



등록특허 10-2294018



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월27일
(11) 등록번호 10-2294018
(24) 등록일자 2021년08월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7005947
- (22) 출원일자(국제) 2014년08월06일
심사청구일자 2019년07월24일
- (85) 번역문제출일자 2016년03월04일
- (65) 공개번호 10-2016-0042004
- (43) 공개일자 2016년04월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/049848
- (87) 국제공개번호 WO 2015/021089
국제공개일자 2015년02월12일

(30) 우선권주장
61/864,217 2013년08월09일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌
WO2012018687 A1
US20130295121 A1
Arthritis & Rheumatism, Vol. 62, pp.
1933-1943 (2010)

(73) 특허권자
마크로제닉스, 임크.
미국 메릴랜드주 20850 록빌 메디칼 센터 드라이
브 9704

(72) 발명자
존슨 레슬리 에스.
미국 메릴랜드 20874 단스타운 포플라 힐 로드
14411
후앙 링
미국 메릴랜드 20817 베데스다 무어랜드 레인
8210
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 17 항

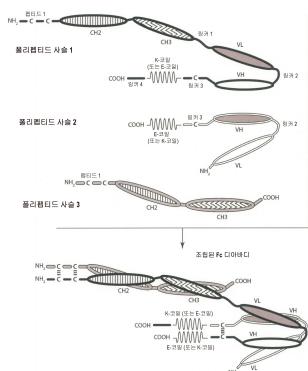
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 CD32B 및 CD79b에 결합할 수 있는 이중특이성 1가 Fc 디아바디 및 그것의 용도

(57) 요약

본 발명은 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하고 3개의 폴리펩티드 사슬로 구성되며 CD32B의 에피토프에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위 및 CD97b의 에피토프에 특이적인 하나의 결합 부위를 가지는 (즉 "CD32B x CD79b 이중 특이성 1가 Fc 디아바디") 이중특이성 1가 디아바디 ("이중특이성 1가 Fc 디아바디")에 관한 것이다. 본 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 CD32B 및 CD79b에 동시에 결합할 수 있다. 발명은 그런 이중특이성 1가 Fc 디아바디를 함유하는 그런 조성물, 약학 조성물 및 염증성 질환 또는 상태, 특히 전신성 홍반성 루푸스 (SLE) 및 이식 편 대 속주병의 치료에 그것들을 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C07K 16/283 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/60 (2013.01)
C07K 2317/624 (2013.01)
C07K 2317/74 (2013.01)
C07K 2319/31 (2013.01)
C07K 2319/73 (2013.01)

(72) 발명자

샤아 칼파나

미국 메릴랜드 20841 보이즈 에델 로즈 웨이 13013

본비니 에지오

미국 메릴랜드 20854 포토맥 파우더 혼 드라이브
11136

무어 폴 에이.

미국 메릴랜드 20852 베데스다 올드 게이트 로드
7013

챈 웨이

미국 메릴랜드 20878 게이더스버그 그랜드 스트리
트 404

(30) 우선권주장

61/866,416 2013년08월15일 미국(US)
61/869,519 2013년08월23일 미국(US)
61/907,525 2013년11월22일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

CD32B의 에피토프 및 CD79b의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있고 IgG Fc 도메인을 가지는 이중특이성 1가 Fc 디아바디로서, 상기 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 제 1 폴리펩티드 사슬, 제 2 폴리펩티드 사슬 및 제 3 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 상기 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있으며 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있고,

A. 제 1 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로:

- i. (1) 시스테인-함유 웨티드 (**SEQ ID NO:1**)를 포함하는 하위도메인 (1A); 및
 (2) IgG 면역글로불린 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 가지는 IgG Fc 도메인의 폴리펩티드 부분을 포함하는 하위도메인 (1B)을 포함하는 도메인 1;
- ii. (1) CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B}) (**SEQ ID NO:11**)을 포함하는 하위도메인 (2A); 및
 (2) CD79b에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b}) (**SEQ ID NO:14**)을 포함하는 하위도메인 (2B)을 포함하며,
 상기 하위도메인 (2A) 및 (2B)는 웨티드 링커 (링커 2) (**SEQ ID NO:4**)에 의해 서로 분리되어 있는 도메인 2;
 iii. E-코일 도메인 (**SEQ ID NO:7**) 또는 K-코일 도메인 (**SEQ ID NO:8**)인 도메인 3로서, 상기 도메인 3는 웨티드 링커 (**SEQ ID NO:5**)에 의해 상기 도메인 2와 분리되어 있는 도메인 3; 및
 iv. C-말단 스페이서 웨티드 (**SEQ ID NO:6**)를 포함하고;

B. 제 2 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로:

- i. (1) CD79b에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{CD79b}) (**SEQ ID NO:13**)을 포함하는 하위도메인 (1A); 및
 (2) CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{CD32B}) (**SEQ ID NO:12**)을 포함하는 하위도메인 (1B)을 포함하며,
 상기 하위도메인 (1A) 및 (1B)는 웨티드 링커 (링커 2) (**SEQ ID NO:4**)에 의해 서로 분리되어 있는 도메인 1; 및
 ii. K-코일 도메인 (**SEQ ID NO:8**) 또는 E-코일 도메인 (**SEQ ID NO:7**)인 도메인 2로서, 상기 도메인 2는 웨티드 링커 (**SEQ ID NO:5**)에 의해 도메인 1과 분리되어 있고; 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 3과 상기 제 2 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 2는 둘 다 E-코일 도메인이 아니거나 또는 둘 다 K-코일 도메인이 아닌, 도메인 2를 포함하며; 및

C. 제 3 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로,

- (1) 시스테인-함유 웨티드 (**SEQ ID NO:1**)를 포함하는 하위도메인 (1A); 및
 (2) IgG 면역글로불린 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 가지는 IgG Fc 도메인의 폴리펩티드 부분을 포함하는 하위도메인 (1B)
 을 포함하는 도메인 1을 포함하고;
 (a) 상기 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬의 IgG Fc 도메인의 상기 폴리펩티드 부분들은 상기 IgG Fc 도메인을 형성하며;

- (b) 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 VL 도메인 및 상기 제 2 폴리펩티드 사슬의 상기 VH 도메인은 CD32B의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항원-결합 도메인을 형성하고; 및
- (c) 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 VH 도메인 및 상기 제 2 폴리펩티드 사슬의 상기 VL 도메인은 CD79b의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항원-결합 도메인을 형성하는,
이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)의 서열과 상이한 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 5

제 1항에 있어서,

- (i) 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1은 Fc γ 수용체에 대해 변경된 결합을 나타내는 변이 CH2-CH3 서열을 포함하거나;
- (ii) 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1은 Fc γ 수용체에 대해 변경된 결합을 나타내는 변이 CH2-CH3 서열을 포함하거나;
- (iii) 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1 및 상기 제3 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1은 Fc γ 수용체에 대해 변경된 결합을 나타내는 변이 CH2-CH3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 6

제 2항에 있어서,

- (i) 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1은 Fc γ 수용체에 대해 변경된 결합을 나타내는 변이 CH2-CH3 서열을 포함하거나;
- (ii) 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1은 Fc γ 수용체에 대해 변경된 결합을 나타내는 변이 CH2-CH3 서열을 포함하거나;
- (iii) 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1 및 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 1은 Fc γ 수용체에 대해 변경된 결합을 나타내는 변이 CH2-CH3 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 3은 E-코일 (SEQ ID NO:7)을 포함하고, 상기 제 2 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 2는 K-코일 (SEQ ID NO:8)을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 8

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 3은 K-코일 (SEQ ID NO:8)을 포함하고, 상기 제 2 폴리펩티드 사슬의 상기 도메인 2는 E-코일 (SEQ ID NO:7)을 포함하는 것을 특징으로 하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 9

CD32B의 에피토프 및 CD79b의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있고 IgG Fc 도메인을 가지는 이중특이성 1가 Fc 디아바디로서, 상기 이중특이성 1가 Fc 디아바디는:

- (1) SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 포함하는 제 1 폴리펩티드 사슬;
- (2) SEQ ID NO:16의 아미노산 서열을 포함하는 제 2 폴리펩티드 사슬; 및
- (3) SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 포함하는 제 3 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 아미노산 잔기 1 내지 10은 웨პ티드 1 (SEQ ID NO:1)이며, 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 아미노산 잔기 11 내지 227은 IgG 항체 Fc 영역 (SEQ ID NO:10)의 CH2 및 CH3 도메인이고;

상기 제 1 및 상기 제 2 폴리펩티드 사슬은 제 1 이황화 결합에 의해 서로에 공유 결합되어 있으며 상기 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 제 2 이황화 결합에 의해 서로에 공유 결합되어 있는, 이중특이성 1가 Fc 디아바디.

청구항 10

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 이중특이성 1가 Fc 디아바디 및 생리적으로 허용되는 담체를 포함하는, 염증성 질환 또는 상태의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 자가면역 질환인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 13

제 10항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 이식편 대 숙주병 (GvHD)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 14

제 9항의 이중특이성 1가 Fc 디아바디 및 생리적으로 허용되는 담체를 포함하는, 염증성 질환 또는 상태의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 자가면역 질환인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 17

제 14항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 이식편 대 숙주병 (GvHD)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 교차-참조:
- [0002] 본 출원은 미국 특허 출원 번호 61/864,217 (2013년 8월 9일 출원; 계류중); 61/866,416 (2013년 8월 15일 출원; 계류중); 61/869,519 (2013년 8월 23일 출원; 계류중); 및 61/907,525 (2013년 11월 22일 출원; 계류중)의 우선권을 주장하며, 상기 출원들은 각각 그 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다.
- [0003] 서열 목록에 대한 참조:
- [0004] 본 출원은 37 C.F.R. 1.821 (이하 참조)에 따르는 하나 또는 그 이상의 서열 목록을 포함하며, 그것들은 서류 및 컴퓨터-판독가능한 매체 두 가지에 모두 개시되고, 그 서류 및 컴퓨터-판독가능한 개시물은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.
- [0005] 기술분야:
- [0006] 본 발명은 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하고 3개의 폴리펩티드 사슬로 구성되며 CD32B의 에피토프에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위 및 CD97b의 에피토프에 특이적인 하나의 결합 부위를 가지는 이중특이성 1가 디아바디 (diabodies, 이중특이성 항체 절편) (즉 "CD32B x CD79b Fc 디아바디")에 관한 것이다. 본 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 CD32B 및 CD79b에 동시에 결합할 수 있다. 발명은 그런 이중특이성 1가 Fc 디아바디를 함유하는 그런 조성물, 약학 조성물 및 염증성 질환 또는 상태, 특히 전신성 홍반성 루푸스 (SLE) 및 이식편 대 속주병 (graft vs. host disease)의 치료에 그것들을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] I. Fc γ 수용체 및 CD32B
- [0008] 항체-항원 복합체와 면역 시스템의 세포들과의 상호작용은 항체-의존성 세포독성, 비만 세포 탈과립화 및 식세포 작용과 같은 이팩터 기능으로부터 조절 림프구 증식 및 항체 분비와 같은 면역조절 신호에 이르기까지 광범위한 반응을 초래한다. 이를 상호작용은 모두 항체 또는 면역 복합체의 Fc 도메인과 조혈 세포 상의 특수한 세포-표면 수용체와의 결합을 통해 시작된다. 항체 및 면역 복합체들에 의해 야기된 세포 반응의 다양성은 Fc 수용체들의 구조적 이질성으로부터 유발된다. Fc 수용체들은 아마도 세포내 신호화를 중재하는 구조적으로 관련된 리간드 결합 도메인들을 공유한다.
- [0009] Fc 수용체들은 단백질의 면역글로불린 유전자 슈퍼페밀리의 구성원들이다. 그것들은 면역글로불린 분자의 Fc 부분에 결합할 수 있는 표면 당단백질들이다. 그 패밀리의 각 구성원은 Fc 수용체의 α 사슬에 있는 인지 도메인을 통해 하나 또는 그 이상의 아이소타입의 면역글로불린들을 인식한다.
- [0010] Fc 수용체들은 면역글로불린 하위유형에 대한 특이성에 의해 정의된다 (Ravetch J.V. et al. (1991) "Fc Receptors," Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S. et al. (2001) "Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fc γ Receptors," Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D.D. et al. (2002) "ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation," J. Clin. Invest. 2(109):161-1681; Ravetch J.V. et al. (2000) "Immune Inhibitory Receptors," Science 290:84-89; Ravetch J.V. et al. (2001) "IgG Fc Receptors," Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) "Fc Receptors: Rubor Redux," Cell, 78(4): 553-60 참조).
- [0011] IgG 항체들에 결합할 수 있는 Fc 수용체들은 "Fc γ R"로 언급된다. 이 패밀리의 각 구성원은 면역글로불린-관련 도메인의 C2-세트에 관련된 세포외재성 도메인들, 단일 막 스패닝 도메인 및 가변적인 길이의 세포질내 도메인을 가지는, 내재성 막 당단백질이다. 3가지의 Fc γ R이 알려져 있는데, Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) 및 Fc γ RIII(CD16)로 표시된다. 3가지 수용체는 구별되는 유전자들에 의해 코드화되지만, 3가지 패밀리 구성원들 사이의 광범위한 상동성은 그것들이 아마도 공통된 조상으로부터 유전자 복제에 의해 발생했음을 시사한다.
- [0012] Fc γ RII(CD32) 단백질은 단량체 Ig에 대한 낮은 친화성 ($10^6 M^{-1}$)으로 인해 복합 IgG에만 결합하는 40kDa의 내재성 막 당단백질이다. 이 수용체는 가장 광범위하게 발현되는 Fc γ R로, 단핵세포, 마크로파지, B 세포, NK 세포, 호중구, 비만 세포 및 혈소판을 포함하여 모든 조혈 세포상에 존재한다. Fc γ RII는 그것의 면역글로불린 결합 사슬에 단지 2개의 면역글로불린-유사 영역을 가지고 있고 따라서 IgG에 대해 Fc γ RI보다 훨씬 더 낮은 친화성을 가진다. 3가지의 인간 Fc γ RII 유전자 (Fc γ RIIA(CD32A), Fc γ RIIB(CD32B) 및 Fc γ RIIC(CD32C))가 있고, 그

것들은 모두 응집체 또는 면역 복합체에서 IgG와 결합한다.

[0013] Fc γ RIIA와 Fc γ RIIB의 세포질 도메인 내의 뚜렷한 차이로 인해 수용체 결찰에 대한 2가지의 기능적으로 이질성인 반응이 생성된다. 기본적인 차이점은, IgG Fc 영역에 결합할 때, Fc γ RIIA 아형 (isoform)은 면역 시스템 활성화 (예컨대 식세포 작용, 호흡 폭발 등)를 유도하는 세포내 신호화를 개시하는 반면, IgG Fc 영역에 결합할 때에 Fc γ RIIB 아형은 면역 시스템의 약화 또는 억제 (예컨대 B 세포 활성화의 억제 등)를 유도하는 신호를 개시한다는 점이다.

[0014] 그런 활성화 및 억제 신호들은 두 가지 모두 IgG Fc 영역에 대한 결찰 후의 Fc γ R을 통해 변환된다. 전혀 다른 이들 반대되는 기능은 상이한 수용체 아형들 중에서도 구조적 차이로부터 유발된다. 수용체의 세포질 신호화 도메인 내에 있는 2개의 구별되는 도메인들은 상이한 반응에 대응하여 면역수용체 타이로신-기초 활성화 모티프 (ITAM) 또는 면역수용체 타이로신-기초 억제 모티프 (ITIM)로 불린다. 이를 구조에 대한 상이한 세포질 효소들의 충원은 Fc γ R-중재된 세포 반응의 결과에 영향을 미친다. ITAM-함유 Fc γ R 복합체는 Fc γ RI, Fc γ RIIA 및 Fc γ RIIIA를 포함하는 반면, ITIM-함유 복합체는 Fc γ RIIB 만을 포함한다.

[0015] 인간 호중구는 Fc γ RIIA 유전자를 발현한다. 면역 복합체 또는 특정 항체 교차결합을 통해 몽쳐진 Fc γ RIIA는 ITAM 인산화를 촉진시키는 수용체-결합 키나제와 함께 ITAM을 응집시키는 역할을 한다. ITAM 인산화는 Syk 키나제에 대한 도킹 부위로서 작용하고, Syk 키나제의 활성화는 하류 기질들 (예컨대 PI₃K)의 활성화를 초래한다. 세포 활성화는 전-염증성 중재자의 방출을 유발한다.

