<sup>125</sup> I
Antifúngicos	<sup>131</sup> I

Nistatina	$^{89}\text{Zr}$
	$^{111}\text{In}$
Antineoplásicos adicionais	$^{123}\text{I}$
Adriamicina	$^{131}\text{I}$
Cerubidina	$^{99m}\text{Tc}$
Bleomicina	$^{201}\text{Tl}$
Alkeran	$^{133}\text{Xe}$
Velbano	$^{11}\text{C}$
Oncovina	$^{62}\text{Cu}$
Fluorouracil	$^{18}\text{F}$
Metotrexato	$^{68}\text{Ga}$
Tiotepa	$^{13}\text{N}$
Bisantreno	$^{15}\text{O}$
Novantrona	$^{38}\text{K}$
Tioguanina	$^{82}\text{Rb}$
Procarabizina	$^{99m}\text{Tc}$ (Tecnécio)
Citarabina	
	Metais pesados
Antibacterianos	Bário
Aminoglicosídeos	Ouro
Estreptomicina	Platina
Neomicina	
Canamicina	Antimicoplasmáticos
Amicacina	Tilosina
Gentamicina	Espectinomicina
Tobramicina	
Estreptomicina B	

Espectinomicina

Ampicilina

Sulfanilamida

Polimixina

Cloranfenicol

[00265]Os técnicos no assunto reconhecerão que uma grande variedade de porções possíveis pode ser acoplada aos anticorpos resultantes da invenção. (Vide, por exemplo, "*Conjugate Vaccines*", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente).

[00266]O acoplamento pode ser realizado por qualquer reação química que ligará as duas moléculas, desde que o anticorpo e a outra porção retenham suas respectivas atividades. Essa ligação pode incluir muitos mecanismos químicos, por exemplo, ligação covalente, ligação por afinidade, intercalação, ligação coordenada e complexação. Em algumas modalidades, a ligação é, contudo, ligação covalente. A ligação covalente pode ser realizada por condensação direta das cadeias laterais existentes ou pela incorporação de moléculas externas servindo de ponte. Muitos agentes de ligação bivalente ou polivalente são úteis no acoplamento de moléculas proteicas, tais como os anticorpos da presente invenção, a outras moléculas. Por exemplo, agentes de acoplamento representativos podem incluir compostos orgânicos como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldeído, diazobenzenos e hexametileno diaminas. Essa listagem não pretende ser completa das várias classes de agentes de acoplamento conhecidos na técnica, mas, em vez disso, é exemplar dos agentes de acoplamento mais comuns (Vide Killen and Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); e Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987)).

[00267]Em algumas modalidades, além das composições e métodos aqui

providos, o anticorpo conjugado ativável pode também ser modificado por conjugação sítio-específica através de sequências de aminoácidos modificadas inseridas ou de outra forma incluídas na sequência do anticorpo ativável. Essas sequências de aminoácidos modificadas são projetadas para permitir o posicionamento controlado e/ou a dose do agente conjugado dentro de um anticorpo conjugado ativável. Por exemplo, o anticorpo ativável pode ser construído para incluir substituições de cisteína em posições nas cadeias leve e pesada que forneçam grupos tióis reativos e sem impacto negativo no dobramento e na montagem da proteína, nem que alterem a ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável pode ser construído para incluir ou de outra forma introduzir um ou mais resíduos de aminoácidos não naturais dentro do anticorpo ativável e fornecer sítios adequados para a conjugação. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável pode ser construído para incluir ou de outra forma introduzir sequências peptídicas enzimaticamente ativáveis dentro da sequência do anticorpo ativável.

[00268]Ligadores adequados estão descritos na literatura (Vide, por exemplo, Ramakrishnan, S. *et al.*, *Cancer Res.* 44:201-208 (1984) que descreve o uso de MBS (M-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida éster). Vide também a Patente U.S. Nº 5 030 719 que descreve o uso de derivados halogenados de acetil hidrazina acoplados a um anticorpo por meio de um ligador oligopeptídeo. Em algumas modalidades, os ligadores adequados incluem: (i) EDC (cloridrato de (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida); (ii) SMPT (4-succinimidylloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio) propionamido]hexanoato (Pierce Chem. Co., Cat nº 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfo-succinimidil 6 [3-(2-piridilditio)-propionamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. Cat. nº 2165-G); e (v) sulfo-NHS (N-hidroxissulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., Cat. nº 24510) conjugado a EDC. Ligadores adicionais incluem, entre outros, SMCC, sulfo-SMCC, SPDB ou sulfo-SPDB.

[00269]Os ligadores descritos acima contêm componentes com atributos diferentes, levando, assim, a conjugados com propriedades físico-químicas distintas. Por exemplo, sulfo-NHS ésteres de alquil carboxilatos são mais estáveis do que sulfo-NHS ésteres de carboxilatos aromáticos. Ligadores contendo NHS-éster são menos solúveis do que os que contêm sulfo-NHS ésteres. Além do mais, o ligador SMPT contém uma ligação dissulfeto estericamente impedida e pode formar conjugados com estabilidade aumentada. As ligações dissulfeto são, em geral, menos estáveis do que outras ligações, pois a ligação dissulfeto é clivada *in vitro*, resultando em menos conjugado disponível. Sulfo-NHS, especialmente, pode aperfeiçoar a estabilidade de acoplamentos mediados por carbodiimida. Os acoplamentos com carbodiimida (como EDC) quando utilizados em conjunto com sulfo-NHS formam ésteres mais resistentes à hidrólise do que a reação de acoplamento somente com carbodiimida.

[00270]Em algumas modalidades, os ligadores são cliváveis. Em algumas modalidades, os ligadores não são cliváveis. Em algumas modalidades, dois ou mais ligadores estão presentes. Os dois ou mais ligadores são todos iguais, ou seja, cliváveis ou não cliváveis, ou os dois ou mais ligadores são diferentes, ou seja, pelo menos um é clivável e pelo menos um não é clivável.

[00271]A presente invenção utiliza diversos métodos para anexar agentes a ABs: (a) ligação às porções carboidrato do AB, (b) ligação a grupos sulfidril do AB, (c) ligação a grupos amino do AB ou (d) ligação a grupos carboxilato do AB. De acordo com a invenção, ABs podem ser ligados covalentemente a um agente através de um ligador intermediário contendo pelo menos dois grupos reativos, um para reagir com o AB e o outro para reagir com o agente. O ligador, que pode incluir qualquer composto orgânico compatível, pode ser escolhido de modo que a reação com AB (ou agente) não afete desfavoravelmente a reatividade e a seletividade de AB. Além do mais, a ligação do ligador ao agente não poderia destruir a atividade do agente. Os ligadores adequados para a reação com anticorpos oxidados ou fragmentos de anticorpos



oxidados incluem aqueles contendo uma amina selecionada a partir do grupo constituído por grupos amina primária, amina secundária, hidrazina, hidrazida, hidroxilamina, fenil-hidrazina, semicarbazida e tiosemicarbazida. Tais grupos funcionais reativos podem existir como parte da estrutura do ligador ou podem ser introduzidos por modificação química adequada de ligadores não contendo tais grupos.

[00272]De acordo com a presente invenção, os ligadores adequados para a ligação a ABs reduzidos incluem aqueles dispondo de certos grupos reativos capazes de reação com um grupo sulfidríla de um anticorpo ou fragmento reduzido. Tais grupos reativos incluem, entre outros, grupos haloalquila reativos (incluindo, por exemplo, grupos haloacetila), grupos p-mercuribenzoato e grupos capazes de reações de adição do tipo Michael (incluindo, por exemplo, maleimidas e grupos do tipo descrito por Mitra and Lawton, 1979, *J. Amer. Chem. Soc.* 101: 3097-3110).

[00273]De acordo com a presente invenção, os ligadores adequados para a ligação a Abs nem oxidados nem reduzidos, incluem aqueles dispondo de certos grupos funcionais capazes de reação com os grupos amino primários presentes em resíduos de lisina não modificados no Ab. Tais grupos reativos incluem, entre outros, ésteres NHS carboxílicos ou carbônicos, ésteres sulfo-NHS carboxílicos ou carbônicos, ésteres 4-nitrofenil carboxílicos ou carbônicos, ésteres pentafluorofenil carboxílicos ou carbônicos, acil imidazóis, isocianatos e isotiocianatos.

[00274]De acordo com a presente invenção, os ligadores adequados para a ligação a Abs nem oxidados nem reduzidos, incluem aqueles dispondo de certos grupos funcionais capazes de reação com os grupos ácido carboxílico presentes em resíduos de aspartato ou glutamato no Ab, que foram ativados com reagentes adequados. Os reagentes ativadores adequados incluem EDC, com ou sem NHS ou sulfo-NHS adicionado, e outros agentes desidratantes utilizados para a formação de carbamida. Nesses casos, os grupos funcionais presentes nos ligadores adequados incluiriam aminas primárias e secundárias, hidrazinas, hidroxilaminas e hidrazidas.

[00275]O agente pode ser anexado ao ligador antes ou depois que o ligador é anexado ao AB. Em certas aplicações, pode ser desejável produzir primeiramente um AB-ligador intermediário no qual o ligador está livre de um agente associado. Dependendo da aplicação em particular, um agente específico pode então ser anexado covalentemente ao ligador. Em algumas modalidades, o AB é anexado primeiramente à MM, à CM e a ligadores associados e depois anexado ao ligador para efeito da conjugação.

[00276]Ligadores ramificados: Em modalidades específicas, utilizam-se ligadores ramificados com múltiplos sítios para a ligação de agentes. Para ligações com múltiplos sítios, uma ligação covalente única a um AB resultaria em um AB-ligador intermediário capaz de ligar um agente em alguns sítios. Os sítios podem ser grupos aldeído ou sulfidril ou qualquer sítio químico ao qual agentes podem ser anexados.

[00277]Em algumas modalidades, pode-se obter atividade específica mais alta (ou razão mais alta de agentes para AB) pela ligação de um ligante com um único sítio em uma pluralidade de sítios no AB. Essa pluralidade de sítios pode ser introduzida no AB por qualquer um de dois métodos. Em primeiro lugar, pode-se gerar múltiplos grupos aldeído e/ou sulfidril no mesmo AB. Em Segundo lugar, pode-se anexar a um aldeído ou sulfidril do AB um "ligador ramificado" dispondo de múltiplos sítios funcionais para anexar subsequentemente ligadores. Os sítios funcionais do ligador ramificado ou do ligador de sítios múltiplos podem ser grupos aldeído ou sulfidril, ou pode ser qualquer sítio químico ao qual ligadores possam ser anexados. Atividades específicas ainda mais elevadas podem ser obtidas combinando essas duas abordagens, ou seja, anexando ligadores de sítios múltiplos em diversos sítios no AB.

[00278]Ligadores cliváveis: Ligadores peptídicos que são suscetíveis à clivagem por enzimas do sistema complemento, tais como, entre outras, ativador do plasminogênio U, ativador do plasminogênio tecidual, tripsina, plasmina, ou outra enzima com atividade proteolítica podem ser utilizados em uma modalidade da presente

invenção. De acordo com um método da presente invenção, um agente é anexado via um ligador suscetível à clivagem pelo complemento. O anticorpo é selecionado a partir de uma classe que pode ativar o complemento. O conjugado anticorpo-agente ativa, assim, a cascata do complemento e libera o agente no sítio alvo. De acordo com outro método da presente invenção, um agente é anexado via um ligador suscetível à clivagem por enzimas dispondo de atividade proteolítica como um ativador do plasminogênio U, um ativador do plasminogênio tecidual, plasmina ou tripsina. Esses ligadores cliváveis são úteis em anticorpos conjugados ativáveis que incluem uma toxina extracelular, p. ex., a título de exemplo não limitante, qualquer uma das toxinas extracelulares mostradas na Tabela 3.

[00279]Exemplos não limitantes de sequências do ligador clivável são fornecidos na Tabela 4.

Tabela 4: Sequências ligadoras exemplares para a conjugação

Tipos de sequências cliváveis	Sequência de aminoácidos
Sequências cliváveis por plasmina	
Pró-uroquinase	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 665)
	PRFRIIGG (SEQ ID NO: 666)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 667)
Plasminogênio	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 668)
Estafiloquinase	SSSFDKGGKYKKGDDA (SEQ ID NO: 669)
	SSSFDKGGKYKRGDDA (SEQ ID NO: 670)
Sequências cliváveis por fator Xa	IEGR (SEQ ID NO: 671)
	IDGR (SEQ ID NO: 672)
	GGSIDGR (SEQ ID NO: 673)
Sequências cliváveis por MMP	
Gelatinase A	PLGLWA (SEQ ID NO: 674)
Sequências cliváveis por collagenase	

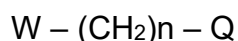
Colágeno cutâneo bovino (cadeia $\alpha 1(I)$ )	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 675)
Colágeno cutâneo bovino (cadeia $\alpha 2(I)$ )	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 676)
Colágeno de cartilagem bovina (cadeia $\alpha 1(II)$ )	GIAGQ (SEQ ID NO: 677)
Colágeno de fígado humano (cadeia $\alpha 1(III)$ )	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 678)
$\alpha 2M$ humano	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 679)
PZP humano	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 680)
	AGLGVER (SEQ ID NO: 681)
	AGLGISST (SEQ ID NO: 682)
$\alpha 1M$ de rato	EPQALAMS (SEQ ID NO: 683)
	QALAMSAI (SEQ ID NO: 312)
$\alpha 2M$ de rato	AAYHLVSQ (SEQ ID NO: 315)
	MDAFLESS (SEQ ID NO: 316)
$\alpha 1I_3(2J)$ de rato	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 317)
$\alpha 1I_3(27J)$ de rato	SAPAVESE (SEQ ID NO: 318)
Colagenase fibroblástica humana	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 319)
(clivagens autolíticas)	VAQFVLTE (SEQ ID NO: 372)
	AQFVLTEG (SEQ ID NO: 373)
	PVQPIGPQ (SEQ ID NO: 380)

---

[00280] Além disso, os agentes podem ser anexados via ligações dissulfeto (por exemplo, as ligações dissulfeto em uma molécula de cisteína) ao AB. Dado que muitos tumores liberam naturalmente altos níveis de glutathione (um agente redutor), isso pode reduzir as ligações dissulfeto com a liberação subsequente do agente no sítio de liberação. Em algumas modalidades, o agente redutor que modificaria uma

CM também modificaria o ligador do anticorpo conjugado ativável.

[00281]Espaçadores e elementos cliváveis: Em algumas modalidades, pode ser necessário construir o ligador de tal maneira a otimizar o espaço entre o agente e o AB do anticorpo ativável. Isso pode ser conseguido pelo uso de um ligador da estrutura geral:



Em que,

W é --NH--CH<sub>2</sub>-- ou --CH<sub>2</sub>--;

Q é um aminoácido, peptídeo; e

n é um número inteiro de 0 a 20.

[00282]Em algumas modalidades, o ligador pode compreender um elemento espaçador e um elemento clivável. O elemento espaçador serve para posicionar o elemento clivável distante do core do AB tal que o elemento clivável fique mais acessível à enzima responsável pela clivagem. Certos ligadores ramificados descritos acima podem server como elementos espaçadores.

[00283]Por toda esta discussão, deve-se entender que a ligação do ligador ao agente (ou do elemento espaçador ao elemento clivável, ou do elemento clivável ao agente) não precisa ser um modo específico de ligação ou reação. Qualquer reação que forneça um produto de estabilidade adequada e compatibilidade biológica é aceitável.

[00284]Complemento sérico e seleção de ligadores: De acordo com um método da presente invenção, quando se deseja liberar um agente, utiliza-se um AB que é um anticorpo de uma classe que pode ativar o complemento. O conjugado resultante retém a capacidade para se ligar a antígeno e para ativar a cascata do complemento. Assim, de acordo com essa modalidade da presente invenção, um agente é unido a uma extremidade do ligador clivável ou do elemento clivável e a outra extremidade do grupo ligador é ligada a um sítio específico no AB. Por exemplo, se dispor de um grupo

hidroxi ou um grupo amino, o agente pode ser anexado à terminação carboxi de um peptídeo, aminoácido ou outro ligador adequadamente escolhido via uma ligação éster ou amida, respectivamente. Por exemplo, tais agentes podem ser anexados ao peptídeo de ligação mediante uma reação com carbodiimida. Se o agente contiver grupos funcionais que interferiam com a ligação ao ligador, esses grupos funcionais intervenientes podem ser bloqueados antes da ligação e desbloqueados assim que criado o produto conjugado ou intermediário. A terminação oposta ou amino do ligador é então utilizada diretamente ou depois de modificação posterior para a ligação a um AB que seja capaz de ativar o complemento.

[00285]Os ligadores (ou elementos espaçadores de ligadores) podem ter qualquer comprimento desejado, sendo que uma de suas extremidades pode ser anexada covalentemente a sítios específicos no AB do anticorpo ativável. A outra extremidade do ligador ou do elemento espaçador pode ser anexada a um aminoácido ou ligador peptídico.

[00286]Assim, quando esses conjugados se ligam a um antígeno na presença do complemento, a ligação amida ou éster que prende o agente ao ligador será clivada, resultando na liberação do agente em sua forma ativa. Esses conjugados, quando administrados a um sujeito, conseguirão entregar e liberar o agente no sítio-alvo, e são especialmente eficazes para a liberação *in vivo* de agentes farmacêuticos, antibióticos, antimetabólitos, agentes antiproliferativos e os semelhantes conforme apresentados, entre outros, na Tabela 3.

[00287]Ligadores para liberação sem ativação do complemento: Em ainda outra aplicação de entrega direcionada, a liberação do agente sem a ativação do complemento é desejada, pois a ativação da cascata do complemento provocará no final a lise da célula-alvo. Consequentemente, essa abordagem é útil quando for preciso entregar e liberar o agente sem eliminar a célula-alvo. Este é o objetivo quando se deseja a liberação de mediadores celulares, como hormônios, enzimas,

corticosteroides, neurotransmissores, genes ou enzimas a células-alvo. Esses conjugados podem ser preparados anexando o agente a um AB incapaz de ativar o complemento via um ligador que seja levemente suscetível à clivagem por proteases séricas. Quando esse conjugado é administrado a um indivíduo, complexos antígeno-anticorpo se formam rapidamente, enquanto a clivagem do agente ocorrerá lentamente, resultando, assim, na liberação do composto no sítio-alvo.

[00288]Formadores de ligação cruzada bioquímicas: Em algumas modalidades, o anticorpo ativável pode ser conjugado a um ou mais agentes terapêuticos utilizando certos formadores de ligação cruzada bioquímica. Os reagentes de ligação cruzada formam pontes moleculares que prendem grupos funcionais um ao outro de moléculas diferentes. Para ligar duas proteínas diferentes de maneira passo a passo, formadores hetero-bifuncionais de ligação cruzada podem ser utilizados para eliminar a formação indesejada de homopolímeros.

[00289]Peptidil ligadores cliváveis por proteases lisossômicas são úteis também, por exemplo, Val-Cit, Val-Ala ou outros dipeptídeos. Além disso, pode-se utilizar ligadores lábeis a ácidos e cliváveis no meio de baixo pH do lisossoma, por exemplo: bis-sialil éter. Outros ligadores adequados incluem substratos lábeis à catepsina, especialmente aqueles que mostram função ótima em pH ácido.

[00290]Formadores hetero-bifuncionais exemplares de ligação cruzada são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5: Formadores hetero-bifuncionais exemplares de ligação cruzada**

Formadores hetero-bifuncionais de ligação cruzada			
Ligador	Reativo frente	Vantagens e aplicações	Comprimento do braço espaçador depois da ligação cruzada (Angstroms)

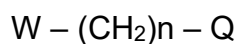
SMPT	Aminas primárias	Maior estabilidade	11,2 Å
	Sulfidrilas		
SPDP	Aminas primárias	Tiolação	6,8 Å
	Sulfidrilas	Ligação cruzada clivável	
LC-SPDP	Aminas primárias	Braço espaçador expandido	15,6 Å
	Sulfidrilas		
Sulfo-LC-SPDP	Aminas primárias	Braço espaçador ampliado	15,6 Å
	Sulfidrilas	Solúvel em água	
SMCC	Aminas primárias	Grupo reativo maleimida estável	11,6 Å
	Sulfidrilas	Conjugação enzima-anticorpo	
		Conjugação hapteno-proteína carreadora	
Sulfo-SMCC	Aminas primárias	Grupo reativo maleimida estável	11,6 Å
	Sulfidrilas	Solúvel em água	
		Conjugação enzima-anticorpo	
MBS	Aminas primárias	Conjugação enzima-anticorpo	9,9 Å
	Sulfidrilas	Conjugação hapteno-proteína carreadora	
Sulfo-MBS	Aminas primárias	Solúvel em água	9,9 Å
	Sulfidrilas		



SIAB	Aminas primárias	Conjugação enzima-anti-corpo	10,6 Å
	Sulfidrilas		
Sulfo-SIAB	Aminas primárias	Solúvel em água	10,6 Å
	Sulfidrilas		
SMPB	Aminas primárias	Braço espaçador ampliado	14,5 Å
	Sulfidrilas	Conjugação enzima-anti-corpo	
Sulfo-SMPB	Aminas primárias	Braço espaçador ampliado	14,5 Å
	Sulfidrilas	Solúvel em água	
EDE/Sulfo-NHS	Aminas primárias	Conjugação hapteno-carreador	0
	Grupos carboxila		
ABH	Carboidratos	Reage com grupos de açúcar	11,9 Å
Não seletivo			

[00291]Ligadores não cliváveis ou ligação direta: Em algumas modalidades da invenção, o conjugado pode ser projetado de modo que o agente seja entregue ao alvo, mas não liberado. Isso pode ser conseguido anexando um agente a um AB diretamente ou mediante um ligador não clivável.

[00292]Esses ligadores não cliváveis podem incluir aminoácidos, peptídeos, D-aminoácidos ou outros compostos orgânicos que possam ser modificados para incluir grupos funcionais que podem ser utilizados subsequentemente na ligação a ABs pelos métodos aqui descritos. Uma fórmula geral para tal ligador orgânico poderia ser:



Em que,

W é --NH--CH<sub>2</sub>-- ou --CH<sub>2</sub>--;

Q é um aminoácido, peptídeo; e

n é um número inteiro de 0 a 20.

[00293]Conjugados não cliváveis: Em algumas modalidades, um composto pode ser anexado a ABs que não ativam o complemento. Quando se utilizam ABs que são incapazes de ativar o complemento, essa ligação pode ser realizada utilizando ligadores que são suscetíveis à clivagem pelo complemento ativado ou utilizando ligadores que não são suscetíveis à clivagem pelo complemento ativado.

[00294]Os anticorpos ora revelados podem ser também formulados como imunolipossomas. Lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, tais como descritos em Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); e as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 4 485 045 e 4 544 545. Lipossomas com tempo de circulação aperfeiçoado são descritos na Patente U.S. N<sup>o</sup> 5 013 556.

[00295]Lipossomas especialmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação em fase reversa com uma composição de lipídios compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada com PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudados através de filtros com tamanho definido de poros para produzir lipossomos com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados aos lipossomas descritos em Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) via uma reação de troca de dissulfeto.

Definições:

[00296]A menos que definidos de outra forma, os termos científicos e técnicos usados em relação a presente invenção terão os significados com que são comumente entendidos pelos técnicos no assunto. O termo "uma" entidade refere-se a uma ou mais daquela entidade. Por exemplo, um composto refere-se a um ou mais

compostos. Sendo assim, os termos “um”, “uma”, “um ou mais” e “pelo menos um” podem ser usados alternadamente. Além disso, a menos que exigido pelo contexto, termos no singular incluirão pluralidades e termos no plural incluirão o singular. Geralmente, as nomenclaturas relacionadas utilizadas e as técnicas de cultura celular e de tecido, biologia molecular e química de proteínas e oligo ou polinucleotídeos e de hibridização aqui descritas são aquelas bem conhecidas e comumente empregadas na técnica. Técnicas padrão são utilizadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos e cultura de tecidos e transformação (p. ex., eletroporação, lipofecção). As reações enzimáticas e as técnicas de purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como normalmente executadas na técnica ou como aqui descritas. As técnicas e procedimentos precedentes são em geral realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e conforme descritos em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas por todo este relatório descritivo. Vide, p. ex., Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). As nomenclaturas relacionadas utilizadas e os procedimentos laboratoriais e técnicas de química analítica, química orgânica sintética e de química médica e farmacêutica ora descritos são aqueles bem conhecidos e normalmente utilizados na técnica. Técnicas padrão são utilizadas para as sínteses químicas, as análises químicas, o preparo, formulação e liberação farmacêutica e o tratamento de pacientes.

[00297]Será compreendido que os termos, a seguir, utilizados de acordo com a presente invenção, terão os significados abaixo:

[00298]Neste relatório descritivo, o termo “anticorpo” refere-se a moléculas de imunoglobulinas e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulinas (Ig), ou seja, moléculas que contêm um sítio de ligação a antígeno que se liga especificamente (imunorreage com) um antígeno. “Liga-se especificamente” ou “imunorreage com” ou “liga-se imuno-especificamente”, neste relatório descritivo, significa que o

anticorpo reage com um ou mais determinantes antigênicos do antígeno desejado e não reage com outros polipeptídeos ou se liga com afinidade muito mais baixa ( $K_d > 10^{-6}$ ). Anticorpos incluem, entre outros, anticorpo policlonal, monoclonal, quimérico, de domínio, cadeia única, fragmentos Fab e  $F(ab')_2$ , scFvs e uma biblioteca de expressão de Fab.

[00299]Sabe-se que a unidade estrutural básica de anticorpos compreende um tetrâmetro. Cada tetrâmetro é composto por dois pares de cadeias polipeptídicas idênticas, cada par tendo uma cadeia “leve” (aproximadamente 25 kDa) e uma cadeia “pesada” (cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável com entre 100 e 110 ou mais aminoácidos, responsável primariamente pelo reconhecimento do antígeno. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante responsável primariamente pela função efetora. Em geral, moléculas de anticorpos obtidas de humano relacionam-se a 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 possuem subclasses também, como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, e outras. Além disso, em humanos, a cadeia leve pode ser uma cadeia kappa ou uma cadeia lambda.

