(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0021614
(43) 공개일자 2025년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 37/02* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/283 (2013.01)
A61P 29/00 (2023.02)
(21) 출원번호 10-2025-7002822(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년06월06일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7034973
원출원일자(국제) 2017년06월06일
심사청구일자 2022년11월01일
(85) 번역문제출일자 2025년01월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/036079
(87) 국제공개번호 WO 2017/214096
국제공개일자 2017년12월14일
(30) 우선권주장
62/346,717 2016년06월07일 미국(US)
62/432,328 2016년12월09일 미국(US)

(71) 출원인
마크로제닉스, 인크.
미국 메릴랜드주 20850 록빌 메디칼 센터 드라이브 9704
(72) 발명자
첸 웨이
미국 메릴랜드 20878 게이더스버그 그랜드 스트리트 404
무어 폴 에이.
미국 메릴랜드 20878 노스 포토맥 터얼리 코오트 10
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

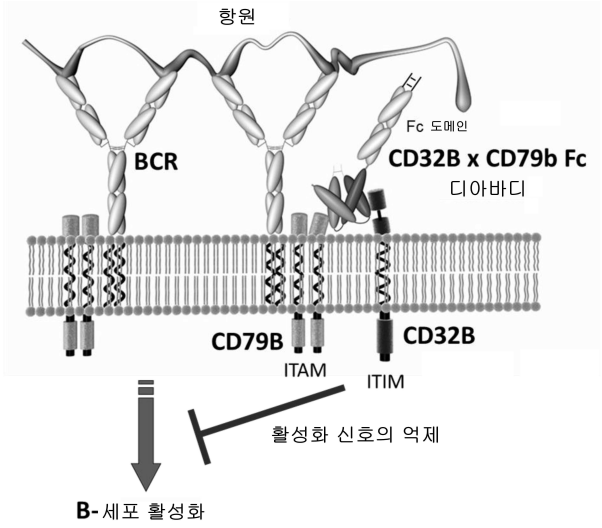
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **염증성 질환 및 장애의 치료에서 CD32B x CD79B-결합 분자의 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 CD32B의 에피토프에 특이적인 결합 부위와 CD79B의 에피토프에 특이적인 결합 부위를 지니며, 따라서 CD32B와 CD79B에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 결합 분자를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 특히 이중특이적 항체 또는 이중특이적 디아바디(및 특히 Fc 도메인을 추가로 포함하는 이러한 디아바디)인 이러한 분자에 관한 것이다. 본 발명은 염증성 질환이나 상태의 치료에서 이러한 분자의 사용, 및 이러한 분자를 함유하는 약학적 조성물의 사용에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 37/02 (2018.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/626 (2013.01)
(72) 발명자
판디야 내미쉬 바라트
미국 메릴랜드 21029 클라크스빌 홀리 그릭 레인 5107
본비니 에지오
미국 메릴랜드 20854 포토맥 파우더 혼 드라이브 11136
위깅턴 존 마크
미국 메릴랜드 20850 록빌 메디컬 센터 드라이브 9704 마크로제닉스, 인크. 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에 투여하는 단계를 포함하는 염증 질환 또는 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 3 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주당 1회 용량의 투약 섭생으로 투여되는, 방법.

청구항 2

CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에 투여하는 단계를 포함하는 면역 반응을 감소시키거나 또는 억제하는 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 3 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주당 1회 용량의 투약 섭생으로 투여되는, 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 3 mg/kg의 용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 10 mg/kg의 용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 30 mg/kg의 용량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투약 섭생은 2주마다 1회 용량(Q2W)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투약 섭생은 3주마다 1회 용량(Q3W)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투약 섭생은 4주마다 1회 용량(Q4W)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 결합하는 이중특이적 항체이거나, 또는 상기 이중특이적 항체의 CD32B- 및 CD79B-결합 도메인을 포함하는 분자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디는 CD32B x CD79B Fc 디아바디인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 자가면역 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 애디슨병, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환, 중증근무력증, 크론병, 피부근염, 가족성 선종성 용종증, 이식편 대 숙주병(GvHD), 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 홍반성 루프스, 다발성 경화증(MS); 악성 빈혈, 라이터 증후군, 류마티스 관절염(RA), 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스(SLE), 제1형 당뇨병, 원발성 혈관염(예를 들어, 류마티스 다발근통, 거대세포 동맥염, 베체트병), 천포창, 시신경척수염, 항-NMDA 수용체 뇌염, 길랑바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 그레이브스 안병증, IgG4 관련 질환, 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP), 및 궤양성 대장염으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 GvHD, RA, MS, 또는 SLE인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린의 혈청 수준이 상기 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 후 제36일까지 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 면역글로불린은 IgM, IgA 또는 IgG인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서, BCR-매개 말초 B-세포 활성화가 상기 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 후 24시간까지 억제되며, 상기 B-세포 활성화는 생체외 칼슘 동원 분석에 의해 결정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 BCR-매개 B-세포 활성화는 적어도 50%까지 억제되며, 상기 억제는 적어도 6일 동안 지속되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 6시간 후에 말초 B-세포 상의 CD32B x CD79B 결합 부위의 적어도 20%가 점유되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서,

(A) B-세포 상의 CD40의 발현이 하향조절되고; 및/또는

(B) CD40 매개 IgG 분비가 억제되는

것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상은 인간인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는:

(A) SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD32B} 도메인;

(B) SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD32B} 도메인;

(C) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD79B} 도메인;

(D) SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD79B} 도메인

을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는:

(A) SEQ ID NO:39의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩타이드 사슬;

(B) SEQ ID NO:41의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩타이드 사슬; 및

(C) SEQ ID NO:44의 아미노산 서열을 포함하는 제3 폴리펩타이드 사슬

을 포함하는 Fc 디아바디인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조:**

[0002] 본 출원은 미국 특허출원 일련번호 62/346,717(2016년 6월 7일에 출원; 계류 중) 및 62/432,328(2016년 12월 9일에 출원; 계류 중)의 우선권을 주장하며, 각 출원은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **서열목록에 대한 참조:**

[0004] 본 출원은 37 C.F.R. 1.821 et seq.에 의해 하나 이상의 서열 목록을 포함하고, 이것은 컴퓨터로 판독 가능한 매체로 개시되며(파일명:1301_0145PCT_ST25.txt, 2017년 5월 19일 생성, 59,748바이트의 크기), 이 파일은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0005] **기술분야:**

[0006] 본 발명은 CD32B의 에피토프에 특이적인 결합 부위와 CD79B의 에피토프에 특이적인 결합 부위를 지니며, 따라서 CD32B와 CD79B에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 결합 분자를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 특히 이중특이적 항체 또는 이중특이적 디아바디(및 특히 Fc 도메인을 더 포함하는 이러한 디아바디)인 이러한 분자에 관한 것이다. 본 발명은 염증성 질환 또는 상태의 치료에서 이러한 분자의 사용, 및 이러한 분자를 함유하는 약학적 조성물의 사용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] **I. Fcγ 수용체 및 CD32B**

[0008] 항체-항원 복합체와 면역 시스템의 세포들과의 상호작용은 항체-의존적 세포독성, 비만 세포 탈과립화 및 식세포 작용과 같은 이펙터 기능으로부터 조절 림프구 증식 및 항체 분비와 같은 면역조절 신호에 이르기까지 광범위한 반응을 초래한다. 이들 상호작용은 모두 항체 또는 면역 복합체의 Fc 도메인과 조혈 세포 상의 특수한 세포-표면 수용체와의 결합을 통해 시작된다. 항체 및 면역 복합체들에 의해 야기된 세포 반응의 다양성은 Fc 수용체들의 구조적 이질성으로부터 유발된다. Fc 수용체들은 아마도 세포내 신호화를 매개하는 구조적으로 관련된 리간드 결합 도메인들을 공유한다.

[0009] Fc 수용체들은 단백질의 면역글로불린 유전자 슈퍼패밀리의 구성원들이다. 그것들은 면역글로불린 분자의 Fc 부분에 결합할 수 있는 표면 당단백질들이다. 그 패밀리의 각 구성원은 Fc 수용체의 α 사슬에 있는 인지 도메인을 통해 하나 또는 그 이상의 이소타입의 면역글로불린들을 인식한다.

[0010] Fc 수용체는 면역글로불린 하위유형에 대한 특이성에 의해 정의된다(Ravetch J.V. *et al.* (1991) "*Fc Receptors*," Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S. *et al.* (2001) "*Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macro-phage 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 Re-dux*," *Cell*, 78(4): 553-60 참조).

[0011] IgG 항체들에 결합할 수 있는 Fc 수용체들은 "FcγR"로 언급된다. 이 패밀리의 각 구성원은 면역글로불린-관련 도메인의 C2-세트에 관련된 세포외재성 도메인들, 단일 막 스패닝 도메인 및 가변적인 길이의 세포질내 도메인을 가지는, 내재성 막 당단백질이다. 3가지의 FcγR이 알려져 있는데, FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) 및 FcγRIII(CD16)로 표시된다. 3가지 수용체는 구별되는 유전자들에 의해 코드화되지만, 3가지 패밀리 구성원들 사이의 광범위한 상동성은 그것들이 아마도 공통된 조상으로부터 유전자 복제에 의해 발생했음을 시사한다.

[0012] FcγRII(CD32) 단백질은 단량체 Ig에 대한 낮은 친화성(10^6 M^{-1})으로 인해 복합 IgG에만 결합하는 40KDa의 내재성 막 당단백질이다. 이 수용체는 가장 광범위하게 발현되는 FcγR로, 단핵세포, 마크로파지, B 세포, NK 세포, 호중구, 비만 세포 및 혈소판을 포함하여 모든 조혈 세포상에 존재한다. FcγRII는 그것의 면역글로불린 결합 사슬에 단지 2개의 면역글로불린-유사 영역을 가지고 있고 따라서 IgG에 대해 FcγRI보다 훨씬 더 낮은 친화성을 가진다. 3가지의 인간 FcγRII 유전자(FcγRIIA(CD32A), FcγRIIB(CD32B) 및 FcγRIIC(CD32C))가 있고, 그것들은 모두 응집체 또는 면역 복합체에서 IgG와 결합한다.

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

[0014] 이러한 활성화 및 억제 신호들은 두 가지 모두 IgG Fc 영역에 대한 결찰 후의 FcγR을 통해 변환된다. 전혀 다른 이들 반대되는 기능은 상이한 수용체 아형들 중에서도 구조적 차이로부터 유발된다. 수용체의 세포질 신호화 도메인 내에 있는 2개의 구별되는 도메인들은 상이한 반응에 대응하여 면역수용체 타이로신-기초 활성화 모티프(ITAM) 또는 면역수용체 타이로신-기초 억제 모티프(ITIM)라고 불린다. 이들 구조에 대한 상이한 세포질 효소들의 충원은 FcγR-매개된 세포 반응의 결과에 영향을 미친다. ITAM-함유 FcγR 복합체는 FcγRI, FcγRIIA 및 FcγRIIIA를 포함하는 반면, ITIM-함유 복합체는 FcγRIIB 만을 포함한다.

[0015] 인간 호중구는 FcγRIIA 유전자를 발현한다. 면역 복합체 또는 특정 항체 교차결합을 통해 뭉쳐진 FcγRIIA는 ITAM 인산화를 촉진시키는 수용체-결합 키나제와 함께 ITAM을 응집시키는 역할을 한다. ITAM 인산화는 Syk 키나제에 대한 도킹 부위로서 작용하고, Syk 키나제의 활성화는 하류 기질들(예컨대 PI_3K)의 활성화를 초래한다. 세포 활성화는 전-염증성 매개자의 방출을 유발한다.

[0016] FcγRIIB 유전자는 B 림프구 상에서 발현된다; 그것의 세포외재성 도메인은 FcγRIIA에 96% 동일하고 구별할 수 없는 방식으로 IGg 복합체에 결합한다. FcγRIIB의 세포질 도메인 중의 ITIM의 존재는 FcγR의 이런 억제성 하위부류를 규정한다. 이 억제의 분자적 기초는 이미 수립되어 있다. FcγRIIB가 면역 복합체의 IgG 면역글로불린의 Fc 영역에 의해 활성화 수용체에 공-결찰될 때, FcγRIIB ITIM은 인산화되고 이노시톨 폴리포스페이트 5'-포스파타제(SHIP)의 SH2 도메인을 끌어들이며, 그것은 ITAM-함유 FcγR-매개된 타이로신 키나제 활성화의 결과로서 방출된 포스포이노시톨 메신저를 가수분해하여, 결과적으로 세포 내 Ca^{++}의 유입을 방지한다. 이로써 이러한 FcγRIIB의 교차 결합 및 수용체 활성화는 활성화 수용체의 활성을 약화시키고, 그로써 세포 반응성을 억제한다. 따라서, B-세포 상에서, B-세포 활성화, B-세포 증식 및 항체 분비는 약화되거나 무산된다. 따라서, 항원 검출이 시작될 때, 단량체 IgG-항원 결합이 발생하고, 결합된 항체의 Fc 영역은 활성화 FcγR의 ITAM에 결합하여 면역 시스템의 활성화를 매개한다. 숙주의 반응이 진전됨에 따라, FcγRIIB에 결합할 수 있는 (이로써 이러한 복합체를 활성화 수용체와 공-결찰할 수 있는) 멀티머 IgG-항원 면역 복합체 형태는 면역 반응의 약화

및 궁극적인 중단을 유도한다(예컨대 미국특허 8,445,645; 8,217,147; 8,216,579; 8,216,574; 8,193,318; 8,192,737; 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 및 미국 특허공보 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 참조).

[0017] **II. B-세포 수용체 및 CD79B**

[0018] B 세포는 항체 생성에 기여하는 면역 세포이다. 항원에 대한 B-세포 반응은 정상적인 면역 시스템의 본질적인 구성요소이다. 추가로, B-세포는 항원을 제시하고 사이토카인을 분비한다. B-세포는 특수한 세포-표면 수용체(B-세포 수용체: "BCR")를 가지고 있다. 만약 B-세포가 그 세포의 BCR에 결합할 수 있는 항원을 만나게 되면, B-세포는 자극되어 증식하고 결합된 항원에 특이적인 항체들을 생성하게 될 것이다. 항원에 대한 효과적인 반응을 생성하기 위하여, BCR-결합된 단백질 및 T-세포 보조가 또한 필요하다. 항원/BCR 복합체는 내재화되고, 항원은 단백질 가수분해적으로 처리된다. 항원의 작은 일부분이 B 세포의 표면 상에서 주요 조직적합성 복합체-II("MHC-II") 분자와 복합체를 형성한 채로 유지되어, 거기에서 복합체가 T-세포에 의해 인식될 수 있다. 그런 항원 제공에 의해 활성화된 T-세포는 CD40L 및 B-세포 돌연변이를 유도하는 다양한 림포카인을 분비한다.

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

[0020] BCR은 CD79의 비-공유 결합된 α 및 β 하위유닛(각각 "CD79a" 및 "CD79B")과 함께, BCR 복합체를 형성하는 막 면역글로불린으로 구성된다. CD79a 및 CD79B는 신호 변환에 필요한 보존된 면역수용체 타이로신-기초 활성화 모티프("ITAM")를 함유하는 신호 변환 하위유닛이다(Dylke, J. *et al.* (2007) "*Role of the extra-cellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor(BCR)*," Immunol. Lett. 112(1):47-57; Cambier, J.C.(1995) "*New Nomenclature For The Reth Motif(or ARH1/TAM/ARAM/YXXL)*," Immunol. Today 16: 110). 다가 항원에 의한 BCR 복합체의 응집은 CD79a 및 CD79B ITAM의 인산전달반응 및 수용체-결합 키나제의 활성화를 개시한다(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). 인산화된 ITAM은 PI_3K, PLC-γ와 같은 추가 이펙터들 및 Ras/MAPK 경로의 구성원들을 충원한다. 이들 신호화 사건은 T-헬퍼("T_h") 세포들과의 후속적인 상호작용에 대해 B 세포를 준비시키는데 필요한 B 세포 증식 및 활성화 마커들(예컨대 MHC-II 및 CD86)의 증가된 발현 둘 다에 기여한다.

[0021] **III. 염증성 질환 또는 상태들**

[0022] 염증은 박테리아 및 바이러스와 같은 외래 물질에 의한 감염으로부터 신체의 백혈구 및 화학물질에 의해 우리의 신체를 보호하려는 과정이다. 그것은 통상적으로 환부의 통증, 부기, 열 및 적열상태를 특징으로 한다. 사이토킨 및 프로스타글란딘으로 알려진 화학물질들이 이 과정을 제어하며, 정돈된 자체-제한 연쇄반응으로 혈액 또는 환부 조직으로 방출된다. 화학물질의 이러한 방출은 상처 또는 감염 부위로의 혈류를 증가시키고, 이로써 적열상태와 열을 초래할 수 있다. 일부 화학물질은 조직 내로 유체의 누출을 유발하여 부기를 초래한다. 이 보호 과정은 신경을 자극하여 통증을 유발할 수 있다. 이들 변화는 관련된 부위에서 제한된 기간 동안 발생할 때, 신체에 유익하게 작용한다.

[0023] 염증성 질환 또는 상태는 신체 자체 세포 및 조직에 대한 면역 시스템 공격을 반영한다(즉 "자가면역" 반응). 신체에 상이한 방식으로 영향을 미치는 상이한 자가면역 장애가 많이 있다. 예를 들면 뇌는 개체에서 다발성 경색에 의해 영향을 받고, 소화관은 개체에서 크론병으로부터 영향을 받으며, 다양한 관절의 활막, 뼈 및 연골은

개체에서 류머티스 관절염으로부터 영향을 받는다. 자가면역 장애가 하나 또는 그 이상의 유형의 신체 조직의 파괴를 진전시킴에 따라, 기관의 비정상적인 성장 또는 기관 기능의 변화들이 초래될 수 있다. 자가면역 장애는 단지 하나의 기관이나 조직 유형에 영향을 미치거나 다수의 기관 및 조직에 영향을 미칠 수 있다. 자가면역 장애에 의해 통상 영향을 받는 기관 및 조직들은 적혈구, 혈관, 연결 조직, 내분비선(예컨대 갑상선 또는 췌장), 근육, 관절 및 피부를 포함한다. 자가면역 장애의 실례로는, 그것들에 한정되는 것은 아니지만, 애디슨병, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환, 중증근무력증, 크론병, 피부근염, 가족성 선종성 용종증, 이식편 대 숙주병(GvHD), 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 홍반성 루푸스, 다발성 경화증(MS), 악성 빈혈, 라이터 증후군, 류머티스 관절염(RA), 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 제1형 당뇨병, 원발성 혈관염(예를 들어, 류머티스 다발근통, 거대세포 동맥염, 베체트병), 천포창, 시신경척수염, 항-NMDA 수용체 뇌염, 길랑바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 그레이브스 안병증, IgG4 관련 질환, 특발성 혈소판감소성 자반증(ITP), 및 궤양성 대장염을 포함한다.

[0024] 염증성 질환 또는 상태는 또한 신체의 정상적인 보호 면역 시스템이 그 존재가 신체에 유익한 외래 세포 또는 조직을 공격함으로써(예컨대 이식편의 거부(숙주 대 숙주병)) 또는 도입된 이식 이식편의 면역경합 세포에 의해 면역손상된 숙주의 세포의 거부(이식편 대 숙주병)에 의해 손상을 유발할 때 발생할 수 있다(DePaoli, A.M. *et al.*(1992) "*Graft-Versus-Host Disease And Liver Transplantation*," Ann. Intern. Med. 117:170-171; Sudhindran, S. *et al.* (2003) "*Treatment Of Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation With Basiliximab Followed By Bowel Resection*," Am J Transplant. 3:1024-1029; Pollack, M.S. *et al.* (2005) "*Severe, Late-Onset Graft-Versus-Host Disease In A Liver Transplant Recipient Documented By Chimerism Analysis*," Hum. Immunol. 66:28-31; Perri, R. *et al.* (2007) "*Graft Vs. Host Disease After Liver Transplantation: A New Approach Is Needed*," Liver Transpl. 13:1092-1099; Mawad, R. *et al.* (2009) "*Graft-Versus-Host Disease Presenting With Pancytopenia After En Bloc Multiorgan Trans-plantation: Case Report And Literature Review*," Transplant Proc. 41:4431-4433; Akbulut, S. *et al.* (2012) "*Graft-Versus-Host Disease After Liver Trans-plantation: A Comprehensive Literature Review*," World J. Gastroenterol. 18 (37):5240-5248).

[0025] 이러한 질환 또는 상태의 치료에서 최근의 진보에도 불구하고, 염증성 질환 또는 상태를 치료하거나 예방할 수 있는 조성물에 대한 요구는 지속적으로 존재한다.

[0026] **IV. 이중특이적 결합 분자**

[0027] **A. 이중특이적 항체**

[0028] 항원의 에피토프에 결합하는 변형되지 않은 천연 항체(예를 들어, IgG)의 능력은 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 상의 가변 도메인의 존재 및 상호작용에 따른다(즉, 항체의 에피토프-결합 부위를 형성하는 그것의 경쇄 가변 도메인(VL 도메인)과 그것의 중쇄 가변 도메인(VH 도메인)). 오직 1종의 경쇄와 1종의 중쇄가 존재하는 결과로서, 천연 항체는 오직 하나의 에피토프 종에만 결합할 수 있으며(즉, 이들은 단일특이적이다), 이들은 그 종의 다수의 카피에 결합할 수 있다(즉, 2가 또는 다원자가를 나타냄).

[0029] 그러나, 본 분야에서는, 예를 들어 상이한 에피토프 특이성을 가진 두 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공-발현을 통해 이중특이적 항체를 생성하고, 친화성 크로마토그래피를 사용하여 원하는 분자를 정제하는데 성공했고, 이것은 Milstein *et al.* (1983) "*Hybrid Hybridomas And Their Use In Immunohistochemistry*," Nature 305:537-39, WO 93/08829에 설명된다. 상이한 접근법에서, 원하는 결합 특이성(항체-항원 조합 부위)을 가진 항체 가변 도메인이 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 영역 중 적어도 일부를 포함하는 면역글로불린 불변 도메인 서열, 예를 들어 중쇄 불변 도메인에 융합되었다. 이들 융합체를 암호화하는 핵산이 동일한 또는 상이한 발현 벡터에 삽입될 수 있으며, 적합한 숙주 유기체에서 발현된다. 이중특이적 항체는, 예를 들어 Traunecker *et al.* (1991) "*Bispecific Single Chain Molecules (Janusins) Target Cytotoxic Lymphocytes On HIV Infected Cells*" EMBO J. 10:3655-3659; Zhukovsky, E.A. *et al.* (2016) "*Bispecific Antibodies And Cars: Generalized Immunothera-peutics Harnessing T Cell Redirection*" Curr. Opin. Immunol. 40:24-35; Kiefer, J.D. *et al.* (2016) "*Immunocytokines And Bispecific Antibodies: Two Complemen-tary Strategies For The Selective Activation Of Immune Cells At The Tumor Site*," Immunol. Rev. 270(1):178-192; Solimando, A.G. *et al.* (2016) "*Targeting B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: New And Old Tricks*," Leuk. Res. 42:93-104; Fan, G. *et al.* (2015) "*Bispecific Antibodies And Their Applications*," J. Hematol. Oncol. 8:130; Grandjenette, C. *et al.* (2015) "*Bispecific Antibodies: An Inno-vative Arsenal To Hunt, Grab And Destroy Cancer Cells*,"

Curr. Pharm. Bio-technol. 16(8):670-683; Nunez-Prado, N. *et al.* (2015) "*The Coming Of Age Of Engineered Multivalent Antibodies*," Drug Discov. Today 20(5):588-594; 및 Kon-termann, R.E. *et al.* (2015) "Bispecific Antibodies," Drug. Discov. Today 20 (7):838-847에 의해 검토된다.