[0016] Fc γ RIIB 유전자는 B 림프구 상에서 발현된다; 그것의 세포외재성 도메인은 Fc γ RIIA에 96% 동일하고 구별할 수 없는 방식으로 IgG 복합체에 결합한다. Fc γ RIIB의 세포질 도메인 중의 ITIM의 존재는 Fc γ R의 이런 억제성 하위부류를 규정한다. 이 억제의 분자적 기초는 이미 수립되어 있다. Fc γ RIIB가 면역 복합체의 IgG 면역글로불린의 Fc 영역에 의해 활성화 수용체에 공동-결찰될 때, Fc γ RIIB ITIM은 인산화되고 이노시톨 폴리포스페이트 5'-포스파타제 (SHIP)의 SH2 도메인을 끌어들이며, 그것은 ITAM-함유 Fc γ R-중재된 타이로신 키나제 활성화의 결과로서 방출된 포스포이노시톨 메신저를 가수분해하여, 결과적으로 세포 내 Ca⁺⁺의 유입을 방지한다. 그로써 그런 Fc γ RIIB의 교차 결합 및 수용체 활성화는 활성화 수용체의 활성을 약화시키고, 그로써 세포 반응성을 억제한다. 그러므로, B-세포 상에서, B-세포 활성화, B-세포 증식 및 항체 분비는 약화되거나 무산된다. 그러므로, 항원 겸출이 시작될 때, 단량체 IgG-항원 결합이 발생하고, 결합된 항체의 Fc 영역은 활성화 Fc γ R의 ITAM에 결합하여 면역 시스템의 활성화를 중재한다. 숙주의 반응이 진전됨에 따라, Fc γ RIIB에 결합할 수 있는 (그로써 그런 복합체를 활성화 수용체와 공동-결찰시킬 수 있는) 다량체 IgG-항원 면역 복합체 형태는 면역 반응의 약화 및 궁극적인 중단을 유도한다 (예컨대 미국 특허 제 8,445,645호; 제 8,217,147호; 제 8,216,579호; 제 8,216,574호; 제 8,193,318호; 제 8,192,737호; 제 8,187,593호; 제 8,133,982호; 제 8,044,180호; 제 8,003,774호; 제 7,960,512호; 제 7,786,270호; 제 7,632,497호; 제 7,521,542호; 제 7,425,619호; 제 7,355,008호 및 미국 특허 공보 제 2012/0276094호; 제 2012/0269811호; 제 2012/0263711호; 제 2012/0219551호; 제 2012/0213781호; 제 2012/0141476호; 제 2011/0305714호; 제 2011/0243941호; 제 2010/0322924호; 제 2010/0254985호; 제 2010/0196362호; 제 2010/0174053호; 제 2009/0202537호; 제 2009/0191195호; 제 2009/0092610호; 제 2009/0076251호; 제 2009/0074771호; 제 2009/0060910호; 제 2009/0053218호; 제 2009/0017027호; 제 2009/0017026호; 제 2009/0017023호; 제 2008/0138349호; 제 2008/0138344호; 제 2008/0131435호; 제 2008/0112961호; 제 2008/0044429호; 제 2008/0044417호; 제 2007/0077246호; 제 2007/0036799호; 제 2007/0014795호; 제 2007/0004909호; 제 2005/0260213호; 제 2005/0215767호; 제 2005/0064514호; 제 2005/0037000호; 제 2004/0185045호 참조).

II. B-세포 수용체 및 CD79b

[0017] B 세포는 항체 생성에 기여하는 면역 세포이다. 항원에 대한 B-세포 반응은 정상적인 면역 시스템의 본질적인 구성요소이다. B-세포는 특수한 세포-표면 수용체 (B-세포 수용체: "BCR")를 가지고 있다. 만약 B-세포가 그 세포의 BCR에 결합할 수 있는 항원을 만나게 되면, B-세포는 자극되어 증식하고 결합된 항원에 특이적인 항체들을 생성하게 될 것이다. 항원에 대한 효과적인 반응을 생성하기 위하여, BCR-결합된 단백질 및 T-세포 보조가 또한 필요하다. 항원/BCR 복합체는 내재화되고, 항원은 단백질 가수분해적으로 처리된다. 항원의 작은 일부분이 B 세포의 표면 상에서 주요 조직적합성 복합체-II ("MHC-II") 분자와 복합체를 형성한 채로 유지되어, 거기에서 복합체가 T-세포에 의해 인식될 수 있다. 그런 항원 제공에 의해 활성화된 T-세포는 B-세포 돌연변이를 유도하는 다양한 림포카인을 분비한다.

[0019] BCR을 통한 신호화는 항체 생성에, 자가면역에, 및 면역학적 내성의 수립에 중요한 역할을 한다 (Gauld, S.B. et al. (2002) "B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles In Cell Development And Disease," Science 296(5573):1641-1642). 자체-항원에 결합하는 한편 여전히 골수에 있는 미성숙 B 세포는 아폽토시스에 의해 제거된다. 대조적으로, 미성숙 B 세포 상의 항원 결합은 활성화, 증식, 아네르기 (anergy) 및 아폽토시스를 초래한다. 관찰된 특정 기능성 반응은 B-세포가 다른 표면 수용체들 및 활성화되는 특수한 신호 변환 경로를 통해 동시-자극성 신호를 수용하는지의 여부에 좌우된다.

[0020] BCR은 CD79의 비-공유적으로 결합된 α 및 β 하위유닛 (각각 "CD79a" 및 "CD79b")과 함께, BCR 복합체를 형성하는 막 면역글로불린으로 구성된다. CD79a 및 CD79b는 신호 변환에 필요한 보존된 면역수용체 타이로신-기초 활성화 모티프 ("ITAM")을 함유하는 신호 변환 하위유닛들이다 (Dylke, J. et al. (2007) "Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR)," Immunol. Lett. 112(1):47-57; Cambier, J.C. (1995) "New Nomenclature For The Reth Motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL)," Immunol. Today 16:110). 다가 항원에 의한 BCR 복합체의 응집은 CD79a 및 CD79b ITAM의 인산전달반응 및 수용체-결합된 키나제의 활성화를 개시한다 (DeFranco, A.L. (1997) "The Complexity Of Signaling Pathways Activated By The BCR," Curr. Opin. Immunol. 9:296-308; Kuroasaki, T. (1997) "Molecular Mechanisms In B-Cell Antigen Receptor Signaling," Curr. Opin. Immunol. 9:309-318; Kim, K.M. et al. (1993) "Signalling Function Of The B-Cell Antigen Receptors," Immun. Rev. 132:125-146). 인산화된 ITAM은 PI₃K, PLC-γ와 같은 추가 이펙터들 및 Ras/MAPK 경로의 구성원들을 충원한다. 이를 신호화 사건은 T-헬퍼 ("T_h") 세포들과의 후속적인 상호작용에 대해 B 세포를 준비시키는 데 필요한 B 세포 증식 및 활성화 마커들 (예컨대 MHC-II 및 CD86)의 증가된 발현 둘 다에 기여한다.

III. 염증성 질환 또는 상태들

[0021] [0022] 염증은 박테리아 및 바이러스와 같은 외래 물질에 의한 감염으로부터 신체의 백혈구 및 케미컬에 의해 우리의 신체를 보호하려는 과정이다. 그것은 통상적으로 환부의 통증, 부기 (swelling), 온기 및 적열상태를 특징으로 한다. 사이토킨 및 프로스타글란딘으로 알려져 있는 케미컬들은 이 과정을 제어하고, 정돈된 자체-제한 캐스케이드로 혈액 또는 환부 조직으로 방출된다. 케미컬의 이런 방출은 상해 또는 감염 부위로의 혈류를 증가시키고, 그로써 적열상태와 온기를 초래할 수 있다. 일부 케미컬은 조직 안으로 유체의 누출을 유발하여 부기를 초래한다. 이런 보호 과정은 신경을 자극하여 통증을 유발할 수 있다. 이를 변화는 관련된 부위에서 제한된 기간 동안 발생할 때, 신체에 유익하게 작용한다.

[0023] [0024] 염증성 질환 또는 상태는 신체 자체 세포 및 조직에 대한 면역 시스템 공격을 반영한다 (즉 "자가면역" 반응). 신체에 상이한 방식으로 영향을 미치는 상이한 자가면역 장애가 많이 있다. 예를 들면 뇌는 개체에서 다발성 경색에 의해 영향을 받고, 소화관은 개체에서 크론병으로 영향을 받으며, 다양한 관절의 활막, 뼈 및 연골은 개체에서 류마티스성 관절염으로 영향을 받는다. 자가면역 장애가 하나 또는 그 이상의 유형의 신체 조직의 파괴를 진전시킴에 따라, 기관의 비정상적인 성장 또는 기관 기능의 변화들이 초래될 수 있다. 자가면역 장애는 단지 하나의 기관이나 조직 유형에 영향을 미치거나 다수의 기관 및 조직에 영향을 미칠 수 있다. 자가면역 장애에 의해 통상적으로 영향을 받는 기관 및 조직들은 적혈구, 혈관, 연결 조직, 내분비선 (예컨대 갑상선 또는 췌장), 근육, 관절 및 피부를 포함한다. 자가면역 장애의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 하시모토 갑상선염, 악성 빈혈, 애디슨병, 1형 당뇨병, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 피부근염, 쇠그렌 증후군, 피부근염, 홍반성 루푸스, 다발성 경화증, 자가면역 내이 질환, 중증 근무력증, 라이터 증후군, 그레이브병, 자가면역 간염, 가족성 대장 폴립증 및 궤양성 대장염을 포함한다.

염증성 질환 또는 상태는 또한 신체의 정상적인 보호 면역 시스템이 그것의 존재가 신체에 유익한 외래 세포 또는 조직을 공격함으로써 (예컨대 이식편의 거부 (숙주 대 숙주병)) 또는 도입된 이식 이식편의 면역경합 세포에 의해 면역손상된 숙주의 세포들의 거부로부터 (이식편 대 숙주병) 손상을 유발할 때 발생할 수 있다 (DePaoli, A.M. et al. (1992) "Graft-Versus-Host Disease And Liver Transplantation," Ann. Intern. Med. 117:170-171; Sudhindran, S. et al. (2003) "Treatment Of Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation With Basiliximab Followed By Bowel Resection," Am J Transplant. 3:1024-1029; Pollack, M.S. et al. (2005) "Severe, Late-Onset Graft-Versus-Host Disease In A Liver Transplant Recipient Documented By Chimerism Analysis," Hum. Immunol. 66:28-31; Perri, R. et al. (2007) "Graft Vs. Host Disease After Liver Transplantation: A New Approach Is Needed," Liver Transpl. 13:1092-1099; Mawad, R. et al. (2009) "Graft-Versus-Host Disease Presenting With Pancytopenia After En Bloc Multiorgan Transplantation: Case

Report And Literature Review," Transplant Proc. 41:4431-4433; Akbulut, S. et al. (2012) "Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation: A Comprehensive Literature Review," World J. Gastroenterol. 18(37):5240-5248).

[0025] 그런 질환 또는 상태의 치료에서 최근의 진보에도 불구하고, 염증성 질환 또는 상태를 치료 또는 방지할 수 있는 조성물에 대한 요구는 지속적으로 존재한다.

IV. 이중특이성 디아바디

항원의 에피토프에 결합하는 무상의 비변형 항체 (예컨대 IgG)의 능력은 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 상의 가변 도메인 (즉 각각 VL 및 VH 도메인)의 존재에 따라 좌우된다. 디아바디의 디자인은 단일 사슬 Fv 구성물 (scFv) 을 기초로 한다 (예컨대 Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944 참조).

[0028] 항체 경쇄 및 항체 중쇄의 상호작용, 및 특히 그것의 VL 및 VH 도메인의 상호작용은 항체의 에피토프 결합 부위들 중 하나를 형성한다. 대조적으로, scFv 구성물은 단일 폴리펩티드 사슬에 함유된 항체의 VL 및 VH 도메인들을 포함하고, 이때 그 도메인들은 충분한 길이의 가요성 링커에 의해 분리되어 두 도메인의 기능성 에피토프 결합 부위로의 자체-조립이 허용된다. VL 및 VH 도메인의 자체-조립이 불충분한 길이 (약 12 아미노산 잔기 미만)의 링커로 인해 불가능하게 되는 경우에, scFv 구성물들 중 2개가 다른 하나와 상호작용하여 한 사슬의 VL 도메인이 다른 사슬의 VH 도메인과 결합하는 2가 분자를 형성하게 된다 (Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658에 개관됨).

[0029] 천연 항체는 단지 하나의 에피토프 종에 결합할 수 있지만 (즉 단일-특이적), 그것은 그 종의 다수의 복사물에 결합할 수 있다 (즉 2-가 또는 다-가를 나타냄). 기술분야는 둘 또는 그 이상의 상이한 에피토프 종에 결합할 수 있는 데에서 그런 천연 항체들과 상이한 디아바디를 생성할 수 있는 (즉 2-가 또는 다-가 외에 이중특이성 또는 다중특이성을 나타내는) 능력에 주목하였다 (예컨대 Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Mertens, N. et al., "New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives," In: Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944 참조).

[0030] 비-단일특이성 디아바디의 제공은 중요한 장점: 상이한 에피토프들을 발현하는 세포를 공동-결찰하고 동시-위치

시키는 능력을 제공한다. 그러므로 이가 디아바디는 치료법 및 면역진단을 포함하여 광범위한 용도를 가진다. 2-가는 다양한 용도에서 디아바디의 디자인 및 엔지니어링 (engineering)에 대단한 유연성을 허용하며, 그것은 다량체 항원, 상이한 항원들의 교차결합, 및 두 가지 표적 항원의 존재에 의존하는 특이한 세포 유형들의 지정된 표적화에 대한 증강된 결합력을 제공한다. 증가된 결합가, 낮은 분해 속도 및 순환계로부터의 신속한 클리어런스 (clearance)로 인해 (~50 kDa 이하의 작은 분자의 디아바디의 경우), 기술분야에 공지된 디아바디 분자들은 또한 종양 영상 분야에서 특별한 용도를 나타냈다 (Fitzgerald *et al.* (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*," Protein Eng. 10:1221). 특히 중요한 것은 상이한 세포들의 공동-결찰, 예를 들면 세포독성 T-세포들의 종양 세포에의 교차결합이다 (Staerz *et al.* (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells," Nature 314:628-631, and Holliger *et al.* (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305).

[0031] 디아바디 에피토프 결합 도메인들은 또한 T 럼프구, 천연 킬러 (NK) 세포 또는 다른 단핵 세포 상에 발현되는, CD3, CD16, CD32 또는 CD64와 같은 어떠한 면역 이펙터 세포의 표면 결정기에 대해 지시될 수 있다. 많은 연구에서, 이펙터 세포 결정기들, 예컨대 Fc γ 수용체 (Fc γ R)에 결합하는 디아바디는 또한 이펙터 세포를 활성화시키는 것으로 밝혀졌다 (Holliger *et al.* (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," Protein Eng. 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins," Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). 정상적으로, 이펙터 세포 활성화는 Fc-Fc γ R 상호작용을 통한 항원 결합된 항체의 이펙터 세포에의 결합에 의해 야기되고; 그로써 이런 관점에서, 발명의 디아바디 분자들은 그것들이 Fc 도메인을 포함하는 것과는 무관하게 Ig-유사 기능성을 나타낼 수 있다 (예컨대 기술분야에 공지된 어떠한 이펙터 기능 분석에서 분석되거나 본원에서 예시된 것과 같이 (예컨대 ADCC 분석)). 종양과 이펙터 세포를 교차결합시킴으로써, 디아바디는 종양 세포와 근접한 곳으로 이펙터 세포를 가져올 뿐만 아니라 효과적인 종양 사멸을 유도한다 (예컨대 Cao *et al.* (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197 참조).

[0032] 그러나, 상기의 장점들은 가장 중요한 비용에 직면하게 된다. 그런 비-단일특이성 디아바디의 형성은 둘 또는 그 이상의 뚜렷하고 상이한 폴리펩티드의 연속적인 조립을 필요로 한다 (즉 그런 형성은 디아바디가 상이한 폴리펩티드 사슬 종들의 이종이량체화 (heterodimerization)를 통해 형성될 것을 필요로 한다). 이런 사실은 동일한 폴리펩티드 사슬들의 동종이량체화를 통해 형성되는 단일-특이성 디아바디와는 대조적이다. 비-단일특이성 디아바디를 형성하기 위하여 적어도 2개의 다른 폴리펩티드 (즉 두 개의 폴리펩티드 종)가 제공되어야 하기 때문에, 그리고 그런 폴리펩티드들의 동종이량체화가 비활성 분자를 유도하기 때문에 (Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588), 그런 폴리펩티드의 제조는 동일한 종의 폴리펩티드를 사이의 공유 결합을 방지하기 위한 것과 같은 방식으로 이루어져야만 한다 (Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588). 그러므로 기술분야는 그런 폴리펩티드들의 비-공유 결합을 교시한다 (예컨대 Olafsen *et al.* (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano *et al.* (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. *et al.* (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672 참조).