[00300]O termo “anticorpo monoclonal” (mAb) ou “composição de anticorpo monoclonal”, neste relatório descritivo, refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie molecular de molécula de anticorpo constituído por um produto gênico único como cadeia pesada e um produto gênico único como cadeia leve. Especificamente, as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal são idênticas em todas as moléculas da população. MAbs contêm um sítio de ligação a antígeno capaz de imuno-reagir com um determinado epítopo do antígeno caracterizado por uma afinidade de ligação exclusiva por ele.

[00301]O termo “sítio de ligação a antígeno” ou “porção de ligação” refere-se

à parte da molécula de imunoglobulina que participa na ligação ao antígeno. O sítio de ligação a antígeno é formado por resíduos de aminoácidos das regiões variáveis (“V”) N-terminal da cadeia pesada (“H”) e da leve (“L”). Três trechos altamente divergentes dentro das regiões V da cadeia pesada e da leve, designados como “regiões hipervariáveis”, estão interpostos entre trechos que os ladeiam mais conservados conhecidos como “regiões *framework* (arcabouço)” ou “FRs”. Assim, o termo “FR” refere-se a sequências de aminoácidos que são encontradas naturalmente entre e adjacentes às regiões hipervariáveis em imunoglobulinas. Em uma molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada estão dispostas uma em relação à outra em espaço tridimensional e formam uma superfície de ligação a antígeno. A superfície de ligação a antígeno é complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, e as três regiões hipervariáveis de cada cadeia pesada e leve são designadas como “regiões determinantes de complementaridade” ou “CDRs”. A designação de aminoácidos para cada domínio é de acordo 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).

[00302] Neste relatório descritivo, o termo “epítipo” inclui qualquer determinante proteico capaz de ligação específica a uma imunoglobulina, um scFv ou um receptor de células T. O termo “epítipo” inclui qualquer determinante proteico capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de células T. Os determinantes epitópicos normalmente consistem em agrupamentos com superfície quimicamente ativa de moléculas como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar, e geralmente possuem características estruturais tridimensionais específicas, bem como características específicas relativas à carga. Por exemplo, podem-se gerar anticorpos contra peptídeos N-terminal ou C-terminal 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,  $\leq 10 \text{ nM}$ .

[00303] Neste relatório descritivo, os termos “ligação específica”, “ligação imunológica” e “propriedades de ligação imunológica” referem-se 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 afinidade de interações de ligação imunológicas, pode ser expressa em termos da constante de dissociação ( $K_d$ ) da interação, em que uma  $K_d$  menor representa uma afinidade maior. As propriedades de ligação imunológica podem de polipeptídeos selecionados podem ser quantificadas utilizando métodos bem conhecidos na técnica. Um de tais métodos implica medir as taxas de sítio de ligação a antígeno/formação e dissociação do complexo com antígeno, em que essas taxas dependem das concentrações dos parceiros do complexo, da afinidade da interação e dos parâmetros geométricos que influenciam igualmente a taxa nos dois sentidos. Assim, tanto a “constante para a taxa de associação (*on rate*)” ( $K_{on}$ ) como a “constante para a taxa de dissociação (*off rate*)” ( $K_{off}$ ) podem ser determinadas pelo cálculo das concentrações e das taxas reais de associação e dissociação (Vide *Nature* 361:186-87 (1993)). A razão de  $K_{off}/K_{on}$  possibilita o cancelamento de todos os parâmetros não relacionados à afinidade, e é igual à constante de dissociação  $K_d$ . (Vide, em geral, Davies *et al.* (1990) *Annual Rev Biochem* 59:439-473). Diz-se que um anticorpo da presente invenção se liga especificamente ao alvo, quando a constante de ligação no equilíbrio ( $K_d$ ) 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 aproximadamente  $1 \text{ pM}$ , conforme medida por ensaios como ensaios de ligação a radioligantes ou ensaios semelhantes conhecidos pelos técnicos no assunto.

[00304] O termo “polinucleotídeo isolado” neste relatório descritivo significará um polinucleotídeo de origem genômica, no cDNA ou sintética ou alguma combinação destes, que, em virtude de sua origem, o “polinucleotídeo isolado” (1) não está associado com todo ou com uma parte de um polinucleotídeo no qual o “polinucleotídeo

isolado” é encontrado na natureza, (2) está ligado operacionalmente a um polinucleotídeo ao qual não está ligado na natureza ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior. Os polinucleotídeos de acordo com a invenção incluem as moléculas de ácido nucleico codificadoras das moléculas de cadeias pesadas das imunoglobulinas aqui mostradas, e moléculas de ácido nucleico codificadoras das moléculas de cadeias leves das imunoglobulinas aqui mostradas.

[00305]O termo “proteína isolada”, neste relatório descritivo, refere-se a uma proteína de origem em cDNA, RNA recombinante ou sintética ou alguma combinação destes, 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 da mesma fonte, p. ex., livre de proteínas murinas, (3) é expressa por uma célula de uma espécie diferente ou (4) não ocorre na natureza.

[00306]O termo “polipeptídeo” é usado neste relatório descritivo como um termo genérico para se referir à proteína natural, fragmentos ou análogos de uma sequência polipeptídica. Consequentemente, fragmentos e análogos da proteína natural são espécies do gênero de polipeptídeo. Os polipeptídeos de acordo com a invenção compreende moléculas de cadeias pesada de imunoglobulinas aqui mostradas e as moléculas de cadeias leves de imunoglobulinas aqui mostradas, bem como moléculas de anticorpos formadas por combinações compreendendo as moléculas de cadeias pesadas de imunoglobulinas com as moléculas de cadeias leves de imunoglobulinas, como moléculas da cadeia leve kappa de imunoglobulinas, e vice-versa, bem como fragmentos e análogos destas.

[00307]O termo “ocorrência natural”, neste relatório descritivo, quando aplicado a um objeto, refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência polipeptídica ou polinucleotídica que está presente em um organismo (incluindo vírus), que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que não foi modificada intencionalmente pelo homem no laboratório ou de outra forma

é de ocorrência natural.

[00308]O termo “ligado operacionalmente”, neste relatório descritivo, refere-se a posições de componentes assim descritas que estão em uma relação que lhes permite funcionar da maneira pretendida. Uma sequência controle “ligada operacionalmente” a uma sequência de codificação está ligada de tal maneira que a expressão da sequência de codificação é alcançada em condições compatíveis com as sequências controle.

[00309]O termo “sequência controle”, neste relatório descritivo, refere-se a sequências polinucleotídicas que são necessárias para efetuar a expressão e o processamento de sequências de codificação às quais estão ligadas. Em procariontes, a natureza de tais sequências controle difere dependendo do organismo hospedeiro, tais sequências controle geralmente incluem promotor, sítio de ligação com o ribossomo e sequência de terminação da transcrição, em eucariontes, geralmente, tais sequências controle incluem promotores e sequência de terminação da transcrição. O termo “sequências controle” destina-se a incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para a expressão e o processamento, e podem também incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências líderes e sequências de parceiro de fusão. O termo “polinucleotídeo”, neste relatório descritivo, significa nucleotídeos com pelo menos 10 bases de comprimento, quer ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer um desses tipos de nucleotídeo. O termo inclui formas de fita simples e dupla de DNA.

[00310]O termo oligonucleotídeo, neste relatório descritivo, inclui nucleotídeos de ocorrência natural e modificados unidos por ligações oligonucleotídicas de ocorrência natural e ocorrência não natural. Oligonucleotídeos constituem um subgrupo de polinucleotídeos tendo geralmente um comprimento de 200 bases ou menos. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos são formados por 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. Os oligonucleotídeos são geralmente de fita simples, p. ex., para sondas, embora os oligonucleotídeos possam ser de fita dupla, p. ex., para uso na construção de um gene mutante. Os oligonucleotídeos da invenção são oligonucleotídeos *sense* ou *antisense*.

[00311]O termo “nucleotídeos de ocorrência natural”, neste relatório descritivo, inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo “nucleotídeos modificados”, neste relatório descritivo, inclui nucleotídeos com grupos de açúcar modificado ou substituído e os semelhantes. O termo “ligações oligonucleotídicas”, neste relatório descritivo, inclui ligações oligonucleotídicas como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselerloato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforomidato e os semelhantes. Vide, p. ex., LaPlanche *et al. Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec *et al. J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984), Stein *et al. Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988), Zon *et al. Anti Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon *et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al. Patente U.S. Nº 5 151 510*; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990). Um oligonucleotídeo pode incluir uma marcação para detecção, se desejado.

[00312]Neste relatório descritivo, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Vide *Immunology - A Synthesis* (2ª edição, E.S. Golub e D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Os estereoisômeros (p. ex., D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais como aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -dissubstituídos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais podem também ser componentes adequados para os polipeptídeos da presente invenção. Os exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetil-lisina,  $\epsilon$ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxilisina,  $\sigma$ -N-metilarginina e outros aminoácidos semelhantes e

iminoácidos (p. ex., 4-hidroxiprolina). Na anotação relativa a polipeptídeos utilizada no presente, o sentido à esquerda é o sentido amino terminal e o sentido à direita é o sentido carboxi-terminal, de acordo com o uso e a convenção padrão.

[00313]Do mesmo modo, a menos que especificado o contrário, a extremidade esquerda de sequências polinucleotídicas de fita simples é a extremidade 5' e o sentido à esquerda de sequências polinucleotídicas de fita dupla é referido como o sentido 5'. O sentido de adição 5' a 3' de transcritos nascentes de RNA é referido como as regiões da sequência no sentido da transcrição na fita de DNA tendo a mesma sequência que o RNA e que são 5' para a extremidade 5' do transcrito do RNA são referidas como “sequências *upstream*”, e as regiões da sequência na fita do DNA com a mesma sequência que o RNA e que são 3' para a extremidade 3' do transcrito do RNA são referidas como “sequências *downstream*”.

[00314]Quando se aplica a polipeptídeos, o termo “identidade substancial” significa que duas sequências peptídicas, quando alinhadas de modo ótimo, como pelos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos padrão para lacuna (gap), compartilham pelo menos 80 por cento de identidade de sequência, em algumas modalidades, pelo menos 90 por cento de identidade de sequência, em algumas modalidades, pelo menos 95 por cento de identidade de sequência e, em algumas modalidades, pelo menos 99 por cento de identidade de sequência.

[00315]Em algumas modalidades, as posições de resíduos que não são idênticas diferem por substituições conservadoras de aminoácidos.

[00316]Como discutido no presente, contempla-se que variações mínimas nas sequências de aminoácidos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulinas sejam abrangidas pela presente invenção, desde que as variações na sequência de aminoácidos mantenham pelo menos 75%, em algumas modalidades, pelo menos 80%, 90%, 95% e, em algumas modalidades, 99%. Especificamente, são contempladas substituições conservadoras de aminoácidos. Substituições conservadoras são

aquelas que acontecem dentro de uma família de aminoácidos que estão relacionados em suas cadeias laterais. Aminoácidos codificados geneticamente são em geral divididos em famílias: (1) os aminoácidos ácidos são aspartato, glutamato; (2) os aminoácidos básicos são lisina, arginina, histidina; (3) os aminoácidos não polares são alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano e (4) os aminoácidos polares sem carga 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 contendo 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 por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina ou uma substituição semelhante de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado não terá um efeito importante na ligação ou propriedades da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolver um aminoácido dentro de um sítio no arcabouço. Se uma mudança de aminoácido resulta em um peptídeo funcional pode ser determinado rapidamente analisando a atividade específica do derivado polipeptídico. Os ensaios são descritos detalhadamente neste documento. Fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulinas podem ser preparados rapidamente pelos técnicos no assunto. Terminações amino e carboxi adequadas de fragmentos ou de análogos ocorrem próximas aos limites de domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados relativos à sequência nucleotídica e/ou de aminoácidos em bancos de dados públicos ou de propriedade exclusiva de sequências. Em algumas modalidades, métodos

computadorizados de comparação são utilizados para identificar sequências motivo ou para prever domínios de conformação da proteína que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecidas. Conhecem-se métodos para identificar sequências proteicas que se doam em uma estrutura tridimensional conhecida. Bowie *et al. Science* 253:164 (1991). Assim, os exemplos precedentes demonstram que os técnicos no assunto são capazes de reconhecer sequências motivo e conformações estruturais que podem ser utilizadas para definir domínios estruturais e funcionais de acordo com a invenção.

[00317]Substituições adequadas de aminoácidos são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade à proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar 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 mutações de uma sequência além da sequência peptídica de ocorrência natural. Por exemplo, substituições únicas ou múltiplas de aminoácidos (por exemplo, substituições conservadoras de aminoácidos) podem ser efetuadas na sequência de ocorrência natural (por exemplo, na parte do polipeptídeo fora do(s) domínio(s) formador(es) de contatos intermoleculares. Uma substituição conservadora de aminoácidos não mudará substancialmente as características estruturais da sequência original (p. ex., uma substituição de aminoácido não deve tender a quebrar uma hélice que ocorre na sequência original, ou afetar outros tipos da estrutura secundária que caracteriza a sequência original). Exemplos de estruturas polipeptídicas secundárias e terciárias reconhecidas na técnica estão descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton *et al. Nature* 354:105 (1991).

[00318]O termo “fragmento polipeptídico”, neste relatório descritivo, refere-se

a um polipeptídeo com uma deleção amino terminal e/ou carboxi-terminal e/ou uma ou mais deleções internas, mas em que a sequência de aminoácidos restante é idêntica às posições correspondentes na sequência de ocorrência natural deduzida, por exemplo, de uma sequência completa de cDNA. Os fragmentos tipicamente contêm pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento, em algumas modalidades, pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, em algumas modalidades, pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, geralmente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento e, em algumas modalidades, pelo menos 70 aminoácidos de comprimento. O termo “análogo”, neste relatório descritivo, refere-se a polipeptídeos que são formados por um segmento com pelo menos 25 aminoácidos que possui identidade substancial com uma parte de uma sequência de aminoácidos deduzida e que possui ligação específica ao alvo, sob condições adequadas de ligação. Tipicamente, os análogos de polipeptídeos compreendem uma substituição conservadora de aminoácido (ou adição ou deleção) em relação à sequência de ocorrência natural. Os análogos tipicamente contêm pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, em algumas modalidades, pelo menos 50 aminoácidos de comprimento ou são mais longos, e com frequência ser tão longos como um polipeptídeo completo de ocorrência natural.

[00319]O termo “agente” é usado neste relatório descritivo para indicar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extrato feito a partir de materiais biológicos.

[00320]Neste relatório descritivo, os termos “marcação” ou “marcado” refere-se à incorporação de um marcador detectável, p. ex., incorporação de um aminoácido radiomarcado ou a ligação a um polipeptídeo de porções biotiniladas que podem ser detectadas por avidina marcada (p. ex., estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou colorimétricos). Em certas situações, a marcação ou o marcador podem também ser terapêuticos. Vários métodos para marcar polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos

e podem ser utilizados. Os exemplos de marcações para polipeptídeos incluem, entre outros, os seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (p. ex.,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), marcação fluorescentes (p. ex., FITC, rodamina, fósforos de lan-tanida), marcações enzimáticas (p. ex., peroxidase do rábano, p-galactosidase, luci-ferase, fosfatase alcalina), grupos biotinilados quimioluminescentes, epítomos prede-terminados em polipeptídeos reconhecidos por um repórter secundário (p. ex., se-quências zíper com par de leucinas, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação a metais, *tag* de epítomos). Em algumas modalidades, as marca-ções são anexadas por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial. O termo “agente farmacêutico ou fármaco”, neste re-latório descritivo, refere-se a um composto químico ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando administrado adequadamente a um paciente.

[00321]Outros termos químicos neste relatório descritivo são usados de acordo com o uso convencional na técnica, conforme exemplificado pelo *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[00322]Neste relatório descritivo, “substancialmente puro” significa uma espé-cie objeto que é a espécie predominante presente (ou seja, em base molar, é mais abundante que qualquer outra espécie individual na composição) e, em algumas mo-dalidades, uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a es-pécie objeto compreende pelo menos cerca de 50 por (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes.

[00323]Geralmente, uma composição substancialmente pura compreenderá mais de aproximadamente 80 por cento de todas as espécies macromoleculares pre-sentes na composição, em algumas modalidades, mais de aproximadamente 85%, 90%, 95% e 99%. Em algumas modalidades, a espécie objeto é purificada até essen-cialmente a homogeneidade (não se consegue detectar espécies contaminantes na

composição por métodos convencionais de detecção), em que a composição consiste essencialmente em uma única espécie macromolecular.

[00324]O termo paciente inclui sujeitos humanos e veterinários.

[00325]Os anticorpos ativáveis da invenção ligam-se especificamente a um dado alvo, p. ex., um alvo proteico humano. A invenção inclui também anticorpos ativáveis que se ligam ao mesmo epítipo que os anticorpos ativáveis aqui descritos.

[00326]Os técnicos no assunto reconhecerão que é possível determinar, sem a indevida experimentação, se um anticorpo monoclonal (p. ex., um anticorpo monoclonal murino ou humanizado) possui a mesma especificidade que um anticorpo monoclonal usado nos métodos aqui descritos, averiguando se o primeiro impede que o último se ligue ao alvo. Se o anticorpo monoclonal em teste competir com o anticorpo monoclonal da invenção, como mostrado por uma diminuição na ligação pelo anticorpo monoclonal da invenção, então os dois anticorpos monoclonais se ligam ao mesmo epítipo, ou a um intimamente relacionado. Um método alternativo para determinar se um anticorpo monoclonal possui a especificidade de um anticorpo monoclonal da invenção é pré-incubar o anticorpo monoclonal da invenção com o alvo e adicionar, a seguir, o anticorpo monoclonal em teste para determinar se o anticorpo monoclonal em teste é inibido em sua capacidade para se ligar ao alvo. Se o anticorpo monoclonal em teste estiver inibido, então, provavelmente, possui a mesma especificidade epitópica ou funcionalmente equivalente à do anticorpo monoclonal da invenção.

#### Anticorpos ativáveis multiespecíficos

[00327]A invenção também provê anticorpos ativáveis multiespecíficos. Os anticorpos ativáveis multiespecíficos aqui providos são anticorpos multiespecíficos que reconhecem dois ou mais antígenos ou epítopos diferentes e que incluem pelo menos uma porção de mascaramento (MM) ligada a pelo menos um domínio de ligação a antígeno ou de ligação a epítipo do anticorpo multiespecífico, tal que o

acoplamento da MM reduz a capacidade do domínio de ligação a antígeno ou a epítipo de se ligar a seu alvo. Em algumas modalidades, a MM é acoplada ao domínio de ligação a antígeno ou a epítipo do anticorpo multiespecífico via uma porção clivável (CM) que funciona como substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de uPA e matriptase. Os anticorpos ativáveis multiespecíficos aqui providos ficam estáveis na circulação, são ativados nos locais pretendidos para terapia e/ou diagnóstico, mas não em tecido normal, ou seja, sadio e, quando ativados, exibem ligação a um alvo que é pelo menos comparável ao anticorpo multiespecífico não modificado correspondente.

[00328]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos são projetados para envolver células imunes efetoras, também designados neste relatório descritivo como anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem células imunes efetoras. Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos são projetados para envolver leucócitos, também designados neste relatório descritivo como anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem leucócitos. Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos são projetados para envolver células T, também designados neste relatório descritivo como anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem células T. Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos envolvem um antígeno de superfície em um leucócito, tal como em uma célula T, em uma célula *natural killer* (NK), em uma célula mononuclear mieloide, em um macrófago e/ou em outra célula imune efetora. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é um leucócito. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é uma célula T. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é uma célula NK. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é uma célula mononuclear, tal como uma célula mononuclear mieloide. Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos são projetados para se ligar ou de outra forma interagir com mais de um alvo e/ou mais de um epítipo, também designados neste relatório



descritivo como anticorpos ativáveis multiespecíficos direcionados a múltiplos antígenos. Neste relatório descritivo, os termos “alvo” e “antígeno” são usados alternadamente.

[00329]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem células imunes efetoras da invenção incluem um anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno e um anticorpo que envolve uma célula imune efetora ou sua porção de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno e/ou o anticorpo que envolve a célula imune efetora ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve uma célula imune efetora ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve a célula imune efetora, em que o AB1 está anexado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está anexado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve uma célula imune efetora ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve uma célula imune efetora, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de

mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve uma célula imune não efetora é um anticorpo direcionado contra câncer. Em algumas modalidades, o anticorpo de célula imune não efetora é uma IgG. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve uma célula imune efetora é um scFv. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado (p. ex., anticorpo de célula imune não efetora) é uma IgG e o anticorpo que envolve uma célula imune efetora é um scFv. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é um leucócito. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é uma célula T. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é uma célula NK. Em algumas modalidades, a célula imune efetora é uma célula mononuclear mieloide.

[00330]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos da invenção que envolvem células T incluem um anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno e um anticorpo que envolve células T ou sua porção de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno e/ou o anticorpo que envolve células T ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células T ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células T, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células T ou seu fragmento de ligação a antígeno

inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células T, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo.

[00331]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem células T incluem um anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno e um anticorpo que envolve células T ou sua porção de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno e/ou o anticorpo que envolve células T ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células T ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células T, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células T ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células T, em que o AB1 está acoplado a uma porção de

maskamento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de maskamento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer.

[00332]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis multiespecíficos que envolvem células T incluem um anticorpo IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno e um scFV que envolve células t, em que pelo menos um, o anticorpo IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno e/ou o anticorpo que envolve células T ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células T ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células T, em que o AB1 está acoplado a uma porção de maskamento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de maskamento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer. Em algumas modalidades, o anticorpo que envolve células T ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a um primeiro alvo que envolve células T, em que o AB1 está acoplado a uma porção de maskamento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar ao primeiro alvo, e o anticorpo

IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer.

[00333]Em algumas modalidades de um anticorpo ativável multiespecífico envolvendo células imunes efectoras, um antígeno é tipicamente um antígeno presente na superfície de uma célula tumoral ou de outro tipo de célula associada com doença, tal como, entre outros, qualquer alvo listado na Tabela 1, como, entre outros, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 ou CD71 (receptor da transferrina) e outro antígeno é tipicamente um receptor estimulatório ou inibitório presente na superfície de uma célula T, célula *natural killer* (NK), célula mononuclear mieloide, macrófago e/ou outra célula imune efectora, como, entre outras, 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 estimulatório presente na superfície de uma célula T ou célula NK; os exemplos de tais receptores estimulatórios incluem, entre outros, CD3, CD27, CD28, CD137 (também designado 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; os exemplos de tais receptores inibitórios incluem, entre outros, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 e KIRs expressos em NK. O domínio do anticorpo que confere especificidade ao antígeno da superfície de células T pode também ser substituído por um ligante ou domínio ligante que se liga a um receptor de células T, um receptor de macrófagos e/ou outro receptor de célula imune efectora, como, entre outros, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2 ou TNFSF9.

[00334]Uma modalidade da invenção é um anticorpo ativável multiespecífico

que pode ser ativado em um microambiente de câncer e que inclui um anticorpo, por exemplo, uma IgG ou scFv, direcionado a um alvo no tumor, e um anticorpo agonista, por exemplo, uma IgG ou scFv, direcionado para um receptor co-estimulatório expresso na superfície de uma célula T ou célula NK ativada, em que pelo menos um, o anticorpo contra o alvo canceroso e/ou o anticorpo agonista está mascarado. Os exemplos de receptores co-estimulatórios incluem, entre outros, CD27, CD137, GITR, HVEM, NKG2D e OX40. Nessa modalidade, o anticorpo ativável multiespecífico, uma vez ativado por proteases associadas ao tumor, formaria uma ligação cruzada com eficiência e ativaria os receptores co-estimulatórios expressos em células T ou células NK de maneira dependente do tumor para reforçar a atividade de células T que respondem a qualquer antígeno tumoral via seus receptores endógenos de antígenos de células T ou ativadores de células NK. A natureza dependente de ativação desses receptores co-estimulatórios de células T ou células NK focalizaria a atividade do anticorpo ativável multiespecífico ativado para células T específicas do tumor, sem ativar todas as células T, independentemente da especificidade por seu antígeno. Em uma modalidade, pelo menos o anticorpo do receptor co-estimulatório do anticorpo ativável multiespecífico está mascarado para impedir a ativação de células T auto-reativas que possam estar presentes em tecidos que também expressam o antígeno reconhecido pelo anticorpo direcionado contra o alvo tumoral no anticorpo ativável multiespecífico, mas cuja atividade é restringida pela falta de envolvimento dos co-receptores.

[00335] Uma modalidade da invenção é um anticorpo ativável multiespecífico que pode ser ativado em uma doença caracterizada pela superestimulação de células T, tal como, entre outras, um microambiente de doença autoimune ou doença inflamatória. Tal anticorpo ativável multiespecífico inclui um anticorpo, por exemplo, uma IgG ou scFv, direcionado para um alvo compreendendo um antígeno de superfície expresso em um tecido atacado por uma célula T em uma doença autoimune ou inflamatória, e um anticorpo, por exemplo, uma IgG ou scFv, direcionado para um receptor

inibitório expresso na superfície de uma célula T ou célula NK, em que pelo menos um, o anticorpo contra o alvo no tecido doente e/ou o anticorpo do receptor inibitório de células T está mascarado. Os exemplos de receptores inibitórios incluem, entre outros, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3 e KIRs expressos em células NK. Os exemplos de um antígeno tecidual atacado por células T em uma doença autoimune incluem, entre outros, um antígeno de superfície expresso em mielina ou células nervosas na esclerose múltipla ou um antígeno de superfície expresso em células de ilhotas pancreáticas na diabetes Tipo 1. Nessa modalidade, o anticorpo ativável multiespecífico quando localizado no tecido sob o ataque autoimune ou da inflamação é ativado e envolve conjuntamente o receptor inibitório de células T ou células NK para suprimir a atividade de células T autorreativas respondendo a quaisquer antígenos visados no tecido com a doença via seus receptores endógenos TCR ou ativadores. Em uma modalidade, pelo menos um ou múltiplos anticorpos estão mascarados para impedir a supressão de respostas de células T em tecidos sem a doença onde o antígeno-alvo pode ser expresso também.

[00336]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CD3 epsilon (CD3 $\epsilon$ , também referido no presente como CD3e e CD3) e um anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o scFv anti-CD3 $\epsilon$  e/ou o anticorpo direcionado ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o scFV contra CD3 $\epsilon$  inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ . Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o

acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o scFv contra CD3 $\epsilon$  inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ , e o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo.