[0030] 무손상 이중특이적 항체에 더하여, 본 분야에서는 제1 결합 분자에 대한 VL 및 VH 도메인 및 제2 결합 분자에 대한 VL 및 VH 도메인을 가진 단일 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이중특이적 단쇄 항체 유도체(예를 들어, 이중특이적 T-세포 인게이저(BiTEs))를 개발했다(예를 들어, 미국특허 7,112,324, 7,235,641, 7,575,923, 7,919,089; Wu, J. *et al.* (2015) "*Blinatumomab: A Bispecific T Cell Engager (BiTe) Antibody Against CD19/CD3 For Refractory Acute* Lymphoid *Leukemia*," J. Hematol. Oncol. 8:104; Lutterbuese, R. *et al.*(2008) "*Conversion Of Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab And Omalizumab Into T-Cell-Engaging BiTE Antibodies Creates Novel Drug Candidates Of High Potency*," Proc. Am. Assoc. Cancer Res 99:Abs 2402; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) "*Bispecific T-Cell Engaging Anti-bodies For Cancer Therapy*," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

[0031] **B. 이중특이적 디아바디**

[0032] 본 분야는 둘 이상의 상이한 에피토프 종과 결합할 수 있는(즉, 2가 또는 다원자가에 더하여 이중특이성 또는 다중특이성을 나타내는) 천연 항체와 상이한 디아바디를 생성하는 능력을 주지했다. 디아바디의 디자인은 단쇄 Fv 구성물(scFv)에 기초하며, 이것은 VL 도메인과 상응하는 VH 도메인을 지니고, 이들은 이러한 도메인이 서로 상호작용하도록 허용하는 개재 링커에 의해 분리된다. VL 및 VH 도메인의 이러한 상호작용이 불충분한 길이(약 12개 아미노산 잔기 미만)의 링커의 사용으로 인해 불가능해지는 경우, 2개의 이러한 scFv 구성물이 서로 상호작용하여 하나의 사슬의 VL 도메인이 나머지 하나의 사슬의 VH 도메인과 회합한 2가 디아바디 분자를 형성할 수 있다(Marvin *et al.* (2005) *"Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,"* Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658, Holliger *et al.* (1993) "'*Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,*" Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Holliger *et al.*); US 2004/0220388 (Mertens *et al.*); Mertens, N. *et al.*, "*New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives*," In: Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use, A. VanBroekhoven *et al.* (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), p. 195-208; Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Olafsen, T. *et al.* (2004) "*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*," Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. *et al.* (2001) "*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fc 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):4941-4944에서 검토).

[0033] 비-단일특이적 디아바디의 제공은 중요한 장점, 즉 상이한 에피토프들을 발현하는 세포를 공-결찰하고 동시-배치하는 능력을 제공한다. 따라서, 2가 디아바디는 치료법 및 면역진단을 포함하여 광범위한 용도를 가진다. 2-원자가는 다양한 용도에서 디아바디의 디자인 및 조작(engineering)에 큰 유연성을 허용하며, 그것은 멀티머 항원에 대한 증진된 결합력, 상이한 항원들의 교차결합, 및 양쪽 표적 항원의 존재에 의존하는 특정 세포 유형에 대한 지정된 표적화를 제공한다. 증가된 원자, 낮은 분해 속도 및 순환계로부터의 신속한 클리어런스(clearance)로 인해(~50 kDa 이하의 작은 크기의 디아바디의 경우), 본 분야에 공지된 디아바디 분자는 또한 종양영상 분야에서 특정한 용도를 나타냈다(Fitzgerald *et al.*(1997) *"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris,"* Protein Eng. 10:1221). 특히 중요한 것은 상이한 세포의 공-결찰, 예를 들면 세포독성 T-세포의 종양 세포에 대한 교차결합이다(Staerz *et al.* (1985) *"Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,"* Nature 314:628-631 및 Holliger *et al.*(1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305).

[0034] 디아바디 에피토프 결합 도메인은 또한 T 림프구, 천연 킬러(NK) 세포 또는 다른 단핵 세포 상에 발현되는, CD3, CD16, CD32 또는 CD64와 같은 임의의 면역 이펙터 세포의 표면 결정기에 대해 지정될 수 있다. 많은 연구에서, 이펙터 세포 결정기들, 예컨대 Fcɣ 수용체(FcɣR)에 결합하는 디아바디는 또한 이펙터 세포를 활성화시키는 것이 밝혀졌다(Holliger *et al.* (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) *"Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins,"* Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). 정상적으로, 이펙터 세포 활성화는 Fc-FcɣR 상호작용을 통한 항원 결합된 항체의 이펙터 세포에의 결합에 의해 야기되고; 그로써 이런 관점에서, 본 발명의 디아바디 분자들은 그들이 Fc 도메인을 포함하는 것과는 무관하게 Ig-유사 기능성을 나타낼 수 있다(예컨대 본 분야에 공지된 임의의 이펙터 기능 분석에서 분석되거나 본원에서 예시된 것과 같이(예컨대 ADCC 분석)). 종양과 이펙터 세포를 교차결합시킴으로써, 디아바디는 종양 세포에 가까운 곳으로 이펙터 세포를 가져올 뿐만 아니라 효과적인 종양 사멸을 유도한다(예를 들어, Cao *et al.* (2003) *"Bi-specific Antibody Conjugates In Therapeutics,"* Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197 참조).

[0035] 그러나, 상기 장점들은 가장 중요한 비용에 직면하게 된다. 이러한 비-단일특이적 디아바디의 형성은 둘 또는 그 이상의 뚜렷하고 상이한 폴리펩타이드의 연속적인 조립을 필요로 한다(즉, 이러한 형성은 디아바디가 상이한 폴리펩타이드 사슬 종의 헤테로다이머화(heterodimerization)를 통해 형성되는 것을 필요로 한다). 이러한 사실은 동일한 폴리펩타이드 사슬의 호모다이머화(homodimerization)를 통해서 형성되는 단일특이적 디아바디와 대조적이다. 비-단일특이적 디아바디를 형성하기 위해 적어도 2개의 다른 폴리펩타이드(즉, 2개의 폴리펩타이드 종)가 제공되어야 하기 때문에, 그리고 이러한 폴리펩타이드들의 호모다이머화는 비활성 분자를 유도하기 때문에(Takemura, S. *et al.* (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13 (8):583-588), 이러한 폴리펩타이드의 제조는 동일한 종의 폴리펩타이드 간의 공유결합을 방지할 수 있는 같은 방식으로 이루어져야 한다(Takemura, S. *et al.*(2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13(8):583-588). 따라서, 본 분야는 이러한 폴리펩타이드들의 비-공유 결합을 교시한다(예컨대 Olafsen *et al.* (2004) *"Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radio-labeling 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 Recom-binant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*" Protein Eng. 13(8): 583-588; Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,*" J. Biol. Chem. 280 (20):19665-19672 참조).

[0036] 그러나, 본 분야는 비-공유적으로 결합된 폴리펩타이드로 구성된 이중특이적 디아바디가 불안정하고 쉽게 비-기능적 단량체들로 분해된다는 것을 인식했다(예를 들어, Lu, D. *et al.* (2005) "*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,*" J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672 참조).

[0037] 이런 문제에 직면하여, 본 분야에서는 안정하며 공유결합된 헤테로다이머 비-단일특이적 디아바디의 개발에 성공했다(예컨대 WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; 및 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 Fcgamma 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; Chen, X. *et al.* (2016) "*Mechanistic Projection Of First In Human Dose For Bispecific Immuno-Modulatory P-Cadherin LP-DART - An Integrated PK/PD Modeling Approach*," Clin. Pharmacol. Ther. doi: 10.1002/ cpt.393; Tsai, P. *et al.* (2016) "*CD19xCD3 DART Protein Mediates Human B-Cell Depletion In Vivo In Humanized BLT Mice*" Mol. Ther. Oncolytics. 3:15024; Root *et al.* (2016) "*Development of PF-06671008, a Highly Potent Anti-P-*

cadherin/ Anti-CD3 Bispecific DART Molecule with Extended Half-Life for the Treatment of Cancer," Antibodies 5:6; Sloan, D.D. *et al.*(2015) "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*," PLoS Pathog. 11(11): e1005233; Al-Hussaini, M. *et al.* (2016) "*Targeting CD123 In Acute Myeloid Leukemia Using A T-Cell-Directed Dual-Affinity Retargeting Platform*," Blood 127(1):122-131; Chichili, G.R. *et al.*(2015) "*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates*," Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Zanin, M. *et al.* (2015) "*An Anti-H5N1 Influenza Virus FcDART Antibody Is A Highly Effica-cious Therapeutic Agent And Prophylactic Against H5N1 Influenza Virus Infec-tion*," J. Virol. 89(8):4549-4561 참조). 이러한 접근법들은 하나 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 각각의 사용된 폴리펩타이드 종으로 조작해 넣는 것을 포함한다. 예를 들어, 이러한 구성물의 C-말단에 시스테인 잔기를 첨가하는 것은 폴리펩타이드 사슬 간에 이황화물 결합을 허용하며, 그 결과 생성된 헤테로다이머를, 2가 분자의 결합 특성을 간섭하지 않으면서 안정화시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0038] 이러한 성공의 축적하에 본 분야에서는 억제성 Fcɣ 수용체 IIb(CD32B)와 B-세포 상의 B-세포 수용체(BCR) 성분 CD79B를 공-결찰하며, 이로써 CD32B와 CD79B에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 2가 DART® 디아바디 MGD010을 생성했다(Chen, W. (2014) "*Development Of Human B-Lymphocyte Targeted Bi-Specific DART® Mol-ecules For The Treatment Of Autoimmune Disorders*," J. Immunol. 192(1 Supp.): 200.9)(도 1a). 본 발명은 MGD010 및 다른 CD32B x CD79B 이중특이적 분자, 특히 Fc 도메인을 포함하는 이러한 이중특이적 분자의 사용 및 투여를 위한 개선된 방법에 관한 것이다.

발명의 내용

[0039] 본 발명은 CD32B의 에피토프에 특이적인 결합 부위와 CD79B의 에피토프에 특이적인 결합 부위를 지니며, 따라서 CD32B와 CD79B에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 결합 분자의 사용 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이중특이적 항체(즉, "CD32B x CD79B 항체") 또는 이중특이적 디아바디(즉, "CD32B x CD79B 디아바디", 및 특히 Fc 도메인을 더 포함하는 이러한 디아바디(즉, "CD32B x CD79B Fc 디아바디")인 이러한 분자에 관한 것이다. 본 발명은 염증성 질환 또는 상태의 치료에서 이러한 분자의 사용, 및 이러한 분자를 함유하는 제약 조성물의 사용에 관한 것이다.

[0040] 상세하게, 본 발명은 CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환 또는 상태의 치료 방법을 제공하며, 여기서 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, CD32B x CD79B 결합 분자는 약 3 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주마다 1회 용량의 투약 섭생(dosage regimen)으로 투여된다.

[0041] 또한, 본 발명은 CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에 투여하는 단계를 포함하는 면역 반응을 감소시키거나 억제하는 방법을 제공하며, 여기서 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, CD32B x CD79B 결합 분자는 약 3 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주마다 1회 용량의 투약 섭생으로 투여된다.

[0042] 또한, 본 발명은 CD32B x CD79B 결합 분자가 약 3 mg/kg의 용량으로 투여되거나, CD32B x CD79B 결합 분자가 약 10 mg/kg의 용량으로 투여되거나, 또는 CD32B x CD79B 결합 분자가 약 30 mg/kg의 용량으로 투여되는, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0043] 또한, 본 발명은 투약 섭생이 2주마다 1회 용량(Q2W)이거나, 투약 섭생이 3주마다 1회 용량(Q3W)이거나, 또는 투약 섭생이 4주마다 1회 용량(Q4W)인, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0044] 또한, 본 발명은 CD32B x CD79B 결합 분자가 CD32B의 에피토프와 CD79B의 에피토프에 결합하는 이중특이적 항체, 또는 이중특이적 항체의 CD32B- 및 CD79B-결합 도메인을 포함하는 분자인, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0045] 또한, 본 발명은 CD32B x CD79B 결합 분자가 CD32B의 에피토프와 CD79B의 에피토프에 결합하는 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디인, 특히 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디가 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디인, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0046] 또한, 본 발명은 염증성 질환 또는 상태가 자가면역 질환인, 특히 자가면역 질환이 애디슨병, 자가면역 간염,

자가면역 내이 질환, 중증근무력증, 크론병, 피부근염, 가족성 선종성 용종증, 이식편 대 숙주병(GvHD), 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 홍반성 루프스, 다발성 경화증(MS); 악성 빈혈, 라이터 증후군, 류마티스 관절염(RA), 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스(SLE), 제1형 당뇨병, 원발성 혈관염(예를 들어, 류마티스 다발근통, 거대세포 동맥염, 베체트병), 천포창, 시신경척수염, 항-NMDA 수용체 뇌염, 길랑바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 그레이브스 안병증, IgG4 관련 질환, 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP), 및 궤양성 대장염으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 염증성 질환 또는 상태가 GvHD, MS, RA 또는 SLE인, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0047] 또한, 본 발명은 면역글로불린의 혈청 수준이 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 후 제36일까지 감소되는, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 면역글로불린이 IgM, IgA 또는 IgG인, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0048] 또한, 본 발명은 BCR-매개 말초 B-세포 활성화가 CD32B x CD79B 결합 분자의 단일 용량의 투여 후 24시간까지 억제되는, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이며, 여기서 B-세포 활성화는 생체외 칼슘 동원(mobilization) 분석에 의해 결정된다. 특히, 본 발명은 BCR-매개 B-세포 활성화가 적어도 50%까지 억제되고, 억제가 적어도 6일 동안 지속되는, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0049] 또한, 본 발명은 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 6시간 후 말초 B-세포 상의 CD32B x CD79B 결합 부위의 적어도 20%가 점유되는, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0050] 더 나아가, 본 발명은 대상이 인간인, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0051] 특히, 본 발명은 CD32B x CD79B 결합 분자가

[0052] (A) SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD32B} 도메인;

[0053] (B) SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD32B} 도메인;

[0054] (C) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD79B} 도메인;

[0055] (D) SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD79B} 도메인

[0056] 을 포함하는, 모든 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

[0057] 또한, 본 발명은 CD32B x CD79B Fc 디아바디가

[0058] (A) SEQ ID NO:39의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩타이드 사슬;

[0059] (B) SEQ ID NO:41의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩타이드 사슬;

[0060] (C) SEQ ID NO:44의 아미노산 서열을 포함하는 제3 폴리펩타이드 사슬

[0061] 을 포함하는, 이러한 방법의 구체예에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 각각 E-코일 또는 K-코일 헤테로다이머-촉진 도메인을 가진 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 2개의 에피토프-결합 도메인을 가진 대표적인 공유결합된 디아바디의 개략도를 제공한다(대안의 헤테로다이머-촉진 도메인이 아래 제공된다). 시스테인 잔기가 도 3a/3b에 도시된 바와 같이 링커 및/또는 헤테로다이머-촉진 도메인에 존재할 수 있다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영(shading) 또는 채움(fill) 패턴을 사용하여 도시된다.

도 2는 회합된 사슬이 Fc 영역의 전부 또는 일부를 형성하도록, 각각 CH2 및 CH3 도메인을 가진 2개의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 2개의 에피토프-결합 도메인을 가진 대표적인 공유결합된 디아바디 분자의 개략도를 제공한다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영 또는 채움 패턴을 사용하여 도시된다.

도 3a-3e는 3개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 2개의 에피토프-결합 도메인을 가진 대표적인 공유결합된 디아바디 분자의 개략도를 제공한다. CH2-CH3 도메인의 두 배향이 도시된다(도 3a/3b 대 도 3c/3d). 폴리펩타이드 사슬 중 2개는 CH2 및 CH3 도메인을 지니며, 이로써 회합된 사슬은 Fc 영역의 전부 또는 일부를 형성한다. VL 및 VH 도메인을 포함하는 폴리펩타이드 사슬은 각각 헤테로다이머-촉진 도메인을 더 포함하며, 링커(도 3a 및

3c)나 헤테로다이머-촉진 도메인(도 3d 및 3b)에 존재하는 시스테인 잔기 사이에 형성된 이황화물 결합을 통해 서로 공유결합된다. 도 3e는 도 3a에 도시된 도메인의 배향을 가진 예시적인 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 구조 및 기능을 나타낸다. 도 3e에 도시된 디아바디는 도 3a의 디아바디의 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 공유결합된 복합체이며, 선택적으로 존재하는 헤테로다이머-촉진 도메인이 없다. 이 복합체는 CH2 및 CH3 IgG 중쇄 도메인을 포함하는 Fc 도메인, 및 CD32B 및 CD79B에 특이적인 결합 도메인을 포함한다. 동일한 에피토프를 인식하는 VL 및 VH 도메인은 동일한 음영 또는 채움 패턴을 사용하여 도시된다.

도 4는 본 발명의 디아바디가 면역 시스템의 억제를 매개할 수 있는 예시적인 메커니즘을 나타낸다. 도면에 도시된 대로, 본 발명의 디아바디는 BCR의 CD79B 분자와 B-세포의 CD32B 분자에 동시에 결합할 수 있고, 이로써 이러한 분자들을 서로 공-결찰할 수 있다. 이러한 공-결찰은 CD32B 분자의 ITIM이 인산화되는 것과 이노시톨 폴리포스페이트 5'-포스파타아제(SHIP)의 SH2 도메인을 유인하는 것을 허용하는 작용을 하며, 이것은 ITAM-매개 티로신 키나아제 활성화의 결과로서 방출된 포스포이노시톨 메신저를 가수분해한다. 이러한 가수분해는 ITAM 활성화 신호를 억제하며, 이로써 B-세포 활성화를 약화시키는 작용을 한다.

도 5는 뮤린 모델에서 이종성 GvHD를 생체내 감소시키는 바람직한 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 능력을 도시한다.

도 6은 인간 대상에 투여시 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 생체내 약동학(pharmacokinetics)을 도시한다.

도 7은 연구 과정 동안 인간 대상에 투여시 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 말초 B-세포에 대한 생체내 결합의 생체외 유세포 분석을 요약한다.

도 8a-8d는 생체외 유세포 분석에 의해 결정된, 연구 과정 동안 인간 대상에 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여 후 말초 B- 및 T-세포 집단을 도시한다.

도 9a-9d는 B-세포 기능 연구의 방법 및 결과를 도시한다. 도 9a-9b는 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 레시피언트의 B-세포 기능을 평가하는데 사용된 생체외 칼슘 동원 분석의 생체외 실험 과정 및 데이터 분석 방법을 나타낸다. 도 9c-9d는 연구 과정 동안 인간 대상에 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여 후 피크(Peak) 반응의 감소(도 9c) 및 곡선 아래 면적(AUC; 도 9d)에 의해 측정된 전체 반응의 지속적인 감소를 도시한다.

도 10a-10c는 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 연구 과정 동안 인간 대상의 $CD27^+$ 기억 B-세포 상에서 BCR 발현을 하향조절하는 것을 나타낸다. 도 10a: 막-결합 IgG(mIgG); 도 10b: 막-결합 IgM; 도 10c: 막-결합 IgD(mIgD). 데이터는 평균±SEM으로 제시된다.

도 11a-11c는 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 연구 과정 동안 인간 대상의 $CD27^-$ 자생 B-세포 상에서 BCR 발현을 하향조절하는 것을 나타낸다. 도 11a: 막-결합 IgD(mIgD); 도 11b: 막-결합 IgM; 도 11c: 막-결합 IgM(mIgM)의 변화 퍼센트. 막-결합 면역글로불린 수준은 유세포분석법에 의해 결정되었다. 데이터는 평균±SEM으로 제시된다.

도 12a-12c는 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 연구 과정 동안 인간 대상의 혈성 Ig 수준을 조정한다는 것을 도시한다. 도 12a: 혈청 IgM; 도 12b: 혈청 IgA; 도 12c: 혈청 IgG. 혈청 면역글로불린 IgA, IgG 및 IgM 수준은 ELISA에 의해 결정되었다. 데이터는 평균±SEM으로 제시된다.

도 13은 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 말초 B-세포의 표면 공-자극 분자의 생체외 유세포 분석에 의해 결정된 대로 공-자극 분자 CD40의 수준을 감소시키는 것을 도시한다. 데이터는 평균±SEM으로 제시된다.

도 14a-14b는 실시예 1의 예시적인 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 생체외 포화 E_{max} PK/PD B-세포 결합 연구에 대한 데이터(두 상이한 농도 범위에서의)를 도시한다. 데이터는 선형-선형 및 로그-선형 스케일을 기준으로 그래프 방식으로 평가되었다.

도 15a-15f는 인간에서 중첩된 CD32B x CD79B 결합 분자 약동학 프로파일을 갖는 전임상 표적 농도를 나타내며, 표적 농도를 얻을 수 있는 용량이 확인된다. 도 15a-15f에서, y-축은 CD32B x CD79B 결합 분자 농도[ng/mL]이고, x-축은 시간 단위의 시간이며, 상부, 중간 및 하부 수평선은 각각 시험관내 B-세포 결합/억제 연구의 결합 분자 농도 값, 본 연구에서 EC50 B-세포 결합의 결합 분자 농도 값, 및 인간화된 마우스 모델에서 IgG 및 IgM의 생체내 억제의 결합 분자 농도 값이다.

도 16a-16d는 2주마다 1회(Q2W), 3주마다 1회(Q3W) 및 4주마다 1회(Q4W) 투약 섭생에 대해 0.3 mg/kg(도 16a),

1 mg/kg(도 16b), 3 mg/kg(도 16c) 및 10 mg/kg(도 16d) 대상 체중의 용량에서 CD32B x CD79B 결합 분자의 평균 농도의 시뮬레이션을 도시한다. 실제 시간 및 농도와 명목상 용량이 사용되었다. 도 16a-16d에서, y-축은 CD32B x CD79B 결합 분자 농도[ng/mL]이고, x-축은 시간 단위의 시간이다.

도 17a-17d는 도 16a-16d의 모델링된 프로파일에서 예측된 변동성을 도시한다(SD와 함께).

도 18은 HAV로의 백신접종 후 제57일에 건강한 인간 대상의 혈청에 존재하는 HAV-특이적 IgG의 농도를 도시한다. 이들 데이터는 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 HAV-백신접종된 인간 대상에서 HAV-특이적 IgG 수준을 감소시키는 것을 나타낸다.

도 19는 CD40 의존적 B-세포 IgG 분비의 시험관내 검출에 의해 결정된 대로 CD32B x CD79B 결합 분자가 CD40 의존적 B-세포 반응을 차단하는 것을 도시한다. 인간 B-세포가 5일 동안 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자(20 μg/mL)의 존재 또는 부재하에 희석되지 않고 사용되는, 또는 일련의 3배 희석물(1, 1/3, 1/9, 및 1/27)로 사용되는, 자극제(CD40-리간드(500 ng/mL), IL-4(100 ng/mL) 및 IL-21(20 ng/mL))와 함께 또는 자극제 없이 배양되었고, 분비된 IgG가 ELISA 분석에 의해 결정되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 본 발명은 CD32B의 에피토프에 특이적인 결합 부위와 CD79B의 에피토프에 특이적인 결합 부위를 지니며, 따라서 CD32B와 CD79B에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 결합 분자의 사용 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이중특이적 항체(즉, "CD32B x CD79B 항체") 또는 이중특이적 디아바디(즉, "CD32B x CD79B 디아바디", 및 특히 Fc 도메인을 더 포함하는 이러한 디아바디(즉, "CD32B x CD79B Fc 디아바디")인 이러한 분자에 관한 것이다. 본 발명은 이러한 분자의 사용, 및 이러한 분자를 함유하는 약학적 조성물의 사용에 관한 것이다.