[0033] 그러나, 기술분야는 비-공유적으로 결합된 폴리펩티드들로 구성된 이종특이성 디아바디가 불안정하고 쉽게 비-기능성 단량체들로 분해된다는 것을 인식하였다 (예컨대 Lu, D. *et al.* (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672 참조).

[0034] 이런 도전에 직면하여, 기술분야는 안정되고, 공유적으로 결합된 이종이량체 비-단일특이성 디아바디의 개발에

성공하였다 (예컨대 WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion," J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fc_{gamma} Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551 참조). 그런 점 근법들은 하나 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 각각의 사용된 폴리펩티드 종 (species)으로 엔지니어링하는 것을 포함한다. 예를 들어, 그런 구성물의 C-말단에 시스테인 잔기를 첨가하는 것은 폴리펩티드 사슬들 사이의 이황화 결합을 허용하여, 그 결과 생성된 이종이량체를, 2가 분자의 결합 특성을 간섭하지 않으면서 안정화시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0035]

그런 성공에도 불구하고, 안정하고, 기능적인 이종이량체의, 비-단일특이성의 제조는 폴리펩티드 사슬들에 사용된 도메인들의 세심한 고려 및 배치에 의해 추가로 개선될 수 있다. 그러므로 본 발명은 공유 결합을 통해, CD32B 및 CD79b에 동시에 결합할 수 있는 이종이량체 Fc 디아바디를 형성하기 위해 특별히 고안된 특수한 폴리펩티드를 제공하는 것에 향해 있다.

과제의 해결 수단

[0036]

발명의 요약:

[0037]

발명은 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 디아바디 ("CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디")에 향해 있다. 발명의 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 3개의 폴리펩티드 사슬 ("제 1", "제 2" 및 "제 3" 폴리펩티드 사슬)로 구성되는데, 여기서 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있고 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있다. 그런 공유 결합은 예를 들면 각 폴리펩티드 사슬 내에 위치한 시스테인 잔기들의 이황화 결합에 의한 것이다. 발명의 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 이종이량체 방식으로 서로와 결합하여 CD32B의 에피토프에 특이적인 하나의 결합 부위와 CD79b의 에피토프에 특이적인 하나의 결합 부위를 형성한다. 그러므로 발명의 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 그것이 CD32B의 에피토프의 한 복사물에만 결합할 수 있고 CD79b의 에피토프의 한 복사물에만 결합할 수 있다는 점에서 1가이지만, 단일 디아바디가 CD32B의 에피토프와 CD79b의 에피토프에 동시에 결합할 수 있다는 점에서 이중특이적이다. 본 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 CD32B 및 CD79b에 동시에 결합할 수 있다. 발명은 그런 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디에 향해 있고, 그런 이중특이성 1가 Fc 디아바디를 함유하는 약학 조성물에 향해 있다. 발명은 추가로 염증성 질환 또는 상태, 특히 전신성 홍반성 루푸스 (SLE) 및 이식편 대 숙주병의 치료에 그런 디아바디들을 사용하는 방법에도 향해 있다.

[0038]

상세하게 설명하자면, 발명은 이중특이성 1가 Fc 디아바디를 제공하는데, 그 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 CD32B의 에피토프 및 CD79b의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있고, IgG Fc 도메인을 가지며, 이때 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 제 1 폴리펩티드 사슬, 제 2 폴리펩티드 사슬 및 제 3 폴리펩티드 사슬을 가지고, 그 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있으며 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있고, 이때

[0039]

A. 제 1 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로:

[0040]

i. (1) 시스테인-함유 웨이드 (특히 (웨이드 1)의 서열 (SEQ ID NO:1)을 가지는 웨이드)를 포함하는 하위도메인 (1A); 및

[0041]

(2) IgG Fc 도메인의 폴리펩티드 부분을 포함하는 (가장 바람직하게, IgG 면역글로불린 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 가지는) 하위도메인 (1B)을 포함하는 도메인 1;

[0042]

i.i. (1) CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B}) (SEQ ID NO:11)을 포함하는 하위도메인 (2A); 및

- [0043] (2) CD79b에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b}) (SEQ ID NO:14)을 포함하는 하위도메인 (2B)을 포함하며,
- [0044] 하위도메인 (2A) 및 (2B)는 웨티드 링커 (특히, SEQ ID NO:4의 서열을 가지는 웨티드 링커 (링커 2))에 의해 상호 분리되어 있는 도메인 2;
- [0045] iiii. E-코일 도메인 (SEQ ID NO:7) 또는 K-코일 도메인 (SEQ ID NO:8)인 도메인 3으로서, 이 도메인 3은 웨티드 링커 (특히, SEQ ID NO:5의 서열을 가지는 웨티드 링커)에 의해 도메인 2와 분리되어 있는 도메인 3; 및
- [0046] iv. C-말단 스페이서 웨티드 (특히, SEQ ID NO:6의 서열을 가지는 스페이서)를 포함하고;
- [0047] B. 제 2 폴리웨티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로:
- [0048] i. (1) CD79b에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{CD79b}) (SEQ ID NO:13)을 포함하는 하위도메인 (1A); 및
- [0049] (2) CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{CD32B}) (SEQ ID NO:12)을 포함하는 하위도메인 (1B)을 포함하며,
- [0050] 하위도메인 (1A) 및 (1B)는 웨티드 링커 (특히, SEQ ID NO:4의 서열을 가지는 웨티드 링커 (링커 2))에 의해 상호 분리되어 있는 도메인 1; 및
- [0051] ii. K-코일 도메인 (SEQ ID NO:8) 또는 E-코일 도메인 (SEQ ID NO:7)인 도메인 2로서, 이 도메인 2는 웨티드 링커 (특히, SEQ ID NO:5의 서열을 가지는 웨티드 링커)에 의해 도메인 1과 분리되어 있고; 제 1 폴리웨티드 사슬의 도메인 3과 제 2 폴리웨티드 사슬의 도메인 2는 둘 다 E-코일 도메인이 아니거나 또는 둘 다 K-코일 도메인이 아닌, 도메인 2를 포함하며; 및
- [0052] C. 제 3 폴리웨티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로,
- [0053] (1) 시스테인-함유 웨티드 (특히 (웨티드 1)의 서열 (SEQ ID NO:1)을 가지는 웨티드)를 포함하는 하위도메인 (1A); 및
- [0054] (2) IgG Fc 도메인의 폴리웨티드 부분을 포함하는 (가장 바람직하게, IgG 면역글로불린 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 가지는) 하위도메인 (1B)을 포함하는 도메인 1을 포함하고;
- [0055] (a) 제 1 및 제 3 폴리웨티드 사슬의 IgG Fc 도메인의 폴리웨티드 부분들은 IgG Fc 도메인을 형성하며;
- [0056] (b) 제 1 폴리웨티드 사슬의 VL 도메인 및 제 2 폴리웨티드 사슬의 VH 도메인은 CD32B의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항원-결합 도메인을 형성하고; 및
- [0057] (c) 제 1 폴리웨티드 사슬의 VH 도메인 및 제 2 폴리웨티드 사슬의 VL 도메인은 CD79b의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항원-결합 도메인을 형성한다.
- [0058] 발명은 추가로 이중특이성 1가 Fc 디아바디를 제공하는데, 그 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 CD32B의 에피토프 및 CD79b의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있고 IgG Fc 도메인을 가지며, 그 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 제 1 폴리웨티드 사슬, 제 2 폴리웨티드 사슬 및 제 3 폴리웨티드 사슬을 가지고, 제 1 및 제 2 폴리웨티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있으며 제 1 및 제 3 폴리웨티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있고,
- [0059] A. 제 1 폴리웨티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로:
- [0060] i. (1) 시스테인-함유 웨티드 (특히 (웨티드 1)의 서열 (SEQ ID NO:1)을 가지는 웨티드)를 포함하는 하위도메인 (1A); 및
- [0061] (2) IgG Fc 도메인의 폴리웨티드 부분을 포함하는 (가장 바람직하게, IgG 면역글로불린 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 가지는) 하위도메인 (1B)을 포함하는 도메인 1;
- [0062] ii. (1) CD79b에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{CD79b}) (SEQ ID NO:13)을 포함하는 하위도메인 (2A); 및
- [0063] (ii) CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{CD32B}) (SEQ ID NO:12)을 포함하는 하위도메인 (2B)을 포함하며,

- [0064] 하위도메인 (2A) 및 (2B)는 웹티드 링커 (특히, SEQ ID NO:4의 서열을 가지는 웹티드 링커)에 의해 상호 분리되어 있는 도메인 2;
- [0065] iii. E-코일 도메인 (SEQ ID NO:7) 또는 K-코일 도메인 (SEQ ID NO:8)인 도메인 3으로서, 이 도메인 3은 웹티드 (특히, SEQ ID NO:5의 서열을 가지는 웹티드 링커)에 의해 도메인 2와 분리되어 있는 도메인 3; 및
- [0066] iv. C-말단 스페이서 웹티드 (특히, SEQ ID NO:6의 서열을 가지는 스페이서)를 포함하고;
- [0067] B. 제 2 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로:
- [0068] i. (1) CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B}) (SEQ ID NO:11)을 포함하는 하위도메인 (1A); 및
- [0069] (2) CD79b에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b}) (SEQ ID NO:14)을 포함하는 하위도메인 (1B)을 포함하며,
- [0070] 하위도메인 (1A) 및 (1B)는 웹티드 링커 (특히, SEQ ID NO:4의 서열을 가지는 웹티드 링커)에 의해 상호 분리되어 있는 도메인 1; 및
- [0071] ii. K-코일 도메인 (SEQ ID NO:8) 또는 E-코일 도메인 (SEQ ID NO:7)인 도메인 2로서, 이 도메인 2는 웹티드 링커 (특히, SEQ ID NO:5의 서열을 가지는 웹티드 링커)에 의해 도메인 1과 분리되어 있고; 제 1 폴리펩티드 사슬의 도메인 3과 제 2 폴리펩티드 사슬의 도메인 2는 둘 다 E-코일 도메인이 아니거나 또는 둘 다 K-코일 도메인이 아닌, 도메인 2를 포함하며; 및
- [0072] C. 제 3 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로,
- [0073] (1) 시스테인-함유 웹티드 (특히 (웹티드 1)의 서열 (SEQ ID NO:1)을 가지는 웹티드)를 포함하는 하위도메인 (1A); 및
- [0074] (2) IgG Fc 도메인의 폴리펩티드 부분을 포함하는 (가장 바람직하게, IgG 면역글로불린 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 가지는) 하위도메인 (1B)을 포함하는 도메인 1을 포함하고;
- [0075] (a) 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬의 IgG Fc 도메인의 폴리펩티드 부분들은 IgG Fc 도메인을 형성하며;
- [0076] (b) 제 1 폴리펩티드 사슬의 VL 도메인 및 제 2 폴리펩티드 사슬의 VH 도메인은 CD79b의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항원-결합 도메인을 형성하고; 및
- [0077] (c) 제 1 폴리펩티드 사슬의 VH 도메인 및 제 2 폴리펩티드 사슬의 VL 도메인은 CD32B의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항원-결합 도메인을 형성한다.
- [0078] 발명은 추가로 그러한 모든 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 구체예들에 관련되는데, 이때 제 1 폴리펩티드 사슬의 도메인 1은 제 3 폴리펩티드 사슬의 도메인 1의 서열과 상이한 서열을 포함한다.
- [0079] 발명은 추가로 그러한 모든 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 구체예들에 관련되는데, 이때 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열을 가지고, 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 가진다.
- [0080] 발명은 추가로 그러한 모든 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 구체예들에 관련되는데, 이때 상기 제 1 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 가지고, 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 상기 하위도메인 (1B)은 SEQ ID NO:9의 아미노산 서열을 가진다.
- [0081] 발명은 추가로 그러한 모든 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 구체예들에 관련되는데, 이때 제 1 폴리펩티드 사슬의 도메인 1 및/또는 제 3 폴리펩티드 사슬의 도메인 1은 $Fc\gamma$ 수용체에 대해 변경된 결합을 나타내는 변이 CH2-CH3 서열을 포함한다.
- [0082] 발명은 추가로 그러한 모든 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 구체예들에 관련되는데, 이때 제 1 폴리펩티드 사슬의 도메인 3은 E-코일 (SEQ ID NO:7)을 포함하고, 제 2 폴리펩티드 사슬의 도메인 2는 K-코일 (SEQ ID NO:8)을 포함한다.
- [0083] 발명은 추가로 그러한 모든 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 구체예들에 관련되는데, 이때 제 1 폴리펩티드 사슬의 도메인 3은 K-코일 (SEQ ID NO:8)을 포함하고, 제 2 폴리펩티드 사슬의 도메인 2는 E-코일 (SEQ ID NO:7)을

포함한다.

- [0084] 발명은 추가로 IgG 면역글로불린 Fc를 포함하는 이중특이성 1가 디아바디 (이중특이성 1가 Fc 디아바디)를 제공하는데, 그 이중특이성 1가 Fc 디아바디는:
- (1) SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 가지는 제 1 폴리펩티드 사슬;
 - (2) SEQ ID NO:16의 아미노산 서열을 가지는 제 2 폴리펩티드 사슬; 및
 - (3) SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 가지는 제 3 폴리펩티드 사슬을 포함하고, 여기서 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 아미노산 잔기 1 내지 10은 웨티드 1 (SEQ IS NO:1)이며, 상기 제 3 폴리펩티드 사슬의 아미노산 잔기 11 내지 227은 IgG 항체 Fc 영역 (SEQ ID NO:10)의 CH2 및 CH3 도메인이고;
- [0085] 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 제 1 이황화 결합에 의해 서로에 공유 결합되어 있고 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 제 2 이황화 결합에 의해 서로에 공유 결합되어 있다.
- [0086] 발명은 추가로 상기 기술된 이중특이성 1가 Fc 디아바디들 중 어느 것과 생리적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0087] 발명은 추가로 염증성 질환 또는 상태, 특히 염증성 질환 또는 상태가 자가면역 질환인 경우, 특히 자가면역 질환이 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)인 경우에 치료에 사용되는 그런 약학 조성물의 용도를 제공한다.
- [0088] 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 제 1 이황화 결합에 의해 서로에 공유 결합되어 있고 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 제 2 이황화 결합에 의해 서로에 공유 결합되어 있다.
- [0089] 발명은 추가로 상기 기술된 이중특이성 1가 Fc 디아바디들 중 어느 것과 생리적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0090] 발명은 추가로 염증성 질환 또는 상태, 특히 염증성 질환 또는 상태가 이식편 대 숙주병 (GvHD)인 경우에 치료에 사용되는 그런 약학 조성물의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0092] 도 1은 바람직한 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 3개의 폴리펩티드 사슬 및 공유 결합된 사슬들의 구조를 도시한다.
- 도 2는 대체 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 3개의 폴리펩티드 사슬 및 공유 결합된 사슬들의 구조를 도시한다.
- 도 3a 및 3b는 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디 및 비-Fc CD32B x CD79b (ABD) 디아바디의 일차 인간 B 세포의 증식 억제 능력을 도시한다.
- 도 4a 및 4b는 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디, 비-Fc CD32B x CD79b (ABD) 디아바디 및 비-Fc CD32B x CD79b 디아바디의 나이브 (naive) (도 4a) 및 메모리 (memory) (도 4b) B 세포의 신호화 억제 능력을 도시한다.
- 도 5a 내지 5c는 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디 또는 비-Fc CD32B x CD79b (ABD) 디아바디의 SLE 세포의 증식 억제 능력을 도시한다. 그런 억제는 질환 상태와 무관한 것으로 밝혀졌다.
- 도 6a 및 6b는 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디 또는 비-Fc CD32B x CD79b 디아바디의 생체 내 B 세포 조절 능력을 도시한 것으로, 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 예상밖의 월등함을 증명한다.
- 도 7은 마우스에서 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 이종 GvHD 감소 능력을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0093] 본 발명은 면역글로불린 Fc 도메인을 포함하고 3개의 폴리펩티드 사슬로 구성되며 CD32B의 에피토프에 특이적인 적어도 하나의 결합 부위 및 CD79b의 에피토프에 특이적인 하나의 결합 부위를 가지는 이중특이성 1가 디아바디 ("이중특이성 1가 Fc 디아바디") (즉 "CD32B x CD79b Fc 디아바디")에 관련된다. 본 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 CD32B 및 CD79b에 동시에 결합할 수 있다. 발명은 그런 조성물, 그런 이중특이성 1가 Fc 디아바디를 함유하는 약학 조성물 및 염증성 질환 또는 상태, 특히 전신성 홍반성 루푸스 (SLE) 및 이식편 대 숙주병의 치료에 그것들을 사용하는 방법에 관련된다.
- [0094] 상기에서 나타낸 것과 같이, CD79b는 B 세포에 의해 발현되고, 그러므로 항원 인식에 대한 반응으로 증식하는 세포들 상에서 발현된다. CD79b에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항체는 그런 B 세포에 결합할 수 있다. CD32B는 Fc γ R이고, B 세포상에서 발현된다. Fc γ RIIB(CD32B)에 면역특이적으로 결합할 수 있는 항체들 및 특히 실질적으로 Fc 결합을 간섭하거나 방해하지 않으면서 Fc γ RIIB에 결합하는 항체들은 Fc γ RIIB의 면역 복합체의 활성화 수용체와 공동-결찰하는 능력을 증가시킬 수 있다. CD32B 및 CD79b 두 가지에 모두 결합할 수 있는 이중특이

성 1가 Fc 디아바디는 원치 않는 B 세포 활성화, B 세포 증식 및 항체 분비에 대한 반응으로 숙주의 면역 시스템을 억제하거나 약화시키는 능력을 가진다. 따라서 그러한 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 염증성 질환 및 장애의 치료에 활용된다.