[00337]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CD3 $\epsilon$  e um anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o scFv anti-CD3 $\epsilon$  e/ou o anticorpo direcionado contra câncer ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o scFv contra CD3 $\epsilon$  inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ . Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer. Em algumas modalidades, o scFv contra CD3 $\epsilon$  inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ , e o anticorpo direcionado contra



câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer.

[00338]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CD3 $\epsilon$  e um anticorpo IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o scFv anti-CD3 $\epsilon$  e/ou o anticorpo IgG direcionado contra câncer ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o scFv contra CD3 $\epsilon$  inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ . Em algumas modalidades, o anticorpo IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer. Em algumas modalidades, o scFv contra CD3 $\epsilon$  inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ , e o anticorpo direcionado contra câncer IgG ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado

ao câncer.

[00339]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CD3 epsilon (CD3ε) que é derivado de OKT3, em que pelo menos um, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno e/ou o scFV de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 está mascarado. Em algumas modalidades, o scFV de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3ε, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3ε. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o scFV de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3ε, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3ε, e o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo.

[00340]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 e um anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 e/ou o anticorpo direcionado contra câncer ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 inclui um primeiro anticorpo ou

seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ . Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer. Em algumas modalidades, o scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ , e o anticorpo direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer.

[00341]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 e um anticorpo IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 e/ou o anticorpo IgG direcionado contra câncer ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3 $\epsilon$ , em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3 $\epsilon$ . Em algumas modalidades, o anticorpo

IgG direcionado contra câncer ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer. Em algumas modalidades, o scFv de OKT3 ou scFv derivado de OKT3 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CD3ε, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CD3ε, e o anticorpo direcionado contra câncer IgG ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo relacionado ao câncer, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo relacionado ao câncer.

[00342]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CTLA-4, em que pelo menos um, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno e/ou o scFv anti-CTLA-4 está mascarado. Em algumas modalidades, o scFv anti-CTLA-4 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CTLA-4, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CTLA-4. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento que inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o scFv anti-CTLA-4

inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CTLA-4, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CTLA-4, e o anticorpo direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo.

[00343]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico que envolve células T inclui um scFv anti-CTLA-4 e um anticorpo IgG direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno, em que pelo menos um, o scFv anti-CTLA-4 e/ou o anticorpo IgG direcionado ou sua porção de ligação a antígeno está mascarado. Em algumas modalidades, o scFv anti-CTLA-4 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CTLA-4, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CTLA-4. Em algumas modalidades, o anticorpo IgG direcionado ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo. Em algumas modalidades, o scFv anti-CTLA-4 inclui um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga a CTLA-4, em que o AB1 está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade do AB1 para se ligar a CTLA-4, e o anticorpo direcionado IgG ou seu fragmento de ligação a antígeno inclui um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo, em que o AB2 está acoplado a uma

porção de mascaramento (MM2) tal que o acoplamento da MM2 reduz a capacidade do AB2 para se ligar ao segundo alvo.

[00344]Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados contra múltiplos antígenos e/ou os anticorpos direcionados ativáveis contra múltiplos antígenos incluem pelo menos um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga a um primeiro alvo e/ou primeiro epítopo e um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga a um segundo alvo e/ou um segundo epítopo. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados contra múltiplos antígenos e/ou anticorpos direcionados ativáveis contra múltiplos antígenos ligam-se a dois ou mais alvos diferentes. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados contra múltiplos antígenos e/ou os anticorpos direcionados ativáveis contra múltiplos antígenos ligam-se a dois ou mais epítopos diferentes no mesmo alvo. Em algumas modalidades, os anticorpos direcionados contra múltiplos antígenos e/ou os anticorpos direcionados ativáveis contra múltiplos antígenos ligam-se a uma combinação de dois ou mais alvos diferentes e dois ou mais epítopos diferentes no mesmo alvo.

[00345]Em algumas modalidades, um anticorpo ativável multiespecífico compreendendo uma IgG possui os domínios variáveis da IgG mascarados. Em algumas modalidades, um anticorpo ativável multiespecífico compreendendo um scFv possui os domínios scFv mascarados. Em algumas modalidades, um anticorpo ativável multiespecífico possui domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que pelo menos um dos domínios variáveis de IgG está acoplado a uma porção de mascaramento. Em algumas modalidades, um anticorpo ativável possui domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que pelo menos um dos domínios scFv está acoplado a uma porção de mascaramento. Em algumas modalidades, um anticorpo ativável multiespecífico possui domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que pelo menos um dos domínios variáveis IgG está acoplado a uma porção de mascaramento e pelo menos um dos domínios scFv está acoplado a uma porção de mascaramento. Em algumas

modalidades, um anticorpo ativável multiespecífico possui domínios variáveis de IgG e domínios scFv, em que cada um dos domínios variáveis de IgG e dos domínios scFv estão acoplados a suas próprias porções de mascaramento. Em algumas modalidades, um domínio de anticorpo de um anticorpo ativável multiespecífico possui especificidade por um antígeno-alvo e outro domínio de anticorpo possui especificidade por um antígeno de superfície de célula T. Em algumas modalidades, um domínio de anticorpo de um anticorpo ativável multiespecífico possui especificidade por um antígeno-alvo e outro domínio de anticorpo possui especificidade por outro antígeno-alvo. Em algumas modalidades, um domínio de anticorpo de um anticorpo ativável multiespecífico possui especificidade por um epítipo de um antígeno-alvo e outro domínio de anticorpo possui especificidade por outro epítipo do antígeno-alvo.

[00346]Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fusionado à terminação carboxila da cadeia pesada de um anticorpo IgG ativável, à terminação carboxila da cadeia leve de um anticorpo IgG ativável ou às terminações carboxila da cadeia pesada e da cadeia leve de um anticorpo IgG ativável. Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fusionado à terminação amino da cadeia pesada de um anticorpo IgG ativável, à terminação amino da cadeia leve de um anticorpo IgG ativável ou às terminações amino da cadeia pesada e da leve de um anticorpo IgG ativável. Em um anticorpo ativável multiespecífico, um scFv pode ser fusionado a qualquer combinação de uma ou mais terminações carboxila e uma ou mais terminações amino de um anticorpo IgG ativável. Em algumas modalidades, uma porção de mascaramento (MM) ligada a uma porção clivável (CM) está anexada e mascara um domínio de ligação a antígeno da IgG. Em algumas modalidades, uma porção de mascaramento (MM) ligada a uma porção clivável (CM) está anexada e mascara um domínio de ligação a antígeno pelo menos de um scFv. Em algumas modalidades, uma porção de mascaramento (MM) ligada a uma porção clivável (CM) está anexada e mascara um domínio de ligação a antígeno de uma IgG e uma porção de

mascaramento (MM) ligada a uma porção clivável (CM) está anexada e mascara um domínio de ligação a antígeno pelo menos de um scFv.

[00347]A invenção provê exemplos de estruturas do anticorpo ativável multi-específico que incluem, entre outras, as seguintes: (VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>: (MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; ou (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>: (VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>, em que: VL e VH representam os domínios variáveis leve e pesado da primeira especificidade, contidos na IgG; VL\* e VH\* representam os domínios variáveis da



segunda especificidade, contidos no scFv; L1 é um peptídeo de ligação conectando a porção de mascaramento (MM) e a porção clivável (CM); L2 é um peptídeo de ligação conectando a porção clivável (CM) e o anticorpo; L3 é um peptídeo de ligação conectando os domínios variáveis do scFv; L4 é um peptídeo de ligação conectando 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 especificidade podem ser dirigidas a qualquer antígeno ou epítipo.

[00348]Em algumas modalidades de um anticorpo ativável multiespecífico envolvendo células T, um antígeno é tipicamente um antígeno presente na superfície de uma célula tumoral ou outro tipo de célula associada com doença, como, entre outros, qualquer alvo listado na Tabela 1, como, entre outros, EGFR, erbB2, EpCAM, Jagged, PD-L1, B7H3 ou CD71 (receptor da transferrina) e outro antígeno é tipicamente um receptor estimulatório (também aqui designados como ativadores) ou inibitório presente na superfície de uma célula T, célula *natural killer* (NK), célula mononuclear mieloide, macrófago e/ou outra célula imune efetora, como, entre outras, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137 (também referida como TNFRSF9), CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 ou VISTA. O domínio de anticorpo que confere especificidade para o antígeno de superfície de células T pode também ser substituído por um domínio 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 imunes efectoras, como, entre outros, B7-1, B7-2, B7H3, PD-L1, PD-L2 ou TNFSF9. Em algumas modalidades de anticorpo direcionado ativável contra múltiplos antígenos, um antígeno é selecionado a partir do grupo de alvos listados na Tabela 1 e outro antígeno é selecionado a partir do grupo de alvos listados na Tabela 1.

[00349]Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado é um anticorpo

anti-EGFR. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado é C225v5, que é específico para a ligação ao EGFR. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado é C225, que é específico para a ligação ao EGFR. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado é C225v4, que é específico para a ligação ao EGFR. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado is C225v6, que é específico para a ligação ao EGFR. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado é um anticorpo anti-Jagged. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado é 4D11, que é específico para a ligação aos Jagged 1 e Jagged 2 humanos e de camundongo. Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado é 4D11v2, que é específico para a ligação aos Jagged 1 e Jagged 2 humanos e de camundongo.

[00350]Em algumas modalidades, o anticorpo direcionado pode estar na forma de um anticorpo ativável. Em algumas modalidades, o(s) scFv(s) pode(m) estar na forma de um Pro-scFv (vide, p. ex., WO 2009/025846, WO 2010/081173).

[00351]Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a CD3ε, e é ou é derivado de um anticorpo ou de seu fragmento que se liga a CD3ε, p. ex., CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHT1 ou V9. Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a CTLA-4 (também aqui referida como CTLA e CTLA4).

[00352]Em algumas modalidades, o scFv anti-CTLA-4 inclui a sequência de aminoácidos:

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS  
QSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED  
FAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGG  
GVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS  
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLTVSSA  
S (SEQ ID NO: 692)

[00353]Em algumas modalidades, o scFv anti-CTLA-4 inclui a sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,

99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 692.

[00354]Em algumas modalidades, o scFv anti-CD3 $\epsilon$  scFv inclui a sequência de aminoácidos:

GGGSGGGGSGSGGGSGGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKA  
SGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFQDKATLTDDKSSSTA  
YMLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGG  
GSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA  
SGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR  
(SEQ ID NO: 693)

[00355]Em algumas modalidades, o scFv anti-CD3 $\epsilon$  inclui a sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 693.

[00356]Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a uma ou mais células T, uma ou mais células NK e/ou um ou mais macrófagos. Em algumas modalidades, o scFv é específico para a ligação a um alvo selecionado a partir do grupo constituído por 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.

[00357]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável 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 seu fragmento. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao anticorpo ativável multiespecífico via um ligador. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador clivável. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador que inclui pelo menos uma sequência de substrato clivável por uPA ou pelo menos uma sequência de substrato clivável por matriptase. Em algumas modalidades, o ligador é um ligador

não clivável. Em algumas modalidades, o agente é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o agente é um agente que danifica ácidos nucleicos, como um alquilante do DNA ou um intercalante do DNA ou outro agente que danifica o DNA. Em algumas modalidades, o ligador é um ligador clivável. Em algumas modalidades, o agente é um agente selecionado a partir do grupo listado na Tabela 4. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoide. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrol-benzodiazepina.

[00358]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico também inclui uma porção detectável. Em algumas modalidades, a porção detectável é um agente diagnóstico.

[00359]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico contém naturalmente uma ou mais ligações dissulfeto. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico pode ser construído para incluir uma ou mais ligações dissulfeto.

[00360]A invenção também provê uma molécula de ácido nucleico isolado codificadora de um anticorpo ativável multiespecífico aqui descrito, bem como vetores que incluem essas sequências de ácido nucleico isolado. A invenção provê métodos para produzir um anticorpo ativável multiespecífico cultivando uma célula em condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que a célula compreende tal molécula de ácido nucleico. Em algumas modalidades, a célula compreende tal vetor.

[00361]A invenção também provê um método para fabricar anticorpos ativáveis multiespecíficos da invenção por (a) cultivar uma célula compreendendo uma construção de ácido nucleico que codifica o anticorpo ativável multiespecífico em condições que levam à expressão do multiespecífico ativável, e (b) recuperar o anticorpo ativável multiespecífico.

[00362]A invenção também provê anticorpos ativáveis multiespecíficos e/ou composições de anticorpo ativável multiespecífico que incluem pelo menos um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga especificamente a um primeiro alvo ou primeiro epítipo e um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga a um segundo alvo ou um segundo epítipo, em que pelo menos AB1 é acoplado ou de outra forma anexado a uma porção de mascaramento (MM1), tal que o acoplamento da MM1 reduz a capacidade de AB1 para se ligar a seu alvo. Em algumas modalidades, a MM1 está acoplada a um AB1 via uma primeira sequência de porção clivável (CM1) que inclui um substrato para uma protease, por exemplo, uma protease que está colocalizada com o alvo de AB1 em um sítio de tratamento ou um sítio diagnóstico em um sujeito. Os anticorpos ativáveis multiespecíficos aqui providos ficam estáveis em circulação, são ativados nos sítios pretendidos para terapia e/ou diagnóstico, mas não em tecido normal, ou seja, sadio, e, quando ativados, exibem ligação ao alvo de AB1 que é pelo menos comparável à do anticorpo multiespecífico não modificado correspondente.

[00363]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico compreende um peptídeo de ligação entre a MM1 e a CM1.

[00364]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico compreende um peptídeo de ligação entre a CM1 e o AB1.

[00365]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2) e pelo menos uma parte do anticorpo ativável multiespecífico possui o arranjo estrutural do N-

terminal ao C-terminal como segue, no estado não clivado: MM1-LP1-CM1-LP2-AB1 ou AB1-LP2-CM1-LP1-MM1. Em algumas modalidades, os dois peptídeos de ligação não precisam ser idênticos.

[00366]Em algumas modalidades, pelo menos um entre LP1 ou LP2 inclui uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por  $(GS)_n$ ,  $(GGS)_n$ ,  $(GSGGS)_n$  (SEQ ID NO: 385) e  $(GGGS)_n$  (SEQ ID NO: 386), onde  $n$  é um número inteiro pelo menos igual a um. Em algumas modalidades, pelo menos um entre LP1 ou LP2 inclui uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por GGSG (SEQ ID NO: 387), GGSGG (SEQ ID NO: 388), GSGSG (SEQ ID NO: 389), GSGGG (SEQ ID NO: 390), GGGSG (SEQ ID NO: 391) e GSSSG (SEQ ID NO: 392).

[00367]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico inclui pelo menos um primeiro anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB1) que se liga especificamente a um primeiro alvo ou primeiro epítipo e um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB2) que se liga especificamente um segundo alvo ou segundo epítipo. Em algumas modalidades, cada AB no anticorpo ativável multiespecífico é selecionado independentemente a partir do grupo constituído por anticorpo monoclonal, anticorpo de domínio, de cadeia única, fragmento Fab, fragmento  $F(ab')_2$ , scFv, scAb, dAb, anticorpo de cadeia pesada de domínio único e anticorpo de cadeia leve de domínio único. Em algumas modalidades, cada AB no anticorpo ativável multiespecífico é um anticorpo monoclonal de roedor (p. ex., camundongo ou rato), quimérico, humanizado ou totalmente humano.

[00368]Em algumas modalidades, cada AB no anticorpo ativável multiespecífico possui uma constante de dissociação no equilíbrio próxima ou inferior a 100 nM para a ligação a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00369]Em algumas modalidades, MM1 possui uma constante de dissociação no equilíbrio para a ligação ao seu AB correspondente que é superior à constante de

dissociação no equilíbrio do AB ao seu alvo ou epítopo correspondente.

[00370]Em algumas modalidades, MM1 possui uma constante de dissociação no equilíbrio para a ligação ao seu AB correspondente que não superior à constante de dissociação no equilíbrio do AB ao seu alvo ou epítopo correspondente.

[00371]Em algumas modalidades, MM1 não interfere nem compete com seu AB correspondente pela ligação ao alvo ou epítopo correspondente quando o anti-corpo ativável multiespecífico está em estado clivado.

[00372]Em algumas modalidades, MM1 é um polipeptídeo com entre 2 e 40 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico é polipeptídeo com no máximo 40 aminoácidos de comprimento.

[00373]Em algumas modalidades, MM1 possui uma sequência polipeptídica diferente daquela do alvo do AB correspondente.

[00374]Em algumas modalidades, MM1 possui uma sequência polipeptídica que é no máximo 50% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB correspondente. Em algumas modalidades, MM1 possui uma sequência polipeptídica que é no máximo 25% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB correspondente. Em algumas modalidades, MM1 possui uma sequência polipeptídica que é no máximo 10% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB correspondente.

[00375]Em algumas modalidades, o acoplamento de MM1 reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítopo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítopo correspondente é pelo menos 20 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítopo correspondente.

[00376]Em algumas modalidades, o acoplamento de MM1 reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítopo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítopo correspondente é pelo menos 40 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à

MM1 dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00377]Em algumas modalidades, o acoplamento de MM1 reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente é pelo menos 100 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00378]Em algumas modalidades, o acoplamento de MM1 reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente é pelo menos 1000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00379]Em algumas modalidades, o acoplamento de MM1 reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente é pelo menos 10.000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM1 dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00380]Em algumas modalidades, MM1 é uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de uma MM aqui descrita.

[00381]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico inclui pelo menos uma segunda porção de mascaramento (MM2) que inibe a ligação do AB2 a seu alvo quando o anticorpo ativável multiespecífico está em estado não clivado, e uma segunda porção clivável (CM2) acoplada ao AB2, em que a CM2 é um polipeptídeo que funciona como substrato para uma segunda protease. Em algumas modalidades, CM2 é um polipeptídeo com no máximo 15 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, a segunda protease está colocalizada com o segundo alvo ou epítipo em um tecido, e em que a segunda protease cliva a CM2 no anticorpo ativável multiespecífico quando o anticorpo ativável multiespecífico é exposto à segunda



protease. Em algumas modalidades, a primeira protease e a segunda protease estão colocalizadas com o primeiro alvo ou epítipo e o segundo alvo ou epítipo em um tecido. Em algumas modalidades, a primeira protease e a segunda protease são a mesma protease. Em algumas modalidades, CM1 e CM2 são substratos diferentes para a mesma protease. Em algumas modalidades, a protease é selecionada a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7. Em algumas modalidades, a primeira protease e a segunda protease são proteases diferentes. Em algumas modalidades, a primeira protease e a segunda protease são proteases diferentes selecionadas a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7.

[00382]Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico, p. ex., MM1 e pelo menos MM2, possui uma constante de dissociação no equilíbrio para a ligação ao seu AB correspondente que é superior à constante de dissociação no equilíbrio do AB a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00383]Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico possui uma constante de dissociação no equilíbrio para a ligação ao seu AB correspondente que não é acima da constante de dissociação no equilíbrio do AB ao seu alvo ou epítipo correspondente.

[00384]Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico não interfere nem compete com seu AB correspondente pela ligação ao alvo ou epítipo correspondente quando o anticorpo ativável multiespecífico está em estado clivado.

[00385]Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico é um polipeptídeo com entre 2 e 40 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico é um polipeptídeo com no máximo 40 aminoácidos de comprimento.

[00386]Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico possui uma sequência polipeptídica que é diferente daquela do alvo do AB

correspondente.

[00387]Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico possui uma sequência polipeptídica que é no máximo 50% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB correspondente. Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico possui uma sequência polipeptídica que é no máximo 25% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB correspondente. Em algumas modalidades, cada MM no anticorpo ativável multiespecífico possui uma sequência polipeptídica que é no máximo 10% idêntica a qualquer parceiro de ligação natural do AB correspondente.

[00388]Em algumas modalidades, o acoplamento de cada MM reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente é pelo menos 20 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00389]Em algumas modalidades, o acoplamento de cada MM reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente é pelo menos 40 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00390]Em algumas modalidades, o acoplamento de cada MM reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente é pelo menos 100 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00391]Em algumas modalidades, o acoplamento de cada MM reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo

correspondente é pelo menos 1000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00392]Em algumas modalidades, o acoplamento de cada MM reduz a capacidade do AB correspondente para se ligar a seu alvo ou epítipo, tal que a constante de dissociação ( $K_d$ ) do AB quando acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente é pelo menos 10.000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando não acoplado à MM dirigida a seu alvo ou epítipo correspondente.

[00393]Em algumas modalidades, cada MM é uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de uma MM aqui descrita.

[00394]Em algumas modalidades, pelo menos uma, CM1 e/ou CM2, é clivada por pelo menos uma protease selecionada a partir de uPA e matriptase. Em algumas modalidades, pelo menos uma CM1 e/ou CM2 inclui uma sequência de aminoácidos que é selecionada a partir do grupo constituído por uma sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 8A-8J, um subgênero de uma sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 8A-8J, uma sequência expandida de consenso com base em uma das sequências *core* de consenso para CM mostradas nas Tabelas 8A-8J. Em algumas modalidades, a sequência expandida de consenso é uma sequência de consenso mostrada nas Tabelas 9A-9J-3, uma sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 10A-10D, um subgênero de uma sequência *core* de consenso para CM mostrada nas Tabelas 10A-10D e uma sequência de consenso mostrada nas Tabelas 11A-11D.

[00395]Em algumas modalidades, pelo menos uma CM1 e/ou CM2 inclui uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 163-267.

[00396]Em algumas modalidades, a protease que cliva a sequência da primeira porção clivável (CM1) está colocalizada com o alvo do AB1 no anticorpo ativável multiespecífico em um tecido, e a protease cliva a CM1 no anticorpo ativável

multiespecífico quando o anticorpo ativável multiespecífico é exposto à protease.

[00397]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico inclui mais de uma sequência de porção clivável, e a protease que cliva pelo menos uma sequência de porção clivável está colocada com o alvo de pelo menos uma das regiões AB no anticorpo ativável multiespecífico em um tecido, e a protease cliva a CM no anticorpo ativável multiespecífico quando o anticorpo ativável multiespecífico é exposto à protease.

[00398]Em algumas modalidades, cada CM, p. ex., CM1 e pelo menos CM2, está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos duas vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00399]Em algumas modalidades, cada CM, p. ex., CM1 e pelo menos CM2, está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos três vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00400]Em algumas modalidades, cada CM, p. ex., CM1 e pelo menos CM2, está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos quatro vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se

a seu alvo.

[00401]Em algumas modalidades, cada CM, p. ex., CM1 e pelo menos CM2, está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos cinco vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00402]Em algumas modalidades, cada CM, p. ex., CM1 e pelo menos CM2, está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos dez vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00403]Em algumas modalidades, cada CM, p. ex., CM1 e pelo menos CM2, está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos vinte vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00404]Em algumas modalidades, cada CM está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos 40 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu

alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00405]Em algumas modalidades, cada CM está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos 50 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00406]Em algumas modalidades, cada CM está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos 100 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00407]Em algumas modalidades, cada CM está posicionada no anticorpo ativável multiespecífico tal que, no estado não clivado, a ligação do anticorpo ativável multiespecífico a um alvo de uma das regiões AB é reduzida para ocorrer com uma constante de dissociação no equilíbrio que é pelo menos 200 vezes maior do que a constante de dissociação no equilíbrio de uma ligação de AB não modificado a seu alvo, enquanto que, no estado clivado, o AB liga-se a seu alvo.

[00408]Em algumas modalidades, cada CM no anticorpo ativável multiespecífico é um polipeptídeo com até 15 aminoácidos de comprimento.

[00409]Em algumas modalidades, pelo menos uma CM no anticorpo ativável multiespecífico inclui uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NOs: 163-267 e a outra CM inclui a sequência de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 26). Em algumas modalidades, pelo menos uma CM inclui a sequência de aminoácidos LSGRSDNH (SEQ ID NO: 26). Em algumas modalidades, pelo menos uma porção clivável é selecionada para uso com uma protease

específica, por exemplo, uma protease conhecida por estar colocalizada com pelo menos um alvo do anticorpo ativável multiespecífico. Por exemplo, porções cliváveis adequadas para uso nos anticorpos ativáveis multiespecíficos da invenção são clivadas por pelo menos uma protease, como uroquinase, legumaina e/ou matriptase (também aqui referida como MT-SP1 ou MTSP1). Em algumas modalidades, uma porção clivável adequada inclui pelo menos uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por SEQ ID NO: 163-267.

[00410]Em algumas modalidades, uma CM é substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de uPA e matriptase, e a outra CM no anticorpo ativável multiespecífico é substrato para uma protease selecionada a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7. Em algumas modalidades, a protease is selecionada a partir do grupo constituído por uPA, legumaina, matriptase, ADAM17, BMP-1, TMPRSS3, TMPRSS4, elastase neutrofílica, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-13 e MMP-14. Em algumas modalidades, a protease é uma catepsina, como, entre outras, catepsina S. Em algumas modalidades, cada CM no anticorpo ativável multiespecífico é substrato para uma protease selecionada a partir do grupo constituído por uPA (ativador do plasminogênio uroquinase), legumaina e matriptase. Em algumas modalidades, a protease compreende uPA. Em algumas modalidades, a protease compreende legumaina. Em algumas modalidades, a protease compreende matriptase.

[00411]Em algumas modalidades, pelo menos uma CM no anticorpo ativável multiespecífico é substrato para pelo menos duas proteases. Em algumas modalidades, pelo menos uma CM no anticorpo ativável multiespecífico é substrato para pelo menos duas proteases, em que uma das proteases é selecionada a partir do grupo constituído por uPA e matriptase e a outra protease é selecionada a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7. Em algumas modalidades, pelo menos uma CM no anticorpo ativável multiespecífico é substrato para pelo menos duas

proteases selecionada a partir do grupo constituído por uPA, legumaina e matriptase.

