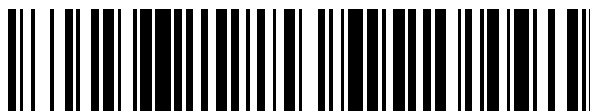


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 730**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2014** **PCT/US2014/049848**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015** **WO15021089**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014** **E 14834798 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** **EP 3030264**

54 Título: **Diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos que son capaces de unirse a CD32B y CD79b y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.08.2013 US 201361864217 P
15.08.2013 US 201361866416 P
23.08.2013 US 201361869519 P
22.11.2013 US 201361907525 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2019

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)
9704 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

JOHNSON, LESLIE S.;
HUANG, LING;
SHAH, KALPANA;
BONVINI, EZIO;
MOORE, PAUL A. y
CHEN, WEI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 720 730 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos que son capaces de unirse a CD32B y CD79b y usos de los mismos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas:

La presente solicitud reclama prioridad a las solicitudes de patente de los Estados Unidos Nº 61/864.217 (presentada el 9 de agosto de 2013; pendiente); 61/866.416 (presentada el 15 de agosto de 2013; pendiente); 61/869.519 (presentada el 23 de agosto de 2013; pendiente) y 61/907.525 (presentada el 22 de noviembre de 2013; pendiente).

Referencia a listados de secuencia

La presente solicitud incluye uno o más listados de secuencias conforme a 37 C.F.R. 1.821 y siguientes, que se divulgan en medios en papel y legibles por ordenador.

Antecedentes de la invención:

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a diacuerpos monovalentes biespecíficos que comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos") y están compuestos por tres cadenas polipeptídicas que poseen, al menos, un sitio de unión específico para un epítipo de CD32B y un sitio de unión específico para un epítipo de CD79b (es decir, un "diacuerpo Fc CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención son capaces de unirse simultáneamente a CD32B y a CD79b. La invención se refiere a dichas composiciones, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos y a su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, y en particular, lupus eritematoso sistémico (SLE) y enfermedad del injerto contra huésped.

Descripción de la técnica relacionada:

I. Los receptores Fcγ y CD32B

La interacción de complejos de antígeno-anticuerpo con células del sistema inmunitario da como resultado una amplia gama de respuestas, que van desde funciones de efector, como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, degranulación de mastocitos y fagocitosis a señales inmunomodulatorias tales como la regulación de la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de anticuerpos o complejos inmunitarios a receptores especializados de la superficie celular en células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunitarios es consecuencia de la heterogeneidad estructural de los receptores Fc. Los receptores Fc comparten dominios de unión a ligando relacionados en forma estructural que presumiblemente median la señal intracelular.

Los receptores Fc son miembros de la superfamilia de genes de inmunoglobulina de proteínas. Son glicoproteínas de superficie que pueden unirse a la porción Fc de moléculas de inmunoglobulina. Cada miembro de la familia reconoce las inmunoglobulinas de uno o más isotipos, a través de un dominio de reconocimiento de la cadena α del receptor Fc.

Los receptores Fc se definen mediante su especificidad para subtipos de inmunoglobulina (véase 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 Fcγ 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).

Los receptores Fc que son capaces de unirse a anticuerpos IgG se denominan "FcγR". Cada miembro de esta familia es una glicoproteína de membrana integral, que posee dominios extracelulares relacionados con un conjunto C2 de dominios relacionados con la inmunoglobulina, un dominio de un único segmento transmembrana y un dominio intracitoplásmico de longitud variable. Existen tres FcγR conocidos, denominados FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) y FcγRIII(CD16). Los tres receptores están codificados por genes diferentes; sin embargo, las amplias homologías entre los tres miembros de la familia sugieren que surgieron de un progenitor común, quizás mediante duplicación génica.

Las proteínas FcγRII(CD32) son glicoproteínas de membrana integral de 40KDa que se unen solamente a IgG complejada debido su una baja afinidad por la Ig monomérica (10^6 M^{-1}). Este receptor es el FcγR expresado más ampliamente, presente en todas las células hematopoyéticas, incluidos monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrófilos, células mastoideas y plaquetas. El FcγRII tiene solamente dos regiones similares a la

inmunoglobulina en su cadena de unión a inmunoglobulina y, por lo tanto, una afinidad mucho menor para IgG que para FcγRI. Existen tres genes FcγRII humanos (FcγRIIA(CD32A), FcγRIIB(CD32B), FcγRIIC(CD32C)), todos los cuales se unen a IgG en agregados o complejos inmunitarios.

Las distintas diferencias dentro de los dominios citoplásmicos de FcγRIIA y FcγRIIB crean dos respuestas heterogéneas de forma funcional a la unión al receptor. La diferencia fundamental es que, al unirse a una región Fc de IgG, la isoforma FcγRIIA inicia la señalización intracelular que conduce a la activación del sistema inmunitario (por ejemplo, fagocitosis, estallido respiratorio, etc.), mientras que, al unirse a una región Fc de IgG, la isoforma FcγRIIB inicia señales que conducen a una atenuación o a la inhibición del sistema inmunitario (por ejemplo, inhibiendo la activación de células B, etc.).

Dichas señales de activación e inhibitoras se transducen a través de FcγR después de la unión a una región Fc de IgG. Estas funciones opuestas diametralmente son resultado de diferencias estructurales entre las distintas isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplásmica del receptor denominados motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM) o motivos de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM) explican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplásmicas en estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solamente incluyen FcγRIIB.

Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La formación de agrupaciones de FcγRIIA por medio de complejos inmunitarios o la unión cruzada a anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con quinasas asociadas con el receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, y su activación da como resultado una activación de sustratos secuencia abajo (por ejemplo, PI₃K). La activación celular conduce a la liberación de mediadores proinflamatorios.

El gen FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es el 96 % idéntico a FcγRIIA y se une a los complejos IgG de manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibitora de FcγR. La base molecular de esta inhibición se ha establecido. Cuando FcγRIIB se coliga con un receptor activador como las regiones Fc de las inmunoglobulinas IgG de un complejo inmunitario, el ITIM de FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, y que en consecuencia evita la entrada de Ca⁺⁺ intracelular. Por lo tanto, dicha unión cruzada de FcγRIIB y un receptor activador atenúa la actividad del receptor activador, y por lo tanto, inhibe la capacidad de respuesta celular. Por lo tanto, en células B, la activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos se atenúan o se abortan. Por lo tanto, en el inicio de la detección de antígenos, tiene lugar la unión IgG monomérica-antígeno y las regiones de Fc de los anticuerpos unidos se unen a los ITAM de los FcγR activadores para mediar la activación del sistema inmunitario. A medida que progresa la respuesta del huésped, se forman los complejos inmunitarios IgG multimérica-antígeno de que son capaces de unirse a FcγRIIB (y por lo tanto, coligar dichos complejos con un receptor de activación), lo que conduce a la atenuación y a la detención final de la respuesta inmunitaria (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 8.445.645; 8.217.147; 8.216.579; 8.216.574; 8.193.318; 8.92.737; 8.187.593; 8.133.982; 8.044.180; 8.003.774; 7.960.512; 7.786.270; 7.632.497; 7.521.542; 7.425.619; 7.355.008 y las publicaciones de patente de Estados Unidos N°: 2012/0276094; 2012/0269811; 2012/0263711; 2012/0219551; 2012/0213781; 2012/0141476; 2011/0305714; 2011/0243941; 2010/0322924; 2010/0254985; 2010/0196362; 2010/0174053; 2009/0202537; 2009/0191195; 2009/0092610; 2009/0076251; 2009/0074771; 2009/0060910; 2009/0053218; 2009/0017027; 2009/0017026; 2009/0017023; 2008/0138349; 2008/0138344; 2008/0131435; 2008/0112961; 2008/0044429; 2008/0044417; 2007/0077246; 2007/0036799; 2007/0014795; 2007/0004909; 2005/0260213; 2005/0215767; 2005/0064514; 2005/0037000; 2004/0185045).

II. El receptor de células B y CD79b

Las células B son células del sistema inmunitario que son responsables de la producción de anticuerpos. La respuesta de la célula B al antígeno es un componente esencial del sistema inmunitario normal. Las células B poseen receptores de superficie celular especializados (receptores de la célula B; "BCR"). Si una célula B encuentra un antígeno capaz de unirse al BCR de la célula, la célula B se estimulará para proliferar y producir anticuerpos específicos para el antígeno unido. Para generar una respuesta eficaz a los antígenos, las proteínas asociadas con BCR y la ayuda de las células T también son necesarias. El complejo antígeno/BCR se internaliza, y el antígeno se procesa proteolíticamente. Una pequeña parte del antígeno sigue complejo con las moléculas principales del complejo II de histocompatibilidad ("MHC-II") en la superficie de las células B, en la que el complejo puede ser reconocido por las células T. Las células T activadas por dicha presentación de antígenos segregan una diversidad de linfocinas que inducen la maduración de la célula B.

La señalización a través del BCR desempeña un papel importante en la generación de anticuerpos, en autoinmunidad, y en el establecimiento de tolerancia inmunológica (Gauld, S.B. *et al.* (2002) "*B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles In Cell Development And Disease*", Science 296(5573):1641-1642). Las células B inmaduras que se unen a autoantígenos mientras aún están en la médula ósea son eliminadas mediante apoptosis.

En contraste, la unión de antígenos en células B maduras deriva en activación, proliferación, anergia y apoptosis. La respuesta funcional particular que se observa depende de si la célula B recibe señales coestimuladoras a través de otros receptores de superficie y se activan las rutas de transducción de señal específica.

El BCR se compone de una inmunoglobulina de membrana que, junto con las subunidades α y β asociadas en forma no covalente de CD79 ("CD79a" y "CD79b", respectivamente), forman el complejo BCR. CD79a y CD79b son subunidades de transducción de señales que contienen un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor conservado ("ITAM") necesario para la transducción de señal (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). La agregación del complejo BCR mediante el antígeno multivalente inicia la transfosforilación de los ITAM de CD79a y CD79b y la activación de las quinasas asociadas al receptor (DeFranco, A.L. (1997) "*The Complexity Of Signaling Pathways Activated By The BCR*", Curr. Opin. Immunol. 9:296-308; Kurosaki, 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). Los ITAM fosforilados reclutan efectores adicionales tales como PI_3K , PLC- γ y miembros de la ruta Ras/MAPK. Estos eventos de señalización son responsables de la proliferación de células B y la expresión aumentada de los marcadores de activación (tales como MHC-II y CD86) que se requieren para preparar células B para sus interacciones posteriores con células T auxiliares ("T_h").

III. Enfermedades y trastornos inflamatorios

La inflamación es un proceso por el que los glóbulos blancos del cuerpo y las sustancias químicas protegen nuestros cuerpos de la infección por sustancias extrañas, tales como bacterias y virus. Se caracteriza generalmente por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento del área afectada. Las sustancias químicas conocidas como citocinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en una cascada ordenada y autolimitante en la sangre o los tejidos afectados. Esta liberación de sustancias químicas aumenta el flujo sanguíneo a la zona de la lesión o la infección, y puede tener como consecuencia enrojecimiento y calor. Algunas de las sustancias químicas provocan una filtración de fluidos en los tejidos, lo que produce una hinchazón. Este proceso potencial puede estimular los nervios y provocar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un periodo limitado en la zona relevante, operan en beneficio del cuerpo.

Las enfermedades o los trastornos inflamatorios reflejan un ataque del sistema inmunitario en las células y los tejidos propios del cuerpo (es decir, una respuesta "autoinmunitaria"). Existen muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al cuerpo de formas diferentes. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en individuos con la enfermedad de Crohn, y el sinovio, el hueso y el cartílago de varias articulaciones son afectados en individuos con artritis reumatoidea. A medida que los trastornos autoinmunitarios avanzan en la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, se puede obtener como resultado el crecimiento anormal de un órgano o cambios en la función de los órganos. El trastorno autoinmunitario puede afectar únicamente a un órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por los trastornos autoinmunitarios incluyen glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, la tiroides o el páncreas), músculos, articulaciones y piel. Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios incluyen, entre otros, tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo 1, artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico (SLE), dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, miastenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmunitaria, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerosa.

Las enfermedades o trastornos inflamatorios también pueden aparecer cuando el sistema inmunitario normalmente protector del cuerpo provoca daños atacando células o tejidos extraños cuya presencia es beneficiosa para el cuerpo (por ejemplo, el rechazo de trasplantes (enfermedad de huésped contra huésped) o el rechazo de las células de un huésped inmunodeprimido por células inmunocompetentes de un injerto de trasplante introducido (enfermedad de injerto contra huésped) (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).

A pesar de los avances recientes en el tratamiento de dichas enfermedades o dichos trastornos, sigue estando presente la necesidad de poseer composiciones capaces de tratar o evitar enfermedades o trastornos inflamatorios.

IV. Diacuerpos biespecíficos

La capacidad de un anticuerpo intacto no modificado (por ejemplo, una IgG) de unirse a un epítipo de un antígeno depende de la presencia de dominios variables en las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina (por ejemplo, los dominios VL y VH, respectivamente). El diseño de un diacuerpo se basa en el constructo Fv monocatenario (scFv) (véase, por ejemplo, Holliger *et al.* (1993) "*Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; documento US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); documento 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; documento 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).