I. 본 발명의 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디

본 발명의 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 "Fc" 디아바디로 명명되는데, 그것이 Fc 도메인을 포함하기 때문이다. 도 1에서 개략적으로 도시된 것과 같이, 그런 Fc 디아바디는 3개의 폴리펩티드 사슬로 구성되고, 그 중 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있고 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있다. 제 1 폴리펩티드 사슬의 VL 도메인은 제 1 항원 (즉 CD32B 또는 CD79b 중 어느 하나)에 특이적인 제 1 기능성 항원 결합 부위를 형성하기 위하여 제 2 폴리펩티드 사슬의 VH 도메인과 상호작용한다. 마찬가지로, 제 2 폴리펩티드 사슬의 VL 도메인은 제 2 항원 (즉, 제 1 항원의 정체성에 따라 CCD79b 또는 CD32B 중 어느 하나)에 특이적인 제 2 기능성 항원 결합 부위를 형성하기 위해 제 1 폴리펩티드 사슬의 VH 도메인과 상호작용한다. 그러므로, 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 도메인의 선택은 두 개의 폴리펩티드 사슬이 포괄적으로 CD32B 및 CD79b에 결합할 수 있는 VL 및 VH 도메인을 포함하도록 조정된다 (즉 그들은 VL_{CD32B}/VH_{CD32B} 및 VL_{CD79b}/VH_{CD79b}을 포함한다)(도 1). 포괄적으로, 각각의 그런 VL 및 VH 도메인, 및 그것들을 분리시키는 개재 (intervening) 링커는 문자의 항원-결합 도메인으로서 언급된다.

본 발명의 Fc 디아바디의 Fc 도메인은 완전한 Fc 영역 (예컨대 완전한 IgG Fc 영역) 또는 단지 완전한 Fc 영역의 단편일 수 있다. 비록 본 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 Fc 도메인이 하나 또는 그 이상의 Fc 수용체 (예컨대 Fc γ R(들))에 결합하는 능력을 갖고 있지만, 보다 바람직하게 그런 Fc 도메인은 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIIB (CD16b)에 대한 감소된 결합 (야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비교하여)을 유발하거나 또는 실질적으로 그런 수용체(들)에 결합하는 그런 Fc 도메인의 능력을 제거할 것이다. 본 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 Fc 도메인은 CH2 도메인의 일부 또는 전부 및/또는 완전한 Fc 영역의 CH3 도메인의 일부 또는 전부를 포함하거나, 또는 변이 CH2 및/또는 변이 CH3 서열 (예를 들면, 완전한 Fc 영역의 CH2 또는 CH3 도메인에 대하여 하나 또는 그 이상의 삽입 및/또는 하나 또는 그 이상의 결실을 포함할 수 있다)을 포함할 수 있다. 본 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 Fc 도메인은 비-Fc 폴리펩티드 부분들을 포함하거나, 비-자연적 완전한 Fc 영역의 부분들을 포함하거나 또는 CH2 및/또는 CH3 도메인의 비-자연적으로 발생하는 배향 (예컨대, 예를 들면 2개의 CH2 도메인 또는 2개의 CH3 도메인, 또는 N-말단에서 C-말단 방향으로 CH2 도메인에 연결된 CH3 도메인 등)을 포함할 수 있다.

바람직한 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제 1 폴리펩티드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음을 포함한다: 아미노 말단, 시스테인-함유 웨프티드 (웨프티드 1), IgG Fc 도메인 (바람직하게, 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인, 가장 바람직하게 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIIB (CD16b)에 대한 감소된 결합 (야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비교하여)을 유발하거나 또는 실질적으로 그런 수용체(들)에 결합하는 그런 Fc 도메인의 능력을 제거할 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인), 제 1 개재 스페이서 웨프티드 (링커 1), CD32B 또는 CD79b 중 어느 하나에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (즉 VL_{CD32B} 또는 VL_{CD79b} 중 어느 하나), 제 2 개재 스페이서 웨프티드 (링커 2), CD79b에 (그런 제 1 폴리펩티드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B에 (그런 제 1 폴리펩티드가 VL_{CD79b}를 함유하는 경우) 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 제 3 개재 스페이서 웨프티드 (링커 3), 이중이량체-촉진 도메인, 이중이량체-촉진 도메인에 향상된 안정화를 제공하기 위한 임의의 제 4 스페이서 웨프티드 (링커 4) 및 C-말단 (도 1).

바람직한 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제 2 폴리펩티드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음을 포함한다: 아미노 말단, CD79b 또는 CD32B 중 어느 하나에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (즉 디아바디의 제 1 폴리펩티드 사슬에 대해 선택된 VL 도메인에 따라 VL_{CD79b} 또는 VL_{CD32B} 중 어느 하나), CD79b에 (그런 제 2 폴리펩티드 사슬이 VL_{CD79b}를 함유하는 경우) 또는 CD32B에 (그런 제 2 폴리펩티드가 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 스페이서 웨프티드 (링커 3), 이중이량체-촉진 도메인 및 C-말단 (도 1).

바람직한 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제 3 폴리펩티드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로) 다음을 포함한다: 아미노 말단, 시스테인-함유 웨프티드 (웨프티드 1), 제 1 폴리펩티드 사슬의 Fc 도메인의 것과 동일한 아이소타입을 가지는 IgG Fc 도메인 (바람직하게 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인) 및 C-말단. 바람직

하게, 제 3 폴리펩티드 사슬의 Fc 도메인은 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIB (CD16b)에 대한 감소된 결합 (야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비교하여)을 유발하거나 또는 실질적으로 그런 수용체(들)에 결합하는 그런 Fc 도메인의 능력을 제거할 것이다 (도 1).

[0101] 제 1 및 제 3 가닥의 시스테인-함유 펩티드 (펩티드 1)는 동일한 아미노산 서열 또는 상이한 아미노산 서열로 구성될 수 있고, 1, 2, 3 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 함유할 것이다. 특히 바람직한 펩티드 1은 아미노산 서열 (SEQ ID NO:1): DKTHTCPPCP를 가진다. 제 1 개재 스페이서 펩티드 (링커 1)는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:2): APSSS를 가지고, 보다 바람직하게 아미노산 서열 (SEQ ID NO:3): APSSSPME를 가진다. 바람직한 제 2 개재 스페이서 펩티드 (링커 2)는 서열 SEQ ID NO:4: GGGSGGGG를 가진다. 바람직한 시스테인-함유 제 3 개재 스페이서 펩티드 (링커 3)는 1, 2, 3 또는 그 이상의 시스테인을 함유할 것이다. 바람직한 시스테인-함유 스페이서 펩티드 (링커 3)는 서열 SEQ ID NO:5: GGCGGGG를 가진다. 바람직한 제 4 스페이서 펩티드 (링커 4)는 서열 GGG를 가지거나 SEQ ID NO:6: GGGNS이다.

[0102] 가장 바람직하게, 개재 링커 펩티드 (VL과 VH 도메인을 분리시키는 링커 2)의 길이는 폴리펩티드의 VL 및 VH 도메인들이 서로 결합하는 것을 실질적으로 또는 완전하게 방해하도록 선택된다. 그러므로 제 1 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 실질적으로 또는 완전하게 서로 결합할 수 없다. 마찬가지로, 제 2 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 실질적으로 또는 완전하게 서로 결합할 수 없다.

[0103] 제 1 및 제 2 폴리펩티드의 이종이량체-촉진 도메인은 서로 상이하며 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬의 결합을 촉진하기 위하여 서로에 결합되도록 디자인된다. 그러므로 바람직한 구체예에서, 이들 폴리펩티드 사슬들 중 하나는 다음의 이종이량체-촉진 "E-코일" 도메인 (SEQ ID NO:7):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

[0105] 를 함유하도록 엔지니어링될 것이고, 그것의 잔기들은 pH 7에서 음전하를 형성하는 한편, 두 개의 폴리펩티드 사슬 중 다른 하나는 다음의 이종이량체-촉진 "K-코일" 도메인 (SEQ ID NO:8):

KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALK

[0106] [0107] 를 함유하도록 엔지니어링될 것이고, 그것의 잔기들은 pH 7에서 양전하를 형성할 것이다. 그런 대전된 도메인들의 존재는 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사이의 결합을 촉진하고, 그로써 이종이량체화를 조성한다. 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬에 사용된 코일이 그런 사슬들 사이에서 이종이량체화를 조성하기 위해 상이한 한, 어느 코일이 어느 사슬에 제공되는지는 중요하지 않다.

[0108] 상기에서 표시된 것과 같이, 제 1 및 제 3 폴리펩티드의 CH2 및 CH3 도메인은 바람직하게 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIB (CD16b)에 대한 결합을 감소시키거나 (야생형 Fc 영역에 비교하여) 제거하기 위해 돌연변이된다. 그런 돌연변이는 기술분야에 잘 알려져 있고, 위치 234 및 235에서의 아미노산 치환, 위치 265에서의 치환 또는 위치 297에서의 치환을 포함한다 (예를 들면 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제 5,624,821호 참조). 바람직한 구체예에서 CH2 및 CH3 도메인은 위치 234에서 알라닌으로의 치환 및 235에서 알라닌으로의 치환을 포함한다.

[0109] 제 1 및 제 2 폴리펩티드의 CH2 및/또는 CH3 도메인은 동일할 필요는 없고, 유리하게 두 개의 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 조성하기 위해 변형된다. 예를 들어, 아미노산 치환 (바람직하게 '손잡이 (knob)'를 형성하는 벌키한 측면 기를 포함하는 아미노산, 예컨대 트립토판으로의 치환)은 CH2 또는 CH3 사슬에 도입될 수 있어서, 입체적 간섭이 유사하게 돌연변이된 도메인과의 상호작용을 방지하고 돌연변이된 도메인이 상보하는, 또는 순응하는 돌연변이, 즉 '구멍' (예컨대 글리신으로의 치환)이 엔지니어링되어 있는 도메인과 불가피하게 쌍을 이루게 될 것이다. 그런 돌연변이 세트는 Fc 디아바디 분자를 포함하는 폴리펩티드의 어떠한 쌍으로, 및 나아가 상기 쌍의 폴리펩티드 사슬들의 어떠한 일부로 엔지니어링될 수 있다. 동종이량체화보다 이종이량체화를 장려하기 위한 단백질 엔지니어링 방법은 기술분야에, 특히 면역글로불린-유사 분자의 엔지니어링에 대해서 잘 알려져 있고, 본원에도 포함된다 (예컨대 Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270:26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101 참조; 상기 문헌들은 각각 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다). 바람직하게 '손잡이'는 제 1 폴리펩티드 사슬의 CH2-CH3 도메인에 엔지니어링되고 '구멍'은 제 3 폴리펩티드 사슬의 CH2-CH3 도메인에 엔지니어링된다. 그러므로 '손잡이'는

제 1 폴리펩티드 사슬이 그것의 CH2 및/또는 CH3 도메인을 통해 동종이량체화하는 것을 방지하는 데 도움이 될 것이다. 제 3 폴리펩티드 사슬은 대신 바람직하게 '구멍'을 함유하기 때문에, 그것은 제 1 폴리펩티드 사슬과 이종이량체화될 뿐 아니라 자체 동종이량체화될 것이다. 바람직한 손잡이는 천연 IgG Fc 영역이 변형 T366W를 함유하도록 변형시킴으로써 생성된다. 바람직한 구멍은 천연 IgG Fc 영역이 변형 T366S, L368A 및 Y407V를 함유하도록 변형시킴으로써 생성된다. 제 3 폴리펩티드 사슬 동종이량체를 제 1, 제 2 및 제 3 폴리펩티드 사슬을 포함하는 최종 이중특이성 1가 Fc 디아바디로부터 정제하는 것을 보조하기 위하여, 제 3 폴리펩티드 사슬의 CH2 및 CH3 도메인의 단백질 A 결합 부위는 바람직하게 위치 435에서 아미노산 치환에 의해 돌연변이된다 (H435R). 제 3 폴리펩티드 사슬 동종이량체를 제 1, 제 2 및 제 3 폴리펩티드 사슬을 포함하는 최종 이중특이성 1가 Fc 디아바디로부터 정제하는 것을 보조하기 위하여, 제 3 폴리펩티드 사슬의 CH2 및 CH3 도메인의 단백질 A 결합 부위는 바람직하게 아미노산 치환에 의해 돌연변이된다. 그러므로 제 3 폴리펩티드 사슬 동종이량체는 단백질 A에 결합하지 않을 것이고, 반면 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 제 1 폴리펩티드 사슬 상의 단백질 A 결합 부위를 통해 단백질 A에 결합하는 능력을 보유할 것이다.

[0110] 제 1 폴리펩티드 사슬에 존재하는 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인에 대해 바람직한 서열은 다음의 (SEQ ID NO:9)이다:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNNAKTK

PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFLYSKL

TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK.

[0115] 제 3 폴리펩티드 사슬에 존재하는 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인에 대해 바람직한 서열은 다음의 (SEQ ID NO:10)이다:

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNNAKTK

PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFLVSKL

TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK.

[0120] CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B})에 대해 바람직한 서열은 다음의 (SEQ ID NO:11)이다:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSQLQQKP GKAPRRLIYA ASTLDSGVPS

RFSGSESGTE FTLLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG GTKVEIK.

[0123] CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD32B})에 대해 바람직한 서열은 다음의 (SEQ ID NO:12)이다:

EVQLVESGGG LVQPQGSSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT

YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLMQNSLRA EDTAVYYCGA LGGLDYWGQGT LTVVSS.

[0126] CD79b에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD79b})에 대해 바람직한 서열은 다음의 (SEQ ID NO:13)이다:

DVVMQTSPPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD

SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP LTFGGGTKLE IK.

[0129] CD79b에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b})에 대해 바람직한 서열은 다음의 (SEQ ID NO:14)이다:

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM IDPSDSETHY

NQKFKDRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWQQGTTVT VSS.

[0132] 그러므로, 제 1 폴리펩티드 사슬에 바람직한 서열은, N-말단에서 C-말단 방향으로 다음의 구조를 가진다: 펩티드 1, IgG Fc 영역의 CH2-CH3 도메인, 링커 1, CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B}), 링커 2, CD79b에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b}), 링커 3, E-코일 도메인, 링커 4 및 C-말단. 그런 바람직한 폴리펩티드의

아미노산 서열은 다음 (SEQ ID NO:15)이다:

[0133] DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPDKT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 [0134] GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
 [0135] GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD
 [0136] DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT
 [0137] QSPSSLSASV GDRVITCRA SQEISGYLSW LQQKPGKAPR RLIYAASTLD SGVPSRFSGS
 [0138] ESGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQYFSYP LTFGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE
 [0139] VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWRQ PGQGLEWIGM IDPSDSETHY NQKFKDRVTM
 [0140] TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAH GYWQGTTVT VSSGGCGGE VAALEKEVAA
 [0141] LEKEVAALEK EVAALEKGGS NS.