[00412]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico inclui pelo menos uma primeira CM (CM1) e uma segunda CM (CM2). Em algumas modalidades, CM1 e CM2 integram um único ligador clivável que une uma MM a um AB. Em algumas modalidades, CM1 integra um ligador clivável que une MM1 a AB1, e CM2 integra um ligador clivável separado que une uma MM2 a AB2. Em algumas modalidades, a anticorpo ativável multiespecífico compreende mais de duas CMs. Em algumas modalidades, tal anticorpo ativável multiespecífico compreende mais de duas CMs e mais de duas MMs. Em algumas modalidades, CM1 e CM2 são polipeptídeos com no máximo 15 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, pelo menos uma, a primeira CM ou a segunda CM, é um polipeptídeo que funciona como substrato para uma protease selecionada a partir do grupo constituído por aquelas listadas na Tabela 7. Em algumas modalidades, pelo menos uma, a primeira CM ou a segunda CM, é um polipeptídeo que funciona como substrato para uma protease selecionada a partir do grupo constituído por uPA, legumaina e matriptase. Em algumas modalidades, a primeira CM é clivada por um primeiro agente de clivagem selecionado a partir do grupo constituído por uPA, legumaina e matriptase em um tecido-alvo, e a segunda CM é clivada por um segundo agente de clivagem em um tecido-alvo. Em algumas modalidades, a outra protease é selecionada a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são a mesma protease selecionada a partir do grupo constituído por aquelas listadas na Tabela 7, e a primeira CM e a segunda CM são substratos diferentes para a enzima. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são a mesma protease selecionada a partir do grupo constituído por uPA, legumaina e matriptase, e a primeira CM e a segunda CM são substratos diferentes para a enzima. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são a mesma protease



selecionada a partir do grupo listado na Tabela 7, e a primeira CM e a segunda CM são o mesmo substrato. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são proteases diferentes. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem são proteases diferentes selecionadas a partir do grupo constituído por aquelas mostradas na Tabela 7. Em algumas modalidades, o primeiro agente de clivagem e o segundo agente de clivagem estão colocados no tecido-alvo. Em algumas modalidades, a primeira CM e a segunda CM são clivadas pelo menos por um agente de clivagem no tecido-alvo.

[00413]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico é exposto e clivado por uma protease tal que, no estado ativado ou estado clivado, o anticorpo ativável multiespecífico ativado inclui uma sequência de aminoácidos de cadeia leve que compreende pelo menos uma parte da sequência de LP2 e/ou CM após a protease ter clivado a CM.

[00414]A invenção também provê composições e métodos que incluem um anticorpo ativável multiespecífico que compreende 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 anticorpo ativável multiespecífico está acoplado a uma porção de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 para se ligar a seu alvo. Em algumas modalidades, cada AB está acoplado a uma MM que diminui a capacidade de seu AB correspondente para cada alvo. Por exemplo, em modalidades de anticorpo ativável biespecífico, AB1 está acoplado a uma primeira porção de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 para se ligar a seu alvo, e AB2 está acoplado a uma segunda porção de mascaramento (MM2) que diminui a capacidade de AB2 para se ligar a seu alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico compreende mais de duas regiões AB; em tais modalidades, AB1 está acoplado a uma primeira porção de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 para se ligar a seu alvo, AB2 está

acoplado a uma segunda porção de mascaramento (MM2) que diminui a capacidade de AB2 para se ligar a seu alvo, AB3 está acoplado a uma terceira porção de mascaramento (MM3) que diminui a capacidade de AB3 para se ligar a seu alvo, e assim por diante para cada AB no anticorpo ativável multiespecífico.

[00415]Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico inclui ainda pelo menos uma porção clivável (CM) que é substrato para uma protease, em que a CM liga uma MM a um AB. Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo ativável 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 anticorpo ativável multiespecífico está acoplado via uma primeira porção clivável (CM1) a uma porção de mascaramento (MM1) que diminui a capacidade de AB1 para se ligar a seu alvo. Em algumas modalidades de anticorpo ativável biespecífico, AB1 está acoplado via CM1 a MM1, e AB2 está acoplado via uma segunda porção clivável (CM2) a uma segunda porção de mascaramento (MM2) que diminui a capacidade de AB2 para se ligar a seu alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável multiespecífico compreende mais de duas regiões AB; em algumas dessas modalidades, AB1 está acoplado via CM1 a MM1, AB2 está acoplado via CM2 a MM2 e AB3 está acoplado via uma terceira porção clivável (CM3) a uma terceira porção de mascaramento (MM3) que diminui a capacidade de AB3 para se ligar a seu alvo, e assim por diante para cada AB no anticorpo ativável multiespecífico.

Anticorpos ativáveis com porções de ligação não estérica ou parceiros de ligação para porções de ligação não estérica

[00416]A invenção também provê anticorpos ativáveis que incluem porções de ligação não estérica (NB) ou parceiros de ligação (BP) para porções de ligação não estérica, em que o BP recruta ou de outra forma atrai a NB para o anticorpo ativável. Os anticorpos ativáveis aqui providos incluem, por exemplo, um anticorpo ativável que

inclui uma porção de ligação não estérica (NB), um ligador clivável (CL) e um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB) que se liga a um alvo; um anticorpo ativável que inclui um parceiro de ligação para uma porção de ligação não estérica (BP), um CL e um AB; e um anticorpo ativável que inclui um BP ao qual uma NB foi recrutada, um CL e um AB que se liga ao alvo. Anticorpos ativáveis, nos quais a NB está ligada covalentemente ao CL e AB do anticorpo ativável ou está associada por interação com um BP que está ligado covalentemente ao CL e ao AB do anticorpo ativável, são aqui referidos como “anticorpos ativáveis contendo NB”. Ativável ou alternável, neste relatório descritivo, significa que o anticorpo ativável exibe um primeiro nível de ligação a um alvo quando o anticorpo ativável está em estado inibido, mascarado ou não clivado (ou seja, uma primeira conformação) e um segundo nível de ligação ao alvo quando o anticorpo ativável está em estado não inibido, não mascarado e/ou clivado (ou seja, uma segunda conformação, ou seja, anticorpo ativado), em que o segundo nível de ligação a alvo é maior do que o primeiro nível de ligação a alvo. As composições de anticorpo ativável podem exibir biodisponibilidade aumentada e distribuição mais favorável quando comparadas a anticorpos terapêuticos convencionais.

[00417]Em algumas modalidades, os anticorpos ativáveis induzem toxicidade e/ou efeitos colaterais adversos reduzidos que do contrário poderiam resultar da ligação nos locais não de tratamento e/ou locais não de diagnóstico se o AB não tivesse sido mascarado ou de outra forma inibido para a ligação em tal local.

[00418]Em uma modalidade, o anticorpo ativável inclui uma porção de ligação não estérica (NB); um ligador clivável (CL); e um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que a NB é um polipeptídeo que não se liga especificamente ao AB; o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) para uma enzima; o CL está posicionado tal que, em estado não clivado, a NB interfere com a ligação do AB ao alvo e, em estado clivado, a NB não interfere com a ligação do AB ao alvo; e a NB não inibe a clivagem do CL pela enzima. Por todo este relatório

descritivo, o termo polipeptídeo refere-se a qualquer polipeptídeo que inclua pelo menos dois resíduos de aminoácido, incluindo polipeptídeos maiores, proteínas completas e seus fragmentos, e o termo polipeptídeo não se limita a polipeptídeos de cadeia única e pode incluir polipeptídeos multi-unitários, p. ex., com múltiplas cadeias. Em casos em que o comprimento do polipeptídeo é mais curto, por exemplo, menos de 50 aminoácidos no total, os termos peptídeo e polipeptídeo são utilizados alternadamente neste relatório descritivo, e em casos em que o comprimento do polipeptídeo é mais longo, p. ex., 50 aminoácidos ou mais, os termos polipeptídeo e proteína são utilizados alternadamente.

[00419]Em uma modalidade, o anticorpo ativável inclui uma porção de ligação não estérica (NB); um ligador clivável (CL); e um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB) que se liga a especificamente ao alvo, em que (i) a NB inclui um polipeptídeo que não se liga especificamente ao AB; (ii) CL é um polipeptídeo com até 50 aminoácidos de comprimento que inclui um substrato (S) para uma enzima, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA.; (iii) o CL está posicionado tal que, em estado não clivado, a NB interfere com a ligação do AB ao alvo e, em estado clivado, a NB não interfere com a ligação do AB ao alvo; e (iv) a NB não inibe a clivagem do CL pela enzima. Por exemplo, o CL possui um comprimento de até 15 aminoácidos, um comprimento de até 20 aminoácidos, um comprimento de até 25 aminoácidos, um comprimento de até 30 aminoácidos, um comprimento de até 35 aminoácidos, um comprimento de até 40 aminoácidos, um comprimento de até 45 aminoácidos, um comprimento de até 50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 10-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 15-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 20-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 25-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 30-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 35-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 40-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 45-50 aminoácidos, um comprimento na faixa de 10-40 aminoácidos, um comprimento na faixa de

15-40 aminoácidos, um comprimento na faixa de 20-40 aminoácidos, um comprimento na faixa de 25-40 aminoácidos, um comprimento na faixa de 30-40 aminoácidos, um comprimento na faixa de 35-40 aminoácidos, um comprimento na faixa de 10-30 aminoácidos, um comprimento na faixa de 15-30 aminoácidos, um comprimento na faixa de 20-30 aminoácidos, um comprimento na faixa de 25-30 aminoácidos, um comprimento na faixa de 10-20 aminoácidos ou um comprimento na faixa de 10-15 aminoácidos.

[00420]Em uma modalidade, o anticorpo ativável inclui uma porção de ligação não estérica (NB); um ligador clivável (CL); e um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB) que se liga a especificamente ao alvo, em que (i) a NB inclui um polipeptídeo que não se liga especificamente ao AB; (ii) o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) para uma enzima, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA; (iii) o CL está posicionado tal que, em estado não clivado, a NB interfere com a ligação do AB ao alvo e, em estado clivado, a NB não interfere com a ligação do AB ao alvo; (iv) a NB não inibe a clivagem do CL pela enzima; e (v) o anticorpo ativável possui o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue, no estado não clivado: NB-CL-AB ou AB-CL-NB.

[00421]Em uma modalidade, o anticorpo ativável inclui uma porção de ligação não estérica (NB); um ligador clivável (CL); e um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB) que se liga a especificamente ao alvo, em que (i) a NB inclui um polipeptídeo que não se liga especificamente ao AB; (ii) o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) para uma enzima, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA; (iii) o CL está posicionado tal que, em estado não clivado, a NB interfere com a ligação do AB ao alvo e, em estado clivado, a NB não interfere com a ligação do AB ao alvo, e em que a NB no anticorpo ativável não clivado reduz a capacidade do AB para se ligar ao alvo em pelo menos 50%, por exemplo, em pelo menos 60%, em pelo menos 70%, em pelo menos 75%, em pelo menos 80%, em pelo menos 85%, em pelo menos

90%, em pelo menos 95%, em pelo menos 96%, em pelo menos 97%, em pelo menos 98%, em pelo menos 99%, em pelo menos 100%, quando comparado à capacidade do AB clivado para se ligar ao alvo; e (iv) a NB não inibe a clivagem do CL pela enzima. A redução na capacidade do AB para se ligar ao alvo é determinada, p. ex., utilizando um ensaio como aqui descrito ou um ensaio de deslocamento de alvo *in vitro* como, por exemplo, o ensaio descrito nas Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 2009/025846 e WO 2010/081173.

[00422]Em uma modalidade, o anticorpo ativável inclui um parceiro de ligação (BP) para uma porção de ligação não estérica (NB); um ligador clivável (CL); e um anticorpo ou fragmento de anticorpo (AB) que se liga a especificamente ao alvo, em que o BP é um polipeptídeo que se liga à NB quando a ela exposto; a NB não se liga especificamente ao AB; o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) para uma enzima, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA; o CL está posicionado tal que, em estado não clivado na presença da NB, a NB interfere com a ligação do AB ao alvo e, em estado clivado, a NB não interfere com a ligação do AB ao alvo e o BP não interfere com a ligação do AB ao alvo; e a NB e o BP não inibem a clivagem de CL pela enzima. Em alguns exemplos dessa modalidade, o BP do anticorpo ativável é ligado opcionalmente à NB. Em uma modalidade, a NB é recrutada pelo BP do anticorpo ativável *in vivo*.

[00423]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável é formulado como uma composição. Em algumas dessas modalidades, a composição também inclui uma NB, em que a NB é coformulada com o anticorpo ativável que inclui o BP, o CL e o AB. Em alguns exemplos dessa modalidade, o BP é selecionado a partir do grupo constituído por um peptídeo de ligação à albumina, peptídeo de ligação, um peptídeo de ligação ao fibrinogênio, um peptídeo de ligação à fibronectina, um peptídeo de ligação à hemoglobina, um peptídeo de ligação à transferrina, um peptídeo de ligação ao domínio de imunoglobulinas

e outros peptídeos de ligação a proteínas séricas.

[00424]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, a NB é uma proteína globular solúvel. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, a NB é uma proteína que circula na corrente sanguínea. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, a NB é selecionada a partir do grupo constituído por albumina, fibrinogênio, fibronectina, hemoglobina, transferrina, um domínio de imunoglobulina e outras proteínas séricas.

[00425]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) para uma protease selecionada a partir de matriptase e uPA. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, a protease está colocalizada com o em um tecido, e a protease cliva um CL no anticorpo ativável quando o anticorpo ativável é exposto à protease. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o CL é um polipeptídeo com até 50 aminoácidos de comprimento. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) com comprimento de até 15 aminoácidos, p. ex., 3 aminoácidos de comprimento, 4 aminoácidos de comprimento, 5 aminoácidos de comprimento, 6 aminoácidos de comprimento, 7 aminoácidos de comprimento, 8 aminoácidos de comprimento, 9 aminoácidos de comprimento, 10 aminoácidos de comprimento, 11 aminoácidos de comprimento, 12 aminoácidos de comprimento, 13 aminoácidos de comprimento, 14 aminoácidos de comprimento ou 15 aminoácidos de comprimento.

[00426]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável possui o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue, no estado não clivado: NB-CL-AB, AB-CL-NB, BP-CL-AB ou AB-CL-BP. Em modalidades em que o anticorpo ativável inclui um BP e o anticorpo

ativável está na presença da NB correspondente, o anticorpo ativável possui um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue, no estado não clivado: NB:BP-CM-AB ou AB-CM-BP:NB, em que “.” representa uma interação, p. ex., ligação, entre a NB e o BP.

[00427]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável inclui um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente a um dado alvo e é anticorpo monoclonal, anticorpo de domínio, de cadeia única, fragmento Fab, fragmento F(ab')<sub>2</sub>, scFv, scab, dAb, anticorpo de cadeia pesada de domínio único ou anticorpo de cadeia leve de domínio único. Em algumas modalidades, tal anticorpo ou seu fragmento imunologicamente ativo que se liga ao alvo é um anticorpo monoclonal de camundongo, outro roedor, quimérico, humanizado ou totalmente humano.

[00428]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável inclui uma combinação de região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos aqui apresentada e região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos aqui apresentada. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável inclui uma combinação de região variável de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácidos aqui apresentada, e uma região variável de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácidos aqui apresentada.

[00429]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável 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 seu fragmento. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador. Em algumas modalidades, o ligador is um ligador clivável. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador não clivável. Em algumas modalidades, o agente é um agente selecionado a partir do grupo listado na Tabela 3. Em algumas modalidades, o agente é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o agente é um agente que danifica ácidos nucleicos, como um alquilante do DNA ou intercalante do DNA ou outro agente que danifica o DNA. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoide. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrol-benzodiazepina.

[00430]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável também inclui uma porção detectável. Em algumas modalidades, a porção detectável é um agente diagnóstico.

[00431]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável também inclui um espaçador. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável também inclui um peptídeo de sinalização. Em algumas modalidades, o peptídeo de sinalização é conjugado ao anticorpo ativável via um espaçador. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o espaçador é unido diretamente à MM do anticorpo ativável.

[00432]Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é

mais longa do que aquela do anticorpo correspondente; p. ex., a pK do anticorpo ativável é mais longa do que aquela do anticorpo correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é semelhante àquela do anticorpo correspondente. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 15 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 12 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 11 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 10 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 9 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 8 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 7 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 6 dias quando administrado a um organismo. Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 5 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 4 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 3 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 2 dias quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 24 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 20 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 18 horas quando administrado a um

organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 16 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 14 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 12 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 10 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 8 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 6 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 4 horas quando administrado a um organismo. Em algumas modalidades, a meia-vida sérica do anticorpo ativável é pelo menos de 3 horas quando administrado a um organismo.

[00433]A invenção também provê uma molécula de ácido nucleico isolado codificador de qualquer um desses anticorpos ativáveis, bem como vetores que incluem essas sequências de ácido nucleico isolado. A invenção provê métodos para produzir um anticorpo ativável, cultivando uma célula em condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que a célula compreende tal sequência de ácido nucleico. Em algumas modalidades, a célula compreende tal vetor.

[00434]A constante de dissociação ( $K_d$ ) do anticorpo ativável contendo NB dirigida ao alvo é maior do que a  $K_d$  do AB dirigida ao alvo quando este não está associado com a NB ou NB:BP. A constante de dissociação ( $K_d$ ) do anticorpo ativável contendo NB dirigida ao alvo é maior do que a  $K_d$  do AB original dirigida ao alvo. Por exemplo, a  $K_d$  do anticorpo ativável contendo NB dirigida ao alvo é 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, 100-1.000, 100-10.000,

100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes maior do que a  $K_d$  do AB quando este não está associado com a NB ou NB:BP ou a  $K_d$  do AB original dirigida ao alvo. Por outro lado, a afinidade de ligação do anticorpo ativável contendo NB dirigida ao alvo é menor do que a afinidade de ligação do AB quando este não está associado com a NB ou NB:BP ou menor do que a afinidade de ligação do AB original dirigida ao alvo. Por exemplo, a afinidade de ligação do anticorpo ativável contendo NB dirigida ao alvo é 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 mais ou entre 5-10, 10-100, 10-1.000, 10-10.000, 10-100.000, 10-1.000.000, 10-10.000.000, 100-1.000, 100-10.000, 100-100.000, 100-1.000.000, 100-10.000.000, 1.000-10.000, 1.000-100.000, 1.000-1.000.000, 1000-10.000.000, 10.000-100.000, 10.000-1.000.000, 10.000-10.000.000, 100.000-1.000.000 ou 100.000-10.000.000 vezes menor do que a afinidade de ligação do AB quando este não está associado com a NB ou NB:BP ou menor do que a afinidade de ligação do AB original dirigida ao alvo.

[00435]Quando o anticorpo ativável contendo NB está na presença do alvo, a ligação específica do AB ao alvo é reduzida ou inibida, em comparação à ligação específica do AB quando este não está associado com a NB ou NB:BP. Quando o anticorpo ativável contendo NB está na presença do alvo, a ligação específica do AB ao alvo é reduzida ou inibida, em comparação à ligação específica do AB original ao alvo. Quando se compara à ligação do AB não associado com uma NB ou NB:BP ou à ligação do AB original ao alvo, a capacidade do anticorpo ativável contendo NB para se ligar ao alvo é reduzida, por exemplo, em pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mesmo 100% 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 tempo quando

medida *in vitro* e/ou *in vivo*.

[00436]Quando o anticorpo ativável contendo NB está na presença do alvo, mas não na presença de um agente modificador (por exemplo, uma protease ou outra enzima), a ligação específica do AB ao alvo é reduzida ou inibida, em comparação à ligação específica do AB quando este não está associado com a NB ou NB:BP. Quando o anticorpo ativável contendo NB está na presença do alvo, mas não na presença de um agente modificador (por exemplo, uma protease ou outra enzima, agente de redução ou luz), a ligação específica do AB ao alvo é reduzida ou inibida, em comparação à ligação específica do AB original ao alvo. Quando se compara à ligação do AB não associado com uma NB ou NB:BP ou à ligação do AB original ao alvo, a capacidade do a anticorpo ativável contendo NB para se ligar ao alvo é reduzida, por exemplo, em pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mesmo 100% 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 tempo quando medida *in vitro* e/ou *in vivo*.

[00437]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, o anticorpo ativável inclui um agente conjugado ao AB para produzir um conjugado de anticorpo ativável. Em algumas modalidades do conjugado de anticorpo ativável, o agente é um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o agente é um agente diagnóstico. Em algumas modalidades, o agente é um marcador detectável. Em algumas modalidades do conjugado de anticorpo ativável, o agente é um agente antineoplásico. Em algumas modalidades do conjugado de anticorpo ativável, o agente é uma toxina ou seu fragmento. Em algumas modalidades do conjugado de anticorpo ativável, o agente é conjugado ao AB via um ligador. Em algumas modalidades do conjugado de anticorpo ativável, o ligador é um ligador clivável. Em algumas modalidades, o agente é conjugado ao AB via um ligador não clivável. Em algumas modalidades, o agente é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o

agente é um agente que danifica ácidos nucleicos, como um alquilante do DNA ou intercalante do DNA ou outro agente que danifica o DNA. Em algumas modalidades, o agente é um agente selecionado a partir do grupo listado na Tabela 3. Em algumas modalidades, o agente é uma dolastatina. Em algumas modalidades, o agente é uma auristatina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é auristatina E ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina E (MMAE). Em algumas modalidades, o agente é monometil auristatina D (MMAD). Em algumas modalidades, o agente é um maitansinoide ou derivado de maitansinoide. Em algumas modalidades, o agente é DM1 ou DM4. Em algumas modalidades, o agente é uma duocarmicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma caliqueamicina ou seu derivado. Em algumas modalidades, o agente é uma pirrol-benzodiazepina.

[00438]Em alguns exemplos de qualquer uma dessas modalidades de anticorpo ativável, os anticorpos ativáveis são anticorpos ativáveis de ligação a alvo duplo. Tais anticorpos ativáveis de ligação a alvo duplo contêm dois Abs que podem se ligar ao mesmo ou a alvos diferentes. Em modalidades específicas, anticorpos ativáveis de direcionamento duplo contêm anticorpos biespecíficos ou fragmento de anticorpos.

[00439]Os anticorpos ativáveis de ligação a alvo duplo são projetados de modo a disporem de um CL clivável por um agente de clivagem, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que está colocalizada em um tecido-alvo com um ou com ambos os alvos capazes de se ligarem aos ABs dos anticorpos ativáveis. Os anticorpos ativáveis de ligação a alvo duplo com mais de um AB contra o mesmo ou contra alvos diferentes podem ser projetados de modo a terem mais de um CL, em que o primeiro CL é clivável por um agente de clivagem em um primeiro tecido-alvo e em que o segundo CL é clivável por um agente de clivagem em um segundo tecido-alvo, com um ou mais dos alvos se ligando aos ABs dos anticorpos ativáveis. Em uma modalidade, o primeiro e o segundo tecido-alvo estão separados

especialmente, por exemplo, em locais diferentes no organismo. Em uma modalidade, o primeiro e o segundo tecido-alvo são o mesmo tecido separados temporalmente, por exemplo, o mesmo tecido em dois momentos diferentes no tempo, por exemplo, o primeiro momento é quando o tecido é um tumor em estágio inicial, e o segundo momento é quando o tecido é um tumor em estágio tardio.

[00440]A invenção também provê moléculas de ácido nucleico que codificam os anticorpos ativáveis ora descritos. A invenção também provê vetores que incluem esses ácidos nucleicos. Os anticorpos ativáveis ora descritos são produzidos cultivando uma célula em condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que a célula inclui essas moléculas de ácido nucleico ou vetores.

[00441]A invenção também provê métodos para fabricar anticorpos ativáveis. Em uma modalidade, o método compreende as etapas de (a) cultivar uma célula que inclui uma construção de ácido nucleico que codifica o anticorpo ativável em condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável inclui (i) uma porção de ligação não estérica (NB); (ii) um ligador clivável (CL); e (iii) um anticorpo ou seu fragmento de ligação a antígeno (AB) que se liga especificamente a um alvo, em que (1) a NB não se liga especificamente ao AB; (2) o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) para uma enzima, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA.; (3) o CL está posicionado tal que, em estado não clivado, a NB interfere com a ligação do AB ao alvo e, em estado clivado, a NB não interfere com a ligação do AB ao alvo; e (4) a NB não inibe a clivagem do CL pela enzima; e (b) recuperar o anticorpo ativável.

[00442]Em algumas modalidades, o método compreende as etapas de (a) cultivar uma célula que inclui uma construção de ácido nucleico que codifica o anticorpo ativável em condições que levam à expressão do anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável inclui (i) um parceiro de ligação (BP) para uma porção de ligação não estérica (NB); (ii) um ligador clivável (CL); e (iii) um anticorpo ou seu fragmento de

ligação a antígeno (AB) que se liga especificamente a um alvo, em que (1) a NB não se liga especificamente ao AB; (2) o CL é um polipeptídeo que inclui um substrato (S) para uma enzima, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA; (3) o CL está posicionado tal que, em estado não clivado na presença da NB, a NB interfere com a ligação do AB ao alvo e, em estado clivado, a NB não interfere com a ligação do AB ao alvo e a BP não interfere com a ligação do AB ao alvo; e (4) a NB e o BP não inibem a clivagem do CL pela enzima; e (b) recuperar o anticorpo ativável. Em alguns exemplos dessa modalidade, o BP do anticorpo ativável está ligado à NB.

Uso de moléculas contendo CM, incluindo anticorpos conjugados e anticorpos ativáveis

[00443]Será reconhecido que a administração de entidades terapêuticas de acordo com a invenção ocorrerá com veículos, excipientes e outros agentes adequados que são incorporados em formulações para melhorar a transferência, a liberação, a tolerância e os semelhantes. Uma multiplicidade de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecidos por todos os químicos farmacêuticos: *Remington's Pharmaceutical Sciences* (15<sup>a</sup> ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), especialmente em seu Capítulo 87 por Blaug, Seymour. Essas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, óleos, lipídios, vesículas contendo lipídios (catiônicos ou aniônicos) (como Lipofectin™), conjugados de DNA, pastas anidras de absorção, emulsões óleo em água e água em óleo, emulsões Carbowax (polietilenoglicóis de várias massas moleculares), géis semissólidos e misturas semissólidas contendo Carbowax. Qualquer uma das misturas precedentes pode ser adequada em tratamentos e terapias de acordo com a presente invenção, desde que o ingrediente ativo na formulação não seja inativado pela formulação e que a formulação seja fisiologicamente compatível e possa ser tolerada 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 as citações ali existentes para obter informações adicionais relativas a formulações, excipientes e veículos bem conhecidos pelos químicos farmacêuticos.