La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y de una cadena pesada de anticuerpo, y en particular, la interacción de sus dominios VL y VH forma uno de los sitios de unión a epítipo del anticuerpo. Por el contrario, el constructo de scFv incluye los dominios VL y VH de un anticuerpo contenido en una única cadena polipeptídica en la que los dominios están separados por un enlazador flexible de una longitud suficiente como para permitir un autoensamblaje de los dos dominios en un sitio de unión a epítipo funcional. Cuando el autoensamblaje de los dominios VL y VH se vuelve imposible debido a un enlazador de longitud insuficiente (menos de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos), dos de los constructos scFv interactúan entre sí para formar una molécula bivalente en la que el dominio VL de una cadena se asocia con el dominio VH de la otra (revisado por Marvin *et al.* (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Los anticuerpos naturales son capaces de unirse solamente a una especie de epítipo (es decir, mono-específico), aunque pueden unirse a múltiples copias de esa especie (es decir, que muestran bivalencia o polivalencia). Se ha notado en la técnica la capacidad para producir diacuerpos que difieren de dichos anticuerpos naturales en que son capaces de unirse a dos o más especies epitopes diferentes (es decir, que muestran bispecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o polivalencia) (véase, por ejemplo, Holliger *et al.* (1993) "*Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; documento US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); documento 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; documento WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Mertens, N. *et al.*, "*New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives*", En: NOVEL FRONTIERS IN THE PRODUCTION OF COMPOUNDS FOR BIOMEDICAL USE, A. VanBroekhoven *et al.* (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos (2001), páginas 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).

La provisión de diacuerpos no mono-específicos proporciona una ventaja significativa: la capacidad de coligar y colocalizar células que expresan diferentes epítipes. Los diacuerpos bivalentes por lo tanto, tienen una amplia gama de aplicaciones, incluidos tratamiento e inmunodiagnóstico. La bivalencia permite una gran flexibilidad en el diseño y la ingeniería del diacuerpo en varias aplicaciones, proporcionando una avidez mejorada para antígenos multiméricos, la unión cruzada de diferentes antígenos y un objetivo dirigido a tipos de células específicos que se basan en la presencia de ambos antígenos diana. Debido a su valencia aumentada, las bajas tasas de disociación y una eliminación rápida de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, de o menos de ~50 kDa), moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han mostrado un uso particular en el campo de la toma de imágenes de tumores (Fitzgerald *et al.* (1997) "*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris**", Protein Eng. 10 (10):1221-1225). Tiene particular importancia el coligado de diferentes células, por ejemplo, la unión cruzada de células T citotóxicas a células tumorales (Staerz *et al.* (1985) "*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*", Nature 314:628-631, y Holliger *et al.* (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng. 9:299-305).

Los dominios de unión a epítipo del diacuerpo también pueden estar dirigidos a un determinante de superficie de cualquier célula efectora inmunitaria tal como CD3, CD16, CD32, o CD64, que se expresan en linfocitos T, células asesinas naturales (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, la unión de diacuerpos a determinantes celulares efectoras, por ejemplo, receptores Fcγ (FcγR), también se encontró que activa la célula efectora (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; documento WO 2006/113665; documento WO 2008/157379; documento WO 2010/080538; documento WO 2012/018687; documento WO 2012/162068). Generalmente, la activación de la célula efectora se desencadena mediante la unión de un anticuerpo unido a antígeno a una célula efectora mediante la interacción de Fc-FcγR; por lo tanto, a este respecto, las moléculas de diacuerpos de la invención pueden mostrar una funcionalidad similar a Ig independientemente de si comprenden un dominio Fc (por ejemplo, analizada en cualquier ensayo de función efectora conocida en la técnica o ejemplificada en el presente documento (por ejemplo, ensayo ADCC)). Mediante la unión cruzada del tumor y las células efectoras, el diacuerpo no solamente lleva la célula efectora a la proximidad de las células tumorales sino que también conduce a la destrucción eficaz del tumor (véase, por ejemplo, Cao *et al.* (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

Sin embargo, las ventajas anteriores tienen un coste destacado. La formación de dichos diacuerpos no monoespecíficos requiere del ensamblaje exitoso de dos o más polipéptidos diferentes y distintos (es decir, dicha formación requiere que los diacuerpos se formen a través de la heterodimerización de diferentes especies de cadena polipeptídica). Este hecho está en contraposición con diacuerpos monoespecíficos, que se forman a través de la homodimerización de cadenas polipeptídicas idénticas. Debido a que deben proporcionarse al menos dos polipéptidos diferentes (por ejemplo, dos especies de polipéptidos) para formar un diacuerpo no monoespecífico, y debido a que la homodimerización de dichos polipéptidos conduce a moléculas inactivas (Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de dichos polipéptidos debe realizarse de tal forma que se evite la unión covalente entre polipéptidos de la misma especie (Takemura, S. *et al.* (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). La técnica, por lo tanto, ha enseñado la asociación no covalente de dichos polipéptidos (véase, por ejemplo, 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).

No obstante, la técnica ha reconocido que los diacuerpos biespecíficos compuestos por polipéptidos asociados de forma no covalente son inestables y se disocian fácilmente en monómeros no funcionales (véase, por ejemplo, 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).

A la luz de este desafío, la técnica ha tenido éxito en desarrollar diacuerpos no monoespecíficos heterodiméricos unidos de forma covalente (véanse, por ejemplo, documento WO 2006/113665; documento WO/2008/157379; documento WO 2010/080538; documento WO 2012/018687; documento WO/2012/162068; Johnson, S. *et al.* (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion", J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. *et al.* (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. *et al.* (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551). Dichos enfoques incluyen la ingeniería de uno o más residuos de cisteína en cada una de las especies de polipéptidos empleada. Por ejemplo, se ha mostrado la adición de un residuo de cisteína al extremo C-terminal de dichos constructos para permitir la unión de disulfuro entre las cadenas de polipéptidos, estabilizando el heterodímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.

El documento WO 2012/162068 A2 se refiere a un polipéptido que comprende una porción de una proteína de unión a albúmina desinmunizada capaz de unirse a albúmina sérica, en el que la presencia de la porción de proteína de unión a albúmina desinmunizada prolonga la semivida en suero del polipéptido con respecto a la semivida en suero en ausencia de dicha porción.

El documento WO 2014/159940 A1 se refiere a moléculas biespecíficas que son capaces de localizar una célula efectora inmunitaria que expresa un receptor de activación en una célula infectada víricamente a fin de facilitar la destrucción de la célula infectada víricamente.

El documento WO 2012/018687 A1 se refiere a moléculas de diacuerpo que comprenden dos cadenas polipeptídicas que se asocian para formar al menos dos sitios de unión a epítopo en las que las cadenas polipeptídicas pueden unirse covalentemente a través de enlaces covalentes de unión no peptídica, y a usos de dichas moléculas de diacuerpo en el tratamiento de diversas enfermedades.

Veri *et al.* (2010) "Therapeutic Control of B Cell Activation via Recruitment of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With a Novel Bispecific Antibody Scaffold", *Arthritis & Rheumatism* 62:1933-1943, divulga la construcción y el análisis de moléculas de diacuerpo específicas para CD32B y CD79B que comprenden dos cadenas polipeptídicas que incluyen una molécula de diacuerpo específica para el ortólogo de ratón de CD32B y CD79B.

Independientemente de dicho éxito, la producción de mono-específicos, heterodiméricos funcionales y estables puede mejorarse aún más mediante la cuidadosa consideración y colocación de los dominios empleados en las cadenas polipeptídicas. La presente invención por lo tanto, se refiere a proporcionar polipéptidos específicos que están particularmente diseñados para formar, mediante unión covalente, diacuerpos Fc heterodiméricos que son capaces de unirse simultáneamente a CD32B y CD79b.

Sumario de la invención:

La invención se refiere a diacuerpos monovalentes bispecíficos CD32B x CD79b que incluyen una región Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos Fc monovalentes bispecíficos CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes bispecíficos CD32B x CD79b de la invención están compuestos por tres cadenas polipeptídicas (una "primera", "segunda" y "tercera" cadena polipeptídica), en las que la primera y la segunda cadena polipeptídica se unen de forma covalente entre sí, y la primera y la tercera cadena polipeptídica se unen de forma covalente entre sí. Dichas uniones covalentes son, por ejemplo, mediante la unión de disulfuro de residuos de cisteína ubicados dentro de cada cadena polipeptídica. Las primeras y segundas cadenas de polipéptidos de los diacuerpos Fc monovalentes bispecíficos CD32B x CD79b de la invención se asocian entre sí de forma heterodimérica para formar un sitio específico de unión para un epítipo de CD32B y un sitio específico de unión para un epítipo de CD79b. Los diacuerpos Fc monovalentes bispecíficos CD32B x CD79b de la invención, por lo tanto, son monovalentes debido a que son capaces de unirse a solamente una copia de un epítipo de CD32B y a solo una copia de un epítipo de CD79b, pero bispecíficos debido a que un diacuerpo único puede unirse simultáneamente al epítipo de CD32B y al epítipo de CD79b. Los diacuerpos Fc monovalentes bispecíficos de la presente invención son capaces de unirse simultáneamente a CD32B y a CD79b. La invención se refiere a dichos diacuerpos Fc monovalentes bispecíficos CD32B x CD79b, y a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes bispecíficos. La invención se refiere adicionalmente a los diacuerpos monovalentes bispecíficos o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios y, en particular, lupus eritmatoso sistémico (SLE) y enfermedad de injerto contra huésped.

En detalle, la invención proporciona un diacuerpo Fc monovalente bispecífico, en la que el diacuerpo Fc monovalente bispecífico es capaz de unirse en forma específica a un epítipo de CD32B y a un epítipo de CD79b, y posee un dominio Fc de IgG, en la que el diacuerpo Fc monovalente bispecífico incluye una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica, en la que la primera y segunda cadena polipeptídica se unen de forma covalente entre sí, y la primera y tercera cadena polipeptídica se unen de forma covalente entre sí, y en el que:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende:

(1) un subdominio (1A), que comprende un péptido que contiene cisteína (en especial, un péptido que tiene la secuencia de (Péptido 1) **SEQ ID NO: 1**); y

(2) un subdominio (1B), que comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG (de la forma más preferida, que tiene dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG);

ii. un dominio 2, que comprende:

(1) un subdominio (2A), que comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VL_{CD32B}) (**SEQ ID NO: 11**); y

(2) un subdominio (2B), que comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VH_{CD79b}) (**SEQ ID NO: 14**),

en el que los subdominios (2A) y (2B) están separados uno de otro mediante un enlazador peptídico (en especial, un enlazador peptídico (enlazador 2) que tiene la secuencia de **SEQ ID NO: 4**);

iii. un dominio 3, en el que el dominio 3 es un dominio de hélice E (**SEQ ID NO: 7**) o un dominio de hélice K (**SEQ ID NO: 8**), en la que el dominio 3 está separado del dominio 2 mediante un enlazador peptídico (en especial, un enlazador peptídico que tiene la secuencia de **SEQ ID NO: 5**); y

iv. un péptido espaciador C-terminal (en especial, un péptido espaciador que tiene la secuencia de **SEQ ID NO: 6**);

B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende:

(1) un subdominio (1A), que comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VL_{CD79b}) (**SEQ ID NO: 13**); y

(2) un subdominio (1B), que comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VH_{CD32B}) (**SEQ ID NO: 12**);

en el que los subdominios (1A) y (1B) están separados uno de otro mediante un enlazador peptídico (en especial, un enlazador peptídico (enlazador 2) que tiene la secuencia de **SEQ ID NO: 4**);

ii. un dominio 2, en la que el dominio 2 es un dominio de hélice K (**SEQ ID NO: 8**) o un dominio de hélice E (**SEQ ID NO: 7**), en la que el dominio 2 está separado del dominio 1 mediante el enlazador peptídico (en especial, un enlazador peptídico que tiene la secuencia de **SEQ ID NO: 5**); y en la que el dominio 3 de la primera cadena polipeptídica y el dominio 2 de la segunda cadena polipeptídica no son ambos dominios de hélice E ni ambos dominios de hélice K; y

C. la tercera cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un dominio 1 que incluye:

(1) un subdominio (1A), que comprende un péptido que contiene cisteína (en especial, un enlazador peptídico que tiene la secuencia de (Péptido 1) **SEQ ID NO: 1**); y

(2) un subdominio (1B), que comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG (de la forma más preferida, que tiene dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG);

y en la que:

(a) las porciones polipeptídicas de los dominios Fc de IgG de la primera y tercera cadena polipeptídica forman el dominio Fc de IgG;

(b) el dominio VL de la primera cadena polipeptídica y el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión de antígeno capaz de unirse de forma específica a un epítipo de CD32B; y

(c) el dominio VH de la primera cadena polipeptídica y el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión de antígeno capaz de unirse de forma específica a un epítipo de CD79b.

La invención adicionalmente se refiere a las formas de realización de todos dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en las que el dominio 1 de la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia diferente del dominio 1 de la tercera cadena polipeptídica.

La invención se refiere adicionalmente a las formas de realización de todos dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en las que dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 9**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 10**.

La invención se refiere adicionalmente a las formas de realización de todos dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en las que dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 10**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 9**.

La invención se refiere adicionalmente a las formas de realización de todos dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos, en las que el dominio 1 de la primera cadena polipeptídica y/o el dominio 1 de la tercera cadena polipeptídica comprenden una secuencia variante de CH2-CH3 que muestra una unión alterada a un receptor Fcγ.