[0064] 상기 논의된 대로, CD79B와 CD32B(FcγRIIB)는 둘 다 항원 인식에 반응하여 증식하는 B-세포에 의해 발현된다. 본 발명의 이중특이적 결합 분자는 양쪽 분자에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 따라서 이 분자들을 공-결찰할 수 있다. 이러한 공-결찰(예를 들어, 도 4 참조)은 CD32B 분자의 ITIM이 인산화되는 것과 이노시톨 폴리포스페이트 5'포스파타아제(SHIP)의 SH2 도메인을 유인하는 것을 허용하며, 이것은 CD79B ITAM의 티로신 키나아제-매개 활성화의 결과로서 방출되는 포스포이노시톨 메신저를 가수분해한다. 이러한 가수분해는 CD79B의 ITAM 활성화 신호를 억제하고, 이로써 B-세포 활성화를 약화시키는 작용을 한다. 따라서, 본 발명의 이중특이적 결합 분자는 원치않는 B-세포 활성화, B-세포 증식 및 항체 분비에 반응하는 숙주의 면역 시스템을 억제하거나 억누르는 능력을 가지며, 염증성 질환 및 장애, 및 특히 전신 홍반성 루프스(SLE), 다발성 경화증(MS), 및 이식편 대 숙주병(GvHD)의 치료에 활용된다.

[0065] **I. 항체 특징 및 구조**

[0066] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 특정 도메인 또는 모이어티 또는 입체구조("에피토프")의 존재로 인해 폴리펩타이드 또는 단백질 또는 비-단백질 분자에 면역특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 분자를 말한다. 에피토프-함유 분자는 면역원성 활성을 가져서, 동물의 항체 생성 반응을 유도할 수도 있다; 이러한 분자는 "항원"이라고 불린다. 에피토프-함유 분자는 반드시 면역원성일 필요는 없다.

[0067] 천연 항체(예컨대 IgG 항체)는 2개의 중쇄와 복합체를 형성하는 2개의 경쇄로 구성된다. 천연 항체(예컨대 IgG 항체)의 각각의 경쇄는 가변 도메인(VL 도메인) 및 불변 도메인(CL 도메인)을 함유한다. 천연 항체의 각각의 중쇄는 중쇄 가변 도메인(VH 도메인), 3개의 불변 도메인(CH1, CH2 및 CH3 도메인), 및 CH1과 CH2 도메인 사이에 위치된 "힌지"(hinge) 도메인("H")을 함유한다. 따라서 자연 발생 면역글로불린(예를 들어, IgG)의 기본 구조 유닛은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 테트라머이며, 보통 약 150,000 Da의 당단백질로서 발현된다. 각 사슬의 아미노-말단("N-말단") 부분은 항원 인식에 대한 주된 원인이 되는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 도메인을 포함한다. 각 사슬의 카르복시-말단("C-말단") 부분은 불변 영역을 한정하며, 경쇄는 단일 불변 도메인을 갖고 중쇄는 보통 3개의 불변 도메인 및 힌지 도메인을 가진다. 따라서, IgG 분자의 경쇄의 구조는 n-VL-CL-c이고 IgG 중쇄의 구조는 n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c이다(여기서 n 및 c는 각각 폴리펩타이드의 N-말단 및 C-말단을 나타냄). 항원의 에피토프에 결합하는 항체의 능력은 항체의 VL 및 VH 도메인의 존재 및 아미노산 서열에 의존한다. 항체 경쇄와 항체 중쇄의 상호작용 및, 특히, 항체의 VL 및 VH 도메인의 상호작용은 천연 항체의 2개의 에피토프-결합 부위 중 하나를 형성한다. 천연 항체는 단 하나의 에피토프 종에 결합할 수 있지만(즉, 이들은 단일특이적이다), 그 종의 다수의 카피에 결합할 수 있다(즉, 2가 또는 다원자가를 나타냄). IgG 분자의 가변 도메인은 에피토프와 접촉된 잔기를 함유하는 상보성 결정 영역(CDR), 및 일반적으로 구조를 유지하고(어떤 프레임워크 잔기는 또한 항원에 접촉할 수도 있지만) 이러한 접촉을 허용하기 위해 CDR 루프의 위치를 결정

하는 프레임워크 세그먼트(FR)라고도 불리는 비-CDR 세그먼트로 이루어진다. 따라서, V_L 및 VH 도메인은 구조 n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c를 가진다. 항체 경쇄의 제1, 제2 및 제3 CDR인(또는 이들의 역할을 할 수도 있는) 폴리펩타이드는 본원에서 각각 CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인, 및 CDR_L3 도메인으로 지정된다. 유사하게, 항체 중쇄의 제1, 제2 및 제3 CDR인(또는 이들의 역할을 할 수도 있는) 폴리펩타이드는 본원에서 각각 CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인, 및 CDR_H3 도메인으로 지정된다. 따라서, 용어 CDR_L1 도메인, CDR_L2 도메인, CDR_L3 도메인, CDR_H1 도메인, CDR_H2 도메인, 및 CDR_H3 도메인은 폴리펩타이드가 단백질로 통합될 때 이러한 단백질이 경쇄 및 중쇄 또는 디아바디 또는 단쇄 결합 분자(예를 들어, scFv, BiTe, 등)를 가진 항체이든, 또는 다른 유형의 단백질이든 상관없이 상기 단백질이 특이적 에피토프에 결합할 수 있게 하는 폴리펩타이드에 관한 것이다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "에피토프-결합 도메인"은 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 이러한 분자의 능력에 대한 원인이 되는 에피토프-결합 분자의 일부를 말한다. 에피토프-결합 단편은 이러한 항체의 CDR 도메인 중 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 모두를 함유할 수도 있고, 이러한 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있지만, 이러한 항체와 다른 이러한 에피토프에 대하여 면역특이성, 친화성 또는 선택성을 나타낼 수도 있다. 하지만, 바람직하게는, 에피토프-결합 단편은 이러한 항체의 CDR 도메인 6개 모두를 함유할 것이다. 항체의 에피토프-결합 단편은 단일 폴리펩타이드 사슬(예를 들어, scFv)일 수도 있거나, 또는 각각 아미노 말단 및 카르복시 말단(예를 들어, 디아바디, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편 등)을 가진 둘 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수도 있다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 단클론성 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 합성 항체, 키메라 항체, 다클론성 항체, 카멜화 항체, 단쇄 Fvs(scFv), 단쇄 항체, 항원, 등에 특이적으로 결합하는 면역학적 활성 항체 단편(예를 들어, 에피토프에 결합할 수 있는 항체 단편, 예를 들어 Fab 단편, Fab' 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fv 단편, V_L 및/또는 V_H 도메인을 함유하거나, 또는 이러한 VL 도메인(즉 CDR_L1, CDR_L2 및/또는 CDR_L3) 또는 VH 도메인(즉, CDR_H1, CDR_H2 및/또는 CDR_H3)의 상보성 결정 영역(CDR) 중 1, 2, 또는 3개를 함유한 단편), 2-기능적 또는 다중기능적 항체, 이황화물-결합된 이중특이적 Fvs(sdFv), 인트라바디, 및 디아바디, 및 상기 중 어느 것의 에피토프 결합 단편을 포함한다. 특히, 용어 "항체"는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자, 즉, 에피토프-결합 부위를 함유한 분자의 면역학적 활성 단편을 포함하도록 의도된다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 분류(예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 및 IgA_2) 또는 하위 분류의 것일 수 있다(예를 들어, 미국특허 공개 번호 20040185045; 20050037000; 20050064514; 20050215767; 20070004909; 20070036799; 20070077246; 및 20070244303 참조). 지난 수십 년간 항체의 치료적 가능성에 대한 관심이 되살아났고, 항체는 생명공학-유래 약물의 주요 분류 중 하나가 되었다(Chan, C.E. *et al.* (2009) "*The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases*," Singapore Med. J. 50(7):663-666). 200개가 넘는 항체-기반 약물이 사용에 대하여 승인되었거나 개발 중에 있다.

[0069] 용어 "키메라 항체"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 하나의 종(예를 들어, 마우스)의 항체 또는 항체 분류 또는 하위 분류와 동일하거나 상동성인 한편, 나머지 부분은, 그것들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 또 다른 종(예를 들어, 인간)의 항체 또는 항체 분류 또는 하위 분류와 동일하거나 상동성인 항체를 말한다. 본원에서 관심 있는 키메라 항체는 비-인간 영장류(예를 들어, 구대륙 원숭이(Old World Monkey), 유인원, 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원 결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0070] 본원에서 사용된 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 동종의 항체의 집단의 항체를 말하며, 즉, 집단을 포함하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수도 있는 자연 발생 돌연변이를 가지고 있는 가능한 항체를 제외하면 동일하고, 본원에서 사용된 용어 "다클론성 항체"는 이종기원 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 말한다. 용어 "단클론성"은 항체의 특징을 항체의 실질적으로 동종의 집단인 것으로 나타내지만, 임의의 특정 방법(예를 들어, 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 트랜스제닉 동물 등)에 의한 항체의 생성이 필요한 것으로 해석되어서는 안 된다. 용어는 전체 면역글로불린뿐 아니라 "항체"의 정의하에서 상기 기술된 단편 등을 포함한다. 단클론성 항체의 제조 방법은 업계에 공지되어 있다. 이용가능한 한 가지 방법은 Kohler, G. *et al.* (1975) "*Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity*," Nature 256:495-497의 방법 또는 그 변형이다. 전형적으로, 단클론성 항체는 마우스, 래트 또는 토끼에서 발생된다. 항체는 세포, 세포 추출물, 또는 원하는 에피토프를 함유한 단백질 조제물의 면역원성 양으로 동물을 면역화시킴으로써 생성된다. 면역원은 1차 세포, 배양 세포주, 암성 세포, 단백질, 펩타이드, 핵산, 또는 조직일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 면역화에 사용된 세포는 면역원으로서 사용 전에 일정 기간(예를 들어, 적어도 24시간)

동안 배양될 수도 있다. 세포는 그 자체로 또는 비-변성 보조제, 예를 들어 Ribi와 조합하여 면역원으로 사용될 수 있다(예를 들어, Jennings, V.M. (1995) "*Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production*," ILAR J. 37(3): 119-125 참조). 일반적으로, 세포는 면역원으로 사용될 때 온전하게 유지되어야 하고 바람직하게는 살아있어야 한다. 온전한 세포는 파열된 세포보다 면역화된 동물에 의해 항원이 더 잘 검출되게 한다. 변성 또는 거친 보조제, 예를 들어, 프로인트 보조제(Freud's adjuvant)의 사용은 세포를 파괴할 수도 있으며 그러므로 권장되지 않는다. 면역원은 주기적인 간격으로, 예컨대 격주로, 또는 매주 여러 번 투여될 수도 있거나, 또는 동물에서(예를 들어, 조직 재조합에서) 생존력을 유지하는 방법으로 투여될 수도 있다. 대안으로, 기존의 단클론성 항체 및 원하는 병원성 에피토프에 대하여 면역특이적인 임의의 다른 동등한 항체가 시퀀싱되어 업계에 공지된 임의의 방법에 의해 재조합으로 생성될 수 있다. 한 구체예에서, 이러한 항체가 시퀀싱된 다음 폴리뉴클레오타이드 서열이 발현 또는 증식을 위해 벡터로 클로닝된다. 관심있는 항체를 암호화하는 서열은 숙주 세포 내 벡터에서 유지될 수도 있으며 그 다음에 숙주 세포는 미래의 사용을 위해 확장되어 냉동될 수 있다. 이러한 항체의 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체의 친화성, 또는 다른 특징을 개선하기 위해 본 발명의 단일특이적 또는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적, 삼중특이적 및 사중특이적) 분자뿐만 아니라 친화성 최적화된 키메라 항체, 인간화 항체, 및/또는 개화 항체를 생성하기 위한 유전자 조작에 사용될 수도 있다.

[0071] 용어 "scFv"는 단쇄 가변 도메인 단편을 말한다. scFv 분자는 짧은 결합 펩타이드를 사용하여 경쇄 및/또는 중쇄 가변 도메인을 결합함으로써 제조된다. Bird *et al.* (1988)("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*," Science 242: 423-426)은 한 가변 도메인의 카르복시 말단 및 다른 가변 도메인의 아미노 말단 사이의 대략 3.5nm를 연결하는 결합 펩타이드의 예를 기술한다. 다른 서열의 링커들이 디자인되고 사용되었다(Bird *et al.* (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*," Science 242:423-426). 링커는 추가적인 기능, 예컨대 약물의 부착 또는 고체 지지체로의 부착을 위해 차례로 변형될 수 있다. 단쇄 변종은 재조합으로 또는 합성으로 생성될 수 있다. scFv의 합성에 의한 생성을 위해서, 자동화 합성기가 사용될 수 있다. scFv의 재조합 생성을 위해서는, scFv를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 적합한 플라스미드가 적합한 숙주 세포, 진핵세포, 예컨대 효모, 식물 세포, 곤충 세포 또는 포유류 세포, 또는 원핵세포, 예컨대 대장균(E. coli)으로 도입될 수 있다. 관심 있는 scFv를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 결찰과 같은 일상적인 조작에 의해 제조될 수 있다. 결과로 생긴 scFv는 업계에 공지된 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 분리될 수 있다.

[0072] 용어 "인간화" 항체는 일반적으로 재조합 기술을 사용하여 제조되는, 비-인간 종의 면역글로불린의 에피토프-결합 부위 및 인간 면역글로불린의 구조 및/또는 서열에 기초한 분자의 나머지 면역글로불린 구조를 가진 키메라 분자를 말한다. 에피토프-결합 부위는 불변 도메인으로 융합된 완전한 가변 도메인 또는 가변 도메인에서 적절한 프레임워크 영역으로 이식된 CDR만을 포함할 수도 있다. 에피토프-결합 부위는 야생형이거나 또는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수도 있다. 이것은 인간 개체에서 면역원으로서 불변 영역을 제거하지만, 외래 가변 영역에 대한 면역 반응의 가능성은 남는다(LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). 또 다른 접근법은 인간-유래 불변 영역를 제공하는 것뿐만 아니라, 가능한 인간 형태에 가깝도록 가변 영역을 재형상화하기 위해 가변 영역을 변형시키는 것에도 초점을 맞추고 있다. 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 영역은 특정 종에서 상대적으로 보존되어 있고 추정상 CDR에 대한 스캐폴딩을 제공하는 4개의 프레임워크 영역(FR)에 의해 플랭킹된 3개의 CDR을 함유하며, 이것들은 문제의 항원에 반응하여 달라지고 결합 능력을 결정하는 것으로 알려져 있다. 비-인간 항체가 특정 항원에 대하여 제조될 때, 가변 영역은 변형되는 인간 항체에 존재하는 FR 상에서 비-인간 항체로부터 유래된 CDR을 이식함으로써 "재형상화" 또는 "인간화"될 수 있다. 다양한 항체에 이 접근법의 적용은 Sato, K. *et al.* (1993) "*Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth*," Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Re-shaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection invivo*" Bio/Technology 9:266-271; Co, M.S. *et al.*(1991) "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*" Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "*Huma-nization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci.

(U.S.A.) 89:4285-4289; 및 Co, M.S. *et al.* (1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*," J. Immunol. 148: 1149-1154에 의해 보고되었다. 일부 구체예에서, 인간화 항체는 모든 CDR 서열(예를 들어, 마우스 항체의 6개의 CDR 모두를 함유한 인간화 마우스 항체)을 보존하고 있다. 다른 구체예에서, 인간화 항체는 원래의 항체와 비교하여 아미노산 서열(들)이 변화된 하나 이상의 CDR(하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 여섯 개)을 가지며, 이것들은 또한 원래의 항체의 하나 이상의 CDR"로부터 유래된"(즉, 이러한 CDR로부터 유래된, 이러한 CDR의 아미노산 서열에 대한 지식으로부터 유래된, 등) 하나 이상의 CDR로도 불린다. 항체의 가변 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 이러한 유도체를 생성하고 이러한 항체의 친화성, 또는 다른 특징을 개선하는데 사용될 수도 있다. 항체를 일반화하는데 있어서 일반적인 원칙은 항체의 에피토프-결합 부분의 기본 서열을 유지하는 한편, 항체의 비-인간 나머지를 인간 항체 서열과 바꾸는 것을 수반한다. 단클론성 항체의 인간화에는 일반적으로 4 단계가 있다. 이들은 다음과 같다: (1) 시작 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인의 뉴클레오타이드 및 예상 아미노산 서열을 결정하는 단계 (2) 인간화 항체 또는 개화 항체를 디자인하는 단계, 즉, 인간화 또는 개화 공정 중에 어떤 항체 프레임워크 영역을 사용할지 결정하는 단계 (3) 실제 인간화 또는 개화 방법론/기술 및 (4) 인간화 항체의 트랜스펙션 및 발현 단계. 예를 들어, 미국특허 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 및 6,331,415 참조.

[0073] 상기 나타낸 대로, 본 발명의 이중특이적 결합 분자는 적어도 2개의 에피토프-결합 도메인을 지닌다. 이러한 에피토프-결합 도메인의 각각은 "면역특이적" 방식으로 에피토프에 결합할 수 있다. 여기 사용된 것과 같은, 항체, 디아바디 또는 본 발명의 다른 이중특이적 결합 분자가 다른 분자의 영역(즉, 에피토프)에 "면역특이적으로" 결합한다(또는 "특이적" 결합을 나타냄)는 것은 그것이 다른 에피토프에 비해 그 에피토프와 더 자주, 더 빠르게, 더 큰 지속기간으로 및/또는 더 큰 친화성으로 반응하거나 회합한다는 것을 말한다. 예를 들어, CD32B의 에피토프(또는 CD79B의 에피토프)에 특이적으로 결합하는 항체는, 그것이 CD32B의 다른 에피토프(또는 CD79B의 다른 에피토프)에 또는 CD32B(또는 CD79B) 이외의 다른 분자의 에피토프에 결합하는 것보다 이러한 에피토프와 더 큰 친화성, 결합력으로, 더 쉽게, 및/또는 더 큰 지속기간으로 결합하는 항체이다. 또한, 예를 들어, 제1 표적에 면역특이적으로 결합하는 항체(또는 모이어티 또는 에피토프)는 제2 표적에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있거나 그렇지 않을 수 있다는 것이 이 정의를 읽음으로써 이해된다. 이와 같이, "면역특이적 결합"은 배타적 결합을 (포함할 수는 있지만) 반드시 필요로 하는 것은 아니다. 반드시 그렇지는 않지만 일반적으로 결합이란 말은 "특이적" 결합을 의미한다. 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체의 능력은, 예를 들어 면역분석에 의해 결정될 수 있다.

[0074] 본 발명의 인간화 분자의 에피토프-결합 도메인은 불변 도메인에 융합된 완전한 가변 도메인 또는 적절한 프레임워크 영역에 이식된 이러한 가변 도메인의 상보성 결정 영역(CDR)만을 포함할 수도 있다. 에피토프-결합 도메인은 야생형일 수 있거나 또는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해, 예를 들어 인간 개체에서 면역원으로서 작용하는 분자의 임의의 불변 도메인의 능력을 줄이도록 변형될 수도 있다. 이것은 인간 개체에서 면역원으로서 불변 영역을 제거할 수 있지만, 외래 가변 도메인에 대한 면역 반응의 가능성은 남는다(LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "*Mouse/ Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). 또 다른 접근법은 인간-유래 불변 영역를 제공하는 것뿐만 아니라, 가능한 인간 형태에 가깝도록 가변 영역을 재형상화하기 위해 가변 영역을 변형시키는 것에도 초점을 맞추고 있다. 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 도메인은 특정 종에서 상대적으로 보존되어 있고 추정상 CDR에 대한 스캐폴딩을 제공하는 4개의 프레임워크 영역(FR)에 의해 플랭킹된 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하며, 이들은 문제의 항원에 반응하여 달라지고 결합 능력을 결정하는 것으로 알려져 있다. 비-인간 항체가 특정 항원에 대하여 제조될 때, 가변 도메인은 변형되는 인간 항체에 존재하는 FR 상에서 비-인간 항체로부터 유래된 CDR을 이식함으로써 "재형상화" 또는 "인간화"될 수 있다. 다양한 항체에 이 접근법의 적용은 Sato, K. *et al.* (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327; Ver-hoeyen, M. *et al.*(1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "*Humani-zation Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity*" Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "*Reshaping A Human Mono-clonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.*(1991) "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "*Humanization Of An Anti-*

p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; 및 Co, M.S. *et al.* (1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*," J. Immunol. 148:1149-1154에 의해 보고되었다. 일부 구체예에서, 인간화 항체는 모든 CDR 서열(예를 들어, 마우스 항체의 6개의 CDR 모두를 함유한 인간화 마우스 항체)을 보존하고 있다. 다른 구체예에서, 인간화 항체는 원래의 항체와 비교하여 서열이 다른 하나 이상의 CDR(하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 여섯 개)을 가진다.

[0075] 설치류 또는 변형된 설치류 가변 도메인 및 인간 불변 도메인에 융합된 관련 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 키메라 항체를 포함한, 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 에피토프-결합 부위를 포함하는 많은 "인간화" 항체 분자가 설명되어 있다(예를 들어, Winter *et al.* (1991) "*Man-made Antibodies*," Nature 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al.* (1987) "*Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody(17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*," J. Immunol. 138:4534-4538, 및 Brown *et al.* (1987) "*Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody*," Cancer Res. 47:3577-3583 참조). 다른 참고문헌은 적절한 인간 항체 불변 도메인과의 융합 전에 인간 지지 프레임워크 영역(FR)에 이식된 설치류 CDR을 설명한다(예를 들어, Riechmann, L. *et al.*(1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Anti-lysozyme Activity*," Science 239:1534-1536; 및 Jones *et al.* (1986) "*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse*," Nature 321:522-525 참조). 또 다른 참고문헌은 재조합으로 덧붙여진 설치류 프레임워크 영역에 의해 지지되는 설치류 CDR을 기술한다. 예를 들어, 유럽 특허 공개 번호 519,596 참조. 이 "인간화" 분자들은 인간 수령체에서 상기 모이어티의 치료적 적용의 기간 및 유효성을 제한하는, 설치류 항-인간 항체 분자에 대한 원치 않는 면역학적 반응을 최소화하도록 디자인된다. 이용될 수 있는 다른 항체 인간화 방법은 Daugherty *et al.*(1991) "*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 및 미국특허 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 및 5,866,692에 개시된다.

[0076] **II. 항체 불변 영역**

[0077] 바람직한 CL 도메인은 인간 IgG CL 카파 도메인이다. 예시적인 인간 CL 카파 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:1)이다:

[0078]
```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

[0079] 대안으로, 예시적인 CL 도메인은 인간 IgG CL 람다 도메인이다. 예시적인 인간 CL 람다 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:2)이다:

[0080]
```
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS
```

[0081] 예시적인 CH1 도메인은 인간 IgG1 CH1 도메인이다. 예시적인 인간 IgG1 CH1 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:3)이다:

[0082]
```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV
```

[0083] 예시적인 CH1 도메인은 인간 IgG2 CH1 도메인이다. 예시적인 인간 IgG2 CH1 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:4)이다:

[0084]
```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV
```

[0085] 예시적인 CH1 도메인은 인간 IgG4 CH1 도메인이다. 예시적인 인간 IgG4 CH1 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:5)이다:

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV
```

[0086]

[0087] 한 예시적인 힌지 영역은 인간 IgG1 힌지 영역이다. 예시적인 인간 IgG1 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:6): EPKSCDKTHTCPPCP이다.