[00444]As formulações terapêuticas da invenção, que incluem uma molécula contendo CM, tais como, a título de exemplo não limitante, um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável, são utilizadas para prevenir, tratar ou de outra forma melhorar uma doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade anormal do alvo. Por exemplo, as formulações terapêuticas da invenção, que incluem uma molécula contendo CM, p. ex., um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável, são utilizadas para prevenir, tratar ou de outra forma melhorar inflamação, um transtorno inflamatório, uma doença autoimune e/ou um câncer ou outra condição neoplásica. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido ou uma malignidade hematológica nos quais o alvo é expresso. Em algumas modalidades, o câncer é um tumor sólido onde o alvo é expresso. Em algumas modalidades, o câncer é uma malignidade hematológica na qual o alvo é expresso. Em algumas modalidades, o alvo é expresso no parênquima (p. ex., em câncer, a parte de um órgão ou tecido que frequentemente executa 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 (ou seja, a estrutura conjuntiva de apoio de uma célula, tecido ou órgão). Em algumas modalidades, o alvo é expresso em um osteoblasto. Em algumas modalidades, o alvo é expresso no endotélio (vasculatura). Em algumas modalidades, o alvo é expresso em uma célula-tronco cancerosa. Em algumas modalidades, o agente ao qual o anticorpo ativável é conjugado é um inibidor de microtúbulos. Em algumas modalidades, o

agente ao qual o anticorpo ativável é conjugado é um agente que danifica ácidos nucleicos.

[00445]A eficácia da prevenção, da melhora ou do tratamento é determinada em associação com qualquer método conhecido para diagnosticar ou tratar a doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade do alvo, como, por exemplo, a expressão e/ou atividade anormal do alvo. Prolongar a sobrevivência de um sujeito ou de outra forma retardar a progressão da doença ou transtorno associado com a expressão e/ou atividade do alvo, p. ex., a expressão e/ou atividade anormal do alvo, em um sujeito indica que o anticorpo conjugado, o anticorpo ativável e/ou o anticorpo conjugado ativável confere um benefício clínico.

[00446]Uma molécula contendo CM, p. ex., um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável pode ser administrada na forma de composições farmacêuticas. Os princípios e as considerações envolvidas em preparar tais composições, bem como a orientação na escolha de componentes são fornecidos, por exemplo, em *Remington: The Science And Practice Of Pharmacy* 19<sup>a</sup> ed. (Alfonso R. Gennaro, *et al.*, editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; *Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends*, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; e *Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4)*, 1991, M. Dekker, Nova York.

[00447]Em algumas modalidades em que fragmentos de anticorpo são utilizados, o menor fragmento que se liga especificamente ao domínio de ligação da proteína-alvo é selecionado. Por exemplo, com base nas sequências das regiões variáveis de um anticorpo, é possível projetar moléculas de peptídeos que retenham a capacidade para se ligar à sequência da proteína-alvo. Tais peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos pela tecnologia do DNA recombinante. (Vide, p. ex., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993)). A formulação pode também conter mais de um composto ativo, conforme necessário para a

indicação em particular em tratamento, por exemplo, em algumas modalidades, aquelas com atividades complementares que não se afetem adversamente. Em algumas modalidades, ou adicionalmente, a composição pode compreender um agente que reforce sua função, como, por exemplo, um agente citotóxico, citocina, agente quimioterápico ou agente inibitório do crescimento. Tais moléculas estão adequadamente presentes em quantidades combinadas que são eficazes para o objetivo pretendido.

[00448]Os ingredientes ativos podem também ser incorporados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou gelatinosas e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas coloidais de liberação de fármacos (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões.

[00449]As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* deverão ser estéreis. Isso é facilmente conseguido por filtração através de membranas filtrantes estéreis.

[00450]Preparados de liberação prolongada podem ser elaborados. Os exemplos adequados de preparados de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, em que as matrizes estão na forma de itens moldados, p. ex., filmes ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) ou poli(álcool vinílico)), polilactídeos (Patente U.S. Nº 3 773 919), copolímeros de ácido L-glutâmico e  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato de vinil etileno não degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico-ácido glicólico como o LUPRON DEPOT<sup>TM</sup> (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Embora polímeros, como os de acetato de vinil etileno e de ácido láctico-ácido glicólico, possibilitem a liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam

proteínas por períodos mais curtos de tempo.

[00451]Em algumas modalidades, uma molécula contendo CM, p. ex., o anticorpo conjugado, o anticorpo ativável e/ou o anticorpo conjugado ativável, contém uma marcação detectável. Um anticorpo intacto, ou seu fragmento (p. ex., Fab, scFv ou F(ab)<sub>2</sub>) é utilizado. O termo “marcado”, com respeito à sonda ou ao anticorpo, destina-se a abranger a marcação direta da sonda ou do anticorpo por acoplamento (ou seja, fisicamente ligados) de uma substância detectável à sonda ou ao anticorpo, bem como a marcação indireta da sonda ou do anticorpo por reatividade com outro reagente que está diretamente marcado. Os exemplos de marcação indireta incluem a detecção de um anticorpo primário utilizando um anticorpo secundário marcado com fluorescência e uma marcação no final de uma sonda de DNA com biotina tal que esta possa ser detectada com estreptavidina marcada com fluorescência. O termo “amostra biológica” destina-se a incluir tecidos, células e líquidos biológicos isolados de um sujeito, bem como tecidos, células e líquidos presentes dentro de um sujeito. Portanto, estão incluídos no uso do termo “amostra biológica”, sangue e uma fração ou componente do sangue, incluindo soro sanguíneo, plasma sanguíneo ou linfa. Ou seja, o método de detecção da invenção pode ser utilizado para detectar, como analito, mRNA, proteína ou DNA genômico em uma amostra biológica *in vitro* bem como *in vivo*. Por exemplo, as técnicas *in vitro* para a detecção, como analito, de mRNA incluem hibridizações *Northern* e hibridizações *in situ*. As técnicas *in vitro* para a detecção, como analito, de proteína incluem ensaios imunoenzimáticos de absorção (ELISAs), *Western blotting* (transferência) imunoprecipitações, coloração imunoquímica e imunofluorescência. As técnicas *in vitro* para a detecção, como analito, de DNA genômico incluem hibridizações *Southern*. Procedimentos para a condução de imunoensaaios estão 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 and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego,

CA, 1996; e “*Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Além disso, as técnicas *in vivo* para a detecção, como analito, de proteína incluem introduzir em um sujeito um anticorpo anti-analito proteico. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um marcador radioativo cuja presença e localização em um sujeito possa ser detectada por técnicas de imagem padrão.

[00452]Os anticorpos conjugados, os anticorpos ativáveis e/ou os anticorpos conjugados ativáveis da invenção são úteis também em uma variedade de formulações diagnósticas e profiláticas. Em uma modalidade, um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável é administrado a pacientes que estão em risco de desenvolver um ou mais dos transtornos citados acima. A predisposição de um paciente ou de um órgão para um ou mais dos transtornos citados acima pode ser determinada utilizando marcadores genotípicos, sorológicos ou bioquímicos.

[00453]Em algumas modalidades da invenção, um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável é administrado a humanos diagnosticados com uma indicação clínica associada com dos transtornos citados acima. Quando do diagnóstico, um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável é administrado para atenuar ou reverter os efeitos da indicação clínica.

[00454]Um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável da invenção é também útil na detecção de um alvo em amostras do paciente e, conseqüentemente, são úteis como ferramentas diagnósticas. Por exemplo, os anticorpos e/ou os anticorpos ativáveis, e suas versões conjugadas, da invenção são utilizados em ensaios *in vitro*, p. ex., ELISA, para detectar os níveis do alvo em uma amostra do paciente.

[00455]Em uma modalidade, um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável

e/ou um anticorpo conjugado ativável da invenção é imobilizado em um suporte sólido (p. ex., a(s) cavidade(s) de uma placa de microtitulação). O anticorpo conjugado, o anticorpo ativável e/ou o anticorpo conjugado ativável imobilizado serve como um anticorpo de captura para qualquer alvo que possa estar presente em uma amostra teste. Antes de contatar o anticorpo imobilizado com uma amostra do paciente, o suporte sólido é enxaguado e tratado com um agente bloqueador, como proteína do leite ou albumina, para impedir a adsorção não específica do analito.

[00456]Subsequentemente, as cavidades são tratadas com uma amostra teste suspeita de conter o antígeno, ou com uma solução contendo uma quantidade padrão do antígeno. Tal amostra, p. ex., é uma amostra de soro de um sujeito com níveis suspeitos do antígeno circulante que são considerados diagnósticos de uma patologia. Depois de limpo com enxague da amostra teste ou padrão, o suporte sólido é tratado com um segundo anticorpo que é marcado para detecção. O segundo anticorpo marcado serve como anticorpo de detecção. O nível da marcação detectável é medido, e a concentração do antígeno-alvo na amostra teste é determinada por comparação com uma curva padrão desenvolvida a partir das amostras do padrão.

[00457]Reconhecer-se-á que, com base nos resultados obtidos utilizando os anticorpos da invenção, e suas versões conjugadas, em um ensaio diagnóstico *in vitro*, é possível determinar o estágio de uma doença em um sujeito de acordo com os níveis de expressão do antígeno-alvo. Para uma dada doença, amostras de sangue são coletadas de sujeitos diagnosticados em vários estágios na progressão da doença, e/ou em vários pontos no tratamento terapêutico da doença. O uso de uma população de amostras que fornece resultados estatisticamente significantes para cada estágio de progressão ou terapia permite atribuir uma faixa de concentrações do antígeno que possa ser considerada característica a cada estágio.

[00458]Um anticorpo conjugado, um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável podem também ser utilizados em métodos diagnósticos e/ou de

imagem. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vitro*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vivo*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in situ*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *ex vivo*. Por exemplo, anticorpos ativáveis com uma CM enzimaticamente clivável podem ser utilizados para detectar a presença ou ausência de uma enzima que seja capaz de clivar a CM. Tais anticorpos ativáveis podem ser utilizados no diagnóstico, que pode incluir a detecção *in vivo* (p. ex., qualitativa ou quantitativa) de atividade enzimática (ou, em algumas modalidades, um meio de maior potencial de redução tal como aquele que reduz as ligações dissulfeto) através do acúmulo medido de anticorpos ativados (ou seja, anticorpos resultantes da clivagem de um anticorpo ativável) em uma dada célula ou tecido de um determinado organismo hospedeiro. Tal acúmulo de anticorpos ativados indica não só que o tecido expressa atividade enzimática (ou maior potencial de redução dependendo da natureza da CM), mas também que o tecido expressa o alvo ao qual se liga o anticorpo ativado.

[00459]Por exemplo, a CM pode ser selecionada como substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, encontradas no sítio de um tumor, no sítio de uma infecção viral ou bacteriana em local biologicamente confinado (p. ex., tal como e um abscesso, em um órgão ou os semelhantes) e semelhantes. O AB poder do tipo que se liga a um antígeno-alvo. Com o uso dos métodos aqui descritos, ou quando adequado, métodos familiares aos técnicos no assunto, é possível conjugar uma marcação detectável (p. ex., uma marcação fluorescente ou marcação radioativa ou radiotraçador) a um AB ou a outra região de um anticorpo e/ou anticorpo ativável. As marcações detectáveis são discutidas no contexto dos métodos de rastreamento acima, e os exemplos específicos adicionais são fornecidos abaixo. Com um AB específico para uma proteína ou peptídeo do estado de doença, juntamente com pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, cuja atividade esteja elevada no tecido de interesse da doença, os anticorpos ativáveis

exibirão uma taxa aumentada de ligação ao tecido da doença em relação a tecidos onde a enzima específica para a CM não está presente em um nível detectável ou está presente em um nível mais baixo do que no tecido doente ou está inativa (p. ex., em forma de zimógeno ou em complexo com um inibidor). Considerando que proteínas pequenas e peptídeos são rapidamente depurados 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 em tecidos não doentes ou está presente em conformação inativa), o acúmulo de anticorpos ativados no tecido doente está aumentado em relação a tecidos não doentes.

[00460]Em outro exemplo, os anticorpos ativáveis podem ser utilizados para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em uma amostra. Por exemplo, se os anticorpos ativáveis contiverem uma CM suscetível à clivagem por uma enzima, os anticorpos ativáveis podem ser utilizados para detectar (seja qualitativa ou quantitativamente) a presença de uma enzima na amostra. Em outro exemplo, se os anticorpos ativáveis contiverem uma CM suscetível à clivagem por uma enzima, os anticorpos ativáveis podem ser utilizados para detectar (seja qualitativa ou quantitativamente) a presença de condições redutoras em uma amostra. Para facilitar a análise nesses métodos, os anticorpos ativáveis podem ser marcados para detecção, e podem ser ligados a um suporte (p. ex., um suporte sólido, como uma lâmina ou microesfera). A marcação detectável pode ser posicionada em uma parte do anticorpo ativável que não é liberada após a clivagem, por exemplo, a marcação detectável pode ser uma marcação fluorescente suprimida ou outra marcação que não seja detectável até que tenha ocorrido a clivagem. O ensaio pode ser conduzido, por exemplo, contando os anticorpos ativáveis imobilizados, marcados para detecção, com uma amostra suspeita de conter uma enzima e/ou um agente redutor por um tempo suficiente para que ocorra a clivagem, em seguida, lavar para remover o excesso de amostra e contaminantes. A presença ou ausência do agente de clivagem (p. ex., enzima ou



agente redutor) na amostra é então avaliada por uma mudança no sinal detectável dos anticorpos ativáveis antes de contatar a amostra p. ex., a presença e/ou aumento no sinal detectável em decorrência da clivagem do anticorpo ativável pelo agente de clivagem na amostra.

[00461]Tais métodos de detecção podem ser adaptados para também permitir detectar a presença ou ausência de um alvo que seja capaz de se ligar ao AB dos anticorpos ativáveis quando clivados. Assim, os ensaios podem ser adaptados para avaliar a presença ou ausência de um agente de clivagem e a presença ou ausência de um alvo de interesse. A presença ou ausência do agente de clivagem pode ser detectada pela presença e/ou aumento na marcação detectável dos anticorpos ativáveis como descrito acima, e a presença ou ausência do alvo pode ser detectada pela confirmação do complexo alvo-AB, p. ex., utilizando um anticorpo anti-alvo marcado para detecção.

[00462]Os anticorpos ativáveis são também úteis em imagens *in situ* para a validação da ativação do anticorpo ativável, p. ex., por meio da clivagem pela protease e a ligação a um alvo em particular. Imagens *in situ* constituem uma técnica que possibilita a localização de atividade proteolítica e alvo em amostras biológicas, tais como culturas celulares ou cortes de tecido. Com o uso dessa técnica, é possível confirmar a ligação a um dado alvo e a atividade proteolítica com base na presença da marcação detectável (p. ex., uma marcação fluorescente).

[00463]Essas técnicas são úteis com quaisquer células congeladas ou tecido derivado de um sítio de doença (p. ex., tecido tumoral) ou tecidos saudáveis. Essas técnicas são úteis também com amostras de células ou tecidos frescos.

[00464]Nessas técnicas, um anticorpo ativável é marcado com uma marcação detectável. A marcação detectável pode ser um corante fluorescente, (p. ex., um fluoróforo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de rodamina (TRITC), uma marcação Alexa Fluor®), um corante no infravermelho próximo (NIR) (p. ex.,

nanocristais Qdot®), um metal coloidal, um hapteno, um marcador radioativo, biotina e um reagente de amplificação como estreptavidina ou uma enzima (p. ex., peroxidase do rábano ou fosfatase alcalina).

[00465]A detecção da marcação em uma amostra que foi incubada com o anticorpo ativável marcado indica que a amostra contém o alvo e que contém uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que é específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença da protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, pode ser confirmada utilizando inibidores de proteases de amplo espectro como aqueles aqui descritos e/ou utilizando um agente que seja específico para a protease, por exemplo, um anticorpo como A11, que é específico para a protease matriptase e que inibe a atividade proteolítica da matriptase; vide, p. ex., a Publicação Internacional Número WO 2010/129609, publicada em 11 de novembro de 2010. A mesma abordagem de se usar inibidores de proteases de amplo espectro como aqueles aqui descritos e/ou usar um agente inibitório mais seletivo pode ser utilizada para identificar uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que seja específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença do alvo pode ser confirmada utilizando um agente que seja específico para o alvo, p. ex., outro anticorpo, ou a marcação detectável na competição com o alvo não marcado. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não marcado poderia ser utilizado com a detecção por um anticorpo secundário marcado ou por um sistema de detecção mais complexo.

[00466]Técnicas semelhantes são também úteis para imagens *in vivo*, em que a detecção do sinal fluorescente em um sujeito, p. ex., um mamífero, inclusive um humano, indica que a amostra contém o sítio de doença e que contém uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que é específica para a CM do anticorpo ativável.

[00467]Essas técnicas são também úteis em kits e/ou como reagentes para a

detecção, a identificação ou a caracterização da atividade de protease em uma variedade de células, tecidos e organismos com base na CM específica para a protease no anticorpo ativável.

[00468]A invenção provê métodos para utilizar os anticorpos e/ou os anticorpos ativáveis em uma variedade de indicações diagnósticas e/ou profiláticas. Por exemplo, a invenção provê métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem e de um alvo de interesse em um sujeito ou uma amostra (i) contactando um sujeito ou uma amostra com um anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável compreende uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o anticorpo ativável em estado não clivado, não ativado compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; e (b) em que, em estado não clivado, não ativado, a MM interfere com a ligação específica do AB ao alvo e, no estado clivado, ativado, a MM não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo; e (ii) medir um nível de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra, em que um nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem e o alvo estão presentes no sujeito ou na amostra e em que nenhum nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos, o agente de clivagem e o alvo, estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é

conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00469]A invenção também provê métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra (i) contatando um sujeito ou uma amostra com um anticorpo ativável na presença de um alvo de interesse, p. ex., o alvo, em que o anticorpo ativável compreende uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o anticorpo ativável em estado não clivado, não ativado compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB natural e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; e (b) em que, em estado não clivado, não ativado, a MM interfere com a ligação específica do AB ao alvo e, em estado clivado, ativado, a MM não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo; e (ii) medir um nível de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra, em que um nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra e em que nenhum nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem está ausente e/ou não está suficientemente presente no sujeito ou na amostra. Em algumas modalidades, o

anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00470]A invenção também provê kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem e do alvo em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um anticorpo ativável que compreende uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo de interesse, em que o anticorpo ativável em estado não clivado, não ativado compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; e (b) em que, em estado não clivado, não ativado, a MM interfere com a ligação específica do AB ao alvo e, em estado clivado, ativado, a MM não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo; e (ii) medir um nível de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra, em que um nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra e em que nenhum nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem está ausente e/ou não está suficientemente presente no sujeito ou na amostra. Em algumas

modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00471]A invenção também provê métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra (i) contatando um sujeito ou uma amostra com um anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável compreende uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, um domínio de ligação a antígeno (AB) que se liga especificamente ao alvo e uma marcação detectável, em que o anticorpo ativável em estado não clivado, não ativado compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB e não é uma forma modificada de um parceiro de ligação natural do AB; em que, em estado não clivado, não ativado, a MM interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e, em estado clivado, ativado, a MM não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo; e em que a marcação detectável está posicionada em uma parte do anticorpo ativável 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 detectável da marcação detectável no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem está ausente e/ou não está suficientemente presente

no sujeito ou na amostra e em que nenhum nível detectável da marcação detectável no sujeito ou na amostra indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00472]A invenção também provê kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem e do alvo em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável (p. ex., um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico) aqui descrito, para uso no contato de um sujeito ou de uma amostra biológica, e recursos para detectar o nível de anticorpo ativável ativado e/ou de anticorpo conjugado ativável no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de anticorpo ativável 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 anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos, o agente de clivagem e o alvo, estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra biológica, tal que não se consegue detectar a ligação ao alvo e/ou a clivagem pela protease do anticorpo ativável no sujeito ou na amostra biológica.

[00473]A invenção também provê métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra (i) contatando um

sujeito ou uma amostra biológica com um anticorpo ativável na presença do alvo, e (ii) medir um nível de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem está presente no sujeito ou na amostra biológica e em que no nível detectável de anticorpo ativável 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, tal que não se consegue detectar a clivagem pela protease do anticorpo ativável no sujeito ou na amostra biológica. Tal anticorpo ativável inclui uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o anticorpo ativável em estado não clivado (ou seja, não ativado) compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB; e (b) em que a MM do anticorpo ativável em estado não clivado interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um anticorpo ativável em estado clivado (ou seja, ativado) não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, a marcação detectável é anexada à porção de mascaramento. Em algumas modalidades, a marcação detectável é anexada à porção clivável N-terminal ao sítio de clivagem da protease. Em algumas modalidades, um único sítio de ligação a antígeno do AB está mascarado. Em algumas modalidades em que um anticorpo da invenção possui pelo menos dois sítios de ligação a antígeno, ao menos um sítio de ligação a antígeno está mascarado e ao



menos um sítio de ligação a antígeno não está mascarado. Em algumas modalidades, todos os sítios de ligação a antígeno estão mascarados. Em algumas modalidades, a etapa de medição inclui o uso de um reagente secundário compreendendo uma marcação detectável.

[00474]A invenção também provê kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem e do alvo em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável aqui descrito para uso no contato de um sujeito ou de uma amostra biológica com um anticorpo ativável na presença do alvo, e medir um nível de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de anticorpo ativável 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 anticorpo ativável 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, tal que não se consegue detectar a clivagem pela protease do anticorpo ativável no sujeito ou na amostra biológica. Tal anticorpo ativável inclui uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, p. ex., uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o anticorpo ativável em estado não clivado (ou seja, não ativado) compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB; e (b) em que a MM do anticorpo ativável, em estado não clivado, interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um anticorpo ativável, em estado clivado (ou seja, ativado), não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo. Em algumas

modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, a marcação detectável é anexada à porção de mascaramento. Em algumas modalidades, a marcação detectável é anexada à porção clivável N-terminal ao sítio de clivagem da protease. Em algumas modalidades, um único sítio de ligação a antígeno do AB está mascarado. Em algumas modalidades em que um anticorpo da invenção possui pelo menos dois sítios de ligação a antígeno, ao menos um sítio de ligação a antígeno está mascarado e ao menos um sítio de ligação a antígeno não está mascarado. Em algumas modalidades, todos os sítios de ligação a antígeno estão mascarados. Em algumas modalidades, a etapa de medição inclui o uso de um reagente secundário compreendendo uma marcação detectável.

[00475]A invenção também provê kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável aqui descrito para uso no contato de um sujeito ou de uma amostra biológica, e recursos para detectar o nível de anticorpo ativável ativado e/ou de anticorpo conjugado ativável no sujeito ou na amostra biológica, em que o anticorpo ativável inclui uma marcação detectável que está posicionada em uma parte do anticorpo ativável que é liberada após a clivagem da CM, em que um nível detectável de anticorpo ativável 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, tal que não se consegue detectar a ligação ao alvo e/ou a clivagem pela protease do anticorpo ativável no sujeito ou na amostra biológica, e em que nenhum nível detectável de anticorpo ativável 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.

[00476]A invenção provê métodos para detectar a presença ou ausência de

um agente de clivagem e do alvo em um sujeito ou uma amostra (i) contatando um sujeito ou uma amostra biológica com um anticorpo ativável, em que o anticorpo ativável inclui uma marcação detectável que está posicionada em uma parte do anticorpo ativável que é liberada após a clivagem da CM e (ii) medir um nível de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos, o agente de clivagem e o alvo, estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra biológica, tal que não se consegue detectar a ligação ao alvo e/ou a clivagem pela protease do anticorpo ativável no sujeito ou na amostra biológica, e em que um nível detectável reduzido de anticorpo ativável 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 quase 5%, quase 10%, quase 15%, quase 20%, quase 25%, quase 30%, quase 35%, quase 40%, quase 45%, quase 50%, quase 55%, quase 60%, quase 65%, quase 70%, quase 75%, quase 80%, quase 85%, quase 90%, quase 95% e/ou quase 100%. Tal anticorpo ativável inclui uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o anticorpo ativável em estado não clivado (ou seja, não ativado) compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB; e (b) em que a MM do anticorpo ativável em estado não clivado interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um anticorpo ativável em estado clivado (ou seja, ativado) não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em

algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00477]A invenção também provê kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem e do alvo em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável aqui descrito para uso no contato de um sujeito ou de uma amostra biológica, e recursos para detectar o nível de anticorpo ativável ativado e/ou de anticorpo conjugado ativável no sujeito ou na amostra biológica, em que um nível detectável de anticorpo ativável ativado no sujeito ou na amostra biológica indica que o agente de clivagem, o alvo ou ambos, o agente de clivagem e o alvo, estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra biológica, tal que não se consegue detectar a ligação ao alvo e/ou a clivagem pela protease do anticorpo ativável no sujeito ou na amostra biológica, e em que nível detectável reduzido de anticorpo ativável 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 quase 5%, quase 10%, quase 15%, quase 20%, quase 25%, quase 30%, quase 35%, quase 40%, quase 45%, quase 50%, quase 55%, quase 60%, quase 65%, quase 70%, quase 75%, quase 80%, quase 85%, quase 90%, quase 95% e/ou quase 100%.

[00478]A invenção também provê métodos para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em um sujeito ou uma amostra (i) contatando um sujeito ou uma amostra biológica com um anticorpo ativável, em que o anticorpo

ativável inclui uma marcação detectável que está posicionada em uma parte do anticorpo ativável que é liberada 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, tal que não se consegue detectar a clivagem pela protease do anticorpo ativável 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 quase 5%, quase 10%, quase 15%, quase 20%, quase 25%, quase 30%, quase 35%, quase 40%, quase 45%, quase 50%, quase 55%, quase 60%, quase 65%, quase 70%, quase 75%, quase 80%, quase 85%, quase 90%, quase 95% e/ou quase 100%. Tal anticorpo ativável inclui uma porção de mascaramento (MM), uma porção clivável (CM) que é clivada pelo agente de clivagem, e um domínio de ligação a antígeno ou seu fragmento (AB) que se liga especificamente ao alvo, em que o anticorpo ativável em estado não clivado (ou seja, não ativado) compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal como segue: 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 possui uma sequência de aminoácidos de um parceiro de ligação de ocorrência natural do AB; e (b) em que a MM do anticorpo ativável, em estado não clivado, interfere com a ligação específica do AB ao alvo, e em que a MM de um anticorpo ativável em estado clivado (ou seja, ativado) não interfere nem compete com o AB pela ligação específica ao alvo. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está

posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00479]A invenção também provê kits para uso em métodos de detecção da presença ou ausência de um agente de clivagem de interesse em um sujeito ou uma amostra, em que os kits incluem pelo menos um anticorpo ativável e/ou um anticorpo conjugado ativável aqui descrito para uso no contato de um sujeito ou de uma amostra biológica, e recursos para detectar o nível de anticorpo ativável ativado e/ou de anticorpo conjugado ativável no sujeito ou na amostra biológica, em que o anticorpo ativável inclui uma marcação detectável que está posicionada em uma parte do anticorpo ativável 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 ambos, o agente de clivagem e o alvo, estão ausentes e/ou não estão suficientemente presentes no sujeito ou na amostra biológica, tal que não se consegue detectar a ligação alvo e/ou a clivagem pela protease do anticorpo ativável 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 quase 5%, quase 10%, quase 15%, quase 20%, quase 25%, quase 30%, quase 35%, quase 40%, quase 45%, quase 50%, quase 55%, quase 60%, quase 65%, quase 70%, quase 75%, quase 80%, quase 85%, quase 90%, quase 95% e/ou quase 100%.