La invención se refiere adicionalmente a las formas de realización de todos dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en las que el dominio 3 de la primera cadena polipeptídica comprende una hélice E (**SEQ ID NO: 7**) y el dominio 2 de la segunda cadena polipeptídica incluye una hélice K (**SEQ ID NO: 8**).

La invención se refiere adicionalmente a las formas de realización de todos dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en las que el dominio 3 de la primera cadena polipeptídica comprende una hélice K (**SEQ ID NO: 8**) y el dominio 2 de la segunda cadena polipeptídica incluye una hélice E (**SEQ ID NO: 7**).

La invención proporciona también un diacuerpo monovalente biespecífico que comprende un Fc de inmunoglobulina IgG (diacuerpo Fc monovalente biespecífico), en el que el diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende:

(1) una primera cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 15**;

(2) una segunda cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y

(3) una tercera cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 17**, en el que los residuos de aminoácidos 1-10 de dicha tercera cadena polipeptídica son Péptido 1 (**SEQ ID NO: 1**), y los residuos de aminoácidos 11-227 de dicha tercera cadena polipeptídica son los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo IgG (**SEQ ID NO: 10**);

en el que la primera y segunda cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra mediante una unión de disulfuro, y la primera y tercera cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra mediante una segunda unión de disulfuro.

La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos que se han descrito anteriormente y un vehículo fisiológicamente aceptable.

La invención proporciona adicionalmente dicha composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inflamatorio, en especial en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio es una enfermedad autoinmunitaria y, en particular, en el que la enfermedad autoinmunitaria es lupus eritematoso sistémico (SLE).

La invención proporciona adicionalmente dicha composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inflamatorio, en especial en el que la enfermedad o trastorno inflamatorio es una enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).

Breve descripción de los dibujos:

La **Figura 1** ilustra las tres cadenas polipeptídicas de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico preferido y la estructura de las cadenas asociadas de forma covalente.

La **Figura 2** ilustra las tres cadenas polipeptídicas de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico alternativo y la estructura de las cadenas asociadas de forma covalente.

Las **Figuras 3A-3B** muestran la capacidad del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido y un diacuerpo no Fc CD32B x CD79b (ABD) para inhibir la proliferación de las células B humanas primarias.

Las **Figuras 4A-4B** muestran la capacidad del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido, un diacuerpo no Fc CD32B x CD79b (ABD) y un diacuerpo no Fc CD32B x CD79b para inhibir la señal en células B sin tratar (**Figura 4A**) y de memoria (**Figura 4B**).

Las **Figuras 5A-5C** muestran la capacidad del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido o de un diacuerpo no Fc CD32B x CD79b (ABD) para inhibir la proliferación de células SLE. Se descubrió que dicha inhibición era independiente del estado de la enfermedad.

Las **Figuras 6A-6B** muestran la capacidad del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido o un diacuerpo no Fc CD32B x CD79b para modular las respuestas de la célula B *in vivo*, y demostrar la superioridad no esperada del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido.

La **Figura 7** muestra la capacidad del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido para disminuir GvHD xenogénico en el ratón.

Descripción detallada de la invención:

La presente invención se refiere a diacuerpos monovalentes biespecíficos según la reivindicación 1 que comprenden un dominio Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos") y están compuestos por tres cadenas polipeptídicas y poseen al menos un sitio de unión específico para un epítipo de CD32B y un sitio de unión específico para un epítipo de CD79b (es decir, un diacuerpo Fc "CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención son capaces de unirse simultáneamente a CD32B y CD79b. La invención se refiere a dichas composiciones, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos y a su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, y en particular, lupus eritomatoso sistémico (SLE) y enfermedad de injerto contra huésped.

Según se ha indicado anteriormente, el CD79b se expresa por medio de células B, y por lo tanto, se expresa en células en proliferación en respuesta al reconocimiento de antígenos. Los anticuerpos capaces de unirse de forma inmuno-específica a CD79b son capaces de unirse a dichas células B. El CD32B es un FcγR y se expresa en células B. Los anticuerpos capaces de unirse de forma inmuno-específica a FcγRIIB(CD32B) y, en particular, los anticuerpos que se unen a FcγRIIB sin interferir sustancialmente o impedir la unión a Fc son capaces de aumentar la capacidad de FcγRIIB de coligarse con receptores de activación de complejos inmunitarios. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico que es capaz de unirse a CD32B y CD79b, tiene la capacidad de inhibir o atenuar el sistema inmunitario de un huésped en respuesta a una activación de células B, una proliferación de células B y una secreción de anticuerpos no deseadas. Dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos, por lo tanto, tienen utilidad en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios.

I: Diacuerpos Fc CD32B x CD79b preferidos de la presente invención

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b preferidos de la presente invención se denominan anticuerpos "Fc", debido a que comprenden un dominio Fc. Como se muestra en forma esquemática en la **Figura 1**, dichos diacuerpos Fc están compuestos por tres cadenas polipeptídicas, de las que la primera y la segunda cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra, y la primera y tercera cadena polipeptídica se unen una a otra. El dominio VL de la primera cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica para formar un primer sitio de unión a antígeno funcional que es específico para el primer antígeno (es decir, CD32B o CD79b). Asimismo, el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH de la primera cadena polipeptídica para formar un segundo sitio de unión a antígeno que es específico para el segundo antígeno (es decir, CD79b o CD32B, dependiendo de la identidad del primer antígeno). Por lo tanto, la selección de los dominios VL y VH de la primera y segunda cadena polipeptídica se coordinan, de manera que las dos cadenas de polipéptidos comprendan de forma colectiva dominios VL y VH capaces de unirse a CD32B y CD79b (es decir, comprenden VL_{CD32B}/VH_{CD32B} y VL_{CD79b}/VH_{CD79b}) (**Figura 1**). De forma colectiva, cada dominio VL y VH, y el enlazador intermedio que los separa se denominan dominio de unión a antígeno de la molécula.

El dominio Fc de los diacuerpos Fc de la presente invención puede ser o bien una región Fc completa (por ejemplo, una región Fc de IgG completa) o bien solamente un fragmento de una región Fc completa. Aunque el dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puede poseer la capacidad de unirse a uno o más receptores Fc (por ejemplo, FcγR), preferentemente dicho dominio Fc provocará una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por una región Fc de tipo silvestre) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc de unirse a dicho(s) receptor(es). El dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puede comprender algunos o todos los dominios CH2 y/o algunos o todos los dominios CH3 de una región Fc completa, o puede comprender una secuencia CH2 variante y/o CH3 variante (que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más eliminaciones con respecto a los dominios CH2 o CH3 de una región Fc completa). El dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la presente invención puede comprender porciones polipeptídicas no Fc, o puede comprender porciones de regiones Fc completas no naturales, o puede incluir orientaciones de origen no natural de los dominios CH2 y/o CH3 (como por ejemplo, dos dominios CH2 o dos dominios CH3, o en la dirección N-terminal a C-terminal, un dominio CH3 enlazado a un dominio CH2, etc.).

La primera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b preferido incluye (en la dirección N-terminal a C-terminal): un extremo amino terminal, un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc IgG (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo, y de la forma más preferida los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo que provocará la unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por una región Fc de tipo silvestre) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dicho(s) receptor(es), un primer péptido espaciador intermedio (enlazador 1), el dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B o CD79b (es decir, o bien VL_{CD32B} o bien VL_{CD79b}), un segundo péptido espaciador intermedio (enlazador 2), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (si dicha primera cadena polipeptídica contiene VL_{CD32B}) o CD32B (si dicha primera cadena polipeptídica contiene VL_{CD79b}), un tercer péptido espaciador intermedio que contiene cisteína (enlazador 3), un dominio promotor de heterodímero, un cuarto péptido espaciador opcional (enlazador 4) para proporcionar una estabilización mejorada al dominio promotor de heterodímero y un extremo C-terminal (**Figura 1**).

La segunda cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b preferido comprende (en la dirección N-terminal a C-terminal): un extremo amino terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b o a CD32B (es decir, o bien VL_{CD79b} o bien VL_{CD32B}, dependiendo del dominio VL seleccionado para la primera cadena polipeptídica del diacuerpo), un péptido enlazador intermedio (enlazador 2), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL_{CD79b}) o CD32B (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL_{CD32B}), un péptido espaciador que contiene cisteína (enlazador 3), un dominio promotor de heterodímero y un extremo C-terminal (**Figura 1**).

La tercera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b preferido incluye (en la dirección N-terminal a C-terminal): un extremo amino terminal, un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc de IgG (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo) que tiene el mismo isotipo que el dominio Fc de la primera cadena polipeptídica y un extremo C-terminal. Preferentemente, el dominio Fc de la tercera cadena polipeptídica provocará una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por una región Fc de tipo silvestre) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dicho(s) receptor(es) (**Figura 1**).

El péptido que contiene cisteína (Péptido 1) de la primera y tercera cadenas puede estar comprendido por la misma secuencia de aminoácidos o por diferentes secuencias de aminoácidos, y contendrá 1, 2, 3 o más residuos de cisteína. Un péptido 1 particularmente preferido tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 1**): DKTHTCPPCP. El primer péptido espaciador intermedio (enlazador 1) incluye la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 2**): APSSS, y de forma más preferida tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 3**): APSSSPME. Un segundo péptido espaciador intermedio preferido (enlazador 2) tiene la secuencia que es **SEQ ID NO: 4**: GGGSGGGG. El tercer péptido espaciador intermedio que contiene cisteína preferido (enlazador 3) contendrá 1, 2, 3 o más cisteínas. Un péptido espaciador que contiene cisteína preferida (enlazador 3) tiene la secuencia que es **SEQ ID NO: 5**: GGCGGG. Un cuarto péptido espaciador preferido (enlazador 4) tiene la secuencia GGG o es **SEQ ID NO: 6**: GGGNS.

De forma más preferida, la longitud del péptido de enlazador intermedio (enlazador 2, que separa dichos dominios VL y VH) se selecciona para evitar de forma sustancial o completa que los dominios VL y VH de la cadena polipeptídica se unan uno a otro. Por lo tanto, los dominios VL y VH de la primera cadena polipeptídica son incapaces de forma sustancial o completa de unirse uno a otro. Asimismo, los dominios VL y VH de la segunda cadena polipeptídica son incapaces de forma sustancial o completa de unirse uno a otro.

Los dominios promotores de heterodímero de los primeros y segundos polipéptidos difieren uno de otro y están diseñados para asociarse con el otro para promover la asociación de la primera y la segunda cadena polipeptídica. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, una de esas cadenas de polipéptidos se diseñará de forma que contenga un dominio "de hélice E" promotor de heterodímero (**SEQ ID NO: 7**):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

cuyos residuos formarán una carga negativa a pH 7, mientras que la otra de las dos cadenas de polipéptidos se diseñará de forma que contenga un dominio "de hélice K" promotor de heterodímero (**SEQ ID NO: 8**):

KVAALEKEKVAALEKEKVAALEKEKVAALEK

cuyos residuos formarán una carga positiva a pH 7. La presencia de dichos dominios cargados promueve la asociación entre el primer y el segundo polipéptido, y por lo tanto, estimula la heterodimerización. No importa qué hélice se proporcione a qué cadena, siempre que las hélices utilizadas en la primera y la segunda cadena polipeptídica difieran, para que estimulen la heterodimerización entre dichas cadenas.

Según se ha indicado anteriormente, los dominios CH2 y CH3 del primer y el tercer polipéptido están preferentemente mutados para reducir (con respecto a la región Fc de tipo silvestre) o eliminar la unión a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b). Dichas mutaciones se conocen bien en la técnica e incluyen sustituciones de aminoácidos en posiciones 234 y 235, una sustitución en la posición 265 o una sustitución en la posición 297 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.624.821). En una forma de realización preferida, el dominio CH2 y CH3 incluye una sustitución en la posición 234 con alanina y 235 con alanina.

Los dominios CH2 y/o CH3 del primer y tercer polipéptido no deben ser necesariamente idénticos, y de forma ventajosa se modifican para estimular la formación de complejo entre los dos polipéptidos. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos (preferentemente una sustitución con un aminoácido que incluye un grupo lateral voluminoso que forma una 'protuberancia', por ejemplo, triptófano) puede introducirse en el dominio CH2 o CH3 de tal manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado en forma similar y obligará al dominio mutado a emparejarse con un dominio en el que una mutación complementaria o de ajuste se haya diseñado, es decir, 'el agujero' (por ejemplo, una sustitución con glicina). Dichos conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que comprenda la molécula de diacuerpo Fc, y asimismo, diseñarse en cualquier porción de las cadenas polipeptídicas de dicho par. Los procedimientos de diseño de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son conocidas en la técnica, en particular, con respecto al diseño de moléculas similares a la inmunoglobulina, y están abarcados por el presente documento (véase, por ejemplo, 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, y Xie *et al.* (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J.