[0142] SEQ ID NO:15에서, 아미노산 잔기 1 내지 10은 웨프티드 1 (SEQ ID NO:1)이고, 아미노산 잔기 11 내지 227은 IgG 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인 (SEQ ID NO:9)이며, 아미노산 잔기 228 내지 235는 링커 1 (SEQ ID NO:3)이고, 아미노산 잔기 236 내지 342는 CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B}) (SEQ ID NO:11)이며, 아미노산 잔기 343 내지 350은 링커 2 (SEQ ID NO:4)이고, 아미노산 잔기 351 내지 463은 CD79b에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b}) (SEQ ID NO:14)이며, 아미노산 잔기 464 내지 469는 링커 3 (SEQ ID NO:5)이고, 아미노산 잔기 470 내지 497은 이종이량체-촉진 E-코일 도메인 (SEQ ID NO:7)이며, 아미노산 잔기 498 내지 502는 링커 4 (SEQ ID NO:6)이다.

[0143] 제 1 폴리웨프티드 사슬을 코드화하는 바람직한 폴리뉴클레오티드는 다음 서열 (SEQ ID NO:23)을 가진다:

[0144] aggaggcgatccggcgccggaggccaggtt cagctggtgcaagtctggagctgaggtgaagaaggctggcgctcagtgaaggctcctgcaggctctggtttacacccattaccagactactggatgaactgggtgcgacagccccctggacaaggcgtggatcggatgattgatccttcagacagtgaaactcaactaatcaaaaggttcaaggacagagtaccatgaccacagacatccacgagcacacgcctacatggagctgaggacgcctagatctgacgacacggccgtgtatactgtgcgagagctatggacttggggcaaggaccacggtcaccgtctcctccggaggatgtggcggtggagaagtggccgcactggagaaagaggttgctgttggagaaggaggtcgctgcacttggaaaaggaggtcgccggctggagaaaggccgggaactct.

[0145] 제 2 폴리웨프티드 서열에 대해 바람직한 서열은 다음 (SEQ ID NO:16)이다:

[0146] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD
 [0147] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP LTFGGTKLE IKGGGSGGGG
 [0148] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT
 [0149] YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLMQNSLRA EDTAVYYCGA LGGLDYWGQGT LTVVSSGGCG
 [0150] GGKVAALKEK VAALKEVAA LKEKVAALKE.

[0151] SEQ ID NO:16에서, 아미노산 잔기 1 내지 112는 CD79b에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD79b}) (SEQ ID NO:13)이고, 아미노산 잔기 113 내지 120은 링커 2 (SEQ ID NO:4)이며, 아미노산 잔기 121 내지 236은 CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD32B}) (SEQ ID NO:12)이고, 아미노산 잔기 237 내지 242는 링커 3 (SEQ ID NO:5)이며, 아미노산 잔기 243 내지 270은 이종이량체-촉진 K-코일 도메인 (SEQ ID NO:8)이다.

[0152] 제 2 폴리웨프티드 사슬을 코드화하는 바람직한 폴리뉴클레오티드는 다음 서열 (SEQ ID NO:24)을 가진다:

[0153] gatgttgtatgactcagtctccacttccctggccgtcacccttggacagccggccatctcctgcaagtcaagttaggcctttagatagtgtatggaaagacatattgaattggttcagcagaggccaggccatctccaaaccgcctaatttatctgggtctaaactggactctgggtcccagacagattcagcggcagtgggtcaggcactgatcacactgaaatcagcaggggtggaggctgaggatgtgggttattactgtggcaaggtaacatccgcctcagcttcggcgaggaccagcttggatcaaaaggaggccgtccggcgccggaggcgaagtgcagcttggatcggaggaggctgggtcaacctggagatccctgagactcttggatcactttagtgcacgcctggatggactgggtccgtcaggccccaggcaaggggcttgggttgcataatggaaacaaactcatgcaacactatgtgactgtgataggaggattcaccatctcaagagatgacgccaacaaacagtctgtacctgcaaatgaacacgcttaagagctgaagacactgccgttattactgtgggtctggccctgactactggggcaaggcaccctgggtgaccgtctccctccggagga

tgtggcggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagtgtgcttgaaagagaaggtcgccgcactaaggaaaaggtcgccgcactgaaagag.

[0154] 제 3 폴리펩티드 사슬에 바람직한 서열은 다음 SEQ ID NO:17이다:

[0155] DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

[0156] GVEVHNNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

[0157] GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVVLDS

[0158] DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK.

[0159] SEQ ID NO:17에서, 아미노산 잔기 1 내지 10은 웨프티드 1 (SEQ ID NO:1)이고, 아미노산 잔기 11 내지 227은 IgG 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인 (SEQ ID NO:10)이다.

[0160] 제 3 폴리펩티드 사슬을 코드화하는 바람직한 폴리뉴클레오티드는 다음 서열 (SEQ ID NO:25)을 가진다:

[0161] gacaaaactcacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgggggaccgtcagtcttcccttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcc
cgaccctcgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtaagttcaactggtagtggacggcgtggaggtgcataatgccaag
acaaggccggggaggaggcgtacaacagcacgtaccgtgtggtagcgcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggtagatggcaaggagtacaagtgcag
gtctccaacaaaggccctcccgccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacagggtgtacaccctgccccatccggag
gagatgaccaagaaccaggcgtcccgctgtggactccgcacggctcttcctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcagggaaacgtttca
tgctccgtgatgcatgaggcttgacacaaccgtacacgcagaagagccttcctgtccggtaaa.

[0162] WO 2012/018687에 개시된 것과 같이, 디아바디 분자의 생체 내 약물동력학적 특성을 향상시키기 위하여, 분자들은 디아바디 분자의 하나 또는 그 이상의 말단에서 혈청-결합 단백질의 폴리펩티드 부분을 함유하도록 변형될 수 있다. 가장 바람직하게, 혈청-결합 단백질의 그런 폴리펩티드 부분은 디아바디 분자의 C-말단에서 자리잡게 될 것이다. 이 목적에 대해 혈청-결합 단백질의 특히 바람직한 폴리펩티드 부분은 스트렙토코쿠스 단백질 G로부터의 알부민-결합 도메인 (ABD)이다. 스트렙토코쿠스 스트레인 G418의 단백질 G의 알부민-결합 도메인 3 (ABD 3)이 특히 바람직하다.

[0163] 스트렙토코쿠스 스트레인 G418의 단백질 G의 알부민-결합 도메인 3 (ABD3)은 안정한 3-나선 번들을 형성하는 46 개의 아미노산 잔기로 구성되고 넓은 알부민 결합 특이성을 가진다 (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). 알부민은 혈장의 가장 풍부한 단백질이고 인간에서 19일의 반감기를 가진다. 알부민은 다른 단백질들에 비-공유적으로 결합하고 그로써 그것들의 반감기를 연장시키는 것을 허용하는 여러 작은 분자 결합 부위를 가지고 있다. 바람직하게, 넓은 링커 (링커 5)(예컨대 GGGS (SEQ ID NO:18) 또는 GGGNS (SEQ ID NO:6))는 그런 폴리펩티드 사슬의 E-코일 (또는 K-코일)을 알부민-결합 도메인으로부터 분리시키는 데 사용된다. 바람직한 알부민-결합 도메인 (ABD)은 다음의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:19)을 가진다:

[0164] LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALID EILAALP.

II. 본 발명의 대체 CD32B x CD79b Fc 디아바디

[0165] 본 발명의 대체 (alternative) CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 이중체 분자는 도 2에 개략적으로 도시된다. 그런 대체 CD32B x CD79b Fc 디아바디 분자는 3개의 폴리펩티드 사슬을 가지는데, 그 중 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있고 제 1 및 제 3 폴리펩티드 사슬은 서로에 공유 결합되어 있다. 대체 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디 분자는 바람직한 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디 분자에 존재하는 순서에 비교하여 그것의 도메인들의 순서가 다르다. 그러나, 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 경우에서와 같이, 대체 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제 1 폴리펩티드 사슬의 VL 도메인은 제 1 항원 (즉 CD32B 또는 CD79b 중 어느 하나)에 특이적인 제 1 기능성 항원 부위를 형성하기 위하여 대체 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제2 폴리펩티드 사슬의 VH 도메인과 상호작용한다. 마찬가지로, 대체 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제 2 폴리펩티드 사슬의 VL 도메인은 제 2 항원 (즉 제 1 항원의 정체성에 따라 CD79b 또는 CD32B 중 어느 하나)에 특이적인 제 2 기능성 항원 결합 부위를 형성하기 위하여, 대체 CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 제 1 폴리펩티드 사슬의 VH 도메인과 상호작용한다. 그로써, 제 1 및 제 2 폴리펩티드 사슬의 VL 및 VH 도메인의 선택은 두 개의 폴리펩티드 사슬이 포괄적으로 CD32B 및 CD79b에 결합할 수 있는 VL 및 VH 도메인을 포함하도록 조정된다 (즉 그것들은 VL_{CD32B}/VH_{CD32B} 및 VL_{CD79b}/VH_{CD79b}을

포함한다)(도 2). 포괄적으로, 각각의 그런 VL 및 VH 도메인, 및 그것들을 분리시키는 개재 링커는 분자의 항원-결합 도메인으로서 언급된다.

[0167] 그런 대체 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 제 1 폴리펩티드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 아미노 말단, CD32B 또는 CD79b 중 어느 하나에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (즉 VL_{CD32B} 또는 VL_{CD79b} 중 어느 하나), 개재 스페이서 웹티드 (링커 2), CD79b에 (제 1 폴리펩티드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B에 (제 1 폴리펩티드 사슬이 VL_{CD79b}를 함유하는 경우) 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 제 3 개재 스페이서 웹티드 (링커 3), 이종이량체-촉진 도메인, 이종이량체-촉진 도메인 (바람직하게 E-코일 도메인)에 향상된 안정화를 제공하기 위한 임의의 제 4 스페이서 웹티드 (링커 4), 시스테인-함유 웹티드 (웹티드 1), IgG Fc 도메인 (바람직하게 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인) 및 C-말단을 포함한다. 바람직하게, 제 1 폴리펩티드의 Fc 도메인은 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIIB (CD16b)에 대한 감소된 결합을 유발하거나 (야생형 Fc 영역에 의해 나타난 결합에 비교하여) 실질적으로 그런 수용체(들)에 결합하는 그런 Fc 도메인의 능력을 제거할 것이다 (도 2).

[0168] 그런 대체 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 제 2 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로, 아미노 말단, CD79b 또는 CD32B 중 어느 하나에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인 (즉 디아바디의 제 1 폴리펩티드 사슬에 대해 선택된 VL 도메인에 따라 VL_{CD79b} 또는 VL_{CD32B} 중 어느 하나), 개재 링커 웹티드 (링커 2), CD79b에 (제 2 폴리펩티드 사슬이 VL_{CD79b}를 함유하는 경우) 또는 CD32B에 (제 2 폴리펩티드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 스페이서 웹티드 (링커 3), 이종이량체-촉진 도메인 (바람직하게 K-코일 도메인) 및 C-말단을 포함한다 (도 2).

[0169] 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 제 3 폴리펩티드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 아미노 말단, 시스테인-함유 웹티드 (웹티드 1), 제 1 폴리펩티드 사슬의 Fc 도메인의 것과 동일한 아이소타입을 가지는 IgG Fc 도메인 (바람직하게, 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인) 및 C-말단을 포함한다. 바람직하게, 제 3 폴리펩티드 사슬의 Fc 도메인은 Fc γ RIA (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIIA (CD16a) 또는 Fc γ RIIIB (CD16b)에 대한 감소된 결합을 유발하거나 (야생형 Fc 영역에 의해 나타난 결합에 비교하여) 실질적으로 그런 수용체(들)에 결합하는 그런 Fc 도메인의 능력을 제거할 것이다 (도 2).

III. 약학 조성물

[0171] 발명의 조성물은 약학 조성물의 제조에 유용한 별크 약물 조성물 (예컨대 불순물이 섞인 또는 비-멸균 조성물) 및 유닛 단위용량 형태의 제조에 사용될 수 있는 약학 조성물 (즉 대상 또는 환자에의 투여에 적당한 조성물)을 포함한다. 그런 조성물들은 예방적으로 또는 치료적으로 유효한 양의 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디, 특히 본원에 개시된 CD32B x CD79b Fc 디아바디 중 어느 것 또는 그런 제제들의 조합 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 바람직하게, 발명의 조성물은 예방적으로 또는 치료적으로 유효한 양의 발명의 하나 또는 그 이상의 분자 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0172] 발명은 또한 그런 CD32B x CD79b Fc 디아바디 및 특정 자가면역 또는 염증성 질환 항원에 특이적인 제 2 치료 항체 (예컨대 자가면역 또는 염증성 질환 항원 특이적 단크론성 항체), 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0173] 특정 구체예에서, 용어 "약학적으로 허용되는"은 동물, 보다 특별하게는 인간에 사용하기 위해, 미국 연방 또는 주 정부의 규제청에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 공인된 약전에 열거된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 그것과 함께 치료제가 투여되는 희석제, 보조제 (예컨대 프로인트 보조제 (완전 및 불완전)), 부형제 또는 비히클을 나타낸다. 그런 약학적 담체는 멸균 액체, 예컨대 물 및, 석유, 동물, 채소 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 오일, 예컨대 땅콩 오일, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등일 수 있다. 약학 조성물이 정맥 내로 투여될 때 물이 바람직한 담체이다. 식염수 용액 및 수성 텍스트로오스 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체로서, 특히 주사용 용액에 대해 사용될 수 있다. 적당한 약학적 부형제는 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 쿠크, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은 필요에 따라 또한 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 혼탁액, 에멀션, 정제, 환, 캡슐, 분말, 지속성 방출 제형 등의 형태를 가질 수 있다.

[0174] 일반적으로, 발명의 조성물의 성분들은 별도로 또는 유닛 단위용량 형태로 함께 혼합되어, 예를 들면 활성 제제

의 양을 표시하는 앰플 또는 봉지와 같은 기밀 밀봉된 용기 중의 건조된 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우에는, 멸균된 약학 등급수 또는 식염수를 함유하는 주입 병을 사용하여 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우에는, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 주사용 멸균 수 또는 식염수 앰플이 제공될 수 있다.

[0175] 발명의 조성물은 중성 또는 염 형태로서 제형될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도된 것들과 같이 음이온으로 형성된 것들, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화 철, 아이소프로필아민, 트라이에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 것들과 같은 양이온으로 형성된 것들을 포함한다.

[0176] 발명은 또한 그런 개시된 CD32B x CD79b Fc 디아바디 단독으로 또는 그런 약학적으로 허용되는 단체로 채워진 하나 또는 그 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 추가로, 질환의 치료에 유용한 하나 또는 그 이상의 예방제 또는 치료제가 또한 약학적 팩 또는 키트에 포함될 수 있다. 발명은 또한 발명의 약학 조성물의 하나 또는 그 이상의 성분들로 채워진 하나 또는 그 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 포함한다. 임의로 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 제어하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 안내문이 그런 용기(들)에 결부될 수 있고, 그 안내문은 기관에 의한 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 승인을 반영한다.

[0177] 본 발명은 상기 방법들에 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 한 구체예에서, 키트는 발명의 하나 또는 그 이상의 분자를 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 추가로 자가면역 또는 염증성 질환의 치료에 유용한 하나 또는 그 이상의 다른 예방제 또는 치료제를 하나 또는 그 이상의 용기에 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 키트는 추가로 자가면역 또는 염증성 질환과 관련된 하나 또는 그 이상의 자가면역 또는 염증성 질환 항원에 결합하는 하나 또는 그 이상의 항체를 더 포함한다. 특정 구체예에서, 다른 예방제 또는 치료제는 화학요법제이다. 또 다른 구체예에서, 예방제 또는 치료제는 생물학적 또는 호르몬 치료제이다.