[00480]Em algumas modalidades desses métodos e kits, o anticorpo 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, uma marcação fluorescente, um cromóforo, um corante, um ou mais íons de metal ou uma marcação baseada em ligante. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de imagem 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 do rábano, fosfatase alcalina ou  $\beta$ -galactosidase. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação fluorescente compreende proteína fluorescente amarela (YFP), proteína fluorescente azul (CFP), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente vermelha modificada (mRFP), proteína fluorescente vermelha tdímero2 (RFP tdímero2), HCRED ou um derivado do európio. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação luminescente compreende um derivado de N-metilacrídio. Em algumas modalidades desses métodos, a marcação compreende uma marcação Alexa Fluor®, como Alex Fluor® 680 ou Alexa Fluor® 750. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a marcação baseada em ligante compreende biotina, avidina, estreptavidina ou um ou mais haptenos.

[00481]Em algumas modalidades desses métodos e kits, o sujeito é um mamífero. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o sujeito é um humano. Em algumas modalidades, o sujeito é um mamífero não humano, como um primata não humano, animal de companhia (p. ex., gato, cão, cavalo), animal agrícola, animal de trabalho ou animal de zoológico. Em algumas modalidades, o sujeito é um roedor.

[00482]Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in vivo*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in situ*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *ex vivo*. Em algumas modalidades desses métodos, o método é um método *in vitro*.

[00483]Em algumas modalidades, a imagem *in situ* e/ou a imagem *in vivo* são úteis em métodos para identificar quais pacientes tratar. Por exemplo, na imagem *in*

*situ*, os anticorpos ativáveis são utilizados para rastrear amostras de pacientes para identificar aqueles pacientes dispondo da(s) protease(s) e do(s) alvos(s) apropriados na localização adequada, por exemplo, em um sítio tumoral.

[00484]Em algumas modalidades, a imagem *in situ* é utilizada para identificar ou de outra forma refinar uma população de pacientes adequados para o tratamento com um anticorpo ativável da invenção. Por exemplo, pacientes com resultado positivo para o alvo (p. ex., o alvo) e uma protease que cliva um substrato na porção clivável (CM) do anticorpo ativável em teste (p. ex., acumula anticorpos ativados no sítio de doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo ativável compreendendo essa CM. Do mesmo modo, pacientes com resultado negativo para qualquer um ou ambos, o alvo (p. ex., o alvo) e a protease que cliva um substrato na CM do anticorpo ativável em teste, utilizando esses métodos, poderiam ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, esses pacientes com resultado negativo referente a um primeiro anticorpo ativável podem ser testados com outros anticorpos ativáveis compreendendo CMs diferentes até ser identificado um anticorpo ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável compreendendo uma CM que é clivada pelo paciente no sítio de doença). Em algumas modalidades, o paciente recebe então uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo conjugado ativável para o qual o paciente obteve resultado positivo.

[00485]Em algumas modalidades, a imagem *in vivo* é utilizada para identificar ou de outra forma refinar uma população de pacientes adequados para o tratamento com um anticorpo ativável da invenção. Por exemplo, pacientes com resultado positivo para ambos, o alvo (p. ex., o alvo) e uma protease que cliva um substrato na porção clivável (CM) do anticorpo ativável em teste (p. ex., acumula anticorpos ativados no sítio de doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo ativável compreendendo essa CM. Do mesmo modo, pacientes com



resultado negativo poderiam ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, esses pacientes com resultado negativo referente a um primeiro anticorpo ativável podem ser testados com outros anticorpos ativáveis compreendendo CMs diferentes até ser identificado um anticorpo ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável compreendendo uma CM que é clivada pelo paciente no sítio de doença). Em algumas modalidades, o paciente recebe então uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo conjugado ativável para o qual o paciente obteve resultado positivo.

[00486]Em algumas modalidades dos métodos e kits, o método ou o kit são utilizados para identificar ou de outra forma refinar uma população de pacientes adequados para o tratamento com um anticorpo ativável da invenção. Por exemplo, pacientes com resultado positivo para ambos, o alvo (p. ex., o alvo) e uma protease que cliva um substrato na porção clivável (CM) do anticorpo ativável testado nesses métodos são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo ativável compreendendo essa CM. Do mesmo modo, pacientes com resultado negativo para ambos, o alvo (p. ex., o alvo) e a protease que cliva um substrato na CM do anticorpo ativável testado utilizando esses métodos poderiam ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, esses pacientes podem ser testados com outros anticorpos ativáveis até ser identificado um anticorpo ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável compreendendo uma CM que é clivada pelo paciente no sítio de doença). Em algumas modalidades, pacientes com resultado negativo para qualquer alvo (p. ex., o alvo) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo ativável compreendendo essa CM. Em algumas modalidades, pacientes com resultado negativo qualquer alvo (p. ex., o alvo) são identificados como candidatos não adequados para o tratamento com esse anticorpo ativável compreendendo essa CM. Em algumas modalidades, esses pacientes podem ser testados com outros anticorpos

ativáveis até ser identificado um anticorpo ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável compreendendo uma CM que é clivada pelo paciente no sítio de doença). Em algumas modalidades, o anticorpo ativável é um anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não é conjugado a um agente. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma marcação detectável. Em algumas modalidades, a marcação detectável está posicionada no AB. Em algumas modalidades, o nível de anticorpo ativável no sujeito ou na amostra é medido utilizando 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.

[00487]Em algumas modalidades, um método ou kit é utilizado para identificar ou de outra forma refinar uma população de pacientes adequados para o tratamento com um anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável contra o alvo (p. ex., anticorpo ativável ao qual é conjugado um agente terapêutico) da invenção, seguido pelo tratamento administrando esse anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável a um sujeito com necessidade desse tratamento. Por exemplo, pacientes com resultado positivo para ambos, o alvo (p. ex., o alvo) e uma protease que cliva um substrato na porção clivável (CM) do anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável testado nesses métodos são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo e/ou esse anticorpo conjugado ativável compreendendo essa CM, e o paciente recebe então uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ativável e/ou do anticorpo conjugado ativável que foi testado. Do mesmo modo, pacientes com resultado negativo para qualquer um ou ambos, o alvo (p. ex., o alvo) e a protease que cliva um substrato na CM do anticorpo ativável testado utilizando esses métodos poderiam ser identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia. Em algumas modalidades, esses pacientes podem ser testados com outro anticorpo

e/ou anticorpo conjugado ativável até ser identificado um anticorpo e/ou anticorpo conjugado ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável compreendendo uma CM que é clivada pelo paciente no sítio de doença). Em algumas modalidades, o paciente recebe então uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo ativável e/ou conjugado para o qual o paciente obteve resultado positivo.

[00488]Em algumas modalidades desses métodos e kits, a MM é um peptídeo com um comprimento entre 4 e 40 aminoácidos. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o anticorpo ativável compreende um peptídeo de ligação, em que o peptídeo de ligação está posicionado entre a MM e a CM. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o anticorpo ativável 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 anticorpo ativável compreende um primeiro peptídeo de ligação (L1) e um segundo peptídeo de ligação (L2), em que o primeiro peptídeo de ligação está posicionado entre a MM e a CM, e o segundo peptídeo de ligação está posicionado entre o AB e a CM. Em algumas modalidades desses métodos e kits, L1 e L2 são peptídeos com entre 1 e 20 aminoácidos de comprimento, e em que L1 e L2 não precisam ser ligadores iguais. Em algumas modalidades desses métodos e kits, um ou ambos, L1 e L2, compreendem um polímero de glicina-serina. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um entre L1 e L2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 385) e (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 386), onde n é um número inteiro pelo menos igual a um. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um entre L1 e L2 compreende uma sequência de aminoácidos com a fórmula (GGS)<sub>n</sub>, onde n é um número inteiro pelo menos igual a um. Em algumas modalidades desses métodos e kits, pelo menos um entre L1 e L2 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo constituído por Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID

NO: 387), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 388), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 389), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 390), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 391) e Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 392).

[00489]Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AB compreende um anticorpo ou sequência de fragmento do anticorpo selecionada a partir das sequências de anticorpo de reação cruzada aqui apresentadas. Em algumas modalidades desses métodos e kits, o AB compreende um fragmento Fab, um scFv ou um anticorpo de cadeia única (scAb).

[00490]Em algumas modalidades desses métodos e kits, o agente de clivagem é uma protease colocada no sujeito ou na amostra com o alvo e a CM é um polipeptídeo que funciona como substrato para a protease, em que a protease cliva a CM no anticorpo ativável quando o anticorpo ativável é exposto à protease. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é um polipeptídeo com até 15 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é acoplada ao N-terminal do AB. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é acoplada ao C-terminal do AB. Em algumas modalidades desses métodos e kits, a CM é acoplada ao N-terminal de uma cadeia VL do AB.

[00491]Os anticorpos ativáveis e/ou os anticorpos conjugados ativáveis da invenção são utilizados em formulações diagnósticas e profiláticas. Em uma modalidade, um anticorpo ativável é administrado a pacientes que estão em risco de desenvolver um ou mais dos citados acima: inflamação, transtornos inflamatórios, câncer ou outros transtornos.

[00492]Uma predisposição do paciente ou de um órgão a um ou mais dos transtornos citados acima pode ser determinada utilizando marcadores genotípicos, sorológicos ou bioquímicos.

[00493]Em algumas modalidades da invenção, um anticorpo ativável e/ou anticorpos conjugados ativáveis é administrado a humanos diagnósticos com uma

indicação clínica associada com um ou mais dos transtornos citados acima. Quando do diagnóstico, um anticorpo ativável e/ou anticorpos conjugados ativáveis são administrados para atenuar ou reverter os efeitos da indicação clínica.

[00494]Os anticorpos ativáveis e/ou anticorpos conjugados ativáveis da invenção são também úteis na detecção do alvo em amostras do paciente e, consequentemente, são úteis como ferramentas diagnósticas. Por exemplo, os anticorpos ativáveis e/ou anticorpos conjugados ativáveis da invenção são utilizados em ensaios *in vitro*, p. ex., ELISA, para detectar níveis do alvo em uma amostra do paciente.

[00495]Em uma modalidade, um anticorpo ativável da invenção é imobilizado em um suporte sólido (p. ex., a(s) cavidade(s) de uma placa de microtitulação). O anticorpo ativável imobilizado serve como um anticorpo de captura para qualquer alvo que possa estar presente em uma amostra teste. Antes de contatar o anticorpo imobilizado com uma amostra do paciente, o suporte sólido é enxaguado e tratado com um agente bloqueador, como proteína do leite ou albumina, para impedir adsorção não específica do analito.

[00496]Subsequentemente, as cavidades são tratadas com uma amostra teste suspeita de conter o antígeno, ou com uma solução contendo uma quantidade padrão do antígeno. Tal amostra, p. ex., é uma amostra de soro de um sujeito com níveis suspeitos do antígeno circulante que são considerados diagnósticos de uma patologia. Depois de limpo com enxague da amostra teste ou padrão, o suporte sólido é tratado com um segundo anticorpo que é marcado para detecção. O segundo anticorpo marcado serve como anticorpo de detecção. O nível da marcação detectável é medido, e a concentração do antígeno-alvo na amostra teste é determinada por comparação com uma curva padrão desenvolvida a partir das amostras do padrão.

[00497]Reconhecer-se-á que, com base nos resultados obtidos utilizando os anticorpos da invenção, e suas versões conjugadas, em um ensaio diagnóstico *in vitro*, é possível determinar o estágio de uma doença em um sujeito de acordo com os

níveis de expressão do antígeno-alvo. Para uma dada doença, amostras de sangue são coletadas de sujeitos diagnosticados em vários estágios na progressão da doença, e/ou em vários pontos no tratamento terapêutico da doença. O uso de uma população de amostras que fornece resultados estatisticamente significantes para cada estágio de progressão ou terapia permite atribuir uma faixa de concentrações do antígeno que possa ser considerada característica a cada estágio.

[00498]Os anticorpos ativáveis e/ou anticorpos conjugados ativáveis podem também ser utilizados em métodos diagnósticos e/ou de imagem. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vitro*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in vivo*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *in situ*. Em algumas modalidades, tais métodos são métodos *ex vivo*. Por exemplo, anticorpos ativáveis com uma CM clivável enzimaticamente podem ser utilizados para detectar a presença ou ausência de uma enzima que é capaz de clivar a CM. Tais anticorpos ativáveis podem ser utilizados em diagnóstico, o que pode incluir a detecção *in vivo* (p. ex., qualitativa ou quantitativa) de atividade da enzima (ou, em algumas modalidades, um meio de maior potencial de redução tal como aquele que reduz as ligações dissulfeto) através do acúmulo medido de anticorpos ativados (ou seja, anticorpos resultantes da clivagem de um anticorpo ativável) em uma dada célula ou tecido de um determinado organismo hospedeiro. Tal acúmulo de anticorpos ativados indica não só que o tecido expressa atividade enzimática (ou maior potencial de redução dependendo da natureza da CM), mas também que o tecido expressa o alvo ao qual se liga o anticorpo ativado.

[00499]Por exemplo, a CM pode ser selecionada como substrato para pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, encontradas no sítio de um tumor, no sítio de uma infecção viral ou bacteriana em local biologicamente confinado (p. ex., tal como e um abscesso, em um órgão ou os semelhantes) e semelhantes. O AB poder do tipo que se liga a um antígeno-alvo. Com o uso dos métodos

aqui descritos, ou quando adequado, métodos familiares aos técnicos no assunto, é possível conjugar uma marcação detectável (p. ex., uma marcação fluorescente ou marcação radioativa ou radiotraçador) a um AB ou a outra região de um anticorpo e/ou anticorpo ativável. As marcações detectáveis são discutidas no contexto dos métodos de rastreamento acima, e os exemplos específicos adicionais são fornecidos abaixo. Com um AB específico para uma proteína ou peptídeo do estado de doença, juntamente com pelo menos uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, cuja atividade esteja elevada no tecido de interesse da doença, os anticorpos ativáveis exibirão uma taxa aumentada de ligação ao tecido da doença em relação a tecidos onde a enzima específica para a CM não está presente em um nível detectável ou está presente em um nível mais baixo do que no tecido doente ou está inativa (p. ex., em forma de zimógeno ou em complexo com um inibidor). Considerando que proteínas pequenas e peptídeos são rapidamente depurados 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 em tecidos não doentes ou está presente em conformação inativa), o acúmulo de anticorpos ativados no tecido doente está aumentado em relação a tecidos não doentes.

[00500]Em outro exemplo, anticorpos ativáveis podem ser utilizados para detectar a presença ou ausência de um agente de clivagem em uma amostra. Por exemplo, quando os anticorpos ativáveis contiverem uma CM suscetível à clivagem por uma enzima, os anticorpos ativáveis podem ser utilizados para detectar (seja qualitativa ou quantitativamente) a presença de uma enzima na amostra. Em outro exemplo, quando os anticorpos ativáveis contiverem uma CM suscetível à clivagem por um agente redutor, os anticorpos ativáveis podem ser utilizados para detectar (seja qualitativa ou quantitativamente) a presença de condições redutoras em uma amostra. Para facilitar a análise nesses métodos, os anticorpos ativáveis podem ser marcados para detecção, e podem ser ligados a um suporte (p. ex., um suporte sólido, como uma lâmina

ou microesfera). A marcação detectável pode ser posicionada em uma parte do anticorpo ativável que não é liberada após a clivagem, por exemplo, a marcação detectável pode ser uma marcação fluorescente suprimida ou outra marcação que não seja detectável até que tenha ocorrido a clivagem. O ensaio pode ser conduzido, por exemplo, contatando os anticorpos ativáveis imobilizados, marcados para detecção, com uma amostra suspeita de conter uma enzima e/ou um agente redutor por um tempo suficiente para que ocorra a clivagem, em seguida, lavar para remover o excesso de amostra e contaminantes. A presença ou ausência do agente de clivagem (p. ex., enzima ou agente redutor) na amostra é então avaliada por uma mudança no sinal detectável dos anticorpos ativáveis antes de contatar a amostra p. ex., a presença e/ou aumento no sinal detectável em decorrência da clivagem do anticorpo ativável pelo agente de clivagem na amostra.

[00501]Tais métodos de detecção podem ser adaptados para também permitirem detectar a presença ou ausência de um alvo que seja capaz de se ligar ao AB dos anticorpos ativáveis quando clivados. Assim, os ensaios podem ser adaptados para avaliar a presença ou ausência de um agente de clivagem e a presença ou ausência de um alvo de interesse. A presença ou ausência do agente de clivagem pode ser detectada pela presença e/ou aumento na marcação detectável dos anticorpos ativáveis como descritos acima, a presença ou ausência do alvo pode ser detectada pela confirmação do complexo alvo-AB, p. ex., utilizando um anticorpo anti-alvo marcado para detecção.

[00502]Os anticorpos ativáveis são também úteis em imagens *in situ* para a validação da ativação do anticorpo ativável, p. ex., por meio da clivagem pela protease e a ligação a um alvo em particular. Imagens *in situ* constituem uma técnica que possibilita a localização de atividade proteolítica e alvo em amostras biológicas, tais como culturas celulares ou cortes de tecido. Com o uso dessa técnica, é possível confirmar a ligação a um dado alvo e a atividade proteolítica com base na presença da marcação



detectável (p. ex., uma marcação fluorescente).

[00503]Essas técnicas são úteis com quaisquer células congeladas ou tecido derivado de um sítio de doença (p. ex., tecido tumoral) ou tecidos saudáveis. Essas técnicas são úteis também com amostras de células ou tecidos frescos.

[00504]Nessas técnicas, um anticorpo ativável é marcado com uma marcação detectável. A marcação detectável pode ser um corante fluorescente, (p. ex., um fluoróforo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de rodamina (TRITC), uma marcação Alexa Fluor®), um corante no infravermelho próximo (NIR) (p. ex., nanocristais Qdot®), um metal coloidal, um hapteno, um marcador radioativo, biotina e um reagente de amplificação como estreptavidina ou uma enzima (p. ex., peroxidase do rábano ou fosfatase alcalina).

[00505]A detecção da marcação em uma amostra que foi incubada com o anticorpo ativável marcado indica que a amostra contém o alvo e que contém uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que é específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença da protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, pode ser confirmada utilizando inibidores de proteases de amplo espectro como aqueles aqui descritos e/ou utilizando um agente que seja específico para a protease, por exemplo, um anticorpo como A11, que é específico para a protease matriptase e que inibe a atividade proteolítica da matriptase; vide, p. ex., a Publicação Internacional Número WO 2010/129609, publicada em 11 de novembro de 2010. A mesma abordagem de se usar inibidores de proteases de amplo espectro como aqueles aqui descritos e/ou usar um agente inibitório mais seletivo pode ser utilizada para identificar uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que seja específica para a CM do anticorpo ativável. Em algumas modalidades, a presença do alvo pode ser confirmada utilizando um agente que seja específico para o alvo, p. ex., outro anticorpo, ou a marcação detectável na competição com o alvo não marcado. Em algumas modalidades, o anticorpo ativável não marcado poderia ser

utilizado com a detecção por um anticorpo secundário marcado ou por um sistema de detecção mais complexo.

[00506]Técnicas semelhantes são também úteis para imagens *in vivo*, em que a detecção do sinal fluorescente em um sujeito, p. ex., um mamífero, inclusive um humano, indica que a amostra contém o sítio de doença e que contém uma protease, selecionada a partir de matriptase e uPA, que é específica para a CM do anticorpo ativável.

[00507]Essas técnicas são também úteis em kits e/ou como reagentes para a detecção, a identificação ou a caracterização da atividade de protease em uma variedade de células, tecidos e organismos com base na CM específica para a protease no anticorpo ativável.

[00508]Em algumas modalidades, a imagem *in situ* e/ou a imagem *in vivo* são úteis em métodos para identificar quais pacientes tratar. Por exemplo, na imagem *in situ*, os anticorpos ativáveis são utilizados para rastrear amostras de pacientes e identificar aqueles pacientes dispondo da(s) protease(s) e do(s) alvos(s) apropriados na localização adequada, por exemplo, em um sítio tumoral.

[00509]Em algumas modalidades, a imagem *in situ* é utilizada para identificar ou de outra forma refinar uma população de pacientes adequados para o tratamento com um anticorpo ativável da invenção. Por exemplo, pacientes com resultado positivo para ambos, o alvo e uma protease que cliva um substrato na porção clivável (CM) do anticorpo ativável em teste (p. ex., acumula anticorpos ativados no sítio de doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo ativável compreendendo essa CM. Do mesmo modo, pacientes com resultado negativo para qualquer um ou ambos, o alvo e a protease que cliva um substrato na CM do anticorpo ativável testado utilizando esses métodos são identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia (ou seja, não adequados para o tratamento com o anticorpo ativável em teste). Em algumas modalidades, esses pacientes

com resultado negativo referente a um primeiro anticorpo ativável podem ser testados com outros anticorpos ativáveis compreendendo CMs diferentes até ser identificado um anticorpo ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável compreendendo uma CM que é clivada pelo paciente no sítio de doença).

[00510]Em algumas modalidades, a imagem *in vivo* é utilizada para identificar ou de outra forma refinar uma população de pacientes adequados para o tratamento com um anticorpo ativável da invenção. Por exemplo, pacientes com resultado positivo para ambos, o alvo e uma protease que cliva um substrato na porção clivável (CM) do anticorpo ativável em teste (p. ex., acumula anticorpos ativados no sítio de doença) são identificados como candidatos adequados para o tratamento com esse anticorpo ativável compreendendo essa CM. Do mesmo modo, pacientes com resultado negativo são identificados como candidatos adequados para outra forma de terapia (ou seja, não adequados para o tratamento com o anticorpo ativável em teste). Em algumas modalidades, esses pacientes com resultado negativo referente a um primeiro anticorpo ativável podem ser testados com outros anticorpos ativáveis compreendendo CMs diferentes até ser identificado um anticorpo ativável adequado para o tratamento (p. ex., um anticorpo ativável compreendendo uma CM que é clivada pelo paciente no sítio de doença).

#### Composições farmacêuticas

[00511]Os anticorpos conjugados, anticorpos ativáveis e/ou anticorpos conjugados ativáveis da invenção (também referidos neste relatório descritivo como “compostos ativos”) e derivados, fragmentos, análogos e homólogos destes, podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração. Tais composições compreendem tipicamente o anticorpo conjugado, anticorpo ativável e/ou anticorpo conjugado ativável e veículo farmaceuticamente aceitável. Neste relatório descritivo, o termo “veículo farmaceuticamente aceitável” destina-se a incluir todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes

antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardadores da absorção, e os semelhantes, compatíveis com a administração farmacêutica. Veículos adequados são descritos na edição mais recente de *Remington's Pharmaceutical Sciences*, um texto de referência padrão no campo, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência neste pedido de patente. Os exemplos adequados de tais veículos ou diluentes incluem, entre outros, água, solução salina, soluções de ringer, solução de dextrose e albumina sérica humana 5%. Lipossomas e veículos não aquosos, como óleos fixos, podem também ser utilizados. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é bem conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, o seu uso nas composições é contemplado. Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

[00512]Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com sua via de administração pretendida. Os exemplos de vias de administração incluem administração parenteral, p. ex., intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (p. ex., inalação), transdérmica (ou seja, tópica), transmucosa e retal. As soluções ou suspensões para aplicação parenteral, intradérmica ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril como água para injetáveis, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes como ácido etilendiaminatetracético (EDTA); tampões como acetatos, citratos ou fosfatos, e agentes para o ajuste da tonicidade como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. O preparado parenteral pode ser inserido em ampolas, seringas descartáveis ou frascos-ampolas de doses múltiplas feitas de vidro ou plástico.

[00513]As composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem

soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para o preparo extemporâneo de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para administração intravenosa, os veículos adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL<sup>TM</sup> (BASF, Parsippany, N.J.) ou solução salina com tampão fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição precisa ser estéril e deve ser suficientemente líquida para que exista facilidade de aplicação por seringa. Deve ser estável nas condições de fabricação e armazenamento e ser conservada contra a ação contaminante de microrganismos como bactérias e fungos. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e os semelhantes) e misturas adequadas destes. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho necessário de partículas no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e os semelhantes. Em algumas modalidades, será desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis como manitol, sorbitol, cloreto de sódio, na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser ocasionada incluindo na composição um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00514] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo, na quantidade necessária em um solvente adequado, com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização filtrada. Em geral, dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contenha um meio básico de dispersão e os outros ingredientes necessários entre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para o preparo de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparo são secagem a vácuo e

liofilização que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução sua filtrada estéril previamente.

[00515]As composições orais em geral incluem um diluente inerte ou um veículo comestível. Podem estar inseridas em cápsulas gelatinosas ou ser prensadas em comprimidos. Para fins de administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e utilizado na forma de comprimidos, pastilhas ou cápsulas. As composições orais podem também ser preparadas utilizando um veículo líquido para uso como enxaguatório bucal, em que o composto no veículo líquido é aplicado oralmente e 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 semelhantes podem conter qualquer um dos ingredientes a seguir, ou compostos de natureza semelhante: um aglutinante como celulose microcristalina, goma tragacanta ou gelatina; um excipiente como amido ou lactose, um agente desintegrante como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante como estearato de magnésio ou Sterotes; um deslizante como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante como hortelã, salicilato de metila ou sabor de laranja.

[00516]Para a administração por inalação, os compostos são liberados, na forma de *spray* de aerossol, de um recipiente pressurizado ou dispensador que contém um propelente adequado, p. ex., um gás como dióxido de carbono, ou um nebulizador.