Immunol. Methods 296:95-101). Preferentemente, la 'protuberancia' se diseña en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena polipeptídica y el 'agujero' se diseña en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena polipeptídica. Por lo tanto, la 'protuberancia' ayudará a evitar que la primera cadena polipeptídica se homodimerice a través de sus dominios CH2 y/o CH3. Como la tercera cadena polipeptídica contiene preferentemente la sustitución del 'agujero', se heterodimerizará con la primera cadena polipeptídica, además de homodimerizarse con sí misma. Una protuberancia preferida se crea modificando una región Fc de IgG nativa para que contenga la modificación T366W. Un agujero preferido se crea modificando una región Fc de IgG nativa para que contenga la modificación T366S, L368A y Y407V. Para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico que comprende la primera, segunda y tercera cadena polipeptídica, el sitio de unión a la proteína A de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena polipeptídica preferentemente se muta por medio de la sustitución de aminoácidos en la posición 435 (H435R). Para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico que comprende la primera, segunda y tercera cadena polipeptídica, el sitio de unión a la proteína A de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena polipeptídica se muta preferentemente mediante la sustitución de aminoácidos. Por lo tanto, el homodímero de la cadena polipeptídica no se unirá a la proteína A, mientras que el diacuerpo Fc monovalente biespecífico retendrá su capacidad de unirse a la proteína A a través del sitio de unión a la proteína A de la primera cadena polipeptídica.

Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo presente en la primera cadena polipeptídica es (**SEQ ID NO: 9**):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS
LSLSPGK

Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo presente en la tercera cadena polipeptídica es (**SEQ ID NO: 10**):

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

Una secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**) es (**SEQ ID NO: 11**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQKPK GKAPRRLIYA ASTLDGVPVS RFGSGESGTE
FTLTISLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG GTKVEIK

Una secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD32B (**VH_{CD32B}**) es (**SEQ ID NO: 12**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF
TISRDDAKNS LYLQMNSLR AEDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LTVSS

Una secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD79b (**VL_{CD79b}**) es (**SEQ ID NO: 13**):

DVVMQTSPSL LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS
GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP LTFGGGKLE IK

Una secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**) es (**SEQ ID NO: 14**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM IDPSDSETHY NQKFKDRVMT
TTDTSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARAM GYWGQGT VSS

Por lo tanto, una secuencia preferida para la primera cadena polipeptídica tiene la estructura, en la dirección N-terminal a C-terminal, de: Péptido 1, un dominio CH2-CH3 de una región Fc de IgG, enlazador 1, un dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**), enlazador 2, un dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**), enlazador 3, un dominio de hélice E, un enlazador 4 y un extremo C. La secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido preferido es (**SEQ ID NO: 15**):

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT QSPSSLSASV GDRVTITCRA SQEISGYLSW LQQKPGKAPR
RLIYAASLTLD SGVPSRFSGS ESGTEFTLT SSLQPEDFAT YYCLQYFSYP LTFGGGKVE IKGGSGGGG
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM IDPSDSETHY NQKFKDRVMT

TTDTSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARAM GYWGQGT TTVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA LEKEVAALEK
EVAALEKGGG NS

En **SEQ ID NO: 15**, los residuos de aminoácidos 1-10 son Péptido 1 (**SEQ ID NO: 1**), los residuos de aminoácidos 11-227 son los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo IgG (**SEQ ID NO: 9**), los residuos de aminoácidos 228-235 son el enlazador 1 (**SEQ ID NO: 3**), los residuos de aminoácidos 236-342 son el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**) (**SEQ ID NO: 11**), los residuos de aminoácidos 343-350 son el enlazador 2 (**SEQ ID NO: 4**), los residuos de aminoácidos 351-463 son el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**) (**SEQ ID NO: 14**), los residuos de aminoácidos 464-469 son el enlazador 3 (**SEQ ID NO: 5**), los residuos de aminoácidos 470-497 son el dominio de hélice E promotor de heterodímero (**SEQ ID NO: 7**) y los residuos de aminoácidos 498-502 son el enlazador 4 (**SEQ ID NO: 6**).

Un polinucleótido preferido que codifica la primera cadena polipeptídica tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 23**):

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgggggaccgtcagcttctctccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccg
accctgaggtcacatgcgtggtggtgagcgtgagccagcaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgataatgccaagacaaa
gcccggggaggagcagtagaacagcacgtaccgtggtgagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcca
acaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaccaggtgtacacctgccccatccccggaggagatga
ccaagaaccaggtcagcctgtggtgctgctgcaaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagacaactacaagac
cacgctcccggtgctggactccgacggctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatga
tgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggtaaaagccctccagctccctatggaagacatccagatgacctgctccatctc
cttatctgcctctgtggagatagagtcacatcactgtcgggcaagtcaggaaattagtggttacttaagctggctgcagcagaaaccaggcaagggcccttagacg
cctgatctacgcccgaatccatcttagattctggtgtccatccaggttcagtggtgagctgtggaccgagttcacctcaccatcagcagcctcagcctgaagattt
gcaacctattactgtctacaataatttagttatccgctcaggttcggaggggggaccaaggtggaaataaaaggaggcggtatccggcgggaggccaggttcagct
ggtgcagctgtgagctgaggtgaagaagcctggcgcctcagtgaaaggtctctgcaaggtctctgttacacctttaccagctactggtgaactgggtgcgacaggc
ccctggacaagggctgtgagtgatcggaatgattgatcttcagacagtgaaactactacaatcaaaagttcaaggacagagtcacatgaccacagacacatcc
acgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggcgtgtattactgtgcgagagctatgggtactgggggcaagggaccacgggtcac
cgctctcccgaggatgtggcggtggagaagtgccgcactggagaaagaggtgtgctgttgagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgacgcct
ggagaaaggcgcggaactct

Una secuencia preferida para la segunda cadena polipeptídica es (**SEQ ID NO: 16**):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS
GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCWQGHFPT LTFGGGTLKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAHNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLQMNSLR
EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LTVSSGGCG GKGVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE

En la **SEQ ID NO: 16**, los residuos de aminoácidos 1-112 es el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD79b (**VL_{CD79b}**) (**SEQ ID NO: 13**), los residuos de aminoácidos 113-120 son el enlazador 2 (**SEQ ID NO: 4**), los residuos de aminoácidos 121-236 son el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD32B (**VH_{CD32B}**) (**SEQ ID NO: 12**), los residuos de aminoácidos 237-242 son el enlazador 3 (**SEQ ID NO: 5**) y los residuos de aminoácidos 243-270 son el dominio de hélice K promotor de heterodímero (**SEQ ID NO: 8**).

Un polinucleótido preferido que codifica la segunda cadena polipeptídica tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 24**):

gatgttgatgactcagctctccactctccctgcccgtcacccttgacagccggcctcatctctgcaagtcagtcagcctcttagatagtgatgaaagacata
ttgaattggttcagcagaggccaggccaatctcaaacgcctaatttatctggtgtctaaactggactctgggtcccagacagattcagcggcagtggttcaggc
actgatttcacactgaaaatcagcaggtgaggctgaggatgttggtgttattactgtcggaaggtacacatttccgctcacgttcggcgaggaggaccaagctg
agatcaaggaggcggtatccggcgggcggaggcgaagtcagctgtggagctgaggaggcttggtcaacctggaggatccctgagactctctgtgccgcctc
tggtattcatttttagtgacgcctggatggactgggtccgtcaggccccaggcaaggggcttgagtggtgtgctgaaattagaacaaagctaaaaatcatgcaacata
ctatgctgagctgtgtagggagggttaccatctcaagagatgacgcaaaaacagctgtacctgcaaatgaacagcttaagagctgaagacactgcggtgtatta
ctgtggggctctggcgctgactactggggccaaaggcaccctggtgacgtctctccggaggatgtggcggtggaaaagtgccgcactgaaggagaaagtgct
gcttgaagagaaggtcgccgacttaaggaaaaggtcgacgccctgaagag

Una secuencia preferida para la tercera cadena polipeptídica es **SEQ ID NO: 17**:

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

En la **SEQ ID NO: 17**, los residuos de aminoácidos 1-10 son el Péptido 1 (**SEQ ID NO: 1**) y los residuos de aminoácidos 11-227 son los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos IgG (**SEQ ID NO: 10**).

Un polinucleótido preferido que codifica la tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 25**):

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgccccggggaccgtcagttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccgg
 acccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa
 gccgccccgaggtacacagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcca
 acaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacccgtcccccatccgggaggagatga
 5 ccaagaaccaggtcagcctgagttgcgagtcacaaaggcttctatccagcgacatgcgctggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagac
 cagcctcccgtgctggactccgacggctcctctctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatga
 tgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcctcctcctcctccggtaaa

Según se divulga en el documento WO 2012/018687, para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de
 10 moléculas de diacuerpos, las moléculas pueden modificarse para que contengan una porción de polipéptido de una
 proteína de unión a suero en uno o más de los extremos terminales de la molécula de diacuerpos. De forma más
 preferida, dicha porción de polipéptido de una proteína de unión a suero se instalará en el extremo C-terminal de la
 molécula de diacuerpo. Una porción particularmente preferida de polipéptido de una proteína de unión a suero para
 15 este fin es el dominio de unión de albúmina (ABD) de la proteína G estreptocócica. Se prefiere en particular el
 dominio de unión de albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa de estreptococo G148.

El dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa de estreptococo G148 consiste en 46 residuos
 de aminoácidos que forman un haz de tres hélices estable y tiene una especificidad amplia de unión a albúmina
 (Johansson, M.U. *et al.* (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding
 20 Modules", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). La albúmina es la proteína más abundante en el plasma y tiene una
 semivida de 19 días en seres humanos. La albúmina posee varios sitios de unión de molécula pequeña que le
 permite unirse de forma no covalente a otras proteínas y, por lo tanto, prolongar sus semividas en suero.
 Preferentemente, un enlazador corto (enlazador 5) (tal como GGGs (SEQ ID NO: 18) o GGGNS (SEQ ID NO: 6) se
 25 emplea para separar la hélice E (o la hélice K) de dicha cadena polipeptídica del dominio de unión a albúmina. Un
 dominio de unión a albúmina (ABD) tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19):

LAEAKVLNLR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALID EILALP

II. Diacuerpos Fc CD32B x CD79b alternativos

Una molécula de diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b alternativo se muestra de forma
 esquemática en la **Figura 2**. Dichas moléculas de diacuerpo Fc CD32B x CD79b alternativo poseen tres cadenas
 polipeptídicas, de las cuales la primera y la segunda cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra, y
 la primera y la tercera cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra. Las moléculas de diacuerpo Fc
 35 monovalente biespecífico CD32B x CD79b alternativo difieren en el orden de sus dominios con respecto al orden
 presente en las moléculas de diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b preferido. Sin embargo, como
 en el caso del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido, el dominio VL de la primera cadena polipeptídica del
 diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b alternativo interactúa con el dominio VH de la segunda
 40 cadena polipeptídica del diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b alternativo para formar un primer
 sitio de unión a antígeno funcional que es específico para el primer antígeno (es decir, o bien CD32B o bien CD79b).
 Asimismo, el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo alternativo Fc monovalente biespecífico
 CD32B x CD79b interactúa con el dominio VH de la primera cadena polipeptídica del diacuerpo alternativo Fc
 monovalente biespecífico CD32B x CD79b para formar un segundo sitio de unión a antígeno funcional que sea
 45 específico para el segundo antígeno (es decir, o bien CD79b o bien CD32B, dependiendo de la identidad del primer
 antígeno). Por lo tanto, la selección de los dominios VL y VH de la primera y segunda cadena polipeptídica se
 coordinan, de manera que las dos cadenas de polipéptidos comprendan de forma colectiva dominios VL y VH
 capaces de unirse a CD32B y CD79b (es decir, comprenden VL_{CD32B}/VH_{CD32B} y VL_{CD79b}/VH_{CD79b}) (**Figura 2**). De
 forma colectiva, cada uno de dichos dominios VL y VH, y el enlazador intermedio que los separa, se denomina
 50 dominio de unión a antígeno de la molécula.

La primera cadena polipeptídica de dicho diacuerpo Fc CD32B x CD79b alternativo comprende, en la dirección N-
 terminal a C-terminal, un extremo amino terminal, el dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse o bien
 a CD32B o bien a CD79b (es decir, o bien VL_{CD32B} o bien VL_{CD79b}), un péptido espaciador intermedio (enlazador 2),
 un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (si dicha primera cadena polipeptídica
 55 contiene VL_{CD32B}) o CD32B (si dicha primera cadena polipeptídica contiene VL_{CD79b}), un tercer péptido espaciador
 intermedio que contiene cisteína (enlazador 3), un dominio promotor de heterodímero, un cuarto péptido espaciador
 opcional (enlazador 4) para proporcionar una estabilización mejorada al dominio promotor de heterodímero
 (preferentemente un dominio de hélice E), un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc de IgG
 (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo) y un extremo C-terminal.
 60 Preferentemente, el dominio Fc de la primera cadena polipeptídica provocará la unión reducida a FcγRIA (CD64),
 FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por
 una región Fc de tipo silvestre) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dicho(s)
 receptor(es) (**Figura 2**).

La segunda cadena polipeptídica de dicho diacuerpo Fc CD32B x CD79b alternativo comprende, en la dirección N-
 terminal a C-terminal, un extremo amino terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse o

bien a CD79b o bien a CD32B (es decir, VL_{CD79b} o VL_{CD32B}, dependiendo del dominio VL seleccionado para la primera cadena polipeptídica del diacuerpo), un péptido enlazador intermedio (enlazador 2), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL_{CD79b}) o CD32B (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL_{CD32B}), un péptido espaciador que contiene cisteína (enlazador 3), un dominio promotor de heterodímero (preferentemente un dominio de hélice K) y un extremo C-terminal (**Figura 2**).