IV. 발명의 조성물의 용도

[0179] 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 CD79b의 발현과 관련되거나 그 발현을 특징으로 하는 또는 그 질환에 대해 B 세포 성분을 가지는 어떠한 질환 또는 상태를 치료하는 능력을 가진다. 그러므로, 제한 없이, 그런 분자들을 포함하는 약학 조성물은 자가면역 또는 염증성 질환 또는 상태의 진단 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0180] 그러므로, 발명은 이식 거부반응, 이식편 대 숙주병 (GvHD) 및 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)를 포함하여, B 세포 중재된 질환 또는 장애의 증상을 치료, 방지, 진전의 둔화 및/또는 개선하기 위하여 사용될 수 있다.

V. 투여 방법

[0182] 본 발명의 조성물은 발명의 약학 조성물의 유효량을 대상에게 투여함으로써, 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 치료, 예방 및 개선하기 위해 제공될 수 있다. 바람직한 측면으로, 그런 조성물은 실질적으로 정제된다 (즉, 실질적으로 조성물의 효과를 제한하거나 바람직하지 못한 부작용을 생성하는 물질들이 없다). 특정 구체예에서, 대상은 동물, 바람직하게 비-영장류 (예컨대 소, 말, 고양이, 개, 설치류 등) 또는 영장류 (예컨대 시노몰구스 (cynomolgous) 원숭이, 인간 등)와 같은 포유류이다. 바람직한 구체예에서, 대상은 인간이다.

[0183] 다양한 전달 시스템이 알려져 있고 발명의 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있는데, 예컨대 리포솜에의 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 항체 또는 응합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-중재된 식세포 작용 (예컨대 Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432 참조), 레트로바이러스 또는 다른 벡터의 일부로서 핵산의 구성 등이 있다.

[0184] 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 투여 방법은, 그것들에 한정되지는 않지만, 비경구 투여 (예컨대 피부내, 근육 내, 복막 내, 정맥 내 및 피하), 경막 외 및 점막 (예컨대 비강 내 및 구강 경로) 투여를 포함한다. 특정 구체예에서, 발명의 분자는 근육 내로, 정맥 내로 또는 피하로 투여된다. 조성물은 어떠한 편리한 경로에 의해, 예를 들면 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 피부점막 라이닝 (예컨대 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고 다른 생물학적 활성 제제들과 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신적 이거나 국소적일 수 있다. 또한, 폐 투여가 예컨대 흡입기 또는 분무기의 사용에 의해, 및 에어로졸화제를 사용한 제형에 의해 또한 사용될 수 있다. 예컨대 미국 특허 제 6,019,968호; 제 5,985,320호; 제 5,985,309호; 제 5,934,272호; 제 5,874,064호; 제 5,855,913호; 제 5,290,540호; 및 제 4,880,078호; 및 PCT 공보 WO

92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; 및 WO 99/66903 참조 (이것들은 각각 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다).

[0185] 발명은 또한 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디가 그런 분자들의 양을 표시하는 앰플 또는 봉지와 같은 기밀 밀봉된 용기에 팩킹되는 것을 제공한다. 한 구체예에서, 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 기밀 밀봉된 용기 중의 건조 멸균된 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급되고 예컨대 대상에게 투여되기 위해 적절한 농도로 물 또는 식염수로 재구성될 수 있다. 바람직하게, 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 기밀 밀봉된 용기 중에 적어도 5 μg , 보다 바람직하게 적어도 10 μg , 적어도 15 μg , 적어도 25 μg , 적어도 50 μg , 적어도 100 μg 또는 적어도 200 μg 의 유닛 단위용량의 건조 멸균 동결건조 분말로서 공급된다.

[0186] 발명의 동결건조된 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 그것의 원래 용기에 2 내지 8°C에서 저장되어야 하고 분자들은 재구성된 후 12시간 이내, 바람직하게 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내 또는 1시간 이내에 투여되어야 한다. 대체 구체예에서, 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 분자, 용합 단백질 또는 포합된 분자의 양과 농도를 표시하는 기밀 밀봉된 용기 중의 액체 형태로 공급된다. 바람직하게 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 액체 형태는 분자들이 적어도 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 보다 바람직하게 적어도 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 적어도 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 적어도 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 적어도 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 적어도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 존재하는 기밀 밀봉 용기로 공급된다.

[0187] 장애와 관련된 하나 또는 그 이상의 증상의 치료, 방지 또는 개선에 효과적일 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 양은 표준 임상 기법들에 의해 측정될 수 있다. 제형에 사용될 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 상태의 심각성에 따라 좌우될 것이고, 의사의 판단 및 각 환자의 환경에 따라서 결정되어야 한다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0188] 발명에 의해 포함된 CD32B x CD79b Fc 디아바디에 대해, 환자에게 투여되는 단위용량은 전형적으로 대상의 체중의 kg에 대해 적어도 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 적어도 약 0.1 mg/kg, 적어도 약 1 mg/kg, 적어도 약 5 mg/kg, 적어도 약 10 mg/kg, 적어도 약 30 mg/kg, 적어도 약 50 mg/kg, 적어도 약 75 mg/kg, 적어도 약 100 mg/kg, 적어도 약 125 mg/kg, 적어도 약 150 mg/kg 또는 그 이상이다.

[0189] 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 투여의 단위용량 및 빈도는 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 흡수 및 조직 침투를, 예를 들면 지질화같은 변형에 의해 증강시킴으로써 감소되거나 변경될 수 있다.

[0190] 한 구체예에서, 환자에게 투여된 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 단위용량은 단일 제제 요법으로서 사용하기 위해 계산될 수 있다. 다른 구체예에서, 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 다른 치료 조성물과 함께 사용되고 환자에게 투여되는 단위용량은 그런 이중특이성 1가 Fc 디아바디 분자가 단일 제제 요법으로서 사용될 때보다 더 적다.

[0191] 특정 구체예에서, 발명의 약학 조성물은 치료를 필요로 하는 지역에 국소적으로 투여되는 것이 바람직할 수 있고; 이것은 예를 들면, 제한 없이, 국소 주입에 의해, 주사에 의해, 또는 이식편에 의해 이루어질 수 있으며, 상기 이식편은 막, 예컨대 시알라스틱(sialastic) 막을 포함하여 다공성, 비-다공성 또는 젤라틴성 물질, 또는 섬유이다. 바람직하게, 발명의 분자를 투여할 때 분자가 흡수되지 않는 물질을 사용하기 위해 세심한 주의가 취해져야 한다.

[0192] 다른 구체예에서, 조성물은 소포, 특히 리포솜으로 전달될 수 있다 (Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, 상기 참조, pp. 317-327 일반적으로 상기 참조).

[0193] 또 다른 구체예에서, 조성물은 조절-방출 또는 지속성-방출 시스템으로 전달될 수 있다. 기술분야의 수련자에게 알려져 있는 어떠한 기법이든지 발명의 하나 또는 그 이상의 분자를 포함하는 지속성-방출 제형을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 예컨대 미국 특허 제 4,526,938호; PCT 공보 WO 91/05548; PCT 공보 WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al. (1997) "Microencapsulation

Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 참조, 이것들은 각각 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다. 한 구체예에서, 펌프가 조절-방출 시스템에 사용될 수 있다 (Langer, 상기 동일; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; and Saudek *et al.* (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," N. Engl. J. Med. 321:574-579 참조). 다른 구체예에서, 중합체 물질이 항체의 조절 방출을 이루기 위해 사용될 수 있다 (예컨대 MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy *et al.* (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During *et al.* (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol. 25:351-356; Howard *et al.* (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 71(1):105-112); 미국 특허 제 5,679,377호; 미국 특허 제 5,916,597호; 미국 특허 제 5,912,015호; 미국 특허 제 5,989,463호; 미국 특허 제 5,128,326호; PCT 공보 번호 WO 99/15154; 및 PCT 공보 번호 WO 99/20253 참조). 지속성-방출 제형에 사용된 중합체의 실례는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜라이드 (PLG), 다가 무수물, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락타이드 (PLA), 폴리(락타이드-코-글리코라이드) (PLGA) 및 폴리오르토에스테르를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 지속성-방출 시스템은 치료 표적 (예컨대 폐) 가까이에 배치될 수 있어서 전신적 용량의 단지 일부분만이 필요하게 된다 (예컨대 Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 다른 구체예에서, 조절-방출 이식편으로서 유용한 중합체 조성물은 Dunn 등에 따라 사용된다 (U.S. 5,945,155 참조). 이 특별한 방법은 중합체 시스템으로부터의 생체활성 물질의 제자리 조절-방출에서의 치료 효과를 토대로 한다. 이식은 일반적으로 치료적 처치를 필요로 하는 환자의 신체에 있는 어느 곳에서든지 일어난다. 또 다른 구체예에서, 비-중합체 지속성 전달 시스템이 사용되는데, 그로써 대상의 신체에서 비-중합체 이식편은 약물 전달 시스템으로서 사용된다. 신체에 이식될 때, 이식편의 유기 용매는 조성물로부터 주변 조직액으로 소멸되거나, 분산되거나 또는 침출될 것이고, 비-중합체 물질은 점차로 응고되거나 침전되어 고체, 미소공성 매트릭스가 형성될 것이다 (U.S. 5,888,533 참조).

[0194]

조절-방출 시스템은 문헌에서 개관적으로 논의된다 (Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533). 기술분야의 숙련자에게 알려져 있는 어떠한 기법이든지 발명의 하나 또는 그 이상의 치료제를 포함하는 지속성-방출 제형을 제조하기 위해 사용될 수 있다. 예컨대 미국 특허 제 4,526,938호; 국제 공보 번호 WO 91/05548 및 WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam *et al.* (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 참조, 이것들은 각각 전체 내용이 참조로 본원에 포함된다.

[0195]

발명의 조성물이 발명의 이중특이성 1가 Fc 디아바디를 코드화하는 핵산인 특정 구체예에서, 그 핵산은 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 핵산을 구성하고 투여되어 세포 내에 있게 됨으로써, 예컨대 레트로바이러스 벡터의 사용에 의해 (미국 특허 제 4,980,286호 참조), 또는 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 폭발에 의해 (예컨대 유전자 총; Biolistic, Dupont), 또는 지질 또는 세포-표면 수용체 또는 형질전환제를 코팅함으로써, 또는 핵으로 들어가는 것으로 알려져 있는 호메오박스 (homeobox)-유사 웹티드에 연결시켜 투여됨으로써 (예컨대 Joliot *et al.* (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868) 참조), 등등의 방법에 의해 생체 내로 투여되어 그것이 코딩하는 이중특이성 1가 Fc 디아바디의 발현이 촉진될 수 있다. 다르게는, 핵산은 동종 재조합에 의한 발현을 위해 세포 내에 도입되고 숙주 세포 DNA 내에 통합될 수 있다.

[0196]

발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 치료적 또는 예방적으로 유효한 양으로 대상을 치료하는 것은 단일 치료를

포함하거나, 또는 바람직하게 일련의 치료를 포함할 수 있다. 바람직한 실례에서, 대상은 약 1 내지 10주, 바람직하게 2 내지 8주, 보다 바람직하게 약 3 내지 7주, 더욱 더 바람직하게 약 4, 5 또는 6주 동안 주 1회 발명의 분자로 치료된다. 다른 구체예에서, 발명의 약학 조성물은 하루에 1회, 하루에 2회 또는 하루에 3회 투여된다. 또 다른 구체예에서, 약학 조성물은 주 1회, 주 2회, 매 2주마다 1회, 1개월에 1회, 매 6주마다 1회, 2개월마다 1회, 1년에 2회 또는 년 1회 투여된다. 또한 치료를 위해 사용된 분자의 효과적인 단위용량은 특정 치료 과정 동안 증가되거나 감소될 수 있다.

[0197] 이제 일반적으로 기술된 발명을 토대로, 예시에 의해 제공되고, 명시되지 않는 한 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않은 다음의 실시예들을 참조함으로써 발명은 보다 쉽게 이해될 것이다.

[0198] 실시예 1

[0199] CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디 및 대조 디아바디의 구성

[0200] 하기 표 1은 발현되고 정제된 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 폴리펩티드 사슬의 서열 목록을 포함한다. 추가로, CD32B 및 FITC에 대한 이중특이성 1가 하나 및 CD79b 및 FITC에 대한 두 번째 이중특이성 1가의 2개의 대조 디아바디를 제조하였다.

표 1

바람직한 CD32B x CD79b 이중특이성 Fc 디아바디	치환기 폴리펩티드 (N-말단에서 C-말단 방향으로)
제 1 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:15)	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:7 SEQ ID NO:6
제 2 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:16)	SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:8
제 3 폴리펩티드 사슬 (SEQ ID NO:17)	SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:10

[0202] 상기 기술한 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 CD32B 및 CD79b에 동시에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 대조 CD32B x FITC 디아바디는 CD32B 및 FITC에 동시에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 대조 CD79b x FITC 디아바디는 CD79b 및 FITC에 동시에 결합할 수 있는 것으로 밝혀졌다. CD32B x CD79b Fc 디아바디는 3개의 폴리펩티드 사슬 (각각의 인용된 아미노산 서열의 하나의 사슬)로 구성된 이중삼량체이다. 이중특이성 1가 디아바디를 형성하는 방법은 WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 및 WO 2012/162067에 제공된다.

[0203] 그런 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 장점들을 추가로 증명하기 위하여, 2개의 비-Fc 함유 CD32B x CD79b 디아바디를 또한 제조하였다. 이를 디아바디는 각각 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성되고, 디아바디 중 하나 (CD32B x CD79b (ABD) 디아바디)는 알부민-결합 도메인을 함유하는 반면, 다른 하나 (CD32B x CD79b 디아바디)는 그렇지 않다는 점에서 상이하다.

[0204] CD32B x CD79b (ABD) 디아바디

[0205] CD32B x CD79b (ABD) 디아바디를, N-말단에서 C-말단 방향으로, CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B}), 링커 2, CD79b에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b}), 링커 3, E-코일 도메인, 링커 5, 알부민-결합 도메인 및

C-말단을 포함하는 제 1 폴리펩티드 사슬로부터 형성한다. 제 2 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로, CD79b에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD79b}), 링커 2, CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD32B}), 링커 3, K-코일 도메인 및 C-말단을 포함한다. 그런 폴리펩티드들의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0206] 제 1 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:20):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA ASTLDSGVPS

RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV

QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK

DRVTTMTTDTs TSTAYMELRS LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGGEVAALE

KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGS LAEA KVLANRELDK YGVSDYYKNL IDNAKSAEGV

KALIDEILAA LP.

[0213] 제 2 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열 (SEQ ID NO:21):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD

SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP LTFGGTKLE IKGGGS GGGGG

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT

YYAESVIGRF TISRDAKNS LYLMQNSLRA EDTAVYYCGA LG LDYWGQGT LTVVSSGGCG

GGKVAALKEK VAALKEVAA LKEKVAALKE.

[0219] CD32B x CD79b 디아바디

[0220] CD32B x CD79b 디아바디는 일부민-결합 도메인을 갖지 않는다는 점에서 CD32B x CD79b (ABD) 디아바디와 상이하다. 그러므로, 그런 디아바디는 N-말단에서 C-말단 방향으로, CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD32B}), 링커 2, CD79b에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD79b}), 링커 3, E-코일 도메인 및 C-말단을 포함하는 제 1 폴리펩티드 사슬로부터 형성한다. 제 2 폴리펩티드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로, CD79b에 결합하는 항체의 VL 도메인 (VL_{CD79b}), 링커 2, CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인 (VH_{CD32B}), 링커 3, K-코일 도메인 및 C-말단을 포함한다. 이 디아바디의 그런 제 1 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:22)이다:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA ASTLDSGVPS

RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV

QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK

DRVTTMTTDTs TSTAYMELRS LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGGEVAALE

KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK.

[0226] 이 디아바디의 제 2 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열은 상기에 나타낸 (SEQ ID NO:21)이다.

[0227] 실시예 2

[0228] CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 인간 일차 B 세포 증식을 억제한다

[0229] 면역 시스템을 약화시키거나 억제하는 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 능력을 추가로 증명하기 위하여, 상기-기술된 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디를 2개의 공여체로부터 얻어진 일차 인간 B 세포의 존재하에 인큐베이션하였다. 증식을 염소 항-인간 IgM Fc μ F(ab)₂ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 달라지는 농도의 CD32B x CD79b Fc 디아바디 또는 CD32B x CD79b ABD 디아바디 중 어느 하나의 존재하에 48시간 후의 ^3H -TdR의 흡수에 의해 모니터링 하였다. 그 결과를 도 3a (공여체 1) 및 도 3b (공여체 2)에 도시하고, 그것들은 CD32B x CD79b Fc 디아바디 또는 CD32B x CD79b ABD 디아바디의 존재하에 B세포 증식이 현저히 감소된 것을 나타낸다.