[00517]A administração sistêmica pode também ser por meio transmucoso ou transdérmico. Para a administração transmucosa ou transdérmica, penetrantes apropriados à barreira a ser permeada são utilizados na formulação. Tais penetrantes são em geral conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, para administração transmucosa, detergentes, sais biliares e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosa pode ser realizada através do uso de *sprays* nasais ou supositórios. Para a administração transdérmica, os compostos ativos são formulados em unguentos,

pomadas, géis ou cremes conforme geralmente conhecido na técnica.

[00518]Os compostos também podem ser preparados na forma de supositórios (p. ex., com bases convencionais de supositório como manteiga de cacau e outros glicerídeos) ou enemas de retenção para liberação retal.

[00519]Em uma modalidade, os compostos ativos são preparados com veículos que protegerão o composto contra a eliminação rápida do corpo, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas microencapsulados de liberação. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizados, como acetato de vinil etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Os métodos para preparar tais formulações serão evidentes para os técnicos no assunto. Os materiais podem também ser obtidos comercialmente com a Alza Corporation e a Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões lipossomais (incluindo lipossomas direcionados para células infectadas com anticorpos monoclonais contra antígenos virais) podem também ser utilizadas como veículos farmacêuticamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de acordo com métodos conhecidos pelos técnicos no assunto, por exemplo, como descrito na Patente U.S. Nº 4 522 811.

[00520]É especialmente vantajoso formular composições orais ou parenterais em forma de dose unitária para facilidade de administração e uniformidade da dose. Forma de dose unitária, neste relatório descritivo, refere-se a unidades fisicamente distintas adequadas como doses unitárias para o sujeito a ser tratado, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, associada com o veículo farmacêutico necessário. As especificações para as formas de dose unitária da invenção são ditadas e são diretamente dependentes das características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico em particular a ser alcançado, além das limitações inerentes na arte da manipulação farmacêutica de tal composto ativo para o tratamento de pessoas.

[00521]As composições farmacêuticas podem ser incluídas em um recipiente,

embalagem ou dispensador, junto com instruções para a administração.

[00522]A invenção será descrita mais detalhadamente nos exemplos a seguir, que não limitam o âmbito da invenção descrita nas reivindicações.

#### Exemplos

##### Exemplo 1. Materiais e métodos

[00523]Reagentes e cepas: Ficoeritrina conjugada à estreptavidina (SA-PE) (Invitrogen, Life Technologies) foi utilizada sem modificações. Matriptase-1 humana (Research & Diagnostics Systems, Inc.) foi utilizada sem modificações. Plasmina humana (Hematologic Technologies Inc.) foi utilizada sem modificações. tPA humana (Molecular Innovations) foi utilizada sem modificações. YPet fusionado ao domínio SH3 de Mona (adaptador monocítico) foi utilizado sem modificações. TBST, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4, foi utilizado. Utilizou-se *E. coli* MC1061 (Casadaban *et al.*, JMB 138(2):179-207 (1980). Todo o crescimento bacteriano foi realizado a 37 °C com agitação vigorosa em caldo Luria-Bertani (LB) suplementado com cloranfenicol 34 µg/mL, a menos que seja especificado outro antibiótico.

[00524]Clivagem do substrato e análise da estabilidade do arcabouço: Para o rastreamento e a análise de clones, culturas do período noturno foram subcultivadas por diluição em meio fresco (1:50) e cresceram por 1,5-2 horas. Cada subcultura foi então induzida com arabinose 0,04% e incubada com agitação a 37 °C por 1 hora. Para interromper o crescimento, as células foram incubadas em gelo por 15-30 minutos. Alíquotas das células foram colhidas e lavadas com PBS (pH 7,4). As células foram peletizadas por centrifugação, o sobrenadante removido e as células ressuspensas em tampão de reação contendo a enzima; a mistura de reação foi incubada estática a 37 °C. Para interromper a reação, as células foram removidas e diluídas 10 vezes em PBS, peletizadas por centrifugação e ressuspensas em PBS contendo SA-PE (20 µg/mL) ou YPet-MONA (50 nM). Depois da incubação no gelo (30 minutos), as células foram lavadas com PBS e analisadas utilizando um classificador de células FACSAria™.



[00525] Para os ensaios de clivagem por protease, as culturas foram induzidas por 1 hora. O tampão de reação para matriptase-1 era TBST. Os ensaios de hidrólise com matriptase-1 foram realizados após reações com matriptase-1 200 pM – 200 nM por 1 hora. A hidrólise de fundo das regiões flanqueadoras o sítio do substrato (utilizando a plataforma eCLiPS3.0-NSUB\_SP descrita no Pedido de Patente PCT PCT/US13/54378, depositado em 09 de agosto de 2013 e publicado como WO 2014/026136 em 13 de fevereiro de 2014), foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato.

[00526] Para os ensaios de estabilidade com plasmina humana, a plataforma eCLiPS3.0-NSUB\_SP foi utilizada; as culturas foram induzidas por 1 hora. O tampão de reação para plasmina foi Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, suplementado com NaCl 100 mM, Tween 20 0,01% e EDTA 1 mM. Os ensaios de hidrólise com plasmina foram realizados após reações com plasmina por 1 hora.

[00527] Para os ensaios de estabilidade com tPA, a plataforma eCLiPS3.0-NSUB\_SP foi utilizada; as culturas foram induzidas por 1 hora. O tampão de reação para tPA foi TBST. Os ensaios de hidrólise com tPA foram realizados após reações com tPA por 1 hora.

[00528] Condições para marcação na terminação amino e carboxi: Ficoeritrina conjugada a estreptavidina (SAPE) foi utilizada para marcação do ligante por afinidade de ligação com estreptavidina nos N-terminais de CPX. A proteína fluorescente YPet fusionada ao domínio SH3 de Mona foi utilizada para marca o ligante por afinidade de ligação com MONA nos C-terminais de CPX. Para a marcação ótima das células sem reação de protease, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com SAPE (20 µg/mL) ou YPet-MONA (50 nM).

[00529] Análise cinética dos dados: A extensão da conversão de substratos peptídicos exibidos na superfície celular foi medida diretamente, utilizando citometria de fluxo, para medir as mudanças na fluorescência média de populações de células

clonais mediante o tratamento com protease. Especificamente, para cada amostra, a conversão foi determinada por análises de citometria de fluxo utilizando a relação:

$$\text{Conversão} = \frac{FL_- - FL_+}{FL_- - FL_0}$$

onde (FL-) é a fluorescência após a incubação sem enzima, (FL+) é a fluorescência após a incubação com enzima e (FL<sub>0</sub>) é a fluorescência de células não marcadas. Dado que as concentrações esperadas de substrato que foram utilizadas são significativamente abaixo da K<sub>M</sub> prevista de substrato para a protease-alvo, o modelo de Michaelis-Menton simplifica para:

$$\frac{d[S]}{dt} \approx -\frac{k_{cat}}{K_M} [S][E] \quad [2]$$

permitindo expressar a conversão de substrato como:

$$\text{Conversão} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{cat}}{K_M} \cdot [E] \cdot t\right) \quad [3]$$

onde [S] é a concentração de substrato, [E] é a concentração de enzima e t é tempo. Para determinar a constante da taxa de segunda ordem (k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>), a equação [3] foi simplificada para:

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = -\ln(1 - \text{Conversão de produto}) / (\text{Tempo} \cdot [\text{protease}])$$

[00530]Análise dos dados de sequências – Meta-motivos: Os substratos foram submetidos ao sequenciamento Ion Torrent™ (vide, p. ex., Rothenberg, JM, *Nature* 475, 348–352). Leituras não processadas do Ion Torrent foram cortadas por sequências do vetor invariante para obter apenas *insert* variáveis do peptídeo. As sequências inseridas foram traduzidas, e sequências com códons de parada foram excluídas da análise posterior. A frequência de cada sequência foi obtida pelo número de vezes observadas dividido de todas as leituras de peptídeos viáveis observadas. O enriquecimento de sequências foi obtido por comparação da frequência observada de cada sequência pós-seleção com a frequência de cada sequência pré-seleção. A análise de motivos foi realizada extraindo todos os possíveis 2mers, 3mers, 4mers e 1n2mers 2n1mers 2n2mers e 2nn2mers não consecutivos (onde o primeiro número

representa o primeiro conjunto de posições invariantes, o segundo número representa o segundo conjunto de posições invariantes e o número de  $n$  entre representa o número de posições variáveis permitidas entre as duas posições invariantes). A frequência de cada motivo foi estabelecida em todas as sequências normalizadas nas bibliotecas pré-selecionadas e pós-selecionadas para estabelecer a significância do enriquecimento de cada motivo. Para gerar meta-motivos, todas as sequências contendo cada motivo foram alinhadas, e criou-se uma Matriz de Peso Posicional (PWM) representando a propensão de aminoácidos em cada posição nos carreadores de motivos. Conduziram-se alinhamentos perfil-perfil e a pontuação em todos os motivos, utilizando uma função de pontuação Conteúdo Mínimo de Informações Mínimas (*Minimum Mutual Information Content*, MMIC) para pontuar cada registro alinhado de perfil-perfil. Registros com alinhamento acima de uma base de registros incorretos de PWMs únicas formadas foram extraídos como significativos; as PWMs individuais foram então adicionadas para criar um meta-motivo médio.

[00531]Análise dos dados de sequências – Famílias direcionadas: conjuntos de substratos finais foram sequenciados utilizando o sequenciamento Ion Torrent™. Sequências individuais foram identificadas e isoladas a partir desses dados, e as sequências foram alinhadas no CLC main lab (CLC Main Workbench 6.6.2, disponível *on-line*). O arquivo do alinhamento foi importado para Jalview (vide, p. ex., Waterhouse, A.M., *et al.*, 2009, *Bioinformatics* 9, 1189-1191) e uma árvore de distância média foi montada utilizando o algoritmo BLOSUM62 (S Henikoff S *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 10915–10919). O grupo restrito de sequências inclui membros do *cluster* (agrupamento) mais próximo da sequência de interesse. O grupo ampliado de sequências inclui o grupo restrito de sequências mais a ramificação que compartilha o ancestral comum mais próximo (quando aplicável).

Exemplo 2. Seleção e caracterização de conjuntos de substratos em um arcabouço da plataforma

[00532]O uso de exibição de múltiplas cópias de substratos em células inteiras possibilitou a seleção de populações de substratos clivados pela matriptase-1. As seleções foram realizadas como descrito na Patente US Nº 7 666 817 B, concedida em 23 de fevereiro de 2010, utilizando matriptase-1 humana recombinante. A hidrólise de base das regiões flangeadoras do sítio do substrato (utilizando a plataforma eCLiPS3.0-NSUB\_SP) foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato. conjuntos finais foram testados contra matriptase-1, plasmina e tPA. Os conjuntos foram clivados pela matriptase-1, mas não pela tPA ou plasmina. A Figura 1 mostra a clivagem do conjunto SMP30 pela matriptase-1 em TBST, a Figura 2 mostra a clivagem do conjunto SMP17 pela matriptase-1 a 50 nM e a resistência à tPA, ambas em TBST. Com técnicas semelhantes, rastreou-se uma biblioteca separada para selecionar substratos clivados pela matriptase-1 e pelo ativador do plasminogênio U, mas não pela tPA ou plasmina.

Exemplo 3. Caracterização da cinética de clivagem do substrato no arcabouço da plataforma

[00533]O uso da exibição de múltiplas cópias de substratos em células inteiras possibilitou a caracterização quantitativa simples e direta da cinética da clivagem. Consequentemente, a citometria de fluxo foi utilizada para classificar clones isolados individuais com base na conversão do substrato, e os clones foram identificados por sequenciamento do DNA. Dessa maneira, a extensão da conversão para cada clone pôde ser determinada em diversas concentrações diferentes da protease e ajuste para um modelo de Michaelis-Menton (Seção de Análise cinética dos dados). A constante da taxa de segunda ordem ( $k_{cat}/K_M$ ) foi determinada para cada substrato *versus* matriptase-1. A hidrólise de base das regiões flangeadoras do sítio do substrato (utilizando a plataforma eCLiPS3.0-NSUB\_SP) foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada de substrato. Por exemplo, a Figura 3 mostra a clivagem de um substrato compreendendo a sequência

de aminoácidos VAGRSMRP pela matriptase-1 em TBST.

#### Exemplo 4. Atividade de substratos *in vitro* em anticorpos ativáveis

[00534]Esse Exemplo demonstra a atividade *in vitro* de substratos da invenção quando são incorporados em anticorpos ativáveis.

[00535]Diversos substratos identificados nesses estudos foram inseridos em Probodies com o mascaramento 3954 e a variante C225v5 de cetuximabe, descrito na Publicação PCT Nº WO 2013/163631, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

[00536]A capacidade de substratos nos anticorpos ativáveis resultantes para serem clivados pela matriptase-1 ou uPA foi determinada como segue. Todas as digestões pela protease foram realizadas em Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH = 7,4. Concentrações variadas de uPA ou matriptase tituladas com atividade no sítio foram combinadas com uma concentração fixa do anticorpo ativável para manter uma razão substrato para protease de pelo menos 50. As amostras foram incubadas a 37 °C por até 20 horas. Para interromper a reação, 5 µL do digerido foram adicionados a 7 µL de tampão HT Protein Express Sample Buffer (Caliper LifeSciences) contendo 2-mercaptoetanol 20 mM por 10 minutos a 95 °C. Depois da desnaturação pelo calor, 32 µL de ddH<sub>2</sub>O foram adicionados e as amostras analisadas em um LabChip GXII de acordo com as instruções do fabricante. O *software* LabChip GXII foi utilizado para quantificar a área de pico da cadeia leve. A conversão do produto foi calculada inserindo as áreas de pico da cadeia leve na seguinte equação: LC clivada/(LC clivada + LC não clivada), LC = cadeia leve. Os valores de  $k_{cat}/K_m$  foram determinados com a seguinte equação:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = -\ln(1 - C)/(t * p)$$

onde C é a conversão do produto, t é tempo (s) e p é a concentração de protease (M), que pressupõe que a concentração de substrato é abaixo da  $K_m$  e acima

da concentração de protease.

[00537]Os anticorpos ativáveis resultantes compreendendo substratos selecionados para clivagem por uPA e matriptase apresentaram valores de  $k_{cat}/K_M$  que variavam entre 400 e 5.000  $M^{-1}s^{-1}$ , para uPA, e entre 3.000 e 100.000  $M^{-1}s^{-1}$  para matriptase (7 substratos testados). Os anticorpos ativáveis resultantes compreendendo substratos selecionados para clivagem por matriptase apresentaram valores de  $k_{cat}/K_M$  que variavam entre 6.500 e 100.000  $M^{-1}s^{-1}$  para matriptase (5 substratos testados).

#### Exemplo 5. Estabilidade de substratos de anticorpos ativáveis *in vivo*

[00538]Esse Exemplo demonstra a estabilidade *in vivo* de substratos da invenção quando são incorporados em anticorpos ativáveis e injetados em camundongos.

[00539]Anticorpos ativáveis, compreendendo diversos substratos da invenção, produzidos como descrito acima, foram marcados com AlexaFluor 680 ou DyLight 680 utilizando química padrão com NHS éster. O corante não reagido foi removido por purificação em uma coluna de dessalinização Zeba Spin (40 kDa MWCO, ThermoFisher). A concentração de proteína foi determinada por  $A_{280}$  utilizando um coeficiente de extinção calculado pela sequência proteica e um fator de correção que levava em conta a absorbância do corante.

[00540]Três camundongos nude (Crl:NU-Foxn1nu) receberam uma dose única IP de cada anticorpo ativável a 10 mg/kg ou 12,5 mg/kg no Dia 0. Os camundongos foram sacrificados no Dia 4 (quase 96 horas após a dose) por asfixia com  $CO_2$ , e o sangue foi coletado imediatamente em plasma-EDTA e armazenado a  $-80^\circ C$ .

[00541]Amostras de plasma foram preparadas para análise por eletroforese capilar, como descrita na seção de  $k_{cat}/K_m$ . Resumidamente, 5  $\mu L$  de plasma foram adicionados a 7  $\mu L$  do tampão Protein Express Sample Buffer com 2-mercaptoetanol. A quantificação da estabilidade circulante foi idêntica à quantificação da conversão de produto.

[00542]Dos 14 anticorpos ativáveis compreendendo substratos da invenção selecionados para a clivagem por uPA ou por matriptase, 13 exibiram menos de 20% de clivagem nas amostras coletadas do plasma.

#### Exemplo 6. Materiais e métodos

[00543]Reagentes e cepas: uPA humana (catálogo nº 1310-SE, Research & Diagnostics Systems, Inc.) foi utilizada sem modificações. Matriptase-1 humana (catálogo nº 3946-SE, Research & Diagnostics Systems, Inc.) foi utilizada sem modificações. tPA humana (catálogo nº. HTPA-TC, Molecular Innovations) foi utilizada sem modificações. Plasmina humana (catálogo nº HCPM-0140, Haematologic Technologies Inc.) foi utilizada sem modificações. O anticorpo monoclonal Anti-EE (Covance, Princeton, NJ) foi marcado com Alexa 647 (Life Sciences) e utilizado sem outras modificações (denominado EE647). As cepas MC1061 ou MC1061 derivadas de *E. coli* (DH10 $\beta$ ) foram utilizadas para todos os experimentos (Casadaban *et al.*, JMB 138(2):179-207 (1980)). Todo o crescimento bacteriano foi realizado a 37 °C com agitação vigorosa em caldo Luria-Bertani (LB) suplementado com cloranfenicol 34  $\mu$ g/mL (cm), a menos que especificado outro antibiótico.

[00544]Plataformas de exibição: As plataformas de exibição, construídas para conterem um substrato com 8 a 12-aminoácidos das modalidades, foram produzidas e utilizadas como descrito na Publicação Internacional Nº WO 2014/026136, publicada em 13 de fevereiro de 2014, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente. A sequência de aminoácidos da plataforma de exibição madura (ou seja, sem um peptídeo de sinalização) CYTX-DP-XXXXXXXXX (SEQ ID NO: 694) é mostrada na Figura 4A. XXXXXXXXX indica a localização na qual cada substrato é inserido. A sequência de aminoácidos da plataforma de exibição CYTX-DP-XXXXXXXXX, incluindo também seu peptídeo de sinalização, ou seja, plataforma de exibição SP-CYTX-DP-XXXXXXXXX (SEQ ID NO: 695) é mostrada na Figura 4B.

Plataforma de exibição CYTX-DP-XXXXXXXXX:

QQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGGQGGSGGSGGSGGSGGSAYYG  
 ITAGPAYRINDWASIYGVVGVGYGSGPGGSYGFSGAGLQFNPMENVALDFSIEQ  
 SRIRSDVDVGTWILSVGYRFGSKSRRATSTVTGGYAQSDAQGMNKMGGFNLKYRY  
 EEDNSPLGVIGSFTYTGGSGGSSGQAAAGHHHHHHHH (SEQ ID NO: 694)

Plataforma de exibição SP-CYTX-DP-XXXXXXXXX:

MKKIACLSALAAVLAFATAGTSVAGQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGG  
 QGGSGGSGGSGGSGGSAYYGITAGPAYRINDWASIYGVVGVGYGSGPGGSYGFSG  
 YGAGLQFNPMENVALDFSIEQSRIRSDVDVGTWILSVGYRFGSKSRRATSTVTGGYA  
 QSDAQGMNKMGGFNLKYRYEEDNSPLGVIGSFTYTGGSGGSSGQAAAGHHHHHH  
 HHH (SEQ ID NO: 695)

[00545]Clivagem do substrato e análise cinética da clivagem: Para a análise de clones, culturas do período noturno foram subcultivadas por diluição em meio fresco (1:40) e cresceram por 1,5-2 horas. A subcultura foi então induzida com arabinose 0,04% e incubada com agitação a 37 °C por 40 minutos até 1 hora. Para interromper o crescimento posterior, as células foram então incubadas em gelo por 15 minutos até 1 hora. Alíquotas das células foram colhidas e lavadas com tampão de reação. As células foram peletizadas por centrifugação, o sobrenadante removido e as células ressuspensas em tampão de reação contendo a enzima; a mistura de reação foi incubada a 37 °C com agitação. Para interromper a reação, as células foram removidas e diluídas 10 vezes em PBS, peletizadas por centrifugação e ressuspensas em PBS contendo anti-EE647 (20 microgramas por mililitro (também aqui referido como ug/mL ou µg/ml)). Depois da incubação em gelo (até 1 hora), células foram lavadas com PBS e analisadas utilizando um classificador de células Accuri C6.

[00546]Para os ensaios de clivagem pela protease uPA, as culturas foram induzidas por 40 minutos a 1 hora. O tampão de reação para uPA foi Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,4 (TBST). Os ensaios de hidrólise com uPA foram realizados após a clivagem com uPA 2 nM – 50 nM por 1 hora. A hidrólise de



base das regiões A hidrólise de base das regiões flanqueadoras do sítio do substrato (utilizando, p. ex., CYTX-DP-NSUB, uma plataforma de exibição na qual o “Substrato” é o ligador não clivável GGGSGGGS) foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato.

[00547]Para os ensaios de clivagem pela protease matriptase-1, as culturas foram induzidas por 40 minutos a 1 hora. O tampão de reação para matriptase-1 foi Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,4 (TBST). Os ensaios de hidrólise com matriptase-1 foram realizados após a clivagem com matriptase-1 2 nM – 50 nM por 1 hora. A hidrólise de base das regiões flanqueadoras do sítio do substrato (utilizando, p. ex., CYTX-DP-NSUB) foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato.

[00548]Para os ensaios de clivagem pela plasmina humana, as culturas foram induzidas por 40 minutos a 1 hora. O tampão de reação para plasmina foi Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, suplementado com NaCl 100 mM, Tween-20 0,01% e EDTA 1 mM. Os ensaios de hidrólise com plasmina foram realizados após a clivagem com plasma 20 - 500 pM por 1 hora. A hidrólise de base das regiões flanqueadoras do sítio do substrato (utilizando, p. ex., CYTX-DP-NSUB) foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato.

[00549]Para os ensaios de clivagem pela protease tPA, as culturas foram induzidas por 40 minutos a 1 hora. O tampão de reação para tPA foi Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,4 (TBST). Os ensaios de hidrólise com tPA foram realizados após a clivagem com tPA 2 nM – 50 nM por 1 hora. A hidrólise de base das regiões flanqueadoras do sítio do substrato (utilizando, p. ex., CYTX-DP-NSUB) foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato.

[00550]Condições para marcação nas terminações amino e carboxila: O anti-corpo anti-EE (EE647) conjugado com Alexa-647 foi utilizado para a marcação do

ligante por afinidade de ligação com EE nos N-terminais da plataforma de exibição CYTX-DP-XXXXXXXXX. O anticorpo anti-His (His647) conjugado com Alexa-647 foi utilizado para a marcação do ligante por afinidade de ligação 8His nos C-terminais da plataforma de exibição CYTX-DP-XXXXXXXXX. Para a marcação ótima das células na reação com protease, as células foram incubadas por 1 hora a 4 °C sem EE647 (1 µg/mL) ou His647 (2 µg/mL). Para o exemplo descrito abaixo, utilizou-se incubação por 1 hora.

[00551]Análise cinética dos dados: A extensão da conversão de substratos peptídicos exibidos na superfície celular foi medida diretamente, utilizando citometria de fluxo para medir mudanças na fluorescência média de populações de células clonais mediante o tratamento com a protease. Especificamente, para cada amostra, a conversão foi determinada pelas análises de citometria de fluxo utilizando a reação:

$$\text{Conversão}_{\text{CLIPS}} = \frac{FL_- - FL_+}{FL_- - FL_0} [1]$$

onde (FL-) é a fluorescência após a incubação sem enzima, (FL+) é a fluorescência após a incubação com enzima e (FL<sub>0</sub>) é a fluorescência de células não marcadas. Dado que as concentrações esperadas do substrato que foram utilizadas são significativamente abaixo da K<sub>M</sub> prevista do substrato para a protease-alvo, o modelo de Michaelis-Menten simplifica para:

$$\frac{d[S]}{dt} \approx -\frac{k_{\text{cat}}}{k_M} [S][E] [2]$$

permitindo expressar a conversão do substrato como:

$$\text{Conversão}_{\text{MM}} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{\text{cat}}}{k_M} [E] \cdot t\right) [3]$$

onde [S] é a concentração de substrato, [E] é a concentração de enzima e t é tempo. Para determinar a constante da taxa de segunda ordem (k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub>), a conversão dependente do tempo para cada substrato foi ajustada à equação [3].

Exemplo 7. Caracterização da capacidade de clivagem do substrato na plataforma de exibição CYTX-DP

[00552]Esse Exemplo demonstra a capacidade de substratos das modalidades serem clivados por matriptase e/ou uPA, mas não por plasmina e/ou tPA.

[00553]O uso de exibição de múltiplas cópias de substratos em células inteiras possibilitou a caracterização quantitativa simples e direta da cinética da clivagem. Os clones codificadores dos substratos foram identificados pelo sequenciamento de DNA e subclonados na plataforma de exibição CYTX-DP-XXXXXXXXX, de modo que a plataforma de exibição expressa contivesse o substrato (tipicamente 8 ou 12 aminoácidos) no lugar XXXXXXXXX. Clones individuais exibindo o substrato (148 plataformas de exibição independentes contendo o substrato, no total) foram avaliados quanto à clivagem por matriptase e/ou uPA (proteases-alvo, ou seja, as proteases utilizadas para selecionar o substrato) e por plasmina e/ou tPA (protease não alvo); o *turnover* foi determinado por citometria de fluxo. Cinquenta e um dos substratos foram selecionados para clivagem por matriptase e por uPA (ou seja, Substratos selecionados para matriptase e uPA). Os vinte e oito substratos selecionados para matriptase e uPA, a partir dos conjuntos, foram selecionados a partir dos mesmos conjuntos que os substratos compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NOs: 308, 314 e 361, bem como a partir de substratos compreendendo as sequências de aminoácidos 369-371, 374-379 e 381-384. Os vinte e três substratos de consenso, selecionados para matriptase e uPA, foram selecionados a partir de substratos compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NOs: 307-311, 313-314 e 320-368. Noventa e sete dos substratos foram selecionados para clivagem por matriptase (ou seja, substratos selecionados para matriptase). Os cinquenta e dois substratos selecionados para matriptase a partir dos conjuntos foram selecionados a partir de substratos nas Tabelas 8A a 8J e nas Tabelas 9A a 9J-3, bem como a partir de substratos compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NOs: 250-267. Os quarenta e cinco substratos de consenso, selecionados para matriptase, foram selecionados a partir de substratos compreendendo as sequências de aminoácidos SEQ ID NOs: 163-249.