La tercera cadena polipeptídica del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido incluye, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo amino terminal, un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc de IgG (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos) que tienen el mismo isotipo que el dominio Fc de la primera cadena polipeptídica y un extremo C-terminal. Preferentemente, el dominio Fc de la tercera cadena polipeptídica provocará una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por una región Fc de tipo silvestre) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dicho(s) receptor(es) (**Figura 2**).

III. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no esterilizadas) y composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que pueden utilizarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Dichas composiciones incluyen una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la presente invención, y en particular cualquiera de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b divulgados en el presente documento o una combinación de dichos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también abarca composiciones farmacéuticas que incluyen dichos diacuerpos Fc CD32B x CD79b y un segundo anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico de antígenos de enfermedad antiinflamatoria o autoinmunitaria) que sea específico para un antígeno de enfermedad antiinflamatoria o autoinmunitaria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización específica, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerado en la Farmacopeia estadounidense u otra farmacopeia reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o portador con el que se administra el tratamiento. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos esterilizados, tales como agua y aceites, incluidos aquellos derivados de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando se administra la composición farmacéutica por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de glicerol y dextrosa acuosas también pueden usarse como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades secundarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adquirir la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, fórmulas de liberación mantenidas y similares.

En general, los ingredientes de composiciones de la invención se administran de forma separada o mezclados conjuntamente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad del agente activo. Cuando la composición se debe administrar mediante infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina esterilizada de grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua esterilizada para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

También se describe un paquete o kit farmacéutico que incluye uno o más recipientes rellenos con dichos diacuerpos Fc CD32B x CD79b divulgados solos o con dicho vehículo farmacéuticamente aceptable. De forma adicional, uno o más agentes terapéuticos o profilácticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el paquete o kit farmacéutico. También se describe un paquete o kit farmacéutico que incluye uno o más recipientes rellenos con uno o más ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. De forma opcional asociada con dicho(s) recipiente(s), puede estar presente una notificación en la forma prescrita por

una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración humana.

También se describen kits que pueden utilizarse en los procedimientos anteriores. En una forma de realización, un kit incluye una o más moléculas de la invención. En otra forma de realización, un kit incluye también uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, útiles para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, en uno o más recipientes. En otra forma de realización, un kit incluye también uno o más anticuerpos que se unen a uno o más antígenos de la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria asociados con la enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria. En determinadas formas de realización, el agente profiláctico o terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico. En otras formas de realización, el agente profiláctico o terapéutico es un tratamiento biológico u hormonal.

IV. Usos de las composiciones de la invención

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la presente invención tienen la capacidad de tratar cualquier trastorno o enfermedad asociado con, o caracterizado por, la expresión de CD79b, o que tiene un componente de célula B en la enfermedad. Por lo tanto, sin limitación, las composiciones farmacéuticas que incluyen dichas moléculas pueden utilizarse en el diagnóstico o el tratamiento de enfermedades o trastornos autoinmunitarios o inflamatorios.

Por lo tanto, la invención puede utilizarse para tratar, evitar, ralentizar la progresión de, y/o aliviar un síntoma de, las enfermedades o los trastornos mediados por células B, incluidos rechazo del injerto, la enfermedad del injerto contra huésped (GvHD) y lupus eritomatoso sistémico (SLE).

V. Procedimientos de administración

Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse para el tratamiento, la prevención y el alivio de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención. En un aspecto preferido, dichas composiciones están purificadas sustancialmente (es decir, sustancialmente exentas de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En una forma de realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, bovino, equino, felino, canino, roedor, etc.) o un primate (por ejemplo, un mono tal como un macaco cangrejero, un ser humano, etc.). En una forma de realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Los diversos sistemas de administración son conocidos y pueden utilizarse para administrar las composiciones de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptor (Véase, por ejemplo, Wu *et al.* (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc.

Los procedimientos de administración de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la invención incluyen, pero sin limitación, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosal (por ejemplo, vías intranasales y orales). En una forma de realización específica, las moléculas de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, la administración pulmonar también puede usarse, por ejemplo, utilizando un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y las publicaciones PCT N° WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 y WO 99/66903.

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención pueden envasarse en un recipiente sellado herméticamente como una ampolla o una bolsita que indica la cantidad de dichas moléculas. En una forma de realización, los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado o concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración adecuada para su administración a un sujeto. Preferentemente, los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco en un recipiente sellado herméticamente a una dosis unitaria de al menos 5 µg, más preferentemente al menos 10 µg, al menos 15 µg, al menos 25 µg, al menos 50 µg, al menos 100 µg, o al menos 200 µg.

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención liofilizados deben almacenarse entre 2 y 8 °C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de las 12 horas, preferentemente dentro de un periodo de 6 horas, dentro de un periodo de 5 horas, dentro de un periodo de 3 horas, o dentro de un periodo de 1 hora después de su reconstitución. En una forma de realización alternativa, los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y la concentración de la

molécula, proteína de fusión, o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención se suministra en un contenedor herméticamente sellado en que las moléculas están presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml, de forma más preferida al menos 2,5 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 50 µg/ml, o al menos 100 µg/ml.

La cantidad de diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención que será eficaz en el tratamiento, la prevención o el alivio de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad del trastorno, y debe decidirse según el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*.

Para los diacuerpos Fc CD32B x CD79b abarcados por la invención, la dosis administrada a un paciente es generalmente de al menos aproximadamente 0,01 µg/kg, al menos aproximadamente 0,05 µg/kg, al menos de aproximadamente 0,1 µg/kg, al menos de aproximadamente 0,2 µg/kg, al menos de aproximadamente 0,5 µg/kg, al menos de aproximadamente 1 µg/kg, al menos de aproximadamente 2 µg/kg, al menos de aproximadamente 5 µg/kg, al menos de aproximadamente 10 µg/kg, al menos de aproximadamente 20 µg/kg, al menos de aproximadamente 50 µg/kg, al menos de aproximadamente 0,1 mg/kg, al menos de aproximadamente 1 mg/kg, al menos de aproximadamente 5 mg/kg, al menos de aproximadamente 10 mg/kg, al menos de aproximadamente 30 mg/kg, al menos de aproximadamente 50 mg/kg, al menos de aproximadamente 75 mg/kg, al menos de aproximadamente 100 mg/kg, al menos de aproximadamente 125 mg/kg, al menos de aproximadamente 150 mg/kg o más del peso corporal del sujeto.

La dosis y la frecuencia de administración de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la invención pueden reducirse o alterarse mejorando la absorción y la penetración en el tejido de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En una forma de realización, la dosis de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención que se administra a un paciente puede calcularse para su uso como un tratamiento con un único agente. En otra forma de realización, los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos de la invención se usan en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosis administrada a un paciente es menor que cuando dichas moléculas del diacuerpo Fc monovalente biespecífico se usan como tratamiento con un único agente.

En una forma de realización específica, puede ser necesario administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y sin limitación, infusión local mediante inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como las membranas de Silastic o fibras. Preferentemente, cuando se administra una molécula de la invención, debe tenerse cuidado de usar materiales en los que la molécula no se absorba.

En otra forma de realización, las composiciones pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Ver Langer (1990) "*New Methods Of Drug Delivery*", Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, en LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327; véase generalmente *ibid.*).

En otra forma de realización más, las composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación mantenida. Cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica puede usarse para producir formulaciones de liberación mantenida que incluyen una o más moléculas de la invención. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.526.938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; Ning *et al.* (196) "*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; y Lam *et al.* (1997) "*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En una forma de realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlado (Véase Langer, anteriormente; 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). En otra forma de realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr una liberación controlada de anticuerpos (véase, por ejemplo, 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, Nueva 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. 7(1):105-112); patente de Estados Unidos N° 5.679.377; patente de Estados Unidos N° 5.916.597; patente de Estados Unidos N° 5.912.015; patente de Estados Unidos N° 5.989.463; patente de Estados Unidos N° 5.128.326; publicación PCT N° WO 99/15154 y publicación PCT N° WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación mantenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil-pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidos (PLA), poli(lactido-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En otra forma de realización más, un sistema de liberación controlada puede disponerse cerca del objetivo terapéutico (por ejemplo, los pulmones), y por lo tanto requiere solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, anteriormente, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). En otra forma de realización, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan según Dunn *et al.* (Véase el documento US 5.945.155). Este procedimiento particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo desde el sistema polimérico. El implante puede tener lugar generalmente en cualquier lugar dentro del cuerpo del paciente con necesidad de tratamiento terapéutico. En otra forma de realización, se usa un sistema de administración mantenida no polimérico, en el que un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto se usa como sistema de administración de fármacos. En el momento del implante en el cuerpo, el disolvente orgánico del implante se disipará, se dispersará o se lixiviará de la composición en el fluido del tejido circundante, y el material no polimérico coagulará gradualmente o precipitará para formar una matriz sólida y microporosa (Véase el documento U.S. 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación mantenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.526.938; las publicaciones internacionales N° WO 91/05548 y 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; y Lam *et al.* (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

En una forma de realización específica en la que la composición es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la invención, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su diacuerpo Fc monovalente biespecífico codificado, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo de forma que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (Véase la patente de Estados Unidos N° 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de un bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biobalística, Dupont), o un revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en asociación con un péptido similar a homeobox que se sabe que penetra en el núcleo (Véase, por ejemplo, Joliot *et al.* (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), etc. De forma alternativa, un ácido nucleico puede introducirse en forma intracelular e incorporarse en el ADN de la célula huésped para la expresión mediante recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la invención puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto se trata con moléculas de la invención una vez por semana entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, de forma más preferida entre aproximadamente 3 a 7 semanas y de forma incluso más preferida aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. En otras formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran una vez al día, dos veces al día, o tres veces al día. En otras formas de realización, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis eficaz de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento en particular.

Una vez que se ha descrito la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención, a menos que se especifique.

Ejemplo 1

Construcción de diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b y diacuerpos de control

La Tabla 1 contiene una lista de secuencias de las cadenas polipeptídicas del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido que se expresaron y purificaron. Además, se produjeron dos diacuerpos de control: uno monovalente biespecífico para CD32B y FITC y el segundo monovalente biespecífico para CD79b y FITC.

Tabla 1

Diacuerpo Fc biespecífico CD32B x CD79b preferido	Polipéptidos sustituyentes (en la dirección N-terminal a C- terminal)
Primera cadena polipeptídica (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
Segunda cadena polipeptídica (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 8
Tercera cadena polipeptídica (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 10

Se descubrió que el diacuerpo Fc CD32B x CD79b descrito anteriormente era capaz de unirse simultáneamente a CD32B y a CD79b. Se descubrió que el diacuerpo de control CD32B x FITC era capaz de unirse simultáneamente a CD32B y a FITC. Se descubrió que el diacuerpo CD79b x FITC de control era capaz de unirse simultáneamente a CD79b y a FITC. El diacuerpo Fc CD32B x CD79b es un heterotrímero compuesto por tres cadenas polipeptídicas (una cadena de cada secuencia de aminoácidos mencionada). Los procedimientos para formar diacuerpos monovalentes biespecíficos se proporcionan en los documentos WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 y WO 2012/162067.

Para demostrar adicionalmente las ventajas de dicho diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido, también se prepararon dos diacuerpos CD32B x CD79b que contienen no Fc. Estos diacuerpos están compuestos por dos cadenas polipeptídicas, y difieren en que uno de los diacuerpos (el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD)) contiene un dominio de unión a albúmina, mientras que el otro (el diacuerpo CD32B x CD79b) no.

Diacuerpo CD32B x CD79b (ABD)

El diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) se forma de una primera cadena polipeptídica que incluye, en la dirección N-terminal a C-terminal, el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**), enlazador 2, el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**), enlazador 3, el dominio de hélice E, enlazador 5, un dominio de unión a albúmina y un extremo C-terminal. La segunda cadena polipeptídica incluye, en la dirección N-terminal a C-terminal, el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD79b (**VL_{CD79b}**), enlazador 2, el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD32B (**VH_{CD32B}**), enlazador 3, el dominio de hélice K y un extremo C-terminal. Las secuencias de aminoácidos de dichos polipéptidos son las siguientes:

Secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica (SEQ ID NO: 20):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA ASTLD SGVPS RFSGSESGTE
FTLTISLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCAS
GYTFTSYWMN WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDT S TSTAYMELRS LRSDDTAVYY
CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAAL KEVAALKEV AALEKEVAAL EKGGSGLAEA KVLANRELDK
YGVSDYYKNL IDNAKSAEGV KALIDEILAA LP

Secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica (SEQ ID NO: 21):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS
GSGTDFTLKI SRVEAEDGVV YYCWQGTHFP LTFGGGKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL
SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLQMNSLRA
EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LTVSSGGCG GKGVAALKEK VAALKEKVAA LKEKVAALKE

Diacuerpo CD32B x CD79b

El diacuerpo CD32B x CD79b difiere del diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) en que no tiene un dominio de unión a albúmina. Por lo tanto, dicho diacuerpo se forma a partir de una primera cadena polipeptídica que comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**), enlazador 2, el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**), enlazador 3, el dominio de hélice E y un extremo C-terminal. La segunda cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD79b (**VL_{CD79b}**), enlazador 2, el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD32B (**VH_{CD32B}**), enlazador 3, el dominio de hélice K y un extremo C-terminal. La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de este diacuerpo es (**SEQ ID NO: 22**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQKPK GKAPRRLIYA ASTLD SGVPS RFSGSESGTE
FTLTISLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVCKAS
GYTFTSYWMN WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTST TSTAYMELRS LRSDDTAVYY
CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAAL KEVAALKEV AALEKEVAAL EK

La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica de este diacuerpo es (**SEQ ID NO: 21**), que se ha presentado anteriormente.