[0088] 다른 예시적인 힌지 영역은 인간 IgG2 힌지 영역이다. 예시적인 인간 IgG2 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:7): ERKCCVECPPCP이다.

[0089] 다른 예시적인 힌지 영역은 인간 IgG4 힌지 영역이다. 예시적인 인간 IgG4 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:8): ESKYGPPCPSCP이다. 여기 설명된 대로, IgG4 힌지 영역은 S228P와 같은 안정화 돌연변이를 포함할 수 있다. 예시적인 안정화된 IgG4 힌지 영역의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:9): ESKYGPPCPPCP이다.

[0090] 항체 중쇄의 CH2 및 CH3 도메인은 상호작용하여 Fc 영역을 형성하며, 이것은 제한은 아니지만 CD32B와 같은 Fc 감마 수용체(FcγRs)를 포함하는 세포성 Fc 수용체에 의해 인식되는 Fc 도메인을 함유한다. 예시적인 인간 IgG1의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:10)이며, 이것은 Kabat에 제시된 대로 EU 인덱스에 의해 넘버링되고, 여기서 X는 리신(K)이거나 부재한다:

```
231    240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

       290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

       340         350         360         370         380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

       390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

       440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

[0091]

[0092] 예시적인 인간 IgG2의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:11)이며, 이것은 Kabat에 제시된 대로 EU 인덱스에 의해 넘버링되고, 여기서 X는 리신(K)이거나 부재한다:

```
231    240         250         260         270         280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

       290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

       340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

       390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

       440     447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

[0093]

[0094] 예시적인 인간 IgG3의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:12)이며, 이것은 Kabat에 제시된 대로 EU 인덱스에 의해 넘버링되고, 여기서 X는 리신(K)이거나 부재한다:

```
231    240         250         260         270         280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

       290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

       340         350         360         370         380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

       390         400         410         420         430
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

       440     447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
```

[0095]

[0096] 예시적인 인간 IgG4의 CH2-CH3 도메인의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:13)이며, 이것은 Kabat에 제시된 대로 EU 인덱스에 의해 넘버링되고, 여기서 X는 리신(K)이거나 부재한다:

```
231    240         250         260         270         280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

       290         300         310         320         330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

       340         350         360         370         380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

       390         400         410         420         430
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

       440     447
ALHNHYTQKS LSLSLGX
```

[0097]

[0098] 본 명세서 전체에서 IgG 중쇄의 불변 영역의 잔기의 넘버링은 본원에 참고로 분명히 포함된, Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, H1, MD(1991)("Kabat")에서와 같은 EU 인덱스를 따른다. 용어 "Kabat에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 넘버링을 말한다. 면역글로불린의 성숙한 중쇄와 경쇄의 가변 도메인으로부터의 아미노산은 그 사슬에서 아미노산의 위치에 의해 지정된다. Kabat은 항체에 대해 수많은 아미노산 서열을 설명했고 각 하위군에 대해 아미노산 컨센서스 서열을 확인했고 각 아미노산에 잔기 번호를 부여했으며, CDR이 Kabat에 의해 정의된 대로 확인된다(Chothia C. & Lesk A. M.((1987) *"Canonical structures for the hyper-variable regions of immunoglobulins,"* J. Mol. Biol. 196:901-917에 의해 정의된 CDR_H1은 먼저 5개 잔기에서 시작한다는 것이 이해될 것이다). Kabat의 넘버링은 해당 항체를 보존된 아미노산을 참조하여 Kabat의 컨센서스 서열 중 하나와 정렬함으로써 그의 개론에 포함되지 않은 항체로 확장될 수 있다. 잔기 번호를 부여하는 이 방법은 본 분야의 표준이 되었으며, 키메라 또는 인간화된 변종을 포함하는 상이한 항체에서 동등한 위치에 있는 아미노산을 쉽게 확인한다. 예를 들어, 인간 항체 경쇄의 위치 50에 있는 아미노산은 마우스 항체 경쇄의 위치 50에 있는 아미노산과 동등한 위치를 점유한다.

[0099] 항체 불변 영역 내 많은 상이한 위치(예를 들어, Kabat에서 제시된 EU 인덱스에 의해 넘버링된 대로, 제한은 아니지만, 위치 270, 272, 312, 315, 356 및 358을 포함하는 Fc 위치)에서 다형성이 관찰되었으며, 따라서 제시된 서열과 선행 기술의 서열 사이에 약간의 차이가 존재할 수 있다. 인간 면역글로불린의 다형성 형태는 잘 특성화되어 있다. 현재, 18개의 Gm 알로타입(allotype)이 공지되어 있다: G1m(1, 2, 3, 17) 또는 G1m(a, x, f, z), G2m(23) 또는 G2m(n), G3m(5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) 또는 G3m(b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5)(Lefranc et al. *"The HumanIgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, FunctionAnd Regulation,"* Pergamon, Oxford, pp. 43-78(1990); Lefranc G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). 구체적으로 본 발명의 항체는 임의의 면역글로불린 유전자의 임의의 알로타입, 이소알로타입, 또는 하플로타입(haplotype)을 포함할 수 있고, 본원에서 제공된 서열의 알로타입, 이소알로타입 또는 하플로타입에 제한되는 것은 아닌 것으로 생각된다. 게다가, 일부 발현 시스템에서 CH3 도메인의 C-말단 아미노산 잔기(상기 볼드체)는 번역 후 제거될 수 있다. 따라서, CH3 도메인의 C-말단 잔기는 본 발명의 Fe 도메인-함유 결합 분자에서 선택적인 아미노산 잔기이다. 구체적으로, CH3 도메인의 C-말단 잔기가 없는 본 발명의 결합 분

자가 본 발명에 포함된다. 또한, CH3 도메인의 C-말단 리신 잔기를 포함하는 이러한 구성물이 본 발명에 구체적으로 포함된다.

[0100] **III. 본 발명의 바람직한 CD32B x CD79B 결합 분자**

[0101] 본 발명은 CD32B의 에피토프와 Cd79b의 에피토프에 결합할 수 있고, 이로써 B-세포의 표면에 자생적으로 어레이되는(즉, 재조합-유도 과발현 없이) 이러한 분자들에 동시에 결합할 수 있는 이중특이적 결합 분자에 관한 것이다. 이러한 특이적 결합 분자는 단일 폴리펩타이드 사슬(예를 들어, BiTe)로 이루어질 수 있거나, 또는 2개, 3개, 4개, 5개 또는 더 이상의 폴리펩타이드 사슬로 이루어질 수 있으며, 이들은 함께 바람직하게는 CD32B x CD79B 결합 분자의 개별 폴리펩타이드 사슬 간의 다수의 이황화물 결합의 존재를 통해서 공유결합된 복합체를 형성한다. 바람직하게, 이러한 분자는 항체 또는 Fc 도메인-함유 디아바디의 Fc 도메인에 결합하는 CD32B 분자의 능력을 실질적으로 방해하거나, 또는 훼방하지 않고, CD32B에 면역특이적으로 결합할 수 있을 것이다.

[0102] **A. 이중특이적 ScFv 및 항체**

[0103] 제1의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 단쇄 분자, 예컨대 VL_{CD32B} 도메인, VL_{CD79B} 도메인, VH_{CD32B} 도메인 및 VL_{CD79B} 도메인을 지닌 BiTe이며, 여기서 이러한 도메인들은 VL_{CD32B} 도메인이 VH_{CD32B} 도메인과 상호작용함으로써 CD32B-에피토프-결합 도메인을 형성하도록 허용하고, VL_{CD79B} 도메인이 VH_{CD79B} 도메인과 상호작용함으로써 CD79B-에피토프-결합 도메인을 형성하도록 허용하는 펩타이드 링커 분자에 의해 분리된다.

[0104] 제2의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B-에피토프 결합 도메인 및 CD79B-에피토프 결합 도메인을 형성할 수 있는, VL_{CD32B} 도메인, VL_{CD79B} 도메인, VH_{CD32B} 도메인 및 VL_{CD79B} 도메인을 지닌 이중특이적 항체, 또는 그것의 에피토프-결합 단편이다. 이러한 항체는 Fc 도메인을 함유할 수 있다.

[0105] **B. 이중특이적 디아바디**

[0106] **1. 비-Fc-도메인-함유 이중특이적 디아바디**

[0107] 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 2개, 3개, 4개, 5개 또는 더 이상의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이중특이적 1가 디아바디이다.

[0108] 예를 들어, 도 1은 이황화물 결합을 통해서 서로 공유결합된 2개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 디아바디를 도시한다. 제1 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인이 제2 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제1 항원(즉, CD32B 또는 CD79B)에 특이적인 제1 기능적 항원 결합 부위를 형성한다. 마찬가지로, 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인은 제1 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제2 항원(즉, CD79B 또는 CD32B, 제1 항원의 실체에 따라서)에 특이적인 제2 기능적 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인의 선택은 이 두 폴리펩타이드 사슬이 종합적으로 CD32B 및 CD79B에 결합할 수 있는 VL 및 VH 도메인을 포함하도록 조정된다(즉, 이들은 VL_{CD32B}/VH_{CD32B} 및 VL_{CD79B}/VH_{CD79B}를 포함한다)(도 1). 종합적으로, 각각의 이러한 VL 및 VH 도메인, 및 이들을 분리하는 개재 링커는 분자의 항원-결합 도메인이라고 언급된다.

[0109] 바람직한 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, CD32B 또는 CD79B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, VL_{CD32B} 또는 VL_{CD79B}), 개재 스페이서 펩타이드(링커 1), CD79B(이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B (이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 개재 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인, 헤테로다이머-촉진 도메인에 개선된 안정화를 제공할 수 있는 선택적 추가 도메인 및 C-말단을 포함한다(도 1).

[0110] 이러한 바람직한 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, CD79B 또는 CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, VL_{CD79B} 또는 VL_{CD32B}, 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬에 대해 선택된 VL 도메인에 따라), 개재 스페이서 펩타이드(링커 1), CD32B (이러한 제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B (이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 개재 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인, 및 C-말단을 포함한다(도 1).

[0111] 더 바람직하게, 이러한 VL 및 VH 도메인을 분리하는 링커 1의 길이는 이러한 VL 및 VH 도메인이 서로 결합되는 것을 실질적으로 또는 완전히 방지하도록 선택된다(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9개 아미노산 잔기로 구성된다). 따라서, 제1 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 실질적으로 또는 완전히 서로 결합할 수 없다. 마찬가지로, 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인은 실질적으로 또는 완전히 서로 결합할 수 없다. 바람직한 개재 스페이서 펩타이드(링커 1)는 서열(SEQ ID NO:14): GGGSGGGG을 가진다.

[0112] 링커 2의 목적은 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인을 그 폴리펩타이드 사슬의 선택적으로 존재하는 헤테로다이머-촉진 도메인으로부터 분리하는 것이다. 다양한 링커 중 어느 것이 링커 2의 목적을 위해 사용될 수 있다. 이러한 링커 2의 바람직한 서열은 IgG CH1 도메인으로부터 유래된 아미노산 서열: ASTKG(SEQ ID NO:15)를 가지거나, 또는 GGCGGG(SEQ ID NO:16)를 가지며, 이것은 이황화물 결합을 통해서 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 서로 공유결합시키는데 사용될 수 있는 시스테인 잔기를 지닌다. 링커 2, ASTKG(SEQ ID NO:15)는 이러한 시스테인을 지니지 않으므로, 이러한 링커 2의 사용은 바람직하게 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 도메인, 예컨대 SEQ ID NO:23의 E-코일 또는 SEQ ID NO:24의 K-코일(아래 참조)의 사용과 연합된다. 따라서, 한 구체예에서, 폴리펩타이드 사슬의 링커 2는 시스테인 잔기를 함유한다(제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 서로 공유결합시키기 위해). 다른 구체예에서, 폴리펩타이드 사슬의 링커 2는 시스테인을 지니지 않고, 이러한 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머-촉진 도메인이 이러한 시스테인 잔기를 함유함으로써 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 서로 공유결합시킨다.

[0113] 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머의 형성은 헤테로다이머-촉진 도메인의 포함에 의해 추진될 수 있다. 이러한 도메인은 하나의 폴리펩타이드 사슬 상의 GVEPKSC(SEQ ID NO:17) 또는 VEPKSC(SEQ ID NO:18)와 나머지 하나의 폴리펩타이드 사슬 상의 GFNRGEC(SEQ ID NO:19) 또는 FNRGEC(SEQ ID NO:20)를 포함한다(US 2007/0004909).

[0114] 그러나, 더 바람직하게, 본 발명의 헤테로다이머-촉진 도메인은 적어도 6개, 적어도 7개 또는 적어도 8개의 하전된 아미노산 잔기의 서열을 포함하는 반대 전하의 1, 2, 4 또는 4개의 직렬 반복 코일 도메인으로부터 형성된다(Apostolovic, B. *et al*. (2008) "*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil*," Biomacromolecules 9:3173-3180; Arndt, K.M. *et al*. (2001) "*Helix-stabilized Fv (hsFv)Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain*," J. Molec. Biol. 312:221-228; Arndt, K.M. *et al*. (2002) "*Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils*," Structure 10:1235-1248; Boucher, C. *et al*.(2010) "*Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions*," Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. *et al*. (2004) "*Synthetic Peptide Vac-cine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*," J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. *et al*. (2003) "*Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils:Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding*," Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriquez, J. *et al*.(2012) "*Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag*," Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. *et al*.(2009) "*End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions:New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures*," Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. *et al*. (2008) "*Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions*," Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. *et al*. (2002) "*Designing Heterodimeric Two-Stranded α-Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α-Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity*" J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. *et al*.(2012) "*The d′ --d--d′ ′ Vertical Triad is Less Discriminating Than the a′ ′--a--a′ ′ Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif*," J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. *et al*. (2007) "*Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface*," J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. *et al*. (2002) "*Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance*," J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N.(2005) "*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies*," Adv. Prot. Chem. 70: 79-112; Zeng, Y. *et al*. (2008) "*A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism*," J. Gene Med. 10:355-367).

[0115] 이러한 반복된 코일 도메인은 정확한 반복부일 수 있거나, 또는 치환을 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머-촉진 도메인은 8개의 음으로 하전된 아미노산의 잔기의 서열을 포함할 수 있고, 제2 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머-촉진 도메인은 8개의 음으로 하전된 아미노산 잔기의 서열을 포함할 수 있다. 제1 또는 제2 폴리펩타이드 사슬에 코일이 제공되는지는 중요하지 않으며, 단 반대 전하의 코일이 나머지 하나의 폴리펩타이드 사슬에 대해 사용되어야 한다. 그러나, 본 발명의 바람직한 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 디아바디는 음으로 하전된 코일을 가진 제1 폴리펩타이드이다. 양으로 하전된 아미노산은 리신, 아르기닌, 히스티딘 등일 수 있고, 및/또는 음으로 하전된 아미노산은 글루탐산, 아스파르트산 등일 수 있다. 양으로 하전된 아미노산은 바람직하게 리신이고 및/또는 음으로 하전된 아미노산은 바람직하게 글루탐산이다. 단지 하나의 헤테로다이머-촉진 도메인이 이용되는 것이 가능하지만(이러한 도메인은 호모다이머화를 억제함으로써 헤테로다이머화를 촉진할 것이다), 본 발명의 디아바디의 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬이 둘 다 헤테로다이머-촉진 도메인을 함유하는 것이 바람직하다.

[0116] 바람직한 구체예에서, 헤테로다이머-촉진 도메인 중 하나는 4개의 직렬 "E-코일" 나선 도메인(SEQ ID NO:21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)을 포함할 것이며, 이것의 글루타메이트 잔기는 pH 7에서 음전하를 형성할 것이고, 헤테로다이머-촉진 도메인 중 나머지는 4개의 직렬 "K-코일" 도메인(SEQ ID NO:22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE)을 포함할 것이고, 이것의 리신 잔기는 pH 7에서 양전하를 형성할 것이다. 이러한 하전된 도메인의 존재는 제1 및 제2 폴리펩타이드 간의 회합을 촉진하고, 따라서 헤테로다이머화를 증진시킨다. 특히 바람직한 것은 SEQ ID NO:21의 4개의 직렬 "E-코일" 나선 도메인 중 하나가 시스테인 잔기를 함유하도록 변형된 헤테로다이머-촉진 도메인이다: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK(SEQ ID NO:23). 마찬가지로, 특히 바람직한 것은 SEQ ID NO:22의 4개의 직렬 "K-코일" 나선 도메인 중 하나가 시스테인 잔기를 함유하도록 변형된 헤테로다이머-촉진 도메인이다: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE(SEQ ID NO:24).

[0117] **2. Fc-도메인-함유 이중특이적 디아바디**

[0118] 추가의 바람직한 구체예에서, 본 발명의 CD32B x CD79B 디아바디는 Fc 도메인을 더 포함한다. 본 발명의 이러한 Fc 도메인-함유 디아바디의 Fc 도메인은 완전한 Fc 영역(예를 들어, 완전한 IgG Fc 영역) 또는 완전한 Fc 영역의 단편일 수 있다. 본 발명의 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 Fc 도메인은 하나 이상의 Fc 수용체(예를 들어, FcγR(s))에 결합하는 능력을 지닐 수 있지만, 더 바람직하게 이러한 Fc 도메인은 FcγRIA(CD64), FcγRIIA(CD32A), FcγRIIB(CD32B), FcγRIIIA(CD16a) 또는 FcγRIIIB(CD16b)에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되거나 이러한 능력을 갖지 않을 것이다(야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비해). 본 발명의 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 Fc 도메인은 완전한 Fc 영역의 CH2 도메인의 일부 또는 전부 및/또는 CH3 도메인의 일부 또는 전부를 포함할 수 있거나, 또는 (예를 들어, 완전한 Fc 영역의 CH2 또는 CH3 도메인에 대하여 하나 이상의 삽입 및/또는 하나 이상의 결실을 포함할 수 있는) 변종 CH2 및/또는 변종 CH3 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 Fc 도메인은 비-Fc 폴리펩타이드 부분을 포함할 수 있거나, 또는 비-천연 완전 Fc 영역의 일부를 포함할 수 있거나, 또는 CH2 및/또는 CH3 도메인의 비-천연 발생 배향을 포함할 수 있다(예컨대, 예를 들어 2개의 CH2 도메인 또는 2개의 CH3 도메인, 또는 N-말단에서 C-말단 방향으로, CH2 도메인에 연결된 CH3 도메인, 등).

[0119] 본 발명의 이러한 Fc-도메인-함유 디아바디는 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있거나(예를 들어, 도 2), 또는 3개(예를 들어, 도 3a-3e) 또는 더 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다. 도 2는 각각의 헤테로다이머-촉진 도메인이 CH2-CH3 도메인으로 치환된 것을 제외하고, 상기 설명된 것과 유사한 구조를 가진 디아바디를 도시한다. 바람직하게, 이러한 폴리펩타이드 사슬에 의해 형성된 Fc 도메인은 FcγRIA(CD64), FcγRIIA(CD32A), FcγRIIIA(CD16a) 또는 FcγRIIIB(CD16b)와 같은 활성화 FcγR에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되거나 또는 이러한 능력을 갖지 않을 것이다(야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비해).

[0120] 도 3a-3e는 3개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 대안의 CD32B x CD79B Fc 디아바디를 도시하며, 이중 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬이 서로 공유결합되고, 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬이 서로 공유결합된다. 상기 설명된 디아바디에서처럼, 제1 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인이 제2 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제1 항원(즉, CD32B 또는 CD79B)에 특이적인 제1 기능적 항원 결합 부위를 형성한다. 마찬가지로, 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인은 제1 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제2 항원(즉, CD79B 또는 CD32B, 제1 항원의 실체에 따라)에 특이적인 제2 기능적 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인의 선택은 이 두 폴리펩타이드 사슬이 종합적으로 CD32B 및 CD79B에 결합할 수 있는 VL 및 VH 도메인을 포함하도록 조정된다(즉, 이들은 VL_{CD32B}/VH_{CD32B} 및 VL_{CD79B}/VH_{CD79B}를 포함한다). 종합적으로, 각각

의 이러한 VL 및 VH 도메인, 및 이들을 분리하는 개재 링커는 분자의 항원-결합 도메인이라고 언급된다.

[0121] 도 3a 및 도 3b에 도시된 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디 구체예에서, 제1 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, 시스테인-함유 펩타이드(펩타이드 1), 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진 IgG Fc 도메인, 개재 링커 펩타이드(링커 3), CH32B 또는 CH79B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, VL_{CD32B} 또는 VL_{CD79B}), 개재 펩타이드(링커 1), CD79B(이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B(이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 개재 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인, 헤테로다이머-촉진 도메인에 개선된 안정화를 제공할 수 있는 선택적 제4 스페이서 펩타이드(링커 4) 및 C-말단을 포함한다.

[0122] 이러한 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디 구체예에서, 제2 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, CH79B 또는 CH32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, VL_{CD79B} 또는 VL_{CD32B}, 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬에 대해 선택된 VL 도메인에 따라), 개재 링커 펩타이드(링커 1), CD32B(이러한 제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B(이러한 제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 개재 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인, 및 C-말단을 포함한다.

[0123] 이러한 바람직한 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, 시스테인-함유 펩타이드(펩타이드 1), 제1 폴리펩타이드 사슬의 Fc 도메인의 것과 동일한 이소타입을 가진 IgG Fc 도메인(바람직하게, 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인) 및 C-말단을 포함한다.

[0124] 도 3a에 도시된 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 구체예는 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 개재 스페이서 펩타이드(링커 2)가 시스테인 잔기를 함유하지 않는다는 점에서 도 3b에 도시된 것과 상이하며, 이러한 시스테인 잔기는 이제 이들 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머-촉진 도메인의 일부이다.

[0125] 도 3c에 도시된 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디 구체예에서, 제1 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, CD32B 또는 CD79B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, VL_{CD32B} 또는 VL_{CD79B}), 개재 펩타이드(링커 1), CD79B(이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B(이러한 제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 개재 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인, 시스테인-함유 펩타이드(펩타이드 1), 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진 IgG Fc 도메인, 및 C-말단을 포함한다.

[0126] 이러한 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디 구체예에서, 제2 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, CD79B 또는 CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, VL_{CD79B} 또는 VL_{CD32B}, 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬에 대해 선택된 VL 도메인에 따라), 개재 링커 펩타이드(링커 1), CD32B(이러한 제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B(이러한 제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 개재 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인, 및 C-말단을 포함한다.

[0127] 도 3c 및 도 3d의 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬은 (N-말단에서 C-말단 방향으로): 아미노 말단, 시스테인-함유 펩타이드(펩타이드 1), 제1 폴리펩타이드 사슬의 Fc 도메인의 것과 동일한 이소타입을 가진 IgF Fc 도메인(바람직하게, 항체 Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인) 및 C-말단을 포함한다.

[0128] 도 3d에 도시된 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 구체예는 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 개재 스페이서 펩타이드(링커 2)가 시스테인 잔기를 함유하지 않는다는 점에서 도 3c에 도시된 것과 상이하며, 이러한 시스테인 잔기는 이제 이들 폴리펩타이드 사슬의 헤테로다이머-촉진 도메인의 일부이다.

[0129] 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 시스테인-함유 펩타이드(펩타이드 1)는 동일한 아미노산 서열로 이루어지거나 상이한 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 1, 2, 3 또는 그 이상의 시스테인 잔기를 함유할 것이다. 특히 바람직한 펩타이드 1은 아미노산 서열(SEQ ID NO:25): DKTHTCPPCP 또는 (SEQ ID NO:26) GGGDKTHTCPPCP를 가진다. 바람직한 개재 링커 펩타이드(링커 3)는 아미노산 서열(SEQ ID NO:27): APSSS를 포함하고, 더 바람직하게는 아미노산 서열(SEQ ID NO:28): APSSSPME를 가진다. 바람직한 제4 스페이서 펩타이드(링커 4)는 서열 GGG를 가지거

나, 또는 SEQ ID NO:29: GGGNS이다.