[0230] 실시예 3

[0231] CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 나이브 및 메모리 B 세포의 신호화를 억제한다

[0232] B 세포에 의한 면역 시스템의 신호화를 약화 또는 억제하는 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 능력을 추가로 증명하기 위하여, 정제된 나이브 또는 메모리 B 세포를 염소 항-인간 IgM Fc μ (항- μ) ($30 \mu\text{g}/\text{ml}$) 단독의 존재하에 또는 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 추가의 존재하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 도 4a (나이브 B 세포) 및 도 4b (메모리 B 세포)에서 알 수 있는 것과 같이, 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디, CD32B x CD79b (ABD) 디아바디 또는 CD32B x CD79b 디아바디의 존재는 모두 B 세포 신호화를 현저하게 감소시켰다.

[0233] 실시예 4

[0234] CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 SLE 환자 B 세포의 증식을 억제한다

[0235] B 세포에 의한 면역 시스템의 신호화를 약화 또는 억제하는 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 능력을 추가로 증명하기 위하여, 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)로 고생하는 환자의 B 세포를 염소 항-인간 IgM Fc μ (항- μ) 단독의 존재하에 또는 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 추가의 존재하에 인큐베이션하였다. 증식을 $^3\text{H-TdR}$ 의 흡수에 의해 모니터링하였다.

[0236] 도 5a에서 알 수 있는 것과 같이, 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 CD32B 및 CD79b 둘 다에 결합할 수 있는 것으로 나타났다. 도 5b는 염소 항-인간 IGM (GAH 항- μ)의 제공이, 대조표준에 비하여 B 세포의 증가된 증식을 유발하였고, 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디 또는 CD32B x CD79b (ABD) 디아바디의 추가의 투여가 그런 증식의 정도를 현저하게 억제한 것을 증명한다.

[0237] SLE로 고생하는 개체들의 B 세포 증식의 정도를 감소시키는 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디 또는 CD32B x CD79b (ABD) 디아바디의 능력은 질환 상태와 무관한 것으로 나타났다. 활성 또는 비활성 SLE에 걸린 환자들의 B 세포 증식의 감소의 정도는 염소 항-인간 IGM (GAH 항- μ)만이 존재할 때 관찰된 증식에 비하여 대략 40%였고, 그러므로 질환 상태와 관련이 없었다 (도 5c). 도 5c는 추가로 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디가 CD32B x CD79b (ABD) 디아바디보다 더 큰 억제를 보였음을 증명한다.

[0238] 실시예 5

[0239] CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 생체 내에서 B 세포 반응을 조절한다

[0240] B 세포에 의한 면역 시스템의 신호화를 약화 또는 억제하는 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 능력을 추가로 증명하기 위하여, 인간 PBMC를 면역결핍성 NSG 마우스에 주사하였다 (Agliano, A. et al. (2008) "Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rgamma Nu11 Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains," Int. J. Cancer 123(9):2222-2227; Sanchez, P.V. et al. (2009) "A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia," Leukemia 23(11):2109-2117; Racki, W.J. et al. (2010) "NOD-Scid IL2rgamma(Nu11) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection," Transplantation 89(5):527-536; Choi, B. et al. (2011) "Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2R(Nu11) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan," J. Clin. Immunol. 31(2):253-264; Sartelet, H. et al. (2012) "Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/IL2rg Null (NSG) Mice," In Vivo 26(1):19-29; Spranger, S. et al. (2012) "NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies *in vivo*," J. Transl. Med. 10:30; von Bonin, M. et al. (2013) "in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice," PLoS One. 8(4):e60680). 동물들에게 대조 비히클 (100 μl 의 인산염 완충 식염수 (PBS)/동물, q3d x 2주), 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디 (100 μl /동물, q3d x 2주) 또는 CD32B x CD79b 디아바디 (단지 2개의 폴리펩티드 스트레인으로 구성되고 알부민-결합 도메인을 함유함)를 투여하였다. 7일 및 14일 째에 ELISA에 의해, 두 가지 모두 이식편 대 숙주병의 개시를 나타내는, 인간 IgM (도 6a) 또는 인간 IgG (도 6b)의 존재에 대해 혈장을 분석하였다.

[0241] 대조 비히클을 받은 마우스들은 고수준의 인간 IgM 및 인간 IgG를 나타냈다. 대조적으로, 그런 항체들은 본질적으로 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디를 받은 마우스들에서는 검출되지 않았다 (도 6a 및 도 6b). CD32B x CD79b 디아바디를 받은 마우스들은 대조 비히클을 받은 마우스에 비교하여 감소된 수준의 인간 IgM 및 인간 IgG를 나타냈지만, 그럼에도 불구하고 그런 수준은 실질적으로는 CD32B x CD79b Fc 디아바디를 받

은 마우스들의 수준보다 높았다. 이들 발견은 이중특이성 1가 CD32B x CD79b 디아바디가 치료적 이용성 및 효과를 갖지만, 상기-기술한 바람직한 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디는 그런 비-Fc 디아바디보다 예상외로 월등하고 훨씬 더 큰 치료적 이용성 및 효과를 가진다는 것을 증명한다 (도 6a 및 도 6b).

[0242] 실시예 6

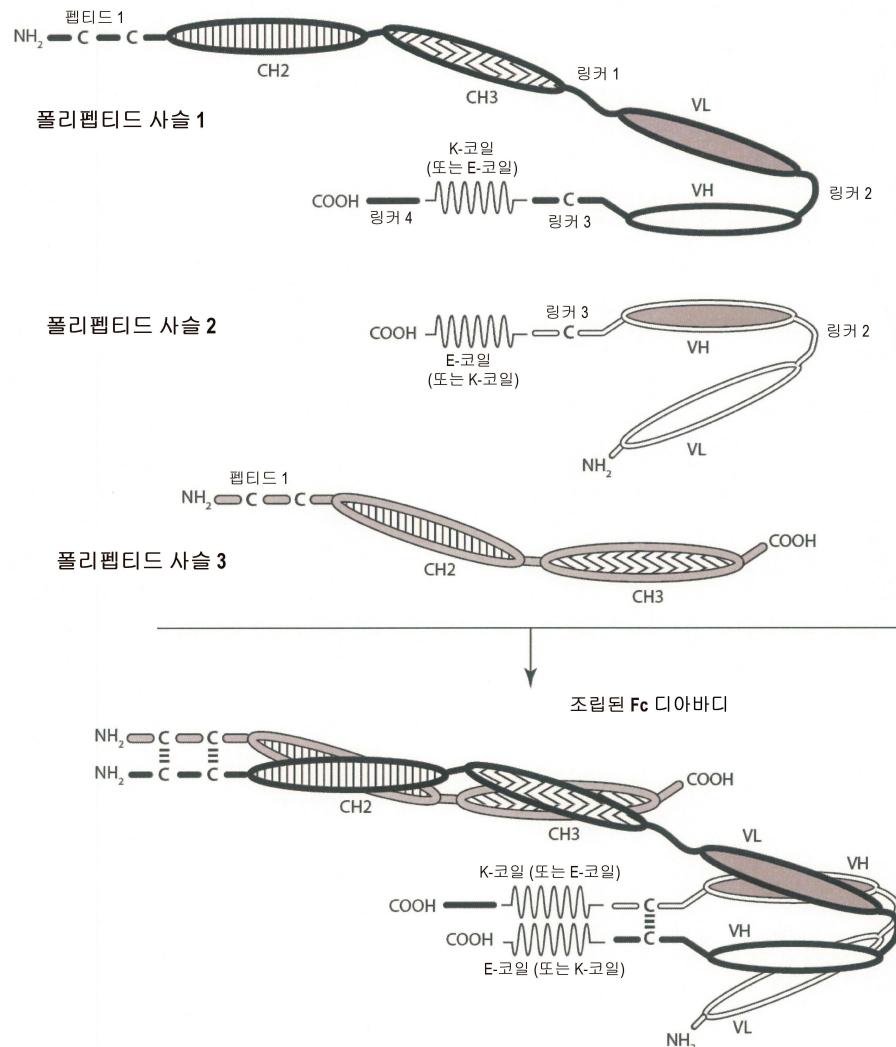
[0243] CD32B x CD79b 이중특이성 1가 Fc 디아바디는 마우스에서 이종 GvHD를 감소시킨다

B 세포에 의한 면역 시스템의 신호화를 약화 또는 억제하는 본 발명의 CD32B x CD79b Fc 디아바디의 능력을 추가로 증명하기 위하여, 인간 PBMC (5×10^6 세포, 정맥 내 주사함)를 면역결핍 NOD.scid IL2r γ null NSG 마우스에 주사하였다. 동물들에게 대조 비히를 (100 μ l의 인산염 완충 식염수 (PBS)/동물), 상기-기술한 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디 (5 mg/kg 또는 10 mg/kg 중 하나) 또는 항-CD20 항체 (리툭시맙; 5 mg/kg; 1회 투여)를 투여하였다. 마우스들의 누적 생존을 시간 경과에 따라 측정하였다. 도 7에서 알 수 있는 것과 같이, 어느 하나의 용량의 바람직한 CD32B x CD79b Fc 디아바디를 받은 동물들은 PCS 대조표준 또는 리툭시맙 중 한 가지를 받은 마우스들에 비교하여 현저하게 증강된 생존을 나타냈다.

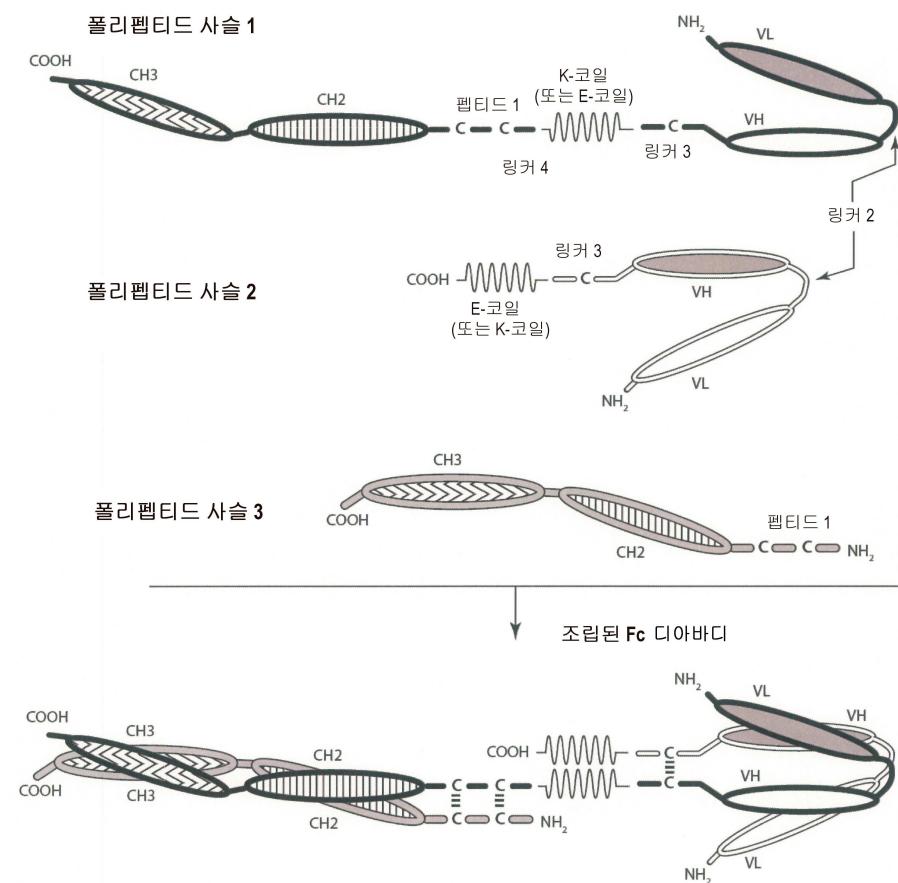
[0245] 본 명세서에서 언급된 모든 공보 및 특허는 본원에 각각의 개별적인 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 그것의 전체 내용이 참조로 포함되는 것으로 표시된 것과 같은 정도로 참조로 본원에 포함된다. 발명은 발명의 특정 구체예들과 관련하여 기술된 한편, 추가로 변형될 수 있고, 본 출원은 일반적으로 발명의 원리에 따르는 발명의 어떠한 변화, 용도 또는 응용을 포함하며 본 개시내용으로부터의 그런 벗어남을 발명이 속하는 기술분야 내의 공지되거나 관례적인 실시범위 내에 있는 것으로서 및 지금까지 설명된 필수적인 특징에도 적용될 수 있는 것으로서 포함하는 것이 인지될 것이다.

도면

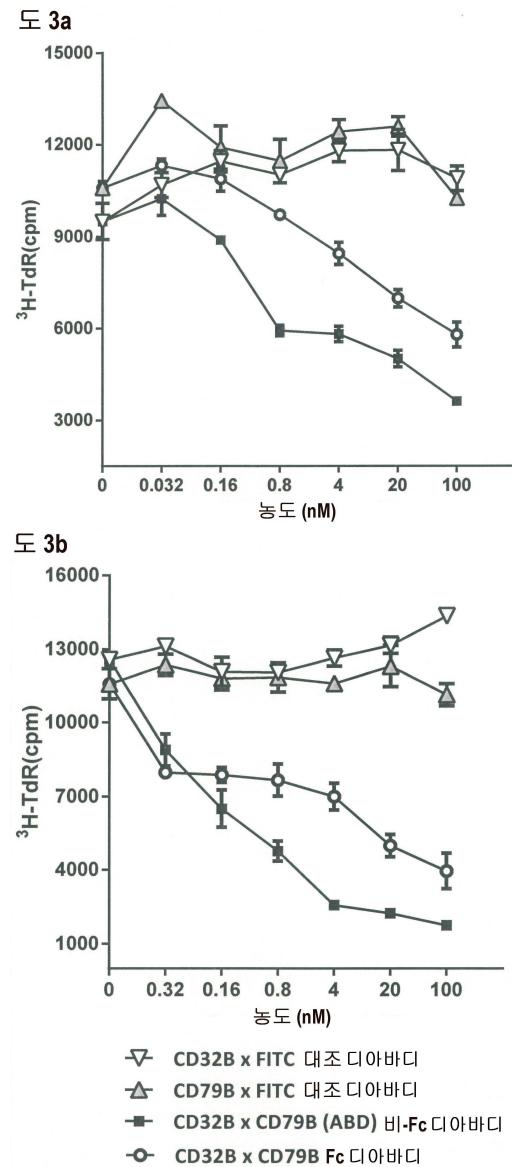
도면1



도면2

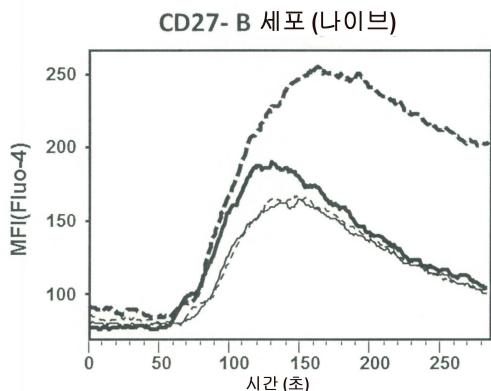


도면3

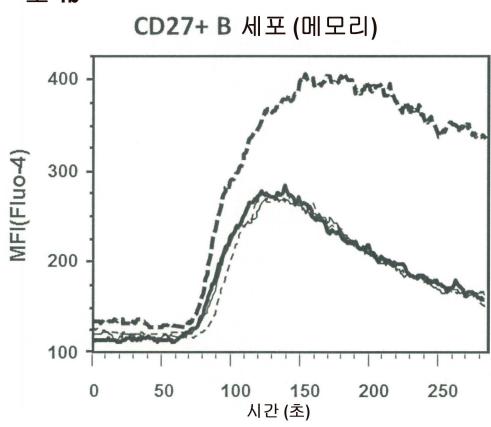


도면4

도 4a

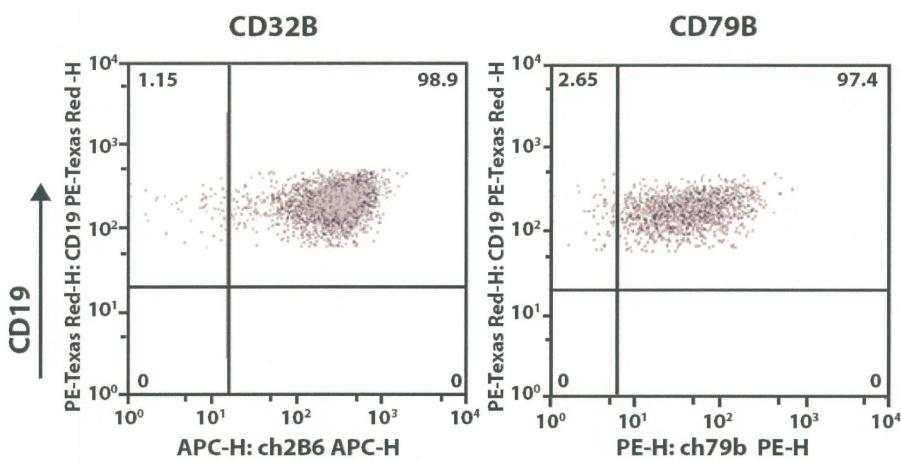


도 4b

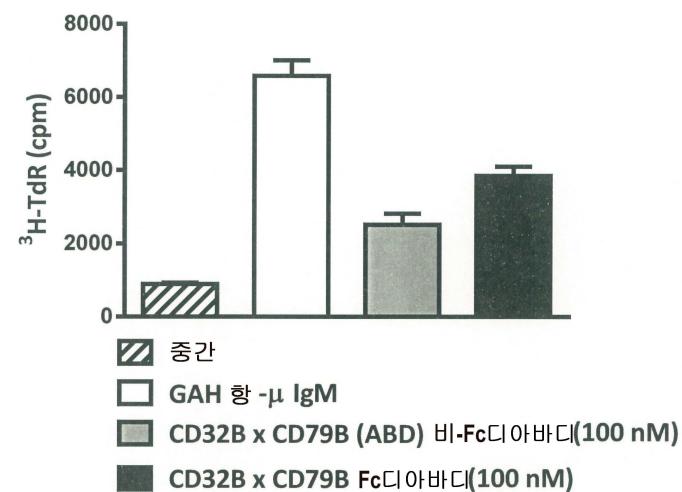


- GAH IgM μ (항- μ): 30 μ g/ml
- + CD32B x CD79B 비-c 디아바디
- + CD32B x CD79B (ABD) 비-c 디아바디
- + CD32B x CD79B Fc 디아바디