Ejemplo 2**Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b monovalentes biespecíficos inhiben la proliferación de células B primarias humanas**

Para demostrar adicionalmente la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la presente invención para atenuar o inhibir el sistema inmunitario, el diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido que se ha descrito anteriormente se incubó en presencia de células B humanas primarias, obtenidas de dos donantes. Se supervisó la proliferación mediante la absorción de ³H-TdR después de 48 horas en presencia de IgM Fc μ F(ab)₂ antihumano de cabra (5 μ g/ml) y distintas concentraciones de un diacuerpo Fc CD32B x CD79b o un diacuerpo CD32B x CD79b ABD. Los resultados se muestran en la **Figura 3A** (Donante 1) y la **Figura 3B** (Donante 2), e indican una reducción marcada en la proliferación de células B en presencia del diacuerpo Fc CD32B x CD79b o el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD).

Ejemplo 3**Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b monovalentes biespecíficos inhiben la señalización en células B sin tratar y de memoria**

Para demostrar adicionalmente la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la presente invención para atenuar o inhibir la señalización del sistema inmunitario mediante células B, se incubaron células B sin tratar o de memoria purificadas durante 30 minutos en presencia de IgM Fc μ (anti- μ) (30 μ g/ml) antihumano de cabra solo o en presencia adicional del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente. Como se observa en la **Figura 4A** (células B sin tratar) y la **Figura 4B** (células B de memoria), la presencia del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido, el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) o el diacuerpo CD32B x CD79b redujeron todos significativamente la señalización de células B.

Ejemplo 4**Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b monovalentes biespecíficos inhiben la proliferación de células B de un paciente con SLE**

Para demostrar adicionalmente la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la presente invención para atenuar o inhibir la señalización del sistema inmunitario mediante células B, las células B de un paciente que padece lupus eritomatoso sistémico (SLE) se incubaron en presencia de IgM Fc μ (anti- μ) antihumano de cabra solo o en presencia adicional del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente. Se supervisó la proliferación mediante la absorción de ³H-TdR.

Tal como se muestra en la **Figura 5A**, se descubrió que el diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente podía unirse a CD32B y a CD79b. La **Figura 5B**, demuestra que la provisión de IgM (GAH anti- μ) antihumana de cabra provocó una proliferación aumentada de las células B, con respecto al control, y que la administración adicional del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente o el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) inhiben significativamente la medida de dicha proliferación.

Se descubrió que la capacidad del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente o del diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) para disminuir la medida de la proliferación de células B de individuos que padecen SLE era

independiente del estado de la enfermedad. La medida de la reducción de la proliferación de células B en pacientes con SLE activo o inactivo era de aproximadamente del 40 % con respecto a la proliferación observada en presencia de la IgM (GAH anti- μ) antihumana de cabra sola, y por lo tanto, era independiente del estado de la enfermedad (**Figura 5C**). La **Figura 5C** asimismo demuestra que el diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido proporcionó una mayor inhibición que el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD).

Ejemplo 5

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b monovalentes biespecíficos modulan las respuestas de células B *in vivo*

Para demostrar aún más la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la presente invención para atenuar o inhibir la señalización del sistema inmunitario mediante células B, se inyectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas en ratones NSG inmunodeficientes (Agliano, A. *et al.* (2008) "Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rgamma Null 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(Null) 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 γ (Null) (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). Se les administró a los animales un vehículo de control (100 μ l de solución salina tamponada con fosfatos (PBS)/animal, q3d x 2 semanas), el diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido mencionado anteriormente (100 μ l/animal, q3d x 2 semanas), o un diacuerpo CD32B x CD79b (compuesto de solamente dos cepas de polipéptidos y que contienen un dominio de unión a albúmina). El plasma se analizó mediante ELISA el día 7 y el día 14 para determinar la presencia de IgM humana (**Figura 6A**) o IgG humana (**Figura 6B**), indicadores del inicio de la enfermedad de injerto contra huésped.

Los ratones que recibieron el vehículo de control mostraron altos niveles de IgM humana y de IgG humana. Por el contrario, dichos anticuerpos no se detectaron esencialmente en ratones que habían recibido el diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente (**Figura 6A y Figura 6B**). Los ratones que habían recibido el diacuerpo CD32B x CD79b mostraron niveles reducidos de IgM humanas y IgG humanas, en comparación con los ratones que recibieron el vehículo de control, pero dichos niveles, sin embargo, eran sustancialmente mayores que los que recibieron el diacuerpo Fc CD32B x CD79b. Estos descubrimientos demuestran que los diacuerpos CD32B x CD79b monovalentes biespecíficos tienen utilidad y eficacia terapéutica, pero que el diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente de la presente invención es inesperadamente superior a dichos diacuerpos no Fc y posee una utilidad y una eficacia terapéutica incluso superiores (**Figura 6A y Figura 6B**).

Ejemplo 6

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b monovalentes biespecíficos disminuyen la GvHD xenogénica en ratones

Para demostrar aún más la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b de la presente invención para atenuar o inhibir la señalización del sistema inmunitario mediante células B, se inyectó PBMC humana (5×10^6 células, inyectadas por vía intravenosa) en ratones NSG NOD.scid IL2rnull inmunodeficientes. Los animales recibieron un vehículo de control (100 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS)/animal), el diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido descrito anteriormente (a 5 mg/kg o a 10 mg/kg) o un anticuerpo anti-CD20 (rituximab; 5 mg/kg; dosificado una vez). La supervivencia acumulativa de los ratones se midió con el tiempo. Como se muestra en la **Figura 7**, los animales que recibieron una dosis del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido mostraron una supervivencia significativamente mejorada; con respecto a los ratones que recibieron control de PCS o rituximab.

Listado de Secuencias

5 <110> MacroGenics, Inc. Johnson, Leslie S Huang, Ling Shah, Kalpana Bonvini, Ezio Moore, Paul Chen, Wei
 <120> Diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos que son capaces de unirse a CD32B y CD79b y usos de los
 mismos
 <130> 1301.0110PCT
 <150> US 61/864.217
 <151> 09/08/2013
 10 <150> US 61/866.416
 <151> 15/08/2013
 <150> US 61/869.519
 <151> 23/08/2013
 <150> US 61/907.525
 15 <151> 22/11/2013
 <160> 25
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 25 <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 2

 Ala Pro Ser Ser Ser
 1 5
 35 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

 Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
 1 5
 40 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador 2
 <400> 4

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5
 50 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador 3
 <400> 5

 Gly Gly Cys Gly Gly Gly
 1 5
 60 <210> 6

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Enlazador 4
 <400> 6

 Gly Gly Gly Asn Ser
 1 5

 10 <210> 7
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Dominio de hélice E promotor de heterodímero
 <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

 20 <210> 8
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Dominio de hélice K promotor de heterodímero
 <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

 30 <210> 9
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo presente en la primera
 cadena polipeptídica
 <400> 9

ES 2 720 730 T3

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

- 5 <210> 10
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo presente en la tercera
 cadena polipeptídica
 <400> 10

ES 2 720 730 T3

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 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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B

<400> 11

10

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

ES 2 720 730 T3

<210> 12
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que se une a 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          30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50          55          60

Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser
65          70          75          80

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
```

10 <210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que se une a 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 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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100         105         110
```

20 <210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b
 <400> 14

ES 2 720 730 T3

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	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	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

- 5 <210> 15
- <211> 502
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia preferida para la primera cadena polipeptídica
- <400> 15

ES 2 720 730 T3

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

ES 2 720 730 T3

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 Gly
 325 330 335
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly 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 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 Gly Asn Ser
 500

<210> 16

<211> 270

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para la segunda cadena polipeptídica

<400> 16

ES 2 720 730 T3

```

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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly 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> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para la tercera cadena polipeptídica

<400> 17

ES 2 720 730 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador 5

<400> 18

10

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 19

<211> 46

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de unión a albúmina (ABD) preferido

<400> 19

ES 2 720 730 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica del diacuerpo CD32B x CD79b (ABD)

<400> 20

10

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 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

ES 2 720 730 T3

```

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 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 Gly 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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica del diacuerpo CD32B x CD79b (ABD)

<400> 21

10

```

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

```

ES 2 720 730 T3

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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly 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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica del diacuerpo CD32B x CD79b

<400> 22

10

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

ES 2 720 730 T3

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 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 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

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido preferido que codifica la cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 15

<400> 23

10

gacaaaactc acacatgccc accgtgccc	gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc	60
ttctcttctc ccccaaaacc caaggacacc	ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac	cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag	ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
cgtgtggtca gcgtctctac cgtcctgcac	caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc	cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc	ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	420

ES 2 720 730 T3

```

aaccagggtca gcctgtggtg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      480
tgaggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc      540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg      600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      660
ctctccctgt ctccgggtaa agcccccttc agctccccta tggaagacat ccagatgacc      720
cagtctccat cctccttata tgctctgtg ggagatagag tcaccatcac ttgtcgggca      780
agtcaggaaa ttagtggtta cttaaagctgg ctgcagcaga aaccaggcaa ggcccctaga      840
cgcctgatct acgccgcatc cacttttagat tctggtgtcc catccagggt cagtggcagt      900
gagtctggga ccgagttcac cctcaccatc agcagccttc agcctgaaga ttttgcaacc      960
tattactgtc tacaatatct tagttatccg ctcacgttcg gaggggggac caaggtggaa     1020
ataaaaggag gcggatccgg cggcggaggc caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag     1080
gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc     1140
agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg     1200
attgatcctt cagacagtga aactcactac aatcaaaagt tcaaggacag agtcaccatg     1260
accacagaca catccacgag cacagcctac atggagctga ggagcctgag atctgacgac     1320
acggccgtgt attactgtgc gagagctatg ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc     1380
gtctcctccg gaggatgtgg cggtaggaga gtggccgcac tggagaaaaga ggttgctgct     1440
ttggagaagg aggtcgtctc acttgaaaag gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg     1500
aactct                                           1506

```

<210> 24

<211> 810

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido preferido que codifica la cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 16

<400> 24

10

```

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttgga gacggcctcc      60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg     120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac     180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc     240
agcaggggtg aggctgagga tgttgggggt tattactgct ggcaaggtag acattttccg     300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg cggcggaggc     360
gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc     420

```

ES 2 720 730 T3

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc	480
ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtt accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt	600
ctgtacctgc aaatgaacag cttaaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctcctccgg aggatgtggc	720
ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgcgcga	780
cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag	810

<210> 25

<211> 681

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido preferido que codifica la cadena polipeptídica de SEQ ID NO: 17

<400> 25

10

gacaaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc	60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	420
aaccagggtca gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc	540
gacggctcct tcttctctct cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc	660
ctctccctgt ctccgggtaa a	681

REIVINDICACIONES

1. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, en el que dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico es capaz de unirse de forma específica a un epítipo de CD32B y a un epítipo de CD79b, y posee un dominio Fc de IgG, en el que el diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende una primera cadena polipeptídica, una segunda cadena polipeptídica y una tercera cadena polipeptídica, en el que dicha primera y segunda cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra, y dicha primera y tercera cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra, y en el que:

A. la primera cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende:

(1) un subdominio (1A), que comprende un péptido que contiene cisteína (**SEQ ID NO: 1**) y

(2) un subdominio (1B), que comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG que tiene dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG;

ii. un dominio 2, que comprende:

(1) un subdominio (2A), que comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VL_{CD32B}) (**SEQ ID NO: 11**) y

(2) un subdominio (2B), que comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VH_{CD79b}) (**SEQ ID NO: 14**),

en el que dichos subdominios (2A) y (2B) están separados uno de otro mediante un enlazador peptídico (enlazador 2) (**SEQ ID NO: 4**);

iii. un dominio 3, en la que dicho dominio 3 es un dominio de hélice E (**SEQ ID NO: 7**) o un dominio de hélice K (**SEQ ID NO: 8**), en la que dicho dominio 3 está separado del dominio 2 mediante un enlazador peptídico (**SEQ ID NO: 5**); y

iv. un péptido espaciador C-terminal (**SEQ ID NO: 6**);

B. la segunda cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal:

i. un dominio 1, que comprende:

(1) un subdominio (1A), que comprende un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VL_{CD79b}) (**SEQ ID NO: 13**); y

(2) un subdominio (1B), que comprende un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VH_{CD32B}) (**SEQ ID NO: 12**);

en el que dichos subdominios (1A) y (1B) están separados uno de otro mediante un enlazador peptídico (enlazador 2) (**SEQ ID NO: 4**);

ii. un dominio 2, en la que dicho dominio 2 es un dominio de hélice K (**SEQ ID NO: 8**) o un dominio de hélice E (**SEQ ID NO: 7**), en la que dicho dominio 2 está separado de dicho dominio 1 mediante el enlazador peptídico (**SEQ ID NO: 5**); y en la que dicho dominio 3 de la primera cadena polipeptídica y dicho dominio 2 de la segunda cadena polipeptídica no son ambos dominios de hélice E ni ambos dominios de hélice K; y

C. la tercera cadena polipeptídica comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un dominio 1 que comprende:

(1) un subdominio (1A), que comprende un péptido que contiene cisteína (**SEQ ID NO: 1**); y

(2) un subdominio (1B), que comprende una porción polipeptídica de un dominio Fc de IgG que tiene dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG;

y en el que:

(a) dichas porciones polipeptídicas de los dominios Fc de IgG de dichas primera y tercera cadena polipeptídica forman dicho dominio Fc de IgG;

(b) dicho dominio VL de la primera cadena polipeptídica y dicho dominio VH de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión de antígeno capaz de unirse de forma específica a un epítipo de CD32B; y

(c) dicho dominio VH de la primera cadena polipeptídica y dicho dominio VL de dicha segunda cadena polipeptídica forman un dominio de unión de antígeno capaz de unirse de forma específica a un epítipo de CD79b.

2. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la reivindicación 1, en el que dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena polipeptídica comprende una secuencia diferente de la de dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena polipeptídica.

3. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de reivindicación 1, en el que dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 9**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 10**.

4. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de reivindicación 1, en el que dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 10**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena polipeptídica tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 9**.

5. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que dicho dominio 1 de dicha primera cadena polipeptídica y/o dicho dominio 1 de dicha tercera cadena polipeptídica comprenden una secuencia de CH2-CH3 variante que muestra una unión alterada a un receptor Fcγ.

6. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho dominio 3 de dicha primera cadena polipeptídica incluye una hélice E (**SEQ ID NO: 7**), y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena polipeptídica incluye una hélice K (**SEQ ID NO: 8**).

7. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho dominio 3 de dicha primera cadena polipeptídica incluye una hélice K (**SEQ ID NO: 8**), y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena polipeptídica incluye una hélice E (**SEQ ID NO: 7**).

8. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, en el que dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico es capaz de unirse de forma específica a un epítipo de CD32B y a un epítipo de CD79b, y posee un dominio Fc de IgG, en el que dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico comprende:

(1) una primera cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 15**;

(2) una segunda cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 16**; y

(3) una tercera cadena polipeptídica que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 17**, en el que los residuos de aminoácidos 1-10 de dicha tercera cadena polipeptídica son el Péptido 1 (**SEQ ID NO: 1**) y los residuos de aminoácidos 11-227 de dicha tercera cadena polipeptídica son los dominios de CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpo IgG (**SEQ ID NO: 10**);

en el que dicha primera y segunda cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra mediante una primera unión de disulfuro, y dicha primera y tercera cadena polipeptídica se unen de forma covalente una a otra mediante una segunda unión de disulfuro.

9. Una composición farmacéutica que comprende el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo fisiológicamente aceptable.

10. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o de la composición farmacéutica de la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno inflamatorio.

11. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad o dicho trastorno inflamatorio es una enfermedad autoinmunitaria.

12. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en el que dicha enfermedad autoinmunitaria es lupus eritomatoso sistémico (SLE).

13. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad o dicho trastorno inflamatorio es una enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).