[0130] 바람직하게, 본 발명의 Fc-함유 디아바디의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬에 의해 형성된 Fc 도메인은 FcγRIA(CD64), FcγRIIA(CD32A), FcγRIIIA(CD16a) 또는 FcγRIIIB(CD16b)와 같은 활성화 FcγR에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되거나 또는 이러한 능력을 갖지 않는다(야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비해). 이러한 수용체에 대한 결합을 감소시키거나 제거하는 돌연변이를 가진 Fc 도메인은 본 분야에 잘 알려져 있으며, 위치 234 또는 235에 아미노산 치환, 위치 265에 치환 또는 위치 297에 치환을 포함한다(예를 들어, 여기 참고로 포함되는 미국특허 5,624,821을 참조한다). 바람직한 구체예에서, CH2 및 CH3 도메인은 위치 234에 알라닌 치환 및 위치 235에 알라닌 치환을 포함한다.

[0131] 본 발명의 F-함유 디아바디의 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2 및/또는 CH3 도메인은 동일할 필요는 없고, 유리하게는 2개의 폴리펩타이드의 복합체 형성을 조성하기 위해 변형된다. 예를 들어, 아미노산 치환(바람직하게 '손잡이'(knob)를 형성하는 벌키한 측면 기를 포함하는 아미노산, 예컨대 트립토판으로의 치환)이 CH2 또는 CH3 사슬에 도입될 수 있어서, 입체적 간섭이 유사하게 돌연변이된 도메인과의 상호작용을 방지하고 돌연변이된 도메인이 상보하는, 또는 순응하는 돌연변이, 즉 '구멍'(예컨대 글리신으로의 치환)이 조작되어 있는 도메인과 불가피하게 쌍을 이루게 될 것이다. 이러한 돌연변이 세트는 Fc 디아바디 분자를 포함하는 폴리펩타이드의 어떠한 쌍으로, 및 나아가 상기 쌍의 폴리펩타이드 사슬들의 어떠한 일부로 조작될 수 있다. 호모다이머화보다 헤테로다이머화를 장려하기 위한 단백질 조작 방법은 본 분야에, 특히 면역글로불린-유사 분자의 조작에 대해서 잘 알려져 있고 본원에도 포함된다(예를 들어, 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 Re-modeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,"* J. Mol. Biol. 270:26-35, and Xie *et al.* (2005) *"A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,"* J. Immunol. Methods 296:95-101 참조; 상기 문헌들은 각각 전체 내용이 참고로 본원에 포함된다). 바람직하게 '손잡이'는 제1 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인에 조작되고 '구멍'은 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2-CH3 도메인에 조작된다. 따라서, '손잡이'는 제1 폴리펩타이드 사슬이 그것의 CH2 및/또는 CH3 도메인을 통해 호모다이머화하는 것을 방지하는데 도움이 될 것이다. 제3 폴리펩타이드 사슬은 대신 바람직하게 '구멍'을 함유하기 때문에, 그것은 제1 폴리펩타이드 사슬과 헤테로다이머화될 뿐만 아니라 자체 호모다이머화될 것이다. 바람직한 손잡이는 천연 IgG Fc 영역이 변형 T366W를 함유하도록 변형시킴으로써 생성된다. 바람직한 구멍은 천연 IgG Fc 영역이 변형 T366S, L368A 및 Y407V를 함유하도록 변형시킴으로써 생성된다. 제3 폴리펩타이드 사슬 호모다이머를 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 최종 이중특이적 1가 Fc 디아바디로부터 정제하는 것을 보조하기 위해, 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2 및 CH3 도메인의 단백질 A 결합 부위는 바람직하게 위치 435에서 아미노산 치환에 의해 돌연변이된다(H435R). 제3 폴리펩타이드 사슬 호모다이머를 제1, 제2 및 제3 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 최종 이중특이적 1가 Fc 디아바디로부터 정제하는 것을 보조하기 위해, 제3 폴리펩타이드 사슬의 CH2 및 CH3 도메인의 단백질 A 결합 부위는 바람직하게 아미노산 치환에 의해 돌연변이된다. 따라서, 제3 폴리펩타이드 사슬 호모다이머는 단백질 A에 결합하지 않을 것이고, 반면 이중특이적 1가 Fc 디아바디는 제1 폴리펩타이드 사슬 상의 단백질 A 결합 부위를 통해 단백질 A에 결합하는 능력을 보유할 것이다.

[0132] **3. 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디**

[0133] 본 발명의 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디는 2개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 것이며, 아래와 같이 포함할 것이다:

[0134] (1) CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD32B}), 이러한 VL_{CD32B} 도메인은 서열 (SEQ ID NO:30)을 가진다:

[0135]
```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
GTKVEIK
```

[0136] (2) CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD32B}), 이러한 VH_{CD32B} 도메인은 서열 (SEQ ID NO:31)을 가진다:

[0137]
```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE
IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA
LGLDYWGQGT LVTVSS
```

[0138] (3) CD79B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD79B}), 이러한 VL_{CD79B} 도메인은 서열 (SEQ ID NO:32)을 가진다:

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
[0139] LTFGGGTKLE IK

[0140] (4) CD79B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD79B}), 이러한 VH_{CD79B} 도메인은 서열 (SEQ ID NO:33)을 가진다:

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
IDPSDSETHY NQKFKDRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM
[0141] GYWGQGTTVT VSS

[0142] 본 발명의 제1의 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디는 2개의 폴리펩타이드 사슬을 가진다. 이러한 예시적인 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단, 상기 나타낸 VL_{CD32B} 도메인, 링커 1, 상기 나타낸 VH_{CD79B} 도메인, 시스테인-함유 링커 2, E-코일 도메인, 및 C-말단의 구조를 가진다. 이러한 바람직한 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:34)이다:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAALE KEVAALEKEV
[0143] AALEKEVAAL EK

[0144] SEQ ID NO:34에서, 아미노산 잔기 1-107은 CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD32B})(SEQ ID NO:30)이고, 아미노산 잔기 108-115는 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 116-228은 CD79B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD79B})(SEQ ID NO:33)이고, 아미노산 잔기 229-234는 시스테인-함유 링커 2(SEQ ID NO:16)이고, 아미노산 잔기 235-262는 헤테로다이머-촉진 E-코일 도메인(SEQ ID NO:21)이다.

[0145] 이러한 예시적인 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로 (SEQ ID NO:35)의 아미노산 서열을 가진다:

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSGGCG GGKVAALKEK
[0146] VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[0147] SEQ ID NO:35에서, 아미노산 잔기 1-112는 CD79B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD79B})(SEQ ID NO:32)이고, 아미노산 잔기 113-120는 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 121-236은 CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD32B})(SEQ ID NO:31)이고, 아미노산 잔기 237-242는 시스테인-함유 링커 2(SEQ ID NO:16)이고, 아미노산 잔기 243-270은 헤테로다이머-촉진 K-코일 도메인(SEQ ID NO:22)이다.

[0148] 본 발명의 제2의 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디는 2개의 폴리펩타이드 사슬을 가지며, 여기서 제1 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로: N-말단, 상기 나타낸 VL_{CD32B} 도메인, 링커 1, 상기 나타낸 VH_{CD79B} 도메인, 링커 2, 시스테인-함유 E-코일 도메인, 및 C-말단의 구조를 가진다. 이러한 바람직한 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:36)이다:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA
ASTLDSGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYTFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVTMTTDTS TSTAYMELRS
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSAS TKGEVAACEK EVAALEKEVA
[0149] ALEKEVAALE K

[0150] SEQ ID NO:36에서, 아미노산 잔기 1-107은 CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD32B})(SEQ ID NO:30)이고, 아

미노산 잔기 108-115는 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 116-228은 CD79B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD79B})(SEQ ID NO:33)이고, 아미노산 잔기 229-233은 링커 2(SEQ ID NO:15)이고, 아미노산 잔기 234-261은 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 E-코일 도메인(SEQ ID NO:23)이다.

[0151] 이러한 제2의 예시적인 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로 (SEQ ID NO:37)의 아미노산 서열을 가진다:

[0152]
```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSASTK GKVAACKEKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE
```

[0153] SEQ ID NO:37에서, 아미노산 잔기 1-112는 CD79B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD79B})(SEQ ID NO:32)이고, 아미노산 잔기 113-120는 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 121-236은 CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD32B})(SEQ ID NO:31)이고, 아미노산 잔기 237-241은 링커 2(SEQ ID NO:15)이고, 아미노산 잔기 242-269는 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 K-코일 도메인(SEQ ID NO:24)이다.

[0154] **4. 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디**

[0155] 본 발명의 제1의 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디는 3개의 폴리펩타이드 사슬을 가진다(도 3a). 제1 폴리펩타이드 사슬은 (SEQ ID NO:38) 서열을 가진 손잡이-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 것이다:

[0156]
```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGK
```

[0157] 따라서, 이러한 예시적인 Fc 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로: 펩타이드 1, IgG Fc 영역의 CH2-CH3 도메인, 링커 1, CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD32B}), 시스테인-함유 링커 2, CD79B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD79B}), 링커 3, E-코일 도메인, 링커 4 및 C-말단의 구조를 가진다. 이러한 바람직한 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:39)이다:

[0158]
```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT QSPSSLSASV
GDRVTITCRA SQEISGYLSW LQQKPGKAPR RLIYAASTLD SGVPSRFSGS
ESGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQYFSYP LTFGGGTKVE IKGGGSGGGG
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
IDPSDSETHY NQKFKDRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM
GYWGQGTTVT VSSGGCGGGE VAALEKEVAA LEKEVAALEK EVAALEKGGG
NS
```

[0159] SEQ ID NO:39에서, 아미노산 잔기 1-10은 펩타이드 1(SEQ ID NO:25)이고, 아미노산 잔기 11-227은 손잡이-함유 IgG Fc 영역의 CH2및 CH3 도메인(SEQ ID NO:38)이고, 아미노산 잔기 228-235는 링커 3(SEQ ID NO:28)이고, 아미노산 잔기 236-342는 CD32B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD32B})(SEQ ID NO:30)이고, 아미노산 잔기 343-350은 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 351-463은 CD79B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD79B})(SEQ ID NO:33)이고, 아미노산 잔기 464-469는 시스테인-함유 링커 2(SEQ ID NO:16)이고, 아미노산 잔기 470-497은 헤테로다이머-촉진 E-코일 도메인(SEQ ID NO:21)이고, 아미노산 잔기 498-502는 링커 4(SEQ ID NO:29)이다.

[0160] 제1 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 바람직한 폴리뉴클레오타이드는 서열 (SEQ ID NO:40)을 가진다:

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ccgcgggggg
accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct
cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc
caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca
gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc
caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat
cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct
tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac
gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa agcccccttcc agctccccta
tggaagacat ccagatgacc cagtctccat cctccttatc tgcctctgtg
ggagatagag tcaccatcac ttgtcgggca agtcaggaaa ttagtggtta
cttaagctgg ctgcagcaga aaccaggcaa ggcccctaga cgcctgatct
acgccgcatc cactttagat tctggtgtcc catccaggtt cagtggcagt
gagtctggga ccgagttcac cctcaccatc agcagccttc agcctgaaga
ttttgcaacc tattactgtc tacaatattt tagttatccg ctcacgttcg
gaggggggac caaggtggaa ataaaaggag gcggatccgg cggcggaggc
caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc
agtgaaggtc tcctgcaagg cttctggtta caccttacc agctactgga
tgaactgggt gcgacaggcc cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg
attgatcctt cagacagtga aactcactac aatcaaaagt tcaaggacag
agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac atggagctga
ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg
ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctcctccg gaggatgtgg
cggtggagaa gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct ttggagaagg
aggtcgctgc acttgaaaag gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg
[0161] aactct

[0162] 이러한 예시적인 Fc 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로: CD79B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD79B}), 링커 1, CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD32B}), 시스테인-함유 링커 2, 헤테로다이머-촉진 K-코일 도메인, 및 C-말단의 구조를 가진다.

[0163] 제2 폴리펩타이드 사슬에 대한 바람직한 서열은 (SEQ ID NO:41)이다:

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSGGCG GGKVAALKEK
[0164] VAALKEKVAA LKEKVAALKE

[0165] SEQ ID NO:41에서, 아미노산 잔기 1-112는 CD79B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD79B})(SEQ ID NO:32)이고, 아미노산 잔기 113-120은 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 121-236은 CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD32B})(SEQ ID NO:31)이고, 아미노산 잔기 237-242는 시스테인-함유 링커 2(SEQ ID NO:16)이고, 아미노산 잔기 243-270은 헤테로다이머-촉진 K-코일 도메인(SEQ ID NO:22)이다.

[0166] 제2 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 바람직한 폴리뉴클레오타이드는 서열 (SEQ ID NO:42)를 가진다:

```
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca
gccggcctcc atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg
gaaagacata tttgaattgg tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac
cgcctaattt atctggtgtc taaactggac tctggggtcc cagacagatt
cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc agcagggtgg
aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg
cggcggaggc gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac
ctggaggatc cctgagactc tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt
gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc ccaggcaagg ggcttgagtg
ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca tactatgctg
agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt
ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta
ctgtggggct ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg
tctcctccgg aggatgtggc ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa
gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgcagc
cctgaaagag
```

[0167]

[0168] 이러한 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디는 아미노산 서열 (SEQ ID NO:43)을 가진 구멍-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 포함할 것인 제3 폴리펩타이드 사슬을 가질 것이다:

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

[0169]

[0170] 따라서, 이러한 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:44이다:

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK
```

[0171]

[0172] SEQ ID NO:44에서, 아미노산 잔기 1-10은 펩타이드 1(SEQ ID NO:25)이고, 아미노산 잔기 11-227은 구멍-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인(SEQ ID NO:43)이다.

[0173] 제3 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 바람직한 폴리뉴클레오타이드는 서열 (SEQ ID NO:45)를 가진다:

```
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ccgcgggggg
accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct
cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc
caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca
gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc
caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat
cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgagttg cgcagtcaaa
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc
ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct
tcttcctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac
gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a
```

[0174]

[0175] 또한, 본 발명의 제2의 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디는 3개의 폴리펩타이드 사슬을 가진다 (도 3b). 제1 폴리펩타이드 사슬은 SEQ ID NO:38의 아미노산 서열을 가진 손잡이-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0176] 따라서, 이러한 제2의 예시적인 Fc 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로: 펩타이드

1, 손잡이-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인, CD32B와 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD32B}), 링커 2, CD79B와 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD79B}), 링커 3, 시스테인-함유 E-코일 도메인, 링커 4 및 C-말단의 구조를 가진다. 이러한 바람직한 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 (SEQ ID NO:46)이다:

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT QSPSSLSASV
GDRVTITCRA SQEISGYLSW LQQKPGKAPR RLIYAASTLD SGVPSRFSGS
ESGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQYFSYP LTFGGGTKVE IKGGGSGGGG
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
IDPSDSETHY NQKFKDRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM
GYWGQGTTVT VSSASTKGEV AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEKGGGN
S
```

[0177]

[0178] SEQ ID NO:46에서, 아미노산 잔기 1-10은 펩타이드 1(SEQ ID NO:25)이고, 아미노산 잔기 11-227은 손잡이-함유 IgG Fc 영역의 CH2및 CH3 도메인(SEQ ID NO:38)이고, 아미노산 잔기 228-235는 링커 3(SEQ ID NO:28)이고, 아미노산 잔기 236-342는 CD32B와 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD32B})(SEQ ID NO:30)이고, 아미노산 잔기 343-350은 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 351-463은 CD79B와 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD79B})(SEQ ID NO:33)이고, 아미노산 잔기 464-468은 링커 2(SEQ ID NO:15)이고, 아미노산 잔기 469-496은 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 E-코일 도메인(SEQ ID NO:23)이고, 아미노산 잔기 497-501은 링커 4(SEQ ID NO:29)이다.

[0179] 이러한 제2의 예시적인 Fc 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로: CD79B와 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD79B}), 링커 1, CD32B와 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD32B}), 링커 2, 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 K-코일 도메인, 및 C-말단의 구조를 가진다.

[0180] 제2 폴리펩타이드 사슬에 대한 바람직한 서열은 (SEQ ID NO:47)이다:

```
DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN
RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
LTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS
LYLQMNSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSASTK GKVAACKEKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE
```

[0181]

[0182] SEQ ID NO:47에서, 아미노산 잔기 1-112는 CD79B에 결합하는 항체의 VL 도메인(VL_{CD79B})(SEQ ID NO:32)이고, 아미노산 잔기 113-120은 링커 1(SEQ ID NO:14)이고, 아미노산 잔기 121-236은 CD32B에 결합하는 항체의 VH 도메인(VH_{CD32B})(SEQ ID NO:31)이고, 아미노산 잔기 237-241은 링커 2(SEQ ID NO:15)이고, 아미노산 잔기 242-269는 시스테인-함유 헤테로다이머-촉진 K-코일 도메인(SEQ ID NO:24)이다.

[0183] 이러한 제2의 예시적인 Fc 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬은 구멍-함유 IgG 영역의 CH2 및 CH3 도메인(SEQ ID NO:43)을 포함할 것이다.

[0184] 따라서, 이러한 예시적인 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬의 아미노산 서열은 SEQ ID NO:48이다:

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK
```

[0185]

[0186] SEQ ID NO:48에서, 아미노산 잔기 1-10은 펩타이드 1(SEQ ID NO:25)이고, 아미노산 잔기 11-227은 구멍-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인(SEQ ID NO:43)이다.

[0187] 본 발명의 대안의 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디 분자가 도 3c에 개략적으로 도시된다. 이러한 대안의 CD32B x CD79B Fc 디아바디 분자는 3개의 폴리펩타이드 사슬을 가지며, 이중 제1 및 제2 폴리펩타이드 사

슬이 서로 공유결합되고, 제1 및 제3 폴리펩타이드 사슬이 서로 공유결합된다. 대안의 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디 분자는 바람직한 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디 분자에 존재하는 순서와 비교하여 그것의 도메인들의 순서가 다르다. 그러나, 바람직한 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 경우에서처럼, 대안의 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인은 대안의 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제1 항원(즉, CD32B 또는 CD79B)에 특이적인 제1 기능적 항원 부위를 형성한다. 마찬가지로, 대안의 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 도메인은 대안의 CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬의 VH 도메인과 상호작용하여 제2 항원(즉, CD79B 또는 CD32B, 제1 항원의 실체에 따라)에 특이적인 제2 기능적 항원 결합 부위를 형성한다. 따라서, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬의 VL 및 VH 도메인의 선택은 이 두 폴리펩타이드 사슬이 종합적으로 CD32B 및 CD79B에 결합할 수 있는 VL 및 VH 도메인을 포함하도록 조정된다(즉, 이들은 VL_{CD32B}/VH_{CD32B} 및 VL_{CD79B}/VH_{CD79B}를 포함한다)(도 3c). 종합적으로, 각각의 이러한 VL 및 VH 도메인, 및 이들을 분리하는 개재 링커는 분자의 항원-결합 도메인이라고 언급된다.

[0188] 이러한 대안의 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 아미노 말단, CD32B 또는 CD79B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, VL_{CD32B} 또는 VL_{CD79B}), 개재 스페이서 펩타이드(링커 1), CD79B(제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B(제1 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 제3 개재 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인, 헤테로다이머-촉진 도메인(바람직하게 E-코일 도메인)에 개선된 안정화를 제공할 수 있는 선택적 제4 스페이서 펩타이드(링커 4), 시스테인-함유 펩타이드(펩타이드 1), IgG Fc 도메인(바람직하게 손잡이-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인) 및 C-말단을 포함한다. 바람직하게, 제1 폴리펩타이드의 Fc 도메인은 FcγRIA(CD64), FcγRIIA(CD32A), FcγRIIB(CD32B), FcγRIIIA(CD16a) 또는 FcγRIIIB(CD16b)에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되거나 또는 이러한 능력을 갖지 않는다(야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비해)(도 3c).

[0189] 이러한 대안의 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에서 C-말단 방향으로, 아미노 말단, CD79B 또는 CD32B에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VL 도메인(즉, 디아바디의 제1 폴리펩타이드 사슬에 대해 선택된 VL 도메인에 따라 VL_{CD79B} 또는 VL_{CD32B}), 개재 링커 펩타이드(링커 1), CD79b(제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD79B}를 함유하는 경우) 또는 CD32B(제2 폴리펩타이드 사슬이 VL_{CD32B}를 함유하는 경우)에 결합할 수 있는 단클론성 항체의 VH 도메인, 시스테인-함유 스페이서 펩타이드(링커 2), 헤테로다이머-촉진 도메인(바람직하게 K-코일 도메인) 및 C-말단을 포함한다(도 3c).

[0190] 바람직한 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 제3 폴리펩타이드 사슬은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 아미노 말단, 시스테인-함유 펩타이드(펩타이드 1), 제1 폴리펩타이드 사슬의 Fc 도메인의 것과 동일한 이소타입을 가진 IgG Fc 도메인(바람직하게, 구멍-함유 IgG Fc 영역의 CH2 및 CH3 도메인) 및 C-말단을 포함한다. 바람직하게, 제3 폴리펩타이드 사슬의 Fc 도메인은 FcγRIA(CD64), FcγRIIA(CD32A), FcγRIIB(CD32B), FcγRIIIA(CD16a) 또는 FcγRIIIB(CD16b)에 결합하는 능력이 실질적으로 감소되거나 또는 이러한 능력을 갖지 않는다(야생형 Fc 영역에 의해 나타나는 결합에 비해)(도 3c).

[0191] 도 3d는 시스테인-함유 링커 2(예를 들어, GGCGGG(SEQ ID NO:16))가 비-시스테인-함유 링커(예를 들어, ASTKG(SEQ ID NO:15)로 치환되고 각각의 헤테로다이머-촉진 도메인이 시스테인 잔기를 함유하는 이러한 Fc 도메인의 변종을 도시한다(예를 들어, **E**VAA**C**P**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K-**E**VAAL**E**K(SEQ ID NO:23) 및 **K**VAA**C**P**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E-**K**VAAL**K**E(SEQ ID NO:24)).

[0192] **약학적 조성물**

[0193] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 유용한 벌크 약물 조성물(예컨대 불순물이 섞인 또는 비-멸균 조성물) 및 단위 제형(dosage form)의 제조에 사용될 수 있는 약학적 조성물(즉, 대상 또는 환자에 투여하기에 적합한 조성물)을 포함한다. 이러한 조성물은 예방적 또는 치료적 유효량의 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, 특히 본 발명의 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디 중 어느 것 또는 이러한 제제의 조합 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 바람직하게, 본 발명의 조성물은 예방적 또는 치료적 유효량의 본 발명의 하나 또는 그 이상의 분자 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0194] 또한, 본 발명은 본 발명의 이러한 CD32B x CD79B 결합 분자, 및 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바

디 중 어느 것 및 특정 자가면역 또는 염증성 질환 항원에 특이적인 제2 치료 항체(예컨대 자가면역 또는 염증성 질환 항원 특이적 단클론성 항체), 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0195] 특정 구체예에서, 용어 "약학적으로 허용되는"은 동물, 더 구체적으로 인간에 사용하기 위해 미국연방 또는 주 정부의 당국에 의해 승인되거나 미국약전 또는 다른 일반적으로 공인된 약전에 열거된 것을 의미한다. 용어 "담체"는 그것과 함께 치료제가 투여되는 희석제, 보조제(예컨대 프로인트 보조제(완전 및 불완전)), 부형제 또는 비히클을 나타낸다. 이러한 약학적 담체는 멸균 액체, 예컨대 물 및, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들을 포함하는 오일, 예컨대 땅콩 오일, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등일 수 있다. 약학적 조성물이 정맥내 투여될 때는 물이 바람직한 담체이다. 또한, 식염수 용액 및 수성 덱스트로오스 및 글리세롤 용액이 액체 담체로서, 특히 주사용 용액에 대해 사용될 수 있다. 적합한 약학적 부형제는 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 쵸크, 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은 필요에 따라 또한 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀션, 정제, 환, 캡슐, 분말, 지속 방출 제제 등의 형태를 가질 수 있다.

[0196] 일반적으로, 본 발명의 조성물의 성분들은 별도로 또는 단위 제형으로 함께 혼합되어, 예를 들면 활성제의 양을 표시하는 앰플 또는 샤세와 같은 밀폐된 용기에 건조 동결건조 분말 또는 수분 무함유 농축물로서 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 멸균 제약 등급 물 또는 식염수를 함유하는 주입 병에 배분될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 멸균 주사용수 또는 식염수의 앰플이 제공될 수 있고, 성분들은 투여 전에 혼합될 수 있다.

[0197] 본 발명의 조성물은 중성 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 염은, 제한은 아니지만, 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유도된 것들과 같은 음이온과 함께 형성된 것들 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화 철, 아이소프로필아민, 트라이에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유도된 것들과 같은 양이온과 함께 형성된 것들을 포함한다.

[0198] 또한, 본 발명은 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자 및 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디 중 어느 것 단독으로 또는 이러한 약학적으로 허용되는 담체와 함께 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 제공한다. 추가로, 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 예방제 또는 치료제가 또한 약학적 팩 또는 키트에 포함될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 약학적 조성물의 하나 이상의 성분으로 채워진 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 팩 또는 키트를 포함한다. 임의로 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 당국에 의해 규정된 형태의 안내문이 이러한 용기(들)에 결합될 수 있고, 안내문은 당국에 의한 인체 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매의 승인을 반영한다.

[0199] 본 발명은 상기 방법들에 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 한 구체예에서, 키트는 본 발명의 하나 이상의 분자를 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 추가로 자가면역 또는 염증성 질환의 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제를 하나 이상의 용기에 더 포함한다. 또 다른 구체예에서, 키트는 추가로 자가면역 또는 염증성 질환과 관련된 하나 이상의 자가면역 또는 염증성 질환 항원에 결합하는 하나 이상의 항체를 더 포함한다. 특정 구체예에서, 다른 예방제 또는 치료제는 화학요법제이다. 또 다른 구체예에서, 예방제 또는 치료제는 생물학적 또는 호르몬 치료제이다.

[0200] **발명의 조성물의 용도**

[0201] 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, 및 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디는 CD79B의 발현과 관련되거나 그것을 특징으로 하는, 또는 질환에 대해 B-세포 성분을 가지는 임의의 질환 또는 상태를 치료하는 능력을 가진다. 따라서, 제한은 아니지만, 이러한 분자를 포함하는 약학적 조성물은 자가면역 또는 염증성 질환 또는 상태의 진단 또는 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 이식 거부반응, 이식편 대 숙주병(GvHD), 류머티스 관절염(RA), 다발성 경화증(MS), 및 전신 홍반성 루푸스(SLE)를 포함하는, B-세포 매개 질환 또는 장애의 증상을 치료, 예방, 진행의 지연 및/또는 완화하기 위해 사용될 수 있다. 도 5는 마우스에서 이종성 GvHD를 감소시키는 바람직한 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 능력을 나타낸다(여기 참고로 포함되는 WO 2015/021089 참조). 유사하게, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 B-세포 매개 면역 반응(예를 들어, 자기-항원을 포함하는, 항원에 대한 반응)을 감소시키거나 억제하고, B-세포 활성화를 약화시키고, 및/또는 B-세포 증식을 감소시키거나 억제하기 위해 이용될 수 있다.

[0202] **투여 방법**

[0203] 본 발명의 조성물은 본 발명의 약학적 조성물의 유효량을 대상에 투여함으로써 질환, 장애 또는 감염과 관련된 하나 또는 이상의 증상을 치료, 예방 및 완화하기 위해 제공될 수 있다. 바람직한 양태에서, 이러한 조성물은 실질적으로 정제된다(즉, 실질적으로 조성물의 효과를 제한하거나 바람직하지 않은 부작용을 생성하는 물질이 없다). 특정 구체예에서, 대상은 동물, 바람직하게 포유류, 예컨대 비-영장류(예컨대 소, 말, 고양이, 개, 설치류 등) 또는 영장류(예컨대 사이노몰거스 원숭이, 인간 등)이다. 바람직한 구체예에서, 대상은 인간이다.

[0204] 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여 용량 및 "투약 섭생"(투여 빈도)은, 예를 들어 지질화와 같은 변형에 의해 이러한 결합 분자의 흡수 및 조직 침투를 증진시킴으로써 감소되거나 변경될 수 있다. 한 구체예에서, 단일 용량 수준(아래 참조)이 치료법 과정에 걸쳐서 한 번 또는 여러 번 투여될 것이다. 제2 구체예에서, 치료 과정에 걸쳐서 제공된 용량은 다양할 것이며, 예를 들어 상승적 투약 섭생 또는 하강적 투약 섭생일 것이다. 추가로, 투여되는 용량은 치료법에 대한 대상의 관용성 및 치료법과 관련된 치료 성공도를 반영하도록 조정될 수 있다.

[0205] 장애와 관련한 하나 이상의 증상의 치료, 예방 또는 완화에 효과적일 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 용량은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 제제에 이용될 수 있는 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 상태의 심각성에 의존할 것이며, 주치의의 판단과 각 환자의 환경에 따라 결정되어야 한다. 유효 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 도출된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다. 그러나, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 바람직하게 전형적으로 피험자의 체중 기준 적어도 약 0.1 mg/kg, 적어도 약 0.2 mg/kg, 적어도 약 0.3 mg/kg, 적어도 약 0.5 mg/kg, 적어도 약 1.0 mg/kg, 적어도 약 3.0 mg/kg, 적어도 약 5.0 mg/kg, 적어도 약 7.5 mg/kg, 적어도 약 10.0 mg/kg, 적어도 약 15 mg/kg, 적어도 약 20 mg/kg 또는 그 이상인 용량으로 투여된다. 특히, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 1.0 mg/kg, 약 3.0 mg/kg, 약 10.0 mg/kg, 약 20.0 mg/kg, 또는 약 30.0 mg/kg인 용량으로 투여된다. 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, 및 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디 중 어느 것은 바람직하게 이러한 분자의 양을 표시한 앰풀 또는 샤세와 같은 밀폐 용기에 포장된다. 여기 사용된 것과 같은 용량은 그것이 인용된 용량을 설명하기 위해 사용된 유의한 숫자 내에서 설명된다면 "약" 인용된 용량이라고 한다(예를 들어, 용량은 그것이 이러한 용량의 ±0.05 mg/kg이면 약 0.1 mg/kg이고, 용량은 그것이 이러한 용량의 ±0.5 mg/kg이면 약 15 mg/kg이다).

[0206] 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여 빈도는, 예를 들어 환자 반응이나 투여 방법에 따라 실질적으로 다양할 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 또는 1일 3회, 주 1회, 주 2회, 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 월 1회, 6주마다 1회, 12주마다 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 년 2회, 년 1회 등으로 투여될 수 있다. 또한, 치료에 사용된 분자의 유효 용량은 특정 치료 과정에 걸쳐서 증가하거나 감소할 수 있다는 것이 인정될 것이다.

[0207] 그러나, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 또는 15주를 넘는 치료법의 과정으로 투여하는 것이 바람직하며, 이러한 단일 치료 과정이 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 또는 더 많은 회수로 반복될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 대상은 2주마다 1회(Q2W), 3주마다 1회(Q3W), 4주마다 1회(Q4W), 5주마다 1회(Q5W), 6주마다 1회(Q6W), 7주마다 1회(Q7W), 8주마다 1회(Q8W), 9주마다 1회(Q9W), 10주마다 1회(Q10W), 11주마다 1회(Q11W), 또는 12주마다 1회(Q2W)의 본 발명의 분자의 치료법의 과정으로 치료된다. 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자는 2주마다 1회(Q2W), 3주마다 1회(Q3W), 또는 4주마다 1회(Q4W)의 치료법의 과정으로 투여하는 것이 특히 바람직하다. 임의의 이러한 단일 치료법 과정의 결과로서, 이 치료법은 동일한 투약 일정으로 또는 상이한 투약 일정으로 다시 시작될 수 있고, 투여되는 CD32B x CD79B 결합 분자의 동일한 용량, 또는 상이한 용량을 수반할 수 있다. 따라서, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 또는 예방적 유효량으로 대상의 치료는 단일 치료 과정을 포함할 수 있거나, 또는 임의의 이전 치료 과정과 동일하거나 상이할 수 있는 다수의 치료 과정을 포함할 수 있다.

[0208] 바람직한 구체예에서, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, CD32B x CD79B 결합 분자들 및 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디 중 어느 것은 Q2W, Q3W 또는 Q4W 치료법의 과정으로 약 3.0 mg/kg, 약 10.0 mg/kg, 약 20.0 mg/kg, 또는 약 30.0 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0209] 한 구체예에서, 본 발명의 CD32B x CD79B Fc 디아바디는 밀폐 용기에 건조 멸균 동결건조 분말 또는 수분 무함유 농축물로서 공급되며, 예를 들어 대상에 투여하기 위한 적절한 농도로 물이나 식염수로 복원될 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, 및 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디 중 어느 것은 적어도 1mg, 더 바람직하게 적어도 2mg, 적어도 3mg, 적어도 5mg, 적어도 10mg, 적어도 20mg, 적어도 30mg, 적어도 50mg, 적어도 100mg, 적어도 200mg, 적어도 300mg, 적어도 500mg, 또는 적어도 1000mg의 단위 용량으로

밀폐 용기에 건조 멸균 동결건조 분말로서 공급되며, 이로써 예를 들어 적절한 부피의 담체를 첨가했을 때 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg 또는 10 mg/kg의 투여가능한 용량이 제조될 수 있다.

[0210] 동결건조된 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, 및 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디 중 어느 것은 그들의 원래 용기에서 2℃ 내지 8℃에 보관되어야 하며, 이 분자는 복원 후 12시간 이내, 바람직하게 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내, 또는 1시간 이내에 투여되어야 한다. 다른 구체예에서, 이러한 분자는 분자, 융합 단백질, 또는 콘쥬게이트 분자의 양 및 농도를 표시한 밀폐 용기에 액체 형태로 공급된다. 바람직하게, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 액체 형태는 밀폐 용기에 공급되며, 여기서 분자는 적어도 1 μg/ml, 더 바람직하게 적어도 2.5 mg/ml, 적어도 5 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 100 mg/ml, 또는 적어도 200 mg/ml의 농도로 존재한다.

[0211] 한 구체예에서, 환자에 투여되는 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 용량은 단일 제제 치료법으로서의 사용에 대해 계산될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 결합 분자는 다른 치료 조성물과 조합하여 사용되며, 환자에 투여되는 용량은 이러한 결합 분자가 단일 제제 치료법으로서 사용되는 경우보다 더 적다.

[0212] 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, 특히 CD32B x CD79B 디아바디 또는 Fc 디아바디 중 어느 것을 투여하는 바람직한 방법은, 제한은 아니지만, 비경구 투여(예를 들어, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하), 경막외, 및 점막(예를 들어, 비내 및 경구 경로) 투여를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 분자는 근육내, 정맥내 또는 피하 경로로 투여된다. 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들어 주입 또는 볼루스(bolus) 주사에 의해, 상피 또는 점막피부성 내막(예를 들어, 경구 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소 투여일 수 있다.

[0213] 특정 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 치료가 필요한 부위에 국소적으로 투여되는 것이 바람직할 수 있다; 이것은, 제한은 아니지만, 예를 들어 국소 주입, 주사, 또는 이식편에 의해 이루어질 수 있으며, 상기 이식편은 막, 예컨대 시알라스틱(sialastic) 막을 포함하는, 다공성, 비-다공성, 또는 젤라틴성 물질, 또는 섬유이다. 바람직하게, 본 발명의 분자를 투여할 때 분자가 흡수되지 않는 물질을 사용하기 위해 주의를 기울여야 한다.

[0214] 본 발명의 구체예

[0215] 이후 본 발명의 특정 구체예의 비제한적 예들이 제공된다.

[0216] 구체예 1. CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 염증 질환 또는 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주당 1회 용량의 투약 섭생으로 투여된다.

[0217] 구체예 2. CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 B-세포 매개 면역 반응을 감소시키거나 억제하는 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주당 1회 용량의 투약 섭생으로 투여된다.

[0218] 구체예 3. CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 B-세포 활성화를 약화시키는 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주당 1회 용량의 투약 섭생으로 투여된다.

[0219] 구체예 4. CD32B x CD79B 결합 분자의 치료적 유효량을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 B-세포 증식을 감소시키거나 억제하는 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 면역특이적으로 결합할 수 있고, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 용량, 및 매주 1회 용량 내지 8주당 1회 용량의 투약 섭생으로 투여된다.

[0220] 구체예 5. 구체예 1-4 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자가 약 1 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

[0221] 구체예 6. 구체예 1-4 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자가 약 3 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

[0222] 구체예 7. 구체예 1 또는 4 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자가 약 10 mg/kg의 용량으로 투여되는 방법.

[0223] 구체예 8. 구체예 1-7 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 투약 섭생이 2주마다 1회 용량(Q2W)인 방법.

[0224] 구체예 9. 구체예 1-7 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 투약 섭생이 3주마다 1회 용량(Q3W)인 방법.

[0225] 구체예 10. 구체예 1-7 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 투약 섭생이 4주마다 1회 용량(Q4W)인 방법.

[0226] 구체예 11. 구체예 1-10 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 결합하는 이중특이적 항체이거나, 또는 상기 항체의 CD32B- 및 CD79B-결합 도메인을 포함하는 분자인 방법.

[0227] 구체예 12. 구체예 1-11 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B의 에피토프 및 CD79B의 에피토프에 결합하는 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디인 방법.

[0228] 구체예 13. 구체예 12의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디가 CD32B x CD79B Fc 디아바디인 방법.

[0229] 구체예 14. 구체예 1 또는 5-13 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 자가면역 질환인 방법.

[0230] 구체예 15. 구체예 14의 방법으로서, 상기 자가면역 질환은 애디슨병, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환, 중증근무력증, 크론병, 피부근염, 가족성 선종성 용종증, 이식편 대 숙주병(GvHD), 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 홍반성 루프스, 다발성 경화증(MS); 악성 빈혈, 라이터 증후군, 류마티스 관절염(RA), 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스(SLE), 제1형 당뇨병, 원발성 혈관염(예를 들어, 류마티스 다발근통, 거대세포 동맥염, 베체트병), 천포창, 시신경척수염, 항-NMDA 수용체 뇌염, 길랑바레 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(CIDP), 그레이브스 안병증, IgG4 관련 질환, 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP), 및 궤양성 대장염으로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

[0231] 구체예 16. 구체예 15의 방법으로서, 상기 염증성 질환 또는 상태는 GvHD, RA, MS, 또는 SLE인 방법.

[0232] 구체예 17. 구체예 1-16 중 어느 하나의 방법으로서, 면역글로불린의 혈청 수준이 상기 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 후 제36일까지 감소되는 방법.

[0233] 구체예 18. 구체예 17의 방법으로서, 상기 면역글로불린은 IgM, IgA 또는 IgG인 방법.

[0234] 구체예 19. 구체예 18의 방법으로서, 상기 면역글로불린은 IgM인 방법.

[0235] 구체예 20. 구체예 1-19 중 어느 하나의 방법으로서, BCR-매개 말초 B-세포 활성화가 상기 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 후 24시간까지 억제되며, 상기 B-세포 활성화는 생체외 칼슘 동원 분석에 의해 결정되는 방법.

[0236] 구체예 21. 구체예 20의 방법으로서, 상기 BCR-매개 B-세포 활성화는 적어도 50%까지 억제되며, 상기 억제는 적어도 6일 동안 지속되는 방법.

[0237] 구체예 22. 구체예 1-21 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자의 1차 용량의 투여 6시간 후에 말초 B-세포 상의 CD32B x CD79B 결합 부위의 적어도 20%가 점유되는 방법.

[0238] 구체예 23. 구체예 1-22 중 어느 하나의 방법으로서,

[0239] (A) B-세포 상의 CD40의 발현이 하향조절되고; 및/또는

[0240] (B) CD40 매개 IgG 분비가 억제되는 방법.

[0241] 구체예 24. 구체예 1-23 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 대상이 인간인 방법.

[0242] 구체예 25. 구체예 1-24 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는:

[0243] (A) SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD32B} 도메인; 및

[0244] (B) SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD32B} 도메인을 포함하는 방법.

[0245] 구체예 26. 구체예 1-24 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는:

[0246] (A) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD79B} 도메인; 및

[0247] (B) SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD79B} 도메인을 포함하는 방법.

[0248] 구체예 27. 구체예 1-24 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는:

[0249] (A) SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD32B} 도메인;

[0250] (B) SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD32B} 도메인;

[0251] (C) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 포함하는 VL_{CD79B} 도메인; 및

[0252] (D) SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 VH_{CD79B} 도메인을 포함하는 방법.

[0253] 구체예 28. 구체예 25-27 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 이중특이적 항체 또는 그것의 이중특이적 항원-결합 단편인 방법.

[0254] 구체예 29. 구체예 25-27 중 어느 하나의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 결합 분자는 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디인 방법.

[0255] 구체예 30. 구체예 29의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B 이중특이적 디아바디는 CD32B x CD79B Fc 디아바디인 방법.

[0256] 구체예 31. 구체예 30의 방법으로서, 상기 CD32B x CD79B Fc 디아바디는:

[0257] (A) SEQ ID NO:39의 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩타이드 사슬;

[0258] (B) SEQ ID NO:41의 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩타이드 사슬; 및

[0259] (C) SEQ ID NO:44의 아미노산 서열을 포함하는 제3 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 방법.

[0260] 이제 일반적으로 기술된 발명을 토대로, 예시에 의해 제공되고, 명시되지 않는 한 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않은 다음의 실시예들을 참조함으로써 발명은 보다 쉽게 이해될 것이다.

[0261] 실시예

[0262] 실시예 1: CD32B x CD79B 이중특이적 1가 Fc 디아바디 및 대조군 디아바디의 구성

[0263] 본 발명의 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자로서 CD32B x CD79B Fc 디아바디를 제조하고 사용했다. 이 CD32B x CD79B Fc 디아바디는 표 1에 나타낸 아미노산 서열을 가진 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함했다.

표 1

[0264]

바람직한 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디	치환 폴리펩타이드 (N-말단에서 C-말단 방향으로)
제 1 폴리펩타이드 사슬 (SEQ ID NO:39)	SEQ ID NO:25 SEQ ID NO:38 SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:30 SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:16 SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:29
제 2 폴리펩타이드 사슬 (SEQ ID NO:41)	SEQ ID NO:32 SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:31 SEQ ID NO:16 SEQ ID NO:22
제 3 폴리펩타이드 사슬 (SEQ ID NO:44)	SEQ ID NO:25 SEQ ID NO:43

[0265] 상기 설명된 CD32B x CD79B Fc 디아바디는 CD32B와 CD79B에 동시에 결합할 수 있다고 판명되었다. 이중특이적 1가 디아바디의 형성 방법은 WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 및 WO 2012-162067에 제공된다.

[0266] 실시예 2: CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 생체내 투여의 평가

[0267] 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 안전성 및 관용성(tolerability)을 평가하기 위해, 실시예 1의 CD32B x CD79B Fc 디아바디를 연령이 18-50세이고 BMI가 18-30 kg/m^2인 건강한 인간 대상에 투여했다. 대상에는 임산부나 가임기 여성은 포함하지 않았다. 추가로, 대상은 유의한 급성 또는 만성 의학적 질병을 가진 개체, 투약 4주 이내에 임의의 처방약을 사용했거나 투약 1주 이내에 일반의약품을 사용했던 개체, 매일 10개피 넘게 담배를 피우는 개체, 결핵, B형 간염 감염, C형 간염 감염 또는 HVI 감염을 가진 개체, 자가면역 장애 또는 혈관 장애의 인지된 병력을 가진 개체, 또는 양성 약물 시험 결과를 가진 개체를 포함하지 않았다. 추가로, 대상은 450 msec를 넘는 수정된 QT(QTc), 45 bpm 미만 또는 120 bpm 초과 심박수, 140 mm Hg를 넘는 수축기 혈압(SBP), 또는 90 mm Hg을 넘는 확장기 혈압(DBP)을 가진 개체를 포함하지 않았다. 연구에 포함된 대상의 기본적 인구통계특성이 표 2에 제시된다.

표 2

[0268]

속성	값
수	49
평균 연령(세)	33.4 ± 7.4
성비 (M:F)	48:1
인종	
백인	12
흑인	35
기타	2
평균 체중 (kg)	78.0 ± 12.1
평균 신장 (cm)	177.5 ± 7.8

[0269] 평가는 6 투약 코호트의 사용을 포함했다(각각 8명의 대상을 포함했고, 이들 중 대상 1-6에는 CD32B x CD79B Fc 디아바디가 투여되며, 대상 7-8은 위약으로 치료된다). 각 코호트 내에서 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 투여는 시차를 두고 행해졌으며, 대상 2는 대상 1로부터 24시간 후에 치료를 받았다. 대상 3-5는 대상 2로부터 24시간 후에 치료를 받았고, 대상 7-8은 대상 3-5로부터 24시간 후에 치료를 받았다. 투약 코호트는 표 3에 설명된다.

표 3

용량 코호트	CD32B x CD79B Fc 디아바디 용량
1	0.01 mg/kg
2	0.1 mg/kg
3	0.3 mg/kg
4	1.0 mg/kg
5	3.0 mg/kg
6	10.0 mg/kg

[0270]

[0271] 투여된 대상은 CD32B x CD79B Fc 디아바디-관련 부작용에 대해 모니터링되었다: 2도 또는 3도 심차단, 심실 부정맥(Torsade de Pointes를 포함한다) 또는 예방백신 임상시험에 등록된 건강한 성인 및 청소년 지원자에 대해 독성 등급 규모 지침(Guidance of Toxicity Grading Scale)에 따른 3등급 이상의 이상 반응. 포함되지 않는 문제(예를 들어, 주입-관련 반응)에 대해서는 NCI CTCAE v4.03이 사용되었다. 15건의 이상 반응이 주지되었고, 이 중 4건이 CD32B x CD79B Fc 디아바디의 투여와 관련된 것으로 간주되었다. 표 4에 관찰된 이상 반응을 요약한다.

표 4

이상 반응 (MedRa 바람직한 항목)	전체 사건		관련	
	전체	≥ Gr 3	전체	≥ Gr 3
결막 출혈	1	-	-	-
안구 충혈	1	-	-	-
동공 불균형	1	-	-	-
메스꺼움	1	-	1	-
오한	1	-	-	-
혈관 천공 부위 멍	1	-	-	-
모낭염	1	-	1	-
상기도 감염	2	-	2	-
바이러스성 상기도 감염	2	-	-	-
타박상	1	-	-	-
인대 염좌	1	-	-	-
팔 부상	1	-	-	-
근육 좌상	1	-	-	-
눈주위 타박상	1	-	-	-
근연축	1	-	-	-
두통	3	-	3	-
졸음	1	-	1	-
불면증	1	-	-	-
비충혈	1	-	-	-
비루	1	-	1	-
피부 건조	1	-	-	-
식은땀	1	-	1	-
소양증	1	-	-	-
발진	1	-	1	-
고혈압	1	1	-	-

[0272]

[0273] A. 체액성 면역 반응에 대한 Fc 디아바디의 약력학(Pharmacodynamics) 효과

[0274] 도 6은 인간 대상에 투여되었을 때 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 약력학을 나타낸다. 결합 분자 농도는 검증된 ELISA 분석에 의해 측정되었고, PK 변수는 비-구획 분석으로부터 계산되었다. 도면에 나타낸 대로, 대상은 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg 체중의 용량으로 CD32B x CD79B Fc 디아바디를 받았고, 투여 후 최대 57일에 걸쳐서 혈청 디아바디 농도가 측정되었다. 디아바디의 혈청 농도, 최대 혈청 농도(C_{max}) 및 AUC(곡선 아래 면적)는 모두 용량 농도의 증가와 함께 증가한 것으로 판명되었다. 디아바디의 반감기는 4-8일의 범위였다. 최저 용량(0.01 mg/kg)에서 디아바디의 빠른 배치가 관찰되었다. 평균 클리어런

스 시간(CL)은 1.426 mL/h/kg(0.01 mg/kg 용량) 내지 0.350 mL/h/kg (10mg/kg 용량)의 범위였고, CL과 용량 간의 관계는 비-선형이었으며, 용량이 증가하면 CL은 감소했다. 혈액량 내 디아바디 분포의 표시인 정류-상태 분포 부피(Vss)는 용량에 독립적인 것으로 판명되었다. 혈청 반감기($T_{1/2}$)는 0.03 mg/kg 용량으로 투여된 디아바디에 대해 92 hrs(~ 4일)에서 10 mg/kg 용량으로 투여된 디아바디에 대해 191 hrs(~ 8일)까지의 범위였고, 용량 증가와 함께 증가했으며, 이것은 CL의 용량-의존적 감소와 일치한다. PK 프로파일의 교란이 주지되었고, 이것은 항-약물-항체(ADA)의 존재를 시사한다. 약동학적 데이터가 표 5에 요약된다.

표 5

[0275]

용량 (mg/kg)	C_{max} (μg/mL)	AUC (h*μg/mL)	CL (mL/h/kg)	V_{ss} (mL/kg)	$T_{1/2}$ (Hr)
0.01	0.192	7.423	1.426	154	156
0.1	1.928	113.861	0.917	87	140
0.3	5.903	423.948	0.722	65	92
1.0	23.701	2255.786	0.461	56	143
3.0	58.825	7919.163	0.387	63	172
10.0	197.633	29206.316	0.350	68	191

[0276] B. 말초 B-세포 상의 CD32B 및 CD79B에 결합하는 능력

[0277] 투여된 CD32B x CD79B 결합 분자는 말초 B-세포에 결합할 수 있는 것으로 판명되었고, ≥ 1 mg/kg 체중의 최대 점유를 나타내며, 더 높은 용량 수준에서는 50% B-세포 점유가 지속되었다. 지속된 20% B-세포 점유가 ≥ 0.3 mg/kg에서 관찰되었다. 도 7은 연구 과정 전반에 걸쳐서 말초 B-세포에 대한 결합의 생체외 유세포 분석을 요약한다.

[0278] C. 말초 B-세포 및 B-세포 하위군의 활성화 상태의 평가

[0279] 디아바디의 투여가 B-세포 수(도 8a), T-세포 수(도 8b), B-세포 대 T-세포의 비(도 8c), 및 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비(도 8d)의 지속적 변화와 관련되었는지 평가하기 위해 유세포 분석을 수행했다. 도 8a-8b에 나타낸 대로, 이 연구에서는 말초 T-세포 집단의 지속적 변화는 관찰되지 않았고, 더 고 용량에서 B-세포 집단의 일시적 감소가 관찰되었다. 도 8c-8d에 나타낸 대로, 이러한 말초 B- 및 T-세포 집단의 비율의 지속적 변화도 관찰되지 않았다.

[0280] D. 생체외 BCR 자극에 대한 말초 B-세포의 반응 평가

[0281] 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 레시피언트의 B-세포 기능을 평가하기 위해 생체외 칼슘 동원 분석을 수행했다. 간단히 말해, 투약 전과 투약 후에 여러 시점에서 수집된 혈액 샘플로부터 PBMC를 신선하게 분리하고, BCR 결찰에 의해 Ca^{++} 플럭스를 유도했다. 이오노마이신을 도입하여 최대 Ca^{++} 플럭스를 유도했다. AUC 또는 피크(Peak)의 값을 이오노마이신에 의해 발생된 값으로 정규화했고, 비(AUC) = AUC(IgM)/AUC(이오노마이신)이 되도록 했다. 도 9a-9b는 이 연구에서 이용된 실험 과정 및 데이터 분석 방법을 예시한다.

[0282] 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자로의 치료는 항-IgM 항체에 의한 BCR 결찰에 대한 반응에서 칼슘 플럭스를 감소시키는 것으로 판명되었고, 따라서 이것은 말초 B-세포에 대한 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 억제 활성을 증명한다(도 9c-9d).

[0283] E. CD32B x CD79B 결합 분자는 $CD27^{+}$ 기억 B-세포 상에서 BCR 발현을 하향조절한다.

[0284] 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여의 효과를 더 평가하기 위해, 유세포분석법을 사용하여 막-결합 면역글로불린 수준을 결정했다. 도 10a-10c는 막-결합 IgG(mIgG)(도 10a), 막-결합 IgM(mIgM)(도 10b), 및 막-결합 IgD(mIgD)(도 10c)의 발현에 의해 결정된 대로, CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 $CD27^{+}$ 기억 B-세포 상에서 BCR 발현을 하향조절한다는 것을 보여준다.

[0285] 유사한 연구들이 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 CD27-자생 기억 B-세포 상에서 BCR 발현을 하향조절한다는 것을 규명했다(도 11a: 막-결합 IgD(mIgD); 도 11b: 막-결합 IgM; 도 11c: 막-결합 IgM(mIgM)의 변화 퍼센트).

[0286] F. CD32B x CD79B 결합 분자는 혈청 Ig 수준을 조정한다.

[0287] IgM, IgA 및 IgG 면역글로불린의 혈청 수준에 대한 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여의 효과를 평가했다. 이 결합 분자는 이들 면역글로불린의 혈성 수준을 조정하는 것으로 판명되었고, IgM 수준이 최대 감소를 나타내며, IgG 수준은 대체로 유지되었다(각각 도 12a-12c). IgG의 절약이 바람직할 것이다. 감소된 혈청 IgM 수준은 형질 모세포에 대한 영향을 시사한다. 이들 결과는 원형질 세포에서 발현되지 않는 CD79B의 발현과 일치한다.

[0288] G. CD32B x CD79B 결합 분자는 공-자극 분자, CD40의 수준을 감소시킨다.

[0289] CD32B x CD79B 결합 분자의 투여는 말초 B-세포의 표면 공-자극 분자의 유세포 분석을 통해서 결정된 대로 B-세포 상에서 CD40 표면 발현 수준을 감소시키는 것으로 판명되었다(도 13a).

[0290] 예시적인 결합 분자(실시예 1의 CD32B x CD79B Fc 디아바디)의 단일 정맥내 용량은 말초 B-세포 수를 실질적으로 감소시키지 않았으며, 이것은 본 발명의 결합 분자가 B-세포를 고갈시키지 않는다는 것을 나타낸다. 유세포 분석은 본 발명의 결합 분자가 말초 B-세포에 결합할 수 있다는 것을 증명했다. 말초 B-세포 상의 이러한 결합 부위의 완전한 포화가 ≥ 1 mg/kg 용량 수준에서 관찰되었다. 이러한 결합의 지속기간은 이용된 용량 수준과 관련되는 것으로 판명되었다.

[0291] 본 발명의 결합 분자는 다수의 약력학 용량-의존적 효과를 매개했으며, 이들은 아래의 내용을 포함한다:

[0292] 1. 생체외 BCR-유도 Ca^{++} 동원의 감소;

[0293] 2. $CD27^{+}$ 기억 B-세포 하위군 상에서 표면 IgG-BCR 발현의 하향조절;

[0294] 3. IgM^{+} 자생 B-세포 집단의 감소;

[0295] 4. 자생 B-세포 상에서 표면 IgD-BCR 발현의 하향조절; 및

[0296] 5. B-세포 상에서 CD40 발현의 하향조절.

[0297] 본 발명의 결합 분자는 임상 투약에 적합한 다수의 유리한 약력학 특징을 매개했다. 말초 B-세포는 ≥ 1 mg/kg 용량 수준에서 실시예 1의 예시적인 CD32B x CD79B Fc 디아바디로 완전히 포화되고, 결합의 지속기간은 용량 수준의 증가와 상호관련되며, ≥ 0.3 mg/kg 용량 수준에서 지속적 20% 점유가 관찰되었다. 본 발명의 결합 분자는 말초 B-세포를 고갈시키지 않았으며, 용량-의존적 방식으로 B-세포 활성을 하향조정하는 것으로 판명되었다:

[0298] 1. BCR-매개 Ca^{2+} 유입의 감소;

[0299] 2. 표면 면역글로불린 발현의 하향조절;

[0300] 3. 혈청 IgM 수준의 감소; 및

[0301] 4. CD40 발현의 하향조절.

[0302] 이 데이터는 염증성 질환, 상태 및 장애의 치료에서, 및 특히 자가면역 질환의 치료에서 본 발명의 활용성을 뒷받침한다.

[0303] 실시예 3: CD32B X CD79B 결합 분자의 약동학 및 약역학적 특성의 조사

[0304] E_{max}(최대 효과) PK/PD 모델을 이용하여 본 발명의 CD32B x CD79 결합 분자의 약동학(PK) 및 약역학(PD) 특성을 더 충분히 조사했다. 간단히 말해, B-세포를 다양한 농도의 결합 분자의 존재하에 인큐베이션하고, E_{max}의 50%, 60%, 80% 및 90% 억제를 가져오는 결합 분자의 농도를 결정했다.

[0305] 레시피언트 대상은 6.3% 내지 15.6%(평균 = 9.4%)의 범위의 베이스라인 값을 나타냈다. 최대 반응의 50%를 야기하는 농도(EC50)는 1677 ng/mL였다. 투여된 결합 분자의 농도가 증가함에 따라, B-세포 결합 퍼센트는 평탄역에 이르렀고, 73.1%에서 B-세포 결합 퍼센트에 대해 최대 반응(E_{max})을 나타낸다. 이 데이터는 표 6에 제시된다. 생체내 인간화 마우스 모델을 기초로 IgG 및 IgM의 완전한 억제를 나타내는 예상된 표적 농도는 1,500 ng/mL이다. 이 연구에서 PK/PD 관계는 ≥ EC50의 농도가 치료적 사용을 위한 잠재적 표적 농도일 수 있음을 시사한다.

표 6

% E_{max}	농도 (ng/ml)
50	1677
60	2658
70	4392
80	8103
90	20364

[0306]

[0307] 도 14a-14b는 (두 상이한 농도 범위에서의) 데이터를 보여준다. 도 15a-15f는 인간에서 중첩된 CD32B x CD79B 결합 분자 약동학을 가진 전임상 표적 농도를 나타내며, 표적 농도를 얻을 수 있는 용량이 확인된다(0.01 mg/kg의 용량(도 15a); 0.1 mg/kg의 용량(도 15b); 0.3 mg/kg의 용량(도 15c); 1 mg/kg의 용량(도 15d); 3 mg/kg의 용량(도 15e); 10 mg/kg의 용량(도 15f)에서 표적 농도의 획득).

[0308] 개별 대상 약동학 데이터가 모델링되었고, 최상의 모델 변수 추정치를 사용하여, 2주마다 1회(Q2W), 3주마다 1회(Q3W) 및 4주마다 1회(Q4W)의 투약 섭생으로 투여하면서 다수의 투약에 대해 프로파일을 예측했다. 조사된 용량은 1, 3 및 10 mg/kg이었다. 노출 변수(C_{max}, C_{min}, 및 AUC)의 비교를 수행했고, 1-구획 및 2-구획 IV 주입 모델을 조사했다. 이러한 모델링의 결과가 2주마다 1회(Q2W), 3주마다 1회(Q3W) 및 4주마다 1회(Q4W) 투약 섭생에 대해 0.3 mg/kg 대상 체중(도 16a), 1 mg/kg 대상 체중(도 16b), 3 mg/kg 대상 체중(도 16c) 및 10 mg/kg 대상 체중(도 16d)의 용량에 대해 도시된다. 상기 모델링된 프로파일에서 예측된 변동성이 도 17a-17d에 제시된다(SD와 함께).

[0309] 1차 용량 후(C_{max1}, C_{min1}, 및 AUC_1) 및 정류-상태에서(C_{maxss}, C_{minss}, 및 AUC_{ss}) 노출 변수의 통계 요약이 1, 3, and 10 mg/kg 용량에 대해 각각 표 7, 8 및 9에 주어진다. 3개 용량은 모두 Q2W, Q3W 및 Q4W 섭생에 따라 투여되었다. 표 7, 8, 9 및 10에서 AUC는 Q2W, Q3W 및 Q4W 섭생에 대해 각각 14, 21 및 28일의 투약 간격에 걸쳐서 결정되었다.

표 7

0.3 Mg/Kg 용량에 대해 시뮬레이션된 노출 변수							
		1 차 용량			정류-상태		
섭생	속성	C_{max1} (ng/mL)	C_{min1} (ng/mL)	AUC_1 (h*ng/mL)	C_{maxss} (ng/mL)	C_{minss} (ng/mL)	AUC_{ss} (h*ng/mL)
0.3 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q2W	기하평균	18468	399	1294521	18961	446	1359230
	%CV	21	45	14	20	51	14
	평균	18793	429	1305069	19272	487	1369843
	SD	3718	162	182553	3698	208	189344
	중간	19759	475	1304448	20303	514	1358376
	Min	13706	219	1066584	14440	237	1127219
	Max	22482	603	1584875	23045	747	1683169
0.3 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q3W	기하평균	18468	107	1336474	18615	112	1359400
	%CV	21	92	14	21	98	14
	평균	18793	134	1346858	18933	142	1370019
	SD	3718	85	184933	3698	95	189411
	중간	19759	128	1337058	19937	131	1358688
	Min	13706	33	1107607	13979	33	1127267
	Max	22482	252	1642310	22605	278	1683546
0.3 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q4W	기하평균	18468	31	1350494	18520	31	1359230
	%CV	21	182	14	21	187	14
	평균	18793	49	1360943	18842	51	1369843
	SD	3718	43	186955	3706	45	189344
	중간	19759	36	1345334	19824	36	1358376
	Min	13706	4	1120902	13819	4	1127219
	Max	22482	114	1665734	22509	119	1683169

[0310]

표 8

1 Mg/Kg 용량에 대해 시뮬레이션된 노출 변수							
		1 차 용량			정류-상태		
섭생	속성	C_{max1} (ng/mL)	C_{min1} (ng/mL)	AUC_1 (h*ng/mL)	C_{maxss} (ng/mL)	C_{minss} (ng/mL)	AUC_{ss} (h*ng/mL)
1 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q2W	기하평균	22538	1099	1941942	23987	1292	2148025
	%CV	22	64	18	22	64	21
	평균	23013	1236	1966948	24454	1467	2185411
	SD	5291	560	341430	5389	749	437841
	중간	21172	1307	1967100	23043	1503	2175560
	Min	17327	368	1547998	18798	461	1613971
	Max	31526	2079	2373060	33025	2744	2714620
1 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q3W	기하평균	22538	379	2066652	23044	413	2148987
	%CV	22	83	19	22	78	21
	평균	23013	461	2098097	23504	501	2186425
	SD	5291	306	392549	5258	351	438369
	중간	21172	421	2098349	21884	434	2175963
	Min	17327	113	1582285	17862	143	1615276
	Max	31526	1019	2509219	31956	1160	2718422
1 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q4W	기하평균	22538	144	2114117	22732	150	2148025
	%CV	22	87	20	22	85	21
	평균	23013	186	2148803	23197	195	2185411
	SD	5291	165	416875	5253	176	437841
	중간	21172	129	2147170	21465	130	2175560
	Min	17327	59	1595946	17534	69	1613971
	Max	31526	507	2599666	31654	538	2714620

[0311]

표 9

3 Mg/Kg 용량에 대해 시뮬레이션된 노출 변수							
		1 차 용량			정류-상태		
섭생	속성	C_{max1} (ng/mL)	C_{min1} (ng/mL)	AUC_1 (h*ng/mL)	C_{maxss} (ng/mL)	C_{minss} (ng/mL)	AUC_{ss} (h*ng/mL)
3 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q2W	기하평균	54486	5472	6488327	61116	6731	7566598
	%CV	18	13	10	18	16	10
	평균	55202	5510	6515372	61868	6799	7599760
	SD	9342	706	649746	10185	1034	771685
	중간	57786	5467	6374280	64553	6923	7614517
	Min	40276	4847	5569784	46074	5383	6483798
	Max	64467	6320	7469875	71898	8065	8583898
3 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q3W	기하평균	54486	2216	7096298	56916	2461	7574231
	%CV	18	24	10	18	27	10
	평균	55202	2268	7125716	57674	2529	7607408
	SD	9342	522	706806	9848	609	772412
	중간	57786	2292	7015300	60333	2618	7623535
	Min	40276	1529	6091270	42319	1579	6494141
	Max	64467	2950	8113876	67381	3282	8594913
3 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q4W	기하평균	54486	946	7353730	55451	1002	7566598
	%CV	18	40	10	18	41	10
	평균	55202	1000	7384883	56193	1061	7599760
	SD	9342	328	738474	9608	346	771685
	중간	57786	1065	7330484	58842	1149	7614517
	Min	40276	482	6299207	41059	487	6483798
	Max	64467	1379	8365442	65674	1444	8583898

[0312]

표 10

10 Mg/Kg 용량에 대해 시뮬레이션된 노출 변수							
		1 차 용량			정류-상태		
섭생	속성	C_{max1} (ng/mL)	C_{min1} (ng/mL)	AUC_1 (h*ng/mL)	C_{maxss} (ng/mL)	C_{minss} (ng/mL)	AUC_{ss} (h*ng/mL)
10 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q2W	기하평균	187747	23684	22895439	218961	30796	28470994
	%CV	10	32	14	12	38	17
	평균	188552	24638	23068595	220351	32493	28803009
	SD	19555	7243	3101087	27625	10968	4747240
	중간	184731	25253	23091722	216792	33549	28899625
	Min	167970	14286	19424051	184962	17285	22095139
	Max	223199	34575	27270524	268285	46008	35558762
10 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q3W	기하평균	187747	10983	25764809	200795	12486	28519275
	%CV	10	47	15	11	50	17
	평균	188552	11863	25996110	201839	13614	28854051
	SD	19555	4719	3795674	22994	5715	4769110
	중간	184731	12454	25932750	198684	14095	28970836
	Min	167970	5649	20974439	174036	6172	22106333
	Max	223199	17340	31468974	242566	19802	35625556
10 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6
Q4W	기하평균	187747	5283	27155195	193509	5621	28470994
	%CV	10	58	16	10	60	17
	평균	188552	5907	27429401	194411	6320	28803009
	SD	19555	2789	4233452	21004	3058	4747240
	중간	184731	6087	27365849	191314	6443	28899625
	Min	167970	2423	21612851	170370	2520	22095139
	Max	223199	8864	33574511	231824	9756	35558762

[0313]

[0314] 1차 용량 데이터와 관련하여 표 7, 8, 9 및 10에 나타낸 대로, 평균 C_{max1} 값은 Q2W, Q3W, 및 Q4W 섭생에 대해 유사했다(즉, 1 mg/kg 투약 섭생에서 대략 22 μg/mL; 3 mg/kg 투약 섭생에서 대략 54 μg/mL; 및 10 mg/kg 투약 섭생에서 대략 187 μg/mL). 3가지 섭생 간에 평균 AUC_1 값에서 약간의 차이가 관찰되었다. 평균 *Cmin1*(트로프 농도)은 Q2W 섭생에서 더 높은 것으로 관찰되었고(즉, 1 mg/kg 투약 섭생에서 대략 1.1 μg/mL; 3 mg/kg 투약 섭생에서 대략 5 μg/mL; 및 10 mg/kg 투약 섭생에서 대략 24 μg/mL), 이것은 28일의 더 긴 투약 간격을 가졌던 Q4W 섭생(즉, 1 mg/kg 투약 섭생에서 대략 0.14 μg/mL; 3 mg/kg 투약 섭생에서 대략 0.95 μg/mL; 및 10 mg/kg 투약 섭생에서 대략 5 μg/mL)과 비교하여 더 짧은 투약 간격(14일)을 가졌다. Q3W 섭생에서 평균 *Cmin1*은 Q2W 및 Q4W 섭생보다 중간인 것으로 관찰되었다(즉, 1 mg/kg 투약 섭생에서 대략 0.38 μg/mL; 3 mg/kg 투약 섭생에서 대략 2.2 μg/mL; 및 10 mg/kg 투약 섭생에서 대략 5 μg/mL).

[0315] 정류-상태와 관련하여 표 7, 8, 9 및 10에 나타낸 대로, 평균 C_{maxss}, C_{minss}, 및 AUC_{ss}는 1차 용량 값과 비교하여 수치상 더 높은 것으로 관찰되었으며, 1차 용량 데이터와 일치하여, Q2W, Q3W 및 Q4W 섭생의 평균 C_{maxss}도 유사한 것으로 관찰되었다(< 13% 차이). 추가로, 1차 용량 데이터와 일치하여, 3가지 섭생 간에 평균 AUC_{ss} 값에서 약간의 차이가 관찰되었다. 그러나, Q4W 섭생의 투약 간격은 28일이며, 동일한 간격에 걸쳐서 Q2W 섭생에서 투여된 용량의 수는 Q4W 섭생보다 2배 더 많다. 따라서, 28일의 투약 간격에 걸쳐서, Q2W 섭생의 AUC_{ss}는 Q4W 섭생의 대략 2배 이상일 것으로 예상된다. 투여된 섭생과 무관하게, 정류-상태의 노출 변수는 1차 용량 데이터와 비교했을 때 CD32B x CD79B 결합 분자의 최소 축적을 시사한다.

[0316] 종합하면, 본 발명의 결합 분자는 최대 10 mg/kg의 용량으로 인간 대상에 투여되었으며, 0.3 mg/kg 내지 10 mg/kg의 임상 용량 범위를 나타냈다. 그러나, 추가로 더 높은 용량 비율도 효과적일 수 있다. Q2W 섭생의 경우 ≥ 1 mg/kg 용량에서 표적 농도가 획득된다. Q3W 섭생의 경우 ≥ 3 mg/kg 용량에서 표적 농도가 획득된다. 그러나, 더 낮은 용량(예를 들어, 0.3 mg/kg)도 원하는 생물학적 활성을 달성하는데 효과적일 수 있다. 투여는 건강한 인간 대상에서 안전하며 면역조정 활성을 나타내는 것으로 판명되었다. 본 발명의 결합 분자의 투여는 바람직하지 않은 사이토카인 방출이 뒤따르지 않았으며, 또는 그것과 관련되지도 않았다. 투여된 용량과 무관하게, 약동학/약력학(PK/PD) 및 모델링 & 시뮬레이션(M&S) 분석은 1차 용량 또는 정류-상태 C_{max} 값이 Q2W, Q3W 및 Q4W 섭생에서 유사하다는 것을 나타낸다. 정류-상태에서 28일 간격(Q2W 섭생에서의 투약 간격)에 걸친 AUC_{ss}는 Q4W 섭생과 비교하여 Q2W 섭생에서 대략 2배 이상일 것으로 예상된다. 더 짧은 투약 간격을 가진 Q2W 및 Q3W 섭생에

서(각각 14일 및 21일) 1차 용량 또는 정류-상태 C_{min} 값은 28일의 더 긴 투약 간격(더 긴 세척 지속기간)을 가진 Q4W 섭생과 비교하여 더 높다.

[0317] 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자의 혈청 반감기($T_{1/2}$)는 대략 4-8일의 범위였지만, 1차 반감기가 지난 후에도 투여된 CD32B x CD79B 결합 분자의 유의한 비율이 말초 B-세포에 결합된 채로 유지되는 것이 관찰되었다. 예를 들어, 실시예 1의 CD32B x CD79B Fc 디아바디와 관련하여, 20%를 초과하는 점유가 0.3 mg/kg 투약 섭생에서는 적어도 8일 동안, 및 3 mg/kg 및 10 mg/kg 투약 섭생에서는 30일 내지 최대 50일 동안 관찰되었다.

[0318] 말초 B-세포 활성화의 억제(특히 AUC 측정에서 반영된)는 제30일 정도에 베이스라인으로 되돌아간다. 또한, CD32B x CD79B 결합 분자는 기억 B-세포(도 10a-10c) 및 자생 B-세포(도 11a-11c) 상에서 BCR 표적을 하향조절하며, 이 하향조절도 역시 약 27일 이상 동안 지속된다. 유사하게, 혈청 Ig 수준의 조정(도 12a-12c)이 최저 용량에서도 적어도 57일 동안 지속된다. 이들 결과는 단일 용량 투여로부터의 결과이다. 따라서, 바람직한 투약 일정은 CD32B x CD79B 결합 분자의 반감기, 장기 작용 생물학적 활성, 또는 반감기와 이러한 장기 작용 생물학적 활성 모두에 기초할 수 있다.

[0319] 실시예 4: 체액성 면역 반응에 대한 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 생체내 투여의 평가

[0320] 여기 설명된 대로, 본 발명의 CD32B x CD79B 결합 분자, 특히 이중특이적 Fc 디아바디는 활성화-억제 커플링에 기초한 생리학적 음성 피드백 루프를 촉발함으로써 활성화된 B-세포를 억제하도록 디자인된다. 열쇠구멍 삿갓조개 헤모시아닌(KLH)과 같은 면역원에 의한 백신접종에 대해 반응하는 체액성 면역반응에 대한 CD32B x CD79B 결합 분자의 억제 효과가 조사될 수 있다. 특히, 비-인간 영장류로부터의 PK 데이터의 외삽에 기초하여, 0.3 mg/kg으로 투여되었을 때, 순환 CD32B x CD79B Fc 디아바디는 6일 동안 말초혈 B-세포 상의 CD32B x CD79B Fc 디아바디 결합 부위의 20% 점유를 지속할 수 있는 수준을 상회하여 유지될 것이다. 시험관내 연구에 기초하면, 이러한 점유 수준은 적어도 6일 동안 BCR-매개 B-세포 활성화의 최소 50% 억제를 지속할 것이 예측될 것이다. 인간에서 KLH 백신접종에 대한 면역 반응이 대략 4 내지 6일 걸리는 것을 고려하면, ≥ 0.3 mg/ml의 용량으로 CD32B x CD79B 결합 분자가 투여된 대상에서 KLH 백신접종의 실시는 KLH 항원을 가진 백신접종에 대한 B-세포 반응의 억제에 의해 증명된 대로 검출가능한 약력학적 활성을 가져올 것이 기대된다. 따라서, KLH는 0.3 mg/kg 이상의 CD32B x CD79B 결합 분자의 용량을 받은 모든 대상에서 제2일에 1.0mg의 피하(SC) 용량으로 투여될 수 있다. 이에 더하여, KLH 백신접종은 CD32B x CD79B 결합 분자의 주입으로부터 24시간을 지나서 제공될 수 있으며, 이로써 백신접종 전에 각 대상에서 이러한 CD32B x CD79B 결합 분자의 안전성 및 관용성이 확립될 수 있다.

[0321] 항-KLH IgG, 및 IgM 역가 및 베이스라인으로부터 이들의 억제 변화 퍼센트, 및 면역화 후 정량가능한 항-KLH, IgG, 및 IgM 반응을 시작한 대상의 비율이 표에 정리되고 용량 패널 및 시간별로 요약될 것이다. CD32B x CD79B 결합 분자 치료와 위약 사이에 면역반응의 차이는 기술 통계(descriptive statistics)를 사용하여 평가될 것이다. 추가의 분석(예를 들어, 노출-반응 분석)은 적절히 판단하여 수행될 수 있다.

[0322] 실시예 5: 체액성 면역 반응에 대한 CD32B x CD79B 이중특이적 Fc 디아바디의 생체내 투여의 평가

[0323] 상기 설명된 대로, 체액성 면역반응에 대한 CD32B x CD79B 결합 분자의 억제 효과가 백신접종에 대한 반응에서 평가될 수 있다. 비활성화 A형 간염 백신(HAV)은 면역 손상 상태에서 면역화 반응을 평가하고(Valdez H, *et al.* (2000) "*Response To Immunization With Recall And Neoantigens After Prolonged Administration Of An Hiv-1 Protease Inhibitor-Containing Regimen*," ACTG 375 team. AIDS clinical trials group. AIDS 14:11-21), B-세포 고갈 요법을 사용한 환자들 중에서 면역화 반응을 평가하기 위해 사용되는 확립된 신생 항원이다(Van Der Kolk LE, *et al.* (2002) "*Rituximab Treatment Results In Impaired Secondary Humoral Immune Responsiveness*," Blood 100:2257-9). 이 연구에서는 상기 설명된 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 억제 효과가 혈청학적 A형 간염 역가가 음성인 정상적인 건강한 지원자에서 HAV 투여에 대한 반응에서 평가된다. 간단히 말해, CD32B x CD79B 결합 분자 또는 위약의 단일 용량이 IV 주입에 의해 3 mg/kg 또는 10 mg/kg로 투여되며, 대상은 또한 제2일에 정맥내 방식으로 HAV(VAQTA®(A형 간염 백신, 비활성화, Merck, 50 U/1-mL)의 단일 용량을 받는다. HAV의 단일 용량에 대한 면역반응에 대한 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여의 영향이 백신접종된 대상에서 혈청 IgG 특이적 항-HAV-특이적 항체의 출현을 모니터링함으로써 평가된다. ARCHITECT HAVAb-IgG 분석(Abbott Laboratories)을 사용하여 HAV-특이적 IgG의 존재가 검출되었다. ARCHITECT HAVAb-IgG 분석은 인간 혈청 또는 혈장에서 HAV에 대한 IgG 항체의 정성적 검출을 위한 화학발광 미소입자 면역분석(CMIA)이다. 변형된 Abbott 시스템에서 정량 분석이 또한 이용되었다.

[0324] 표 11은 위약, 또는 3 mg/kg 또는 10 mg/kg의 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자로 치료된 10명의 대상으로부

터 얻은 초기 결과를 요약한다. 표 12는 이 연구에 참여한 모든 대상으로부터 백신접종 후 제56일에 얻은 결과를 요약한다. 각 백신접종된 그룹의 혈청에 존재하는 HAV-특이적 IgG(항-HAV IgG)의 평균 농도가 표 13에 요약된다. 백신접종된 대상의 각각에서 혈청에 존재하는 항-HAV IgG의 농도가 도 18에 플롯팅된다. 이 연구의 결과는 CD32B x CD79B 결합 분자의 투여가 백신접종에 대한 반응에서 활성화 B-세포 및 체액성 면역 반응을 억제한다는 것을 나타낸다.

표 11

[0325]

그룹	양성 (n)	음성 (n)	혈청전환 비율 (%)
위약 (n=4)	4	0	100
3 mg/kg (n=3)	1	2	33.3
10 mg/kg (n=3)	1	2	33.3

표 12

[0326]

그룹	양성 (n)	음성 (n)	혈청전환 비율 (%)
위약 (n=8)	6	2	75
3 mg/kg (n=8)	3	5	37.5
10 mg/kg (n=8)	3	5	37.5

표 13

[0327]

	HAV-IgG 농도 (평균 ± SC, mIU/mL)	
그룹	제 29 일	제 57 일
위약	34.3 ± 19.8	172.8 ± 108.3
3 mg/kg	40.8 ± 1.9	74.5 ± 70.9
10 mg/kg	16.2 ± 1.9	61.5 ± 49.7

[0328] 실시예 6: CD32B x CD79B 결합 분자는 CD40 의존적 B-세포 반응을 차단한다.

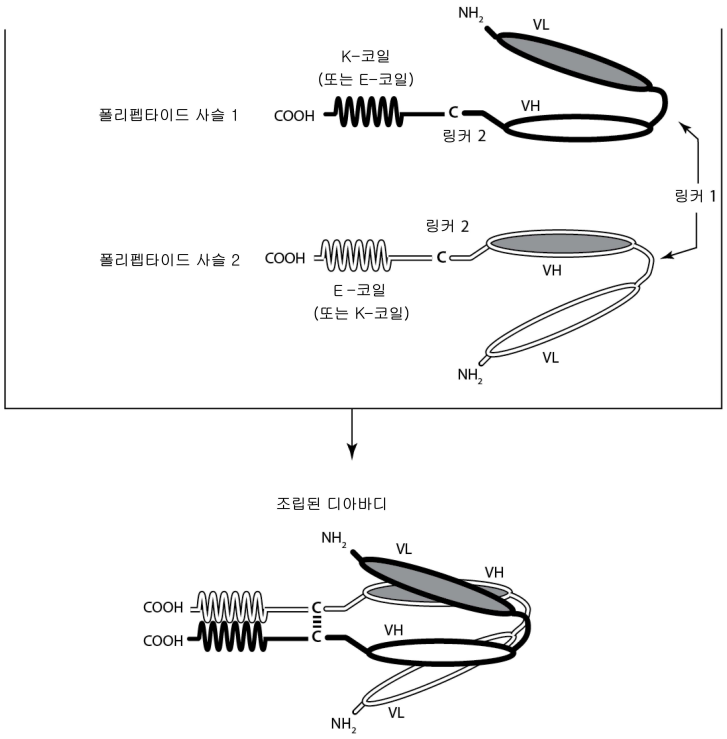
[0329] 상기 설명된 대로, CD32B x CD79B 결합 분자의 투여는 공-자극 분자, CD40의 수준을 감소시킨다. CD40 의존적 반응에 대한 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자의 활성을 시험관내 평가했다. 이들 연구는 2차 또는 국소(territory) 림프양 기관의 배중심에서 발생하는 여포 CD4-헬퍼 세포에 의해 제공된 자극 신호의 존재하에 항체(예를 들어, IgG) 분비 세포로 B-세포가 분화하는 과정을 의태하는 분석 시스템을 사용한다. 간단히 말해, 인간 B-세포를 음성 선택 키트를 사용하여 건강한 도너의 말초 전혈로부터 정제했다. 정제된 인간 B-세포를 5일 동안 5% CO_2 37℃ 인큐베이터에서 상기 설명된 예시적인 CD32B x CD79B 결합 분자(20 μg/mL)의 존재 또는 부재하에 희석되지 않은 채로, 또는 3배 연속 희석(1, 1/3, 1/9 및 1/27)하여 사용되는, 자극제(CD40-리간드(500 ng/mL), IL-4(100 ng/mL) 및 IL-21 (20 ng/mL))가 있거나 또는 없는, 완전 배지에서 배양했다. 배양 상청액을 수집하고, ELISA에 의해 분비된 인간 IgG를 결정했다. 이 연구의 결과가 도 19에 플롯팅된다.

[0330] 도 19에 나타낸 대로, CD32B x CD79B 결합 분자는 IgG 분비를 감소시킬 수 있으며, 이것은 CD32B x CD79B 결합 분자가 IgG 생성과 관련된 CD40 매개 경로를 억제할 수 있다는 것을 나타낸다.

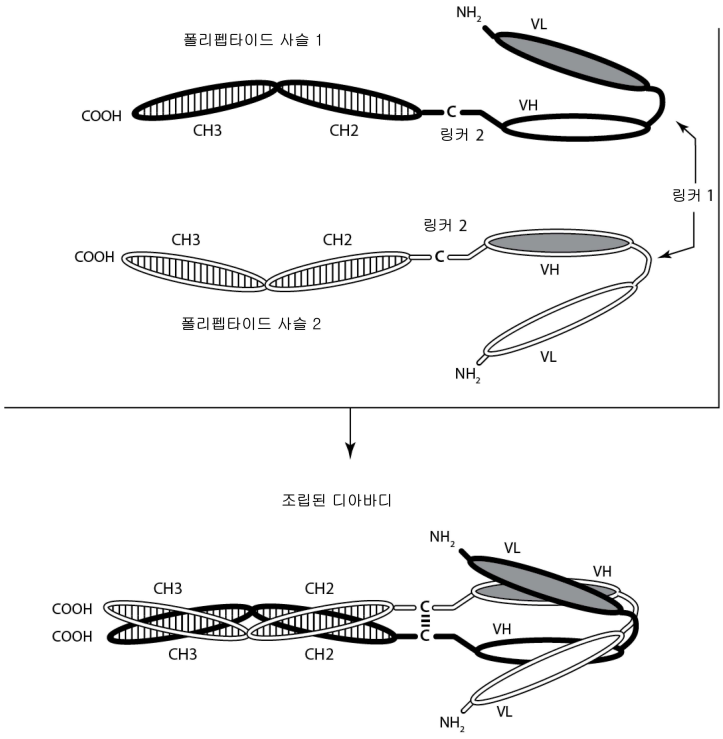
[0331] 본 명세서에서 언급된 모든 공보 및 특허는 본원에 각각의 개별적인 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 그것의 전체 내용이 참조로 포함되는 것으로 표시된 것과 같은 정도로 참조로 본원에 포함된다. 발명은 발명의 특정 구체예들과 관련하여 기술된 한편, 추가로 변형될 수 있고, 본 출원은 일반적으로 발명의 원리에 따르는 발명의 어떠한 변화, 용도 또는 응용을 포함하며 본 개시내용으로부터의 그런 벗어남을 발명이 속하는 기술분야 내의 공지되거나 관례적인 실시범위 내에 있는 것으로서 및 지금까지 설명된 필수적인 특징에도 적용될 수 있는 것으로서 포함하는 것이 인지될 것이다.

도면

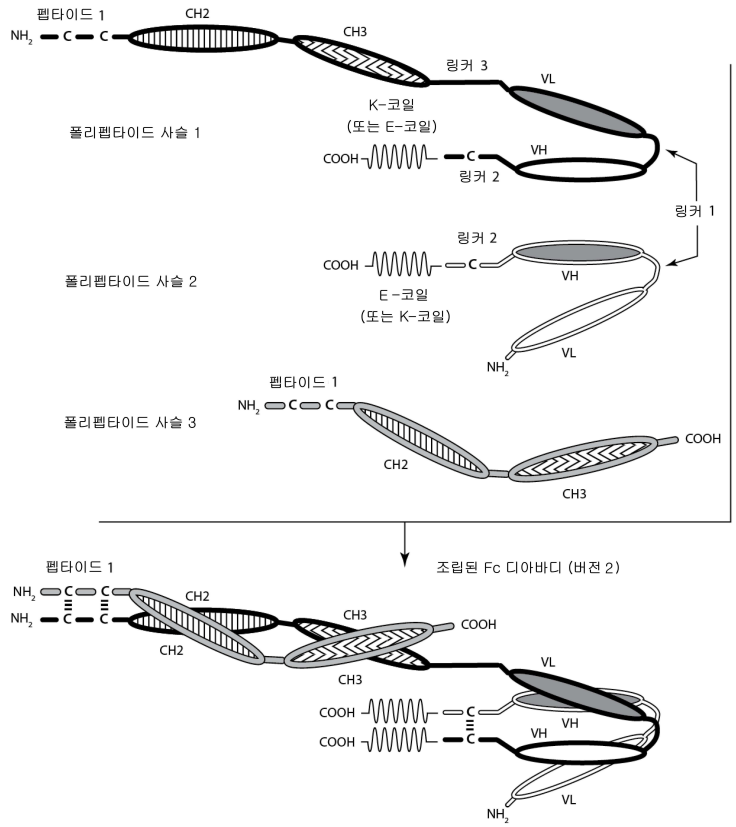
도면1


NH2
VL
K-코일
(또는 E-코일)
폴리펩타이드 사슬 1
COOH
C
VH
링커 2
링커 1
링커 2
폴리펩타이드 사슬 2
COOH
C
VH
E-코일
(또는 K-코일)
VL
NH2
조립된 디아바디
NH2
VL
VH
COOH
COOH
C
C
VH
VL
NH2

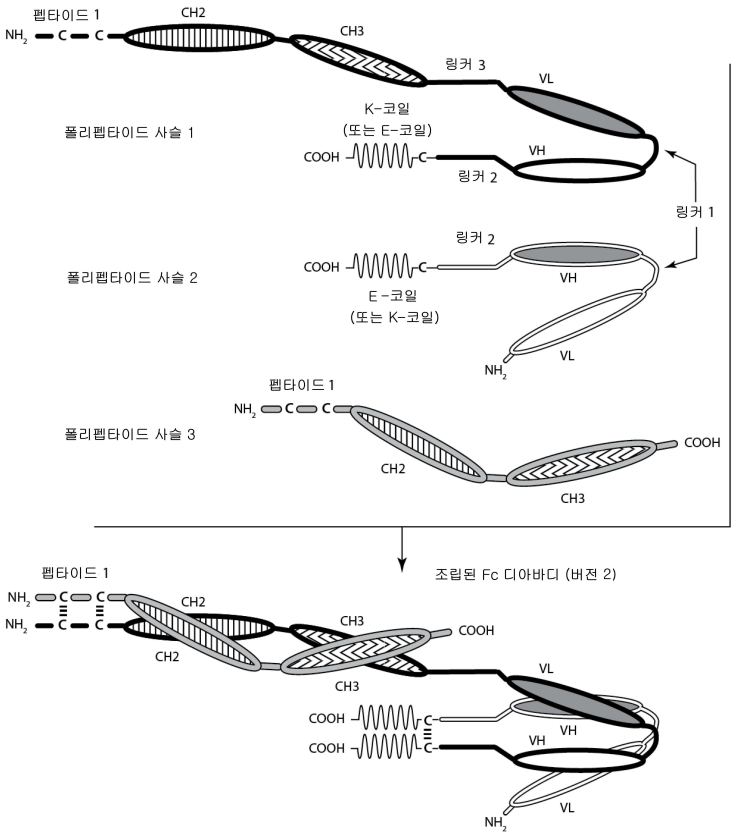
도면2


NH2
VL
폴리펩타이드 사슬 1
COOH
CH3
CH2
C
VH
링커 2
링커 1
CH3
CH2
링커 2
COOH
C
VH
폴리펩타이드 사슬 2
VL
NH2
조립된 디아바디
NH2
VL
VH
CH3
CH2
COOH
COOH
C
C
VH
CH3
CH2
VL
NH2

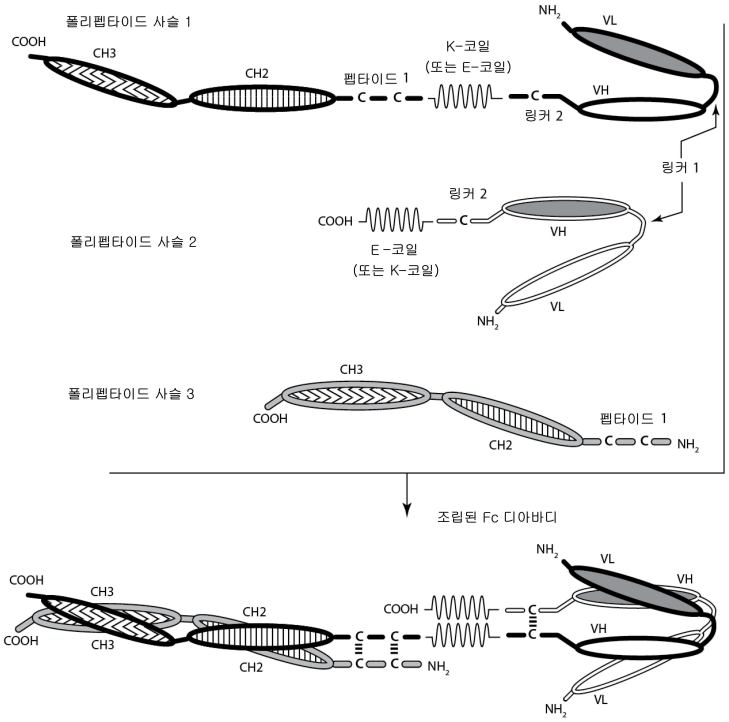
도면3a


펩타이드 1
CH2
CH3
링커 3
VL
K-코일
(또는 E-코일)
폴리펩타이드 사슬 1
COOH
VH
링커 2
링커 1
링커 2
폴리펩타이드 사슬 2
VH
E-코일
(또는 K-코일)
VL
펩타이드 1
폴리펩타이드 사슬 3
CH2
COOH
CH3
조립된 Fc 디아바디 (버전 2)
펩타이드 1
CH2
CH3
COOH
CH2
CH3
VL
COOH
VH
COOH
VH
VL

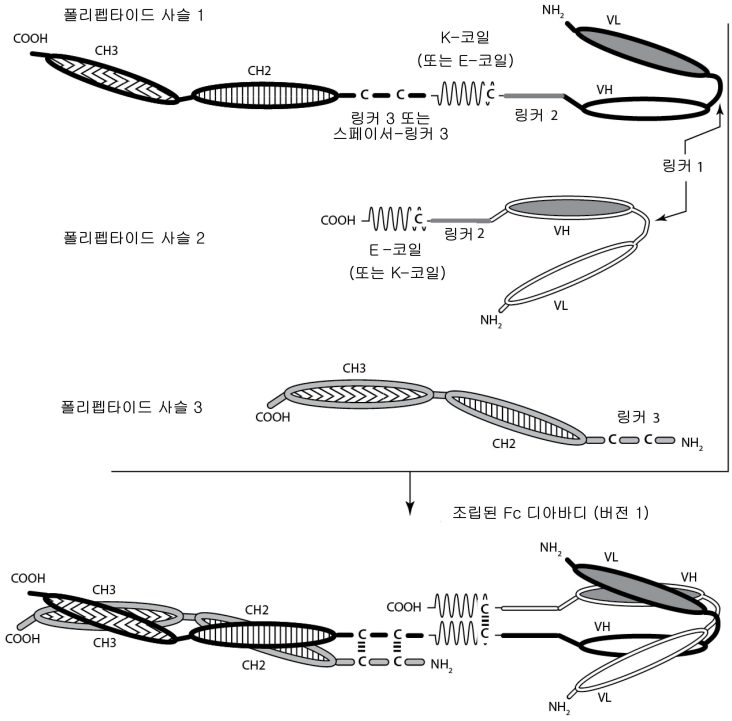
도면3b


펩타이드 1
CH2
CH3
링커 3
VL
K-코일
(또는 E-코일)
폴리펩타이드 사슬 1
COOH
VH
링커 2
링커 1
링커 2
폴리펩타이드 사슬 2
VH
E-코일
(또는 K-코일)
VL
펩타이드 1
폴리펩타이드 사슬 3
CH2
COOH
CH3
조립된 Fc 디아바디 (버전 2)
펩타이드 1
CH2
CH3
COOH
CH2
CH3
VL
COOH
VH
COOH
VH
VL