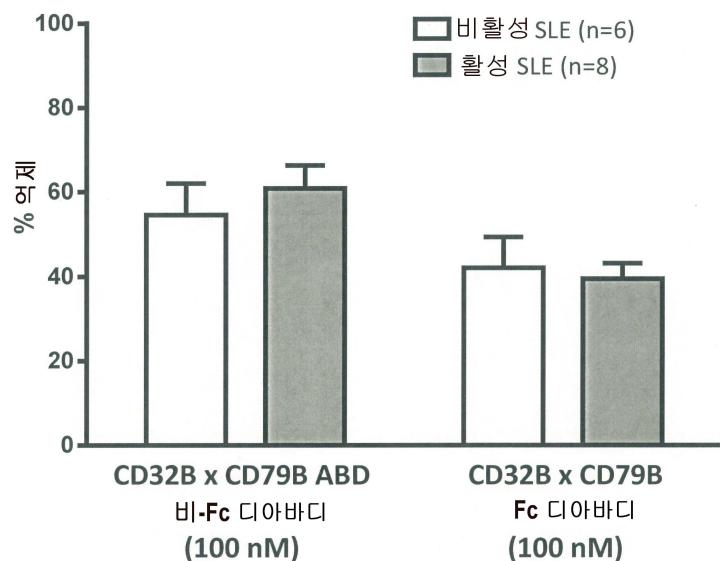
도면5a



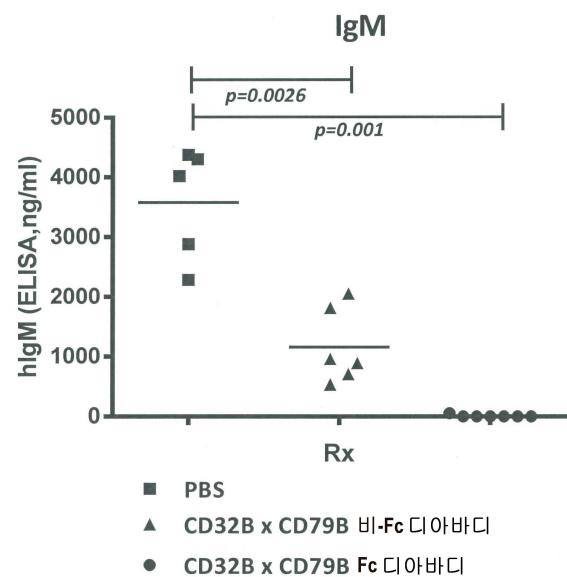
도면5b



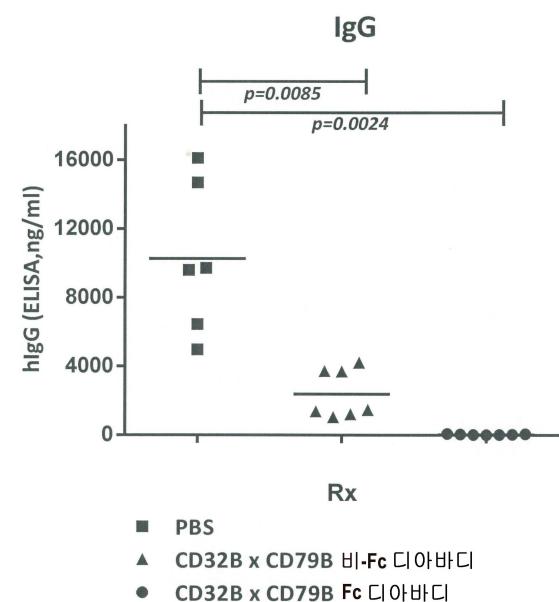
도면5c



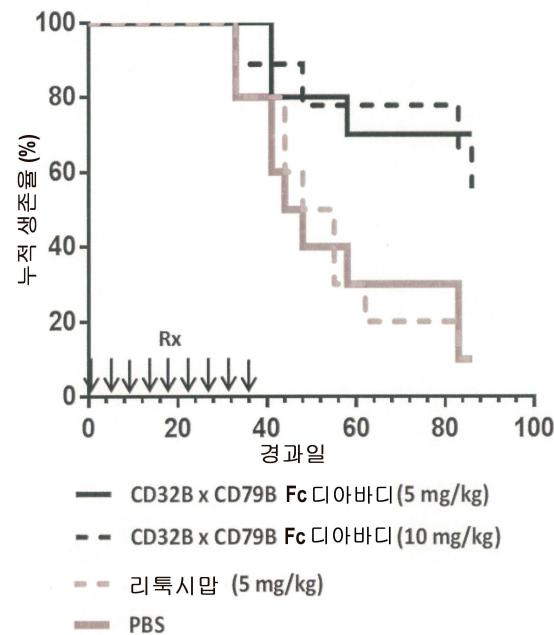
도면6a



도면6b



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MacroGenics, Inc.

Johnson, Leslie S

Huang, Ling

Shah, Kalpana

Bonvini, Ezio

Moore, Paul

Chen, Wei

<120> Bi-Specific Monovalent Fc Diabodies That Are Capable Of Binding

CD32B And CD79b And Uses Thereof

<130> 1301.0110PCT

<150> US 61/864,217

<151> 2013-08-09

<150> US 61/866,416

<151> 2013-08-15

<150> US 61/869,519

<151> 2013-08-23

<150> US 61/907,525

<151> 2013-11-22

<160> 25

<170

> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Ser Ser Ser

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 2

<400> 4

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 3

<400> 5

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 4

<400> 6

Gly Gly Gly Asn Ser

1 5

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting E-Coil Domain

<400> 7

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 8

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting K-Coil Doamin

<400> 8

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

20

25

<210> 9

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Sequence For The CH₂ And CH₃ Domains Of An Antibody Fc

Region Present In The First Polypeptide Chain

<400> 9

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

180	185	190
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
195	200	205
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
210	215	
<210> 10		
<211> 217		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Preferred Sequence For The CH2 And CH3 Domains Of An Antibody Fc		

Region Present In The Third Polypeptide Chain

<400> 10		
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		
1	5	10
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		
20	25	30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		
35	40	45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		

50	55	60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
65	70	75
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		
85	90	95
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
100	105	110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		

115	120	125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
130	135	140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
145	150	155
160		

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Preferred Sequence for the VL Domain of an Antibody that Binds
 CD32B
 <400> 11
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 12
 <211> 116
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Sequence for the VH Domain of an Antibody that Binds
CD32B

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15												
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Ala
20		25													
Trp	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
35															
Ala	Glu	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Lys	Asn	His	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu
50		55													
Ser	Val	Ile	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ala	Lys	Asn	Ser
65		70			75										
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
85			90									95			
Tyr	Cys	Gly	Ala	Leu	Gly	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
100			105									110			
Thr	Val	Ser	Ser												
115															

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Sequence for the VL Domain of an Antibody that Binds

CD79b

<400> 13

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

	20	25	30
--	----	----	----

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Sequence for the VH Domain of an Antibody that Binds

CD79b

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Asp Thr Ser Thr Ser Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 15

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Sequence for the First Polypeptide Chain

<400> 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195	200	205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
210	215	220
Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Asp Ile Gln Met Thr		
225	230	235
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile		
245	250	255
Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser Trp Leu Gln		
260	265	270
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr		
275	280	285
Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr		
290	295	300
Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr		
305	310	315
320		
Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly		
325	330	335
Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gln Val		
340	345	350
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val		
355	360	365
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met		
370	375	380
Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met		
385	390	395
400		
Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp		
405	410	415
Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu		
420	425	430
Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
435	440	445

Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 450 455 460
 Gly Cys Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
 465 470 475 480
 Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 485 490 495
 Lys Gly Gly Asn Ser
 500

<210> 16
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><233> Preferred Sequence for the Second Polypeptide Chain
 <400> 16

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly

115 120 125
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
 165 170 175
 Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190
 Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
 210 215 220
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270
 <210> 17
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Preferred Sequence for the Third Polypeptide Chain
 <400> 17
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85

90

95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100

105

110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

115

120

125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

130

135

140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

145

150

155

160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165

170

175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

180

185

190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

195

200

205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210

215

220

Pro Gly Lys

225

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 5

<400> 18

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Albumin-Binding Domain (ABD)

<400> 19

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly

1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu

20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro

35 40 45

<210> 20

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of First Polypeptide Chain of CD32B x CD79b

(ABD) Diabody

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly

100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

130	135	140
Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
145	150	155
Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn		
165	170	175
Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser		
180	185	190
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val		
195	200	205
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val		
210	215	220
Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu		
225	230	235
Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu		
245	250	255
Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val		
260	265	270
Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys		
275	280	285
Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile		
290	295	300
Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro		
305	310	
<210> 21		
<211> 270		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Amino Acid Sequence of Second Polypeptide Chain of CD32B x CD79b		
(ABD) Diabody		
<400> 21		
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		

1	5	10	15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser			
20	25	30	
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly			
85	90	95	
Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly			
115	120	125	
Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala			
130	135	140	
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala			
145	150	155	160
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys			
165	170	175	
Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile			
180	185	190	
Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu			
195	200	205	
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp			
210	215	220	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly			
225	230	235	240
Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu			
245	250	255	

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

260 265 270

<210> 22

<211> 262

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid Sequence of First Polypeptide Chain of CD32B x CD79b

Diobody

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly

100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu

145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn

165 170 175

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser

180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val

195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

210 215 220

Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu

225 230 235 240

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu

245 250 255

Val Ala Ala Leu Glu Lys

260

<210> 23

<211> 1506

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Polynucleotide Encoding the Polypeptide Chain of SEQ ID

NO:15

<400> 23

gacaaaactc acacatgcc	accgtgccc gcacctgaag	ccgcgggggg accgtcagtc	60
----------------------	----------------------	-----------------------	----

ttcctttcc ccccaaacc	caaggacacc ctcatgatct	ccggacccc tgaggtcaca	120
---------------------	-----------------------	----------------------	-----

tgcgtgggg tggacgtgag	ccacgaagac cctgaggta	agttaactg gtacgtggac	180
----------------------	----------------------	----------------------	-----

ggcggtggagg tgcataatgc	caagacaaag ccgcgggagg	agcagtacaa cagcacgtac	240
------------------------	-----------------------	-----------------------	-----

cgtgtggta	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc tgaatggcaa	300
-----------	------------	------------	-----------------------	-----

tgcaaggct	ccaacaaagc	cctcccgacc	cccatcgaga aaaccatctc	360
-----------	------------	------------	-----------------------	-----

gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgccccat cccgggagga	420
------------	------------	------------	----------------------	-----

aaccaggta	gcctgtggtg	cctggtaaa	ggcttctatc ccagcgacat	480
-----------	------------	-----------	-----------------------	-----

tggagagca	atggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	540
-----------	-----------	------------	------------	-----

gacggctcct	tcttcctcta	cagcaagtc	accgtggaca	agagcaggta	gcagcagggg	600
------------	------------	-----------	------------	------------	------------	-----

aacgtttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	660
-----------	------------	------------	------------	------------	------------	-----

ctctccctgt	ctccggtaa	agcccattcc	agctcccta	tggaagacat	ccagatgacc	720
------------	-----------	------------	-----------	------------	------------	-----

cagtcctccat	cctccttatac	tgcctctgtg	ggagatagag	tcaccatcac	ttgtcggca	780
-------------	-------------	------------	------------	------------	-----------	-----

agt caggaaa ttatgggta cttaaatgg ctgcagcaga aaccaggcaa ggccctaga 840
 cgcctgatct acgcccata cacttagat tctgggttcc catccaggtt cagtggcagt 900
 gagtctggga ccgagttcac cctcaccata agcagccctc agcctgaaga ttttcaacc 960

tattactgtc tacaatattt tagttatccg ctcacgttcg gaggggggac caaggtggaa 1020
 ataaaaaggag gggatccgg cggcgaggc cagggtcagc tgggtcagtc tggagctgag 1080
 gtgaagaagc ctggcgctc agtgaaggta tcctgcaagg ctctggta caccttacc 1140
 agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc cctggacaag ggcttgagt gatcggaatg 1200
 attgatcctt cagacagtga aactcaactac aatcaaaagt tcaaggacag agt caccatg 1260
 accacagaca catccacgag cacagctac atggagctga ggagccctgag atctgacgac 1320
 acggccgtgt attactgtgc gagagctatg ggctactggg ggcaaggac cacgtcacc 1380

gtctccctcg gaggatgtgg cgggtggagaa gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct 1440
 ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag gaggtcgcaag ccctggagaa aggccggcggg 1500
 aactct 1506

<210> 24

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Preferred Polynucleotide Encoding the Polypeptide Chain of SEQ ID

NO:16

<400> 24

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccccgtca ccctggaca gccggcctcc 60
 atctccctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgtatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcaggcaga gcccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctgggtc taaacctggac 180
 tctgggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg aggctgagga tgggggtt tattactgtc ggcaaggtac acatttccg 300
 ctcacgttcg gcccaggacca caagcttgcg atcaaaggag gggatccgg cggcgaggc 360
 gaagtgcgc tgggggtt tggaggaggc ttgggtcaac ctggaggatc cctgagactc 420
 tcttggccg cctctggatt cacttttagt gacgcctggaa tggactgggt ccgtcaggcc 480
 ccaggcaagg ggcttgagt ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgtc agtctgtat agggaggatc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600
 ctgtacctgc aaatgaacag cttaaagatc gaagacactg ccgtgttata ctgtgggct 660

ctggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg ttcctccgg aggatgtggc 720
 ggtggaaaag tggccgact gaaggagaaa gttgctgc tt tgaaagagaa ggtcgccgca 780
 ctttaaggaaa aggtcgacg cctgaaagag 810
 <210> 25
 <211> 681
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Preferred Polynucleotide Encoding the Polypeptide Chain of SEQ ID

NO:17

<400> 25
 gacaaaactc acacatgcc accgtgccc gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc 60
 ttcctttcc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtggtgg tggacgttag ccacgaagac cctgaggtca agtcaactg gtacgtggac 180
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtgtca ggcgttcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
 tgcaaggctt ccaacaaagc cttccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccggagga gatgaccaag 420
 aaccaggtaa gcctgagtt cgcaactaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
 tggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc 540
 gacggctct tttcctcg tcaagacacc accgtggaca agagcaggta gcaacgggg 600
 aacgtttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc 660
 ctctccctgt ctccggtaa a 681