[00554]Desse modo, a extensão da clivagem para cada clone pôde ser determinada, assim como os dados agregados para determinar um percentual de clones que foram clivados pela protease-alvo e não pela protease fora do alvo. A hidrólise de base das regiões flanqueadoras do sítio do substrato (utilizando, p. ex., a plataforma de exibição CYTX-DP-NSUB) foi medida em cada condição de reação para assegurar que a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato. Os resultados são apresentados Tabela 12.

Tabela 12: Resumo estatístico da capacidade de clivagem

Esforço de descoberta	Grupo de substrato	>20% de clivagem com matriptase-1 50 nM ou uPA 50 nM	>20% de clivagem com uPA 50nM	>20% de clivagem com matriptase-1 50nM	<20% de clivagem com plasmina 500 pM ou tPA 50 nM	<20% de clivagem com plasmina 500 pM	<20% de clivagem com tPA 50 nM
Substratos selecionados para matriptase e uPA	Todos os substratos testados selecionados para matriptase e uPA	100% (51 de 51)	78% (40 de 51)	75% (38 de 51)	76% (39 de 51)	76% (39 de 51)	96% (49 de 51)
	Substratos de conjuntos	100% (28 de 28)	64% (18 de 28)	89% (25 de 28)	89% (25 de 28)	89% (25 de 28)	93% (26 de 28)

	Substra- tos de con- senso	100% (23 de 23)	96% (22 de 23)	57% (13 de 23)	61% (14 de 23)	61% (14 de 23)	100% (23 de 23)
Substra- tos sele- cionados para ma- triptase	Todos os substra- tos sele- cionados para ma- triptase	86% (83 de 97)	41% (40 de 97)	67% (65 de 97)	70% (68 de 97)	82% (80 de 97)	85% (82 de 97)
	Substra- tos de conjun- tos	81% (42 de 52)	35% (18 de 52)	62% (32 de 52)	81% (42 de 52)	94% (49 de 52)	87% (45 de 52)
	Substra- tos de con- senso	91% (41 de 45)	49% (22 de 45)	73% (33 de 45)	58 (26 de 45)	69% (31 de 45)	82% (37 de 45)
Substra- tos com- binados para cli- vagem por ma- triptase e/ou uPA	Total	91% (134 de 148)	54% (80 de 148)	70% (103 de 148)	72% (107 de 148)	80% (119 de 148)	89% (131 de 148)

[00555]A Tabela 12 retrata a porcentagem de substratos selecionados para

matriptase e uPA ou de substratos selecionados para matriptase, testados na plataforma de exibição CYTX-DP, (a) que exibiram clivagem superior a 20% quando incubados com uPA humana 50 nM (catálogo nº 1310-SE, Research & Diagnostics Systems, Inc.) utilizada sem modificações por 1 hora a 37 °C em Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,4 (TBST) (>20% de clivagem com uPA 50 nM); (b) que exibiram clivagem superior a 20% quando incubados com matriptase-1 humana 50 nM (catálogo nº 3946-SE, Research & Diagnostics Systems, Inc.) utilizada sem modificações por 1 hora a 37 °C em Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,4 (TBST) (>20% de clivagem com matriptase-1 50 nM); (c) que exibiram clivagem inferior a 20% quando incubados com plasmina humana 500 pM (catálogo nº HCPM-0140, Haematologic Technologies, Inc.) utilizada sem modificações por 1 hora a 37 °C em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, suplementado com NaCl 100 mM, Tween-20 0,01% e EDTA 1 mM (<20% de clivagem com plasmina 500 pM); e (d) que exibiram clivagem inferior a 20% quando incubados com tPA humana 50 nM (catálogo nº HTPA-TC, Molecular Innovations) utilizada sem modificações por 1 hora a 37 °C em Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,4 (TBST) (<20% de clivagem com tPA 50 nM).

Exemplo 8. Caracterização da cinética de clivagem de substratos na plataforma de exibição CYTX-DP

[00556]Esse Exemplo demonstra a cinética de clivagem de vários substratos das modalidades.

[00557]O uso de exibição de múltiplas cópias de substratos em células inteiras possibilitou a caracterização quantitativa simples e direta da cinética de clivagem. Os clones foram identificados por sequenciamento de DNA e subclonados na plataforma de exibição CYTX-DP-XXXXXXXXX, como descrito acima. Noventa clones individuais exibindo substrato foram avaliados quanto à clivagem, e um subconjunto foi escolhido para avaliar a cinética da clivagem pela protease-alvo do clone. A extensão da conversão de cada clone pôde ser determinada em diversas concentrações diferentes de

protease e ajuste no modelo de Michaelis-Menten descrito acima. A hidrólise de base das regiões flanqueadoras do sítio do substrato (utilizando, p. ex., CYTX-DP-NSUB) foi medida em cada condição de reação para assegurar a hidrólise tinha ocorrido na região designada como substrato. Os resultados são apresentados na Tabela 13 e Tabela 14.

Tabela 13: Resumo estatístico da cinética do substrato para uPA

Esforço de descoberta	uPA kcat/Km > 1x10E2	uPA kcat/Km > 1x10E3	uPA kcat/Km > 1x10E4
Substratos selecionados para matriptase e uPA	100% (18 de 18)	100% (18 de 18)	50% (9 de 18)
Substratos selecionados para matriptase	100% (16 de 16)	100% (16 de 16)	6% (1 de 16)
Substratos combinados clivados por matriptase e/ou uPA	100% (34 de 34)	100% (34 de 34)	29% (10 de 34)

Tabela 14: Resumo estatístico da cinética do substrato para matriptase-1

Esforço de descoberta	Matriptase-1 kcat/Km > 1x10E2	Matriptase-1 kcat/Km > 1x10E3	Matriptase-1 kcat/Km > 1x10E4
Substratos selecionados para matriptase e uPA	100% (25 de 25)	100% (25 de 25)	16% (4 de 25)

Substratos selecionados para matriptase	100% (31 de 31)	100% (31 de 31)	3% (1 de 31)
Substratos combinados clivados por matriptase e/ou uPA	100% (56 de 56)	100% (56 de 56)	9% (5 de 56)

[00558]Exemplo 9. Eficácia *in vivo* e ativação *in situ* de anticorpos ativáveis compreendendo um substrato clivável por matriptase e/ou uPA

[00559]Esse Exemplo demonstra que anticorpos ativáveis compreendendo substratos das modalidades, cliváveis por matriptase e/ou uPA, são eficazes *in vivo*. Esse Exemplo também demonstra que tais anticorpos ativáveis podem ser ativados, em um ensaio de imagem *in situ*, como aquele descrito na Publicação Internacional Nº WO 2014/107559, publicada em 10 de julho de 2014, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

[00560]Três anticorpos ativáveis, cada um compreendendo um substrato diferente das modalidades que são clivados por matriptase e/ou uPA, foram administrados a 10 mg/kg a camundongos portadores do xenoinxerto tumoral H292 (câncer de pulmão) no Dia 0. Todos os três anticorpos ativáveis também compreendiam a porção de mascaramento incluindo a sequência de aminoácidos CISPRGCPDGPYVMY (SEQ ID NO: 515) e o anticorpo c225v5 anticorpo anti-EGFR compreendendo uma cadeia leve (SEQ ID NO: 458) e uma cadeia pesada (SEQ ID NO: 455). A configuração da cadeia leve do anticorpo ativável era porção de mascaramento – substrato – cadeia leve de C225v5.

[00561]Os camundongos foram sangrados na região retro-orbital no 4º dia (aproximadamente 96 horas após a dose). O sangue foi coletado imediatamente em plasma-EDTA e armazenado a -80 °C. Os três anticorpos ativáveis foram purificados



do plasma por imunoprecipitação com anti-IgG humana utilizando microesferas magnéticas. Para análise por eletroforese capilar, 5 µL da IgG eluída foram adicionados a 7 µL do tampão Protein Express Sample Buffer (Caliper LifeSciences) contendo 2-mercaptoetanol 20 mM por 10 minutos a 95 °C. Após desnaturação pelo calor, 32 µL de ddH<sub>2</sub>O foram adicionados e as amostras analisadas em um LabChip GXII de acordo com as instruções do fabricante. O *software* LabChip GXII foi utilizado para quantificar a área de pico da cadeia leve. A conversão do produto foi calculada inserindo as áreas de pico da cadeia leve na seguinte equação:  $LC \text{ clivada} / (LC \text{ clivada} + LC \text{ não clivada})$ , LC = área de pico da cadeia leve. No Dia 4, os três anticorpos ativáveis demonstraram valores % médios de ativação variando de 13% a 30%. A ativação % média é calculada como  $((\text{soma da conversão de produto do grupo em teste}) * 100\%) / (\text{número de animais no grupo em teste})$ .

[00562]Os três anticorpos ativáveis demonstraram inibição do crescimento tumoral variando de 32% a 59%, conforme medida por % Δ médio de inibição. A inibição % Δ média é calculada como  $((C) \text{ médio} - (C0) \text{ médio}) - ((T) \text{ médio} - (T0) \text{ médio}) / ((C) \text{ médio} - (C0) \text{ médio}) * 100\%$ , em que T é o valor do grupo teste atual, T0 é o valor inicial do grupo teste atual, C é o valor do grupo controle e C0 é o valor inicial do grupo controle. O cetuximabe, anticorpo contra EGFR, demonstrou 96% de inibição nesse estudo.

[00563]Os mesmos três anticorpos ativáveis foram submetidos a ensaios de imagem *in situ* de tecidos contendo o xenoenxerto tumoral dos camundongos, utilizando as condições descritas nos exemplos de WO 2014/107559, *ibid*. Os três anticorpos ativáveis foram ativados, demonstrando que os substratos tinham sido clivados e os anticorpos se ligado ao EGFR no tecido tumoral. Os sinais de coloração variaram de 15% a 85% da intensidade de sinal IHC do cetuximabe.

Outras modalidades

[00564]Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com a sua

descrição detalhada, a descrição precedente destina-se a ilustrar e não a limitar o âmbito da invenção, que é definido pelo âmbito das reivindicações anexadas. Outros aspectos, vantagens e modificações são abrangidos pelo âmbito do seguinte.

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo (AB);

(b) uma porção clivável (CM) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOs: 286, 305, 306 e 361 a 368, em que a porção clivável é um substrato para pelo menos uma protease matriptase ou uma protease ativadora de plasminogênio U (uPA); e

(c) uma porção de mascaramento (MM) que inibe a capacidade de AB de se ligar a um antígeno, em que a MM está ligada a CM de modo que o polipeptídeo isolado, em um estado não clivado, compreende um arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal de MM-CM-AB; e

em que o MM não interfere ou compete com o AB pela ligação ao antígeno em estado clivado.

2. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a CM compreende uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo que consiste em: SEQ ID NOs: 305, 306 e 361 a 368.

3. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a CM é um substrato para uma protease que está co-localizada em um tecido com o antígeno.

4. Polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o fragmento de ligação ao antígeno é selecionado dentre o grupo consistindo em um fragmento Fab, um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, um scFv, um scAB, um dAb, um anticorpo de cadeia pesada de domínio único e um anticorpo de cadeia leve de domínio único.

5. Polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o AB está ligado diretamente a CM ou em que o AB está ligado a CM por meio de um peptídeo de ligação.

6. Polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a MM tem pelo menos uma das seguintes características:

(a) a MM tem uma constante de dissociação no equilíbrio para se ligar ao AB que é maior do que a constante de dissociação no equilíbrio do AB para se ligar ao alvo;

(b) a MM tem uma constante de dissociação no equilíbrio para se ligar ao AB que não é maior do que a constante de dissociação no equilíbrio do AB ao alvo;

(c) a MM é um polipeptídeo com não mais de 40 aminoácidos de comprimento;  
e

(d) a sequência de aminoácidos da MM é diferente da do antígeno.

7. Polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo isolado compreende um peptídeo de ligação entre a MM e a CM; e/ou o polipeptídeo isolado que compreende um peptídeo de ligação entre a CM e o AB.

8. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo isolado compreende um primeiro peptídeo de ligação (LP1) e um segundo peptídeo de ligação (LP2) e em que o polipeptídeo isolado, em um estado não clivado, tem o arranjo estrutural do N-terminal ao C-terminal de MM-LP1-CM-LP2-AB, opcionalmente em que os dois peptídeos de ligação não precisam ser idênticos um ao outro, opcionalmente em que cada um de LP1 e LP2 é um peptídeo de cerca de 1 a 20 aminoácidos de comprimento.

9. Polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo isolado compreende um scFv que envolve células T ligado ao AB, opcionalmente em que o scFv que envolve células T compreende uma porção de mascaramento.

10. Polipeptídeo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo isolado é conjugado a um agente, opcionalmente em que o agente é selecionado dentre o grupo consistindo em:

(a) uma toxina ou fragmento da mesma, opcionalmente em que o agente é selecionado dentre o grupo que consiste em uma dolastatina ou um derivado da mesma, uma auristatina ou um derivado da mesma, um maitansinoide ou um derivado do mesmo, uma duocarmicina ou um derivado da mesma, uma caliqueamicina ou um derivado da mesma, auristatina E ou um derivado da mesma, monometil auristatina E (MMAE) ou um derivado da mesma, monometil auristatina D (MMAD) ou um derivado da mesma, DM1 ou um derivado do mesmo ou DM4 ou um derivado do mesmo; e

(b) uma porção detectável, opcionalmente em que a porção detectável é um agente de diagnóstico.

11. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente é conjugado ao polipeptídeo por meio de um ligante, opcionalmente em que o ligante é um ligante clivável.

12. Polipeptídeo isolado, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente é conjugado ao AB por meio de um ligante, opcionalmente em que o ligante é um ligante clivável.

13. Método para produzir um polipeptídeo isolado compreendendo uma porção clivável (CM) **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende cultivar uma célula engenheirada para expressar o polipeptídeo isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, sob condições que levam à expressão do polipeptídeo.

14. Método para fabricar um polipeptídeo isolado compreendendo uma porção clivável (CM) **CARACTERIZADO** pelo fato de que o método compreende:

(a) cultivar uma célula engenheirada para expressar o polipeptídeo isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, sob condições que levam à expressão do polipeptídeo; e

(b) recuperar o polipeptídeo.

15. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o polipeptídeo isolado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, e um veículo, opcionalmente compreendendo um agente adicional, em que o agente adicional é um agente terapêutico.

16. Uso da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para tratar um distúrbio ou doença em um indivíduo, opcionalmente câncer ou outra condição neoplásica, distúrbio ou doença autoimune ou distúrbio ou doença inflamatória.

17. Quantidade terapeuticamente eficaz da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 15, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para uso no tratamento de, alívio de um sintoma de, ou retardamento da progressão de um distúrbio ou doença em um indivíduo em necessidade do mesmo, opcionalmente um câncer ou outra condição neoplásica, distúrbio ou doença autoimune ou doença ou distúrbio inflamatória.

Figura 1

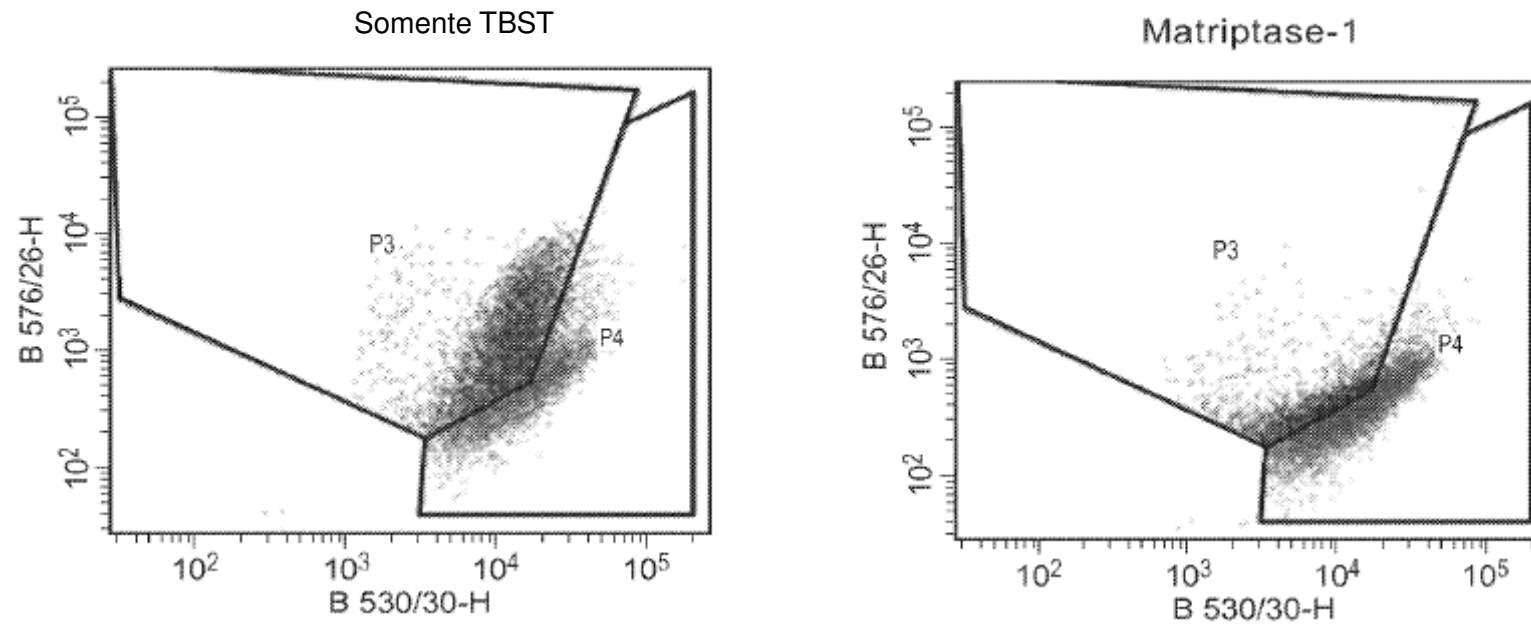


Figura 2

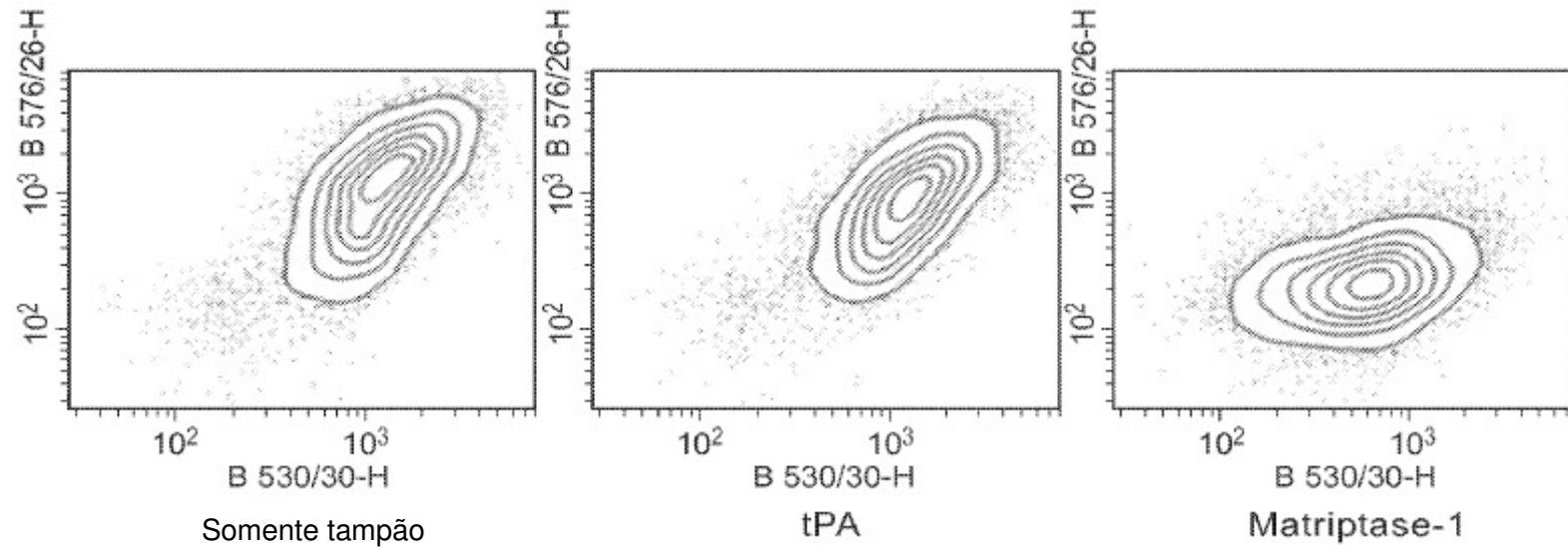




Figura 3

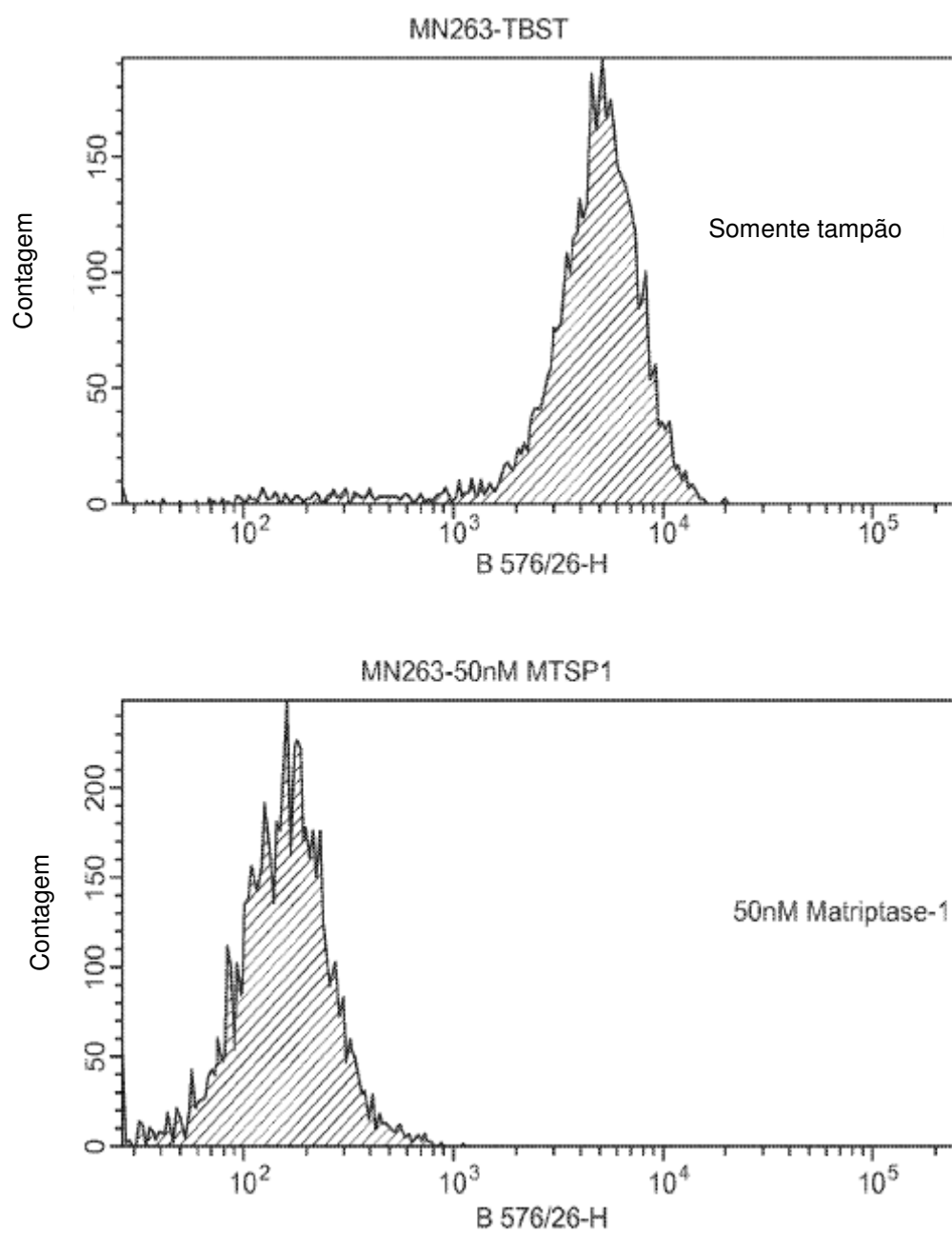


Figura 4A

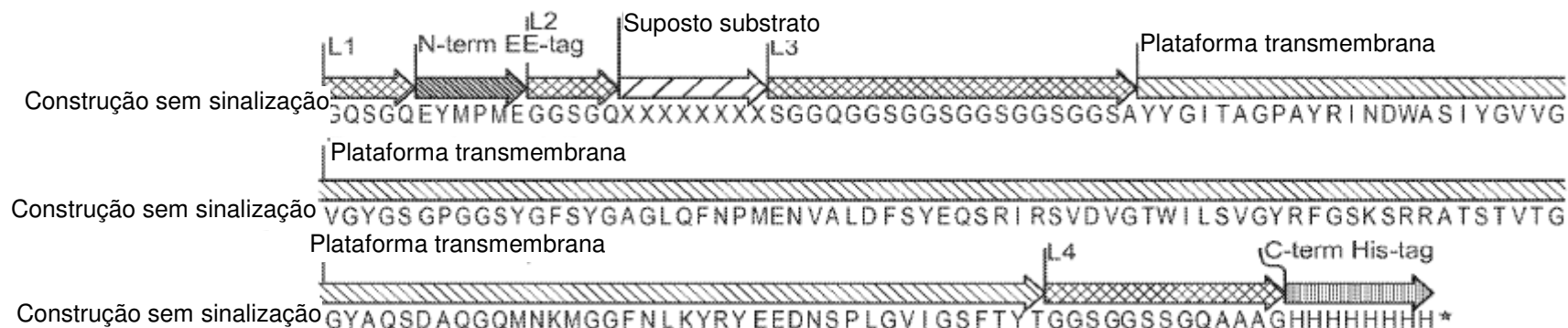


Figura 4B