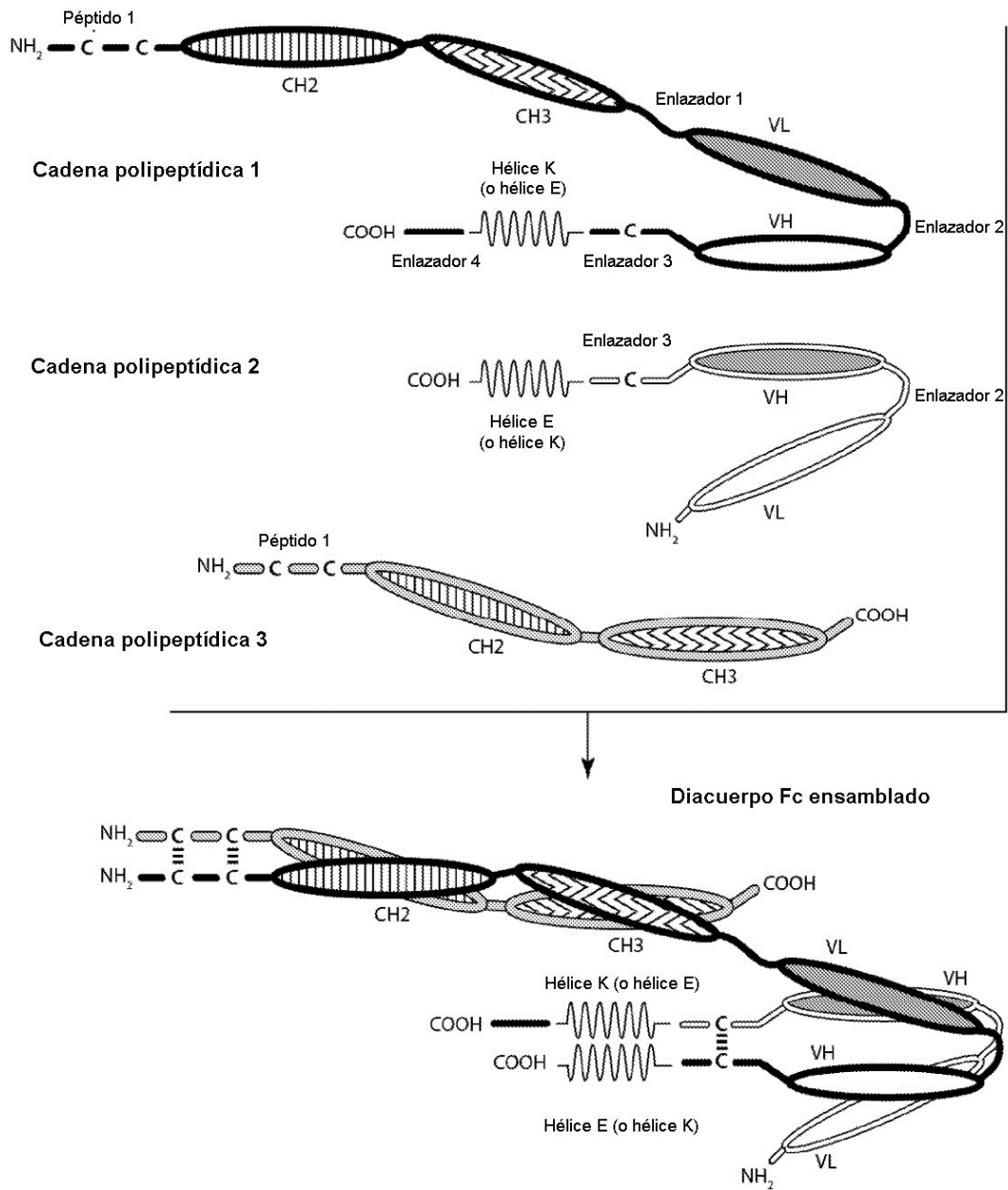


Figura 1

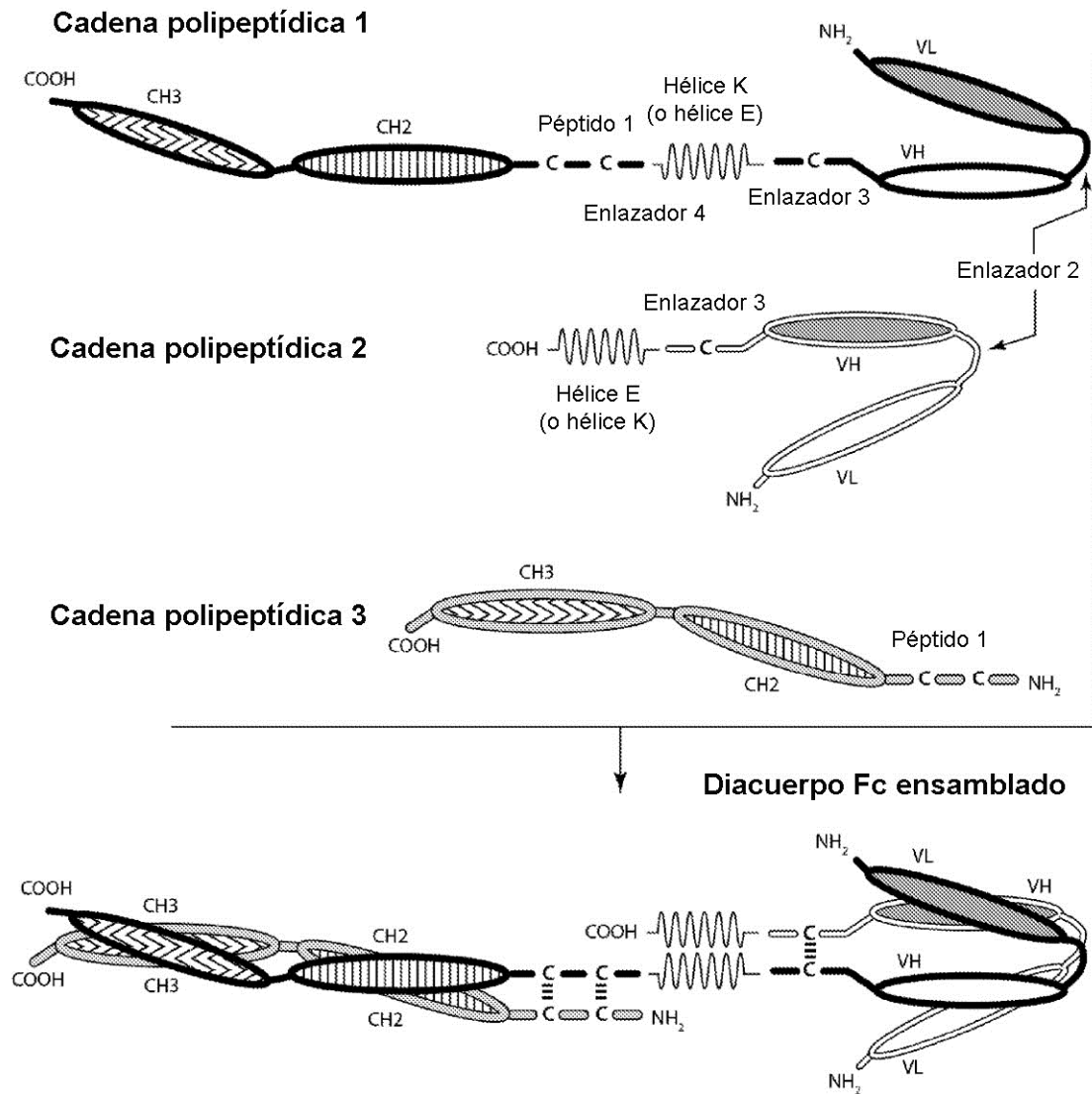


Figura 2

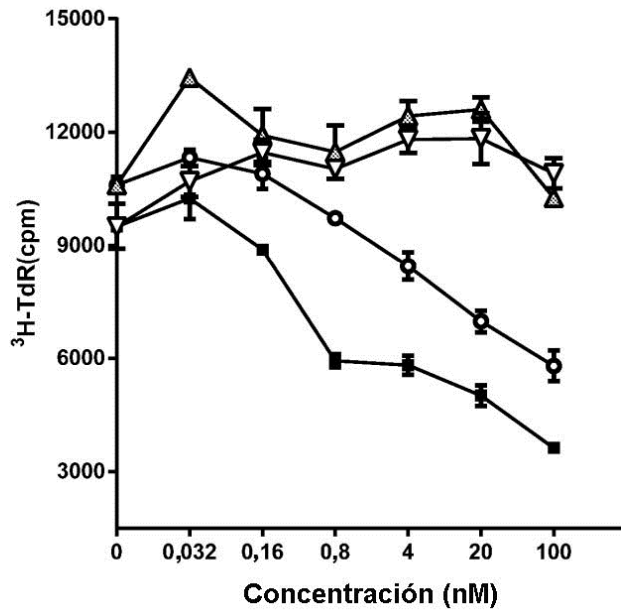


Figura 3A

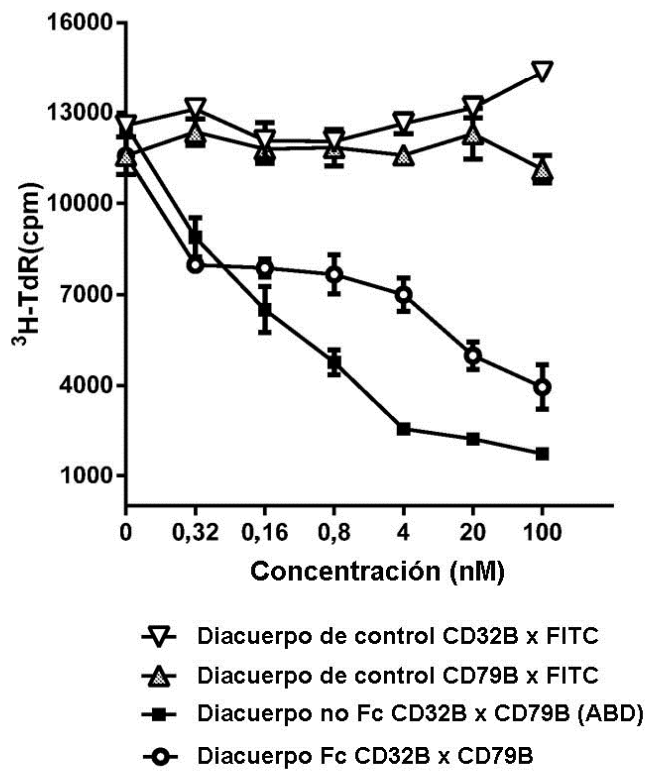


Figura 3B

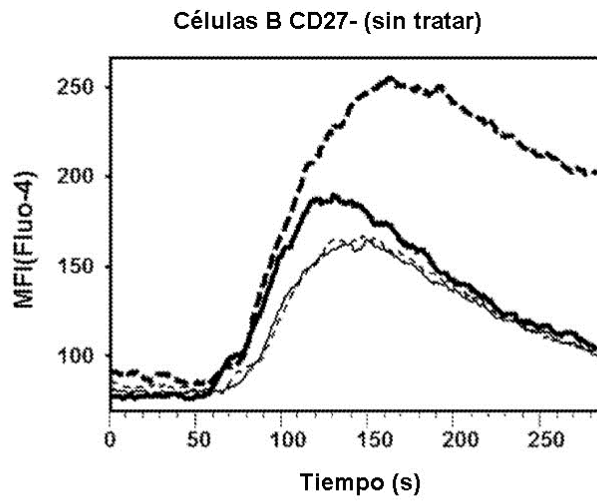
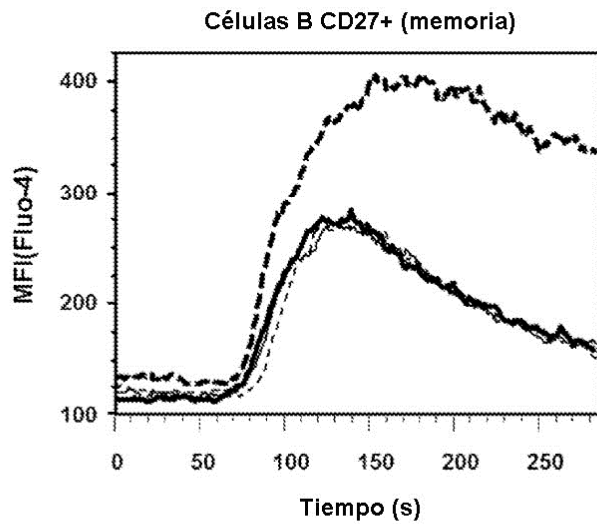


Figura 4A



- GAH IgM μ (anti- μ); 30 $\mu\text{g/ml}$
- Diacuerpo no Fc + CD32B X CD79B
- ... Diacuerpo no Fc + CD32B X CD79B (ABD)
- Diacuerpo Fc + CD32B X CD79B

Figura 4B

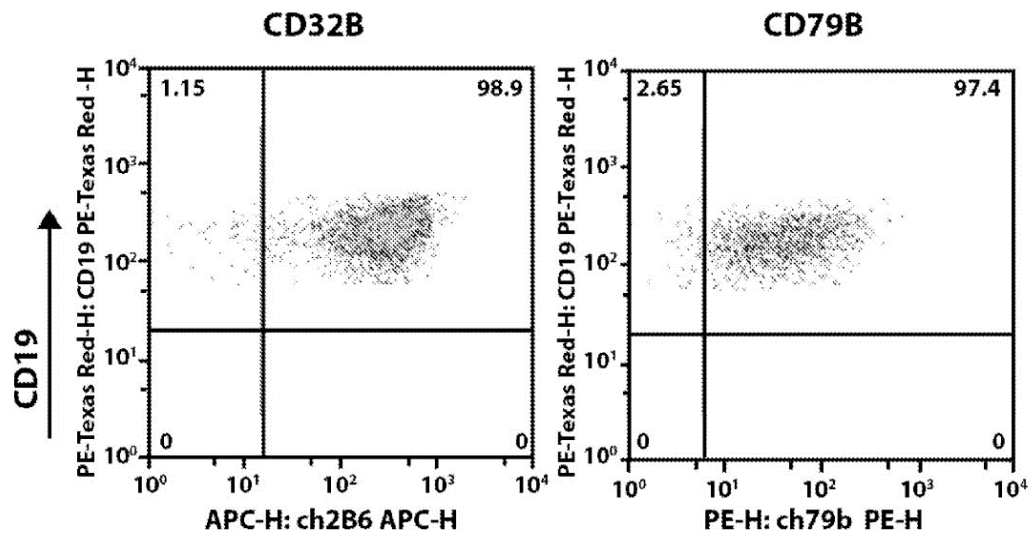


Figura 5A

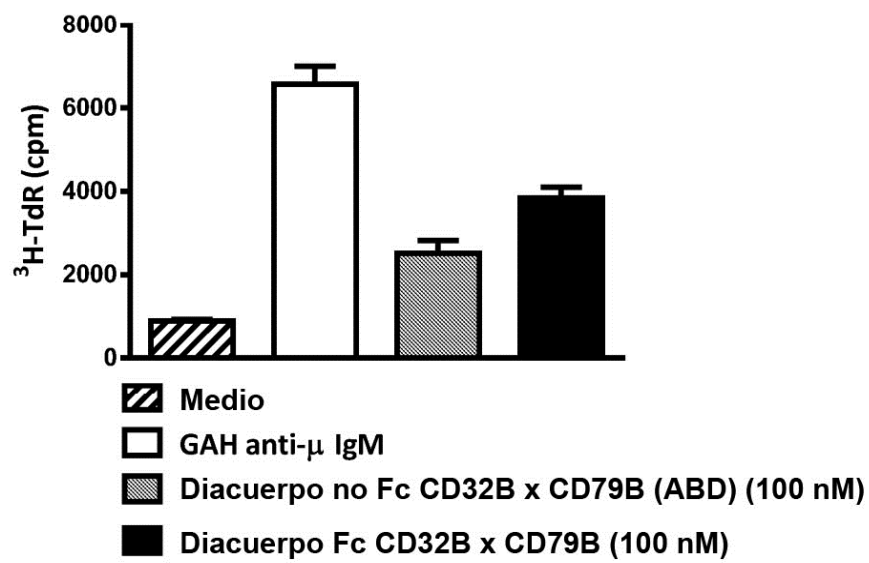


Figura 5B

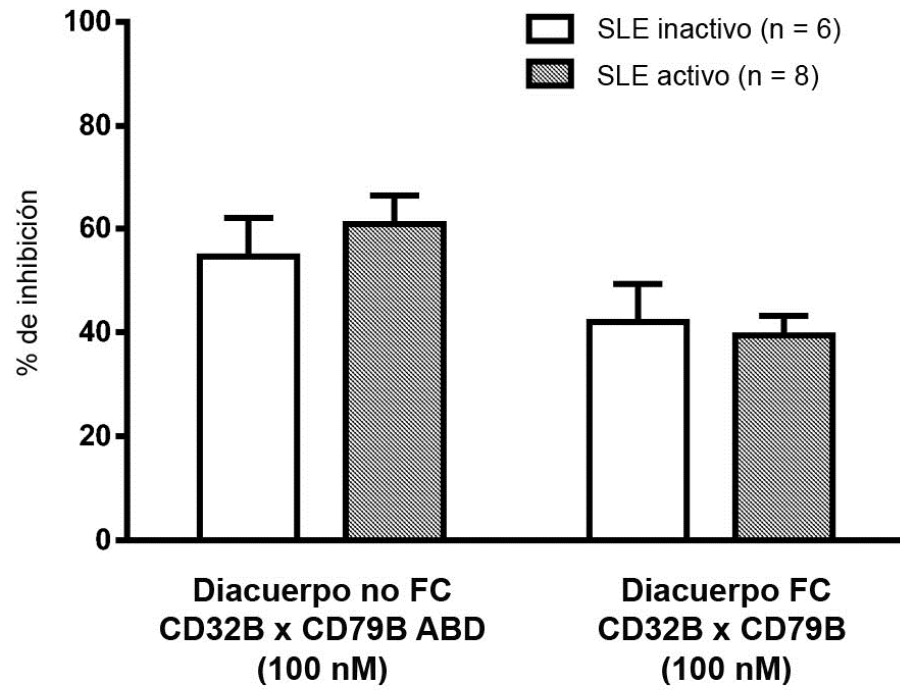


Figura 5C

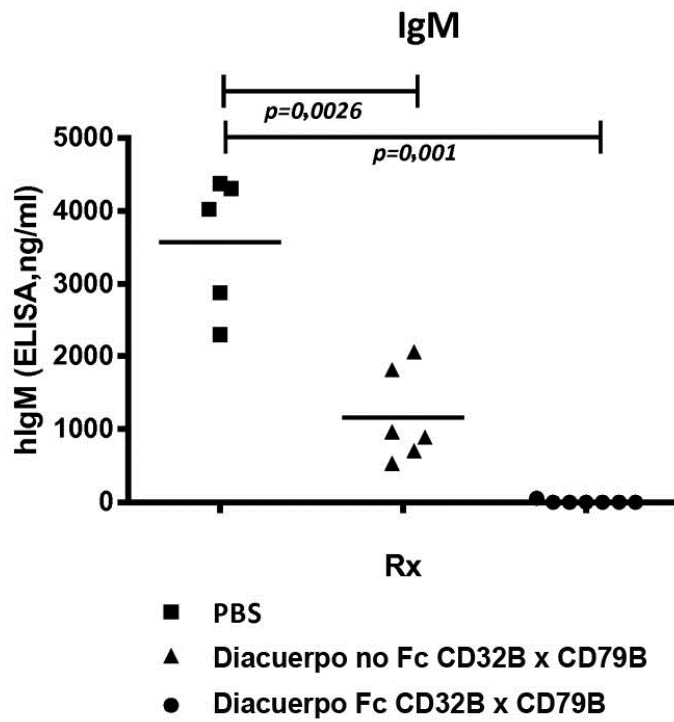


Figura 6A

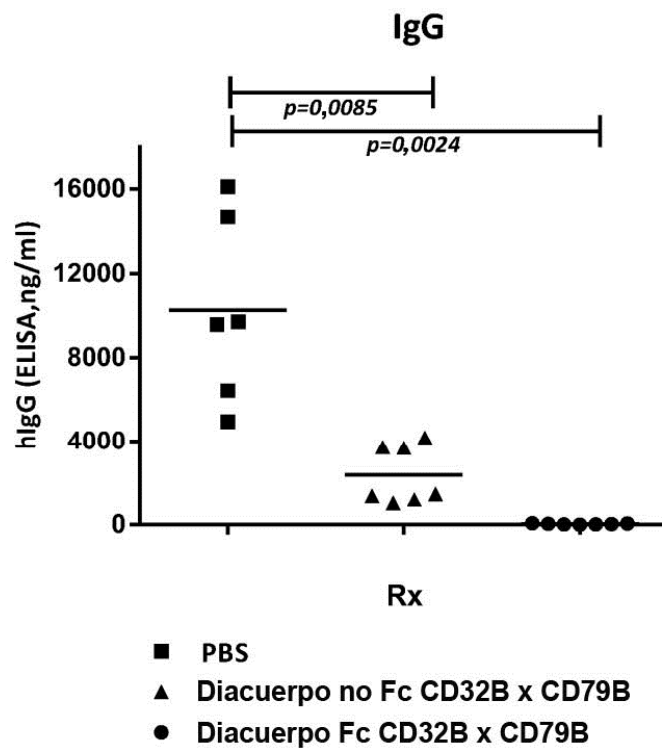


Figura 6B

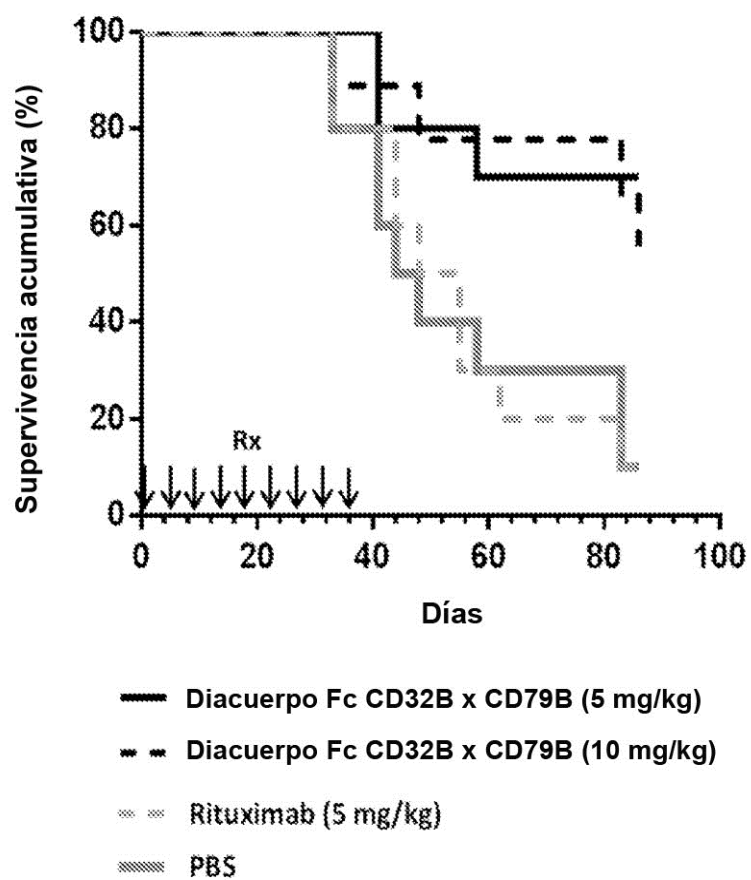


Figura 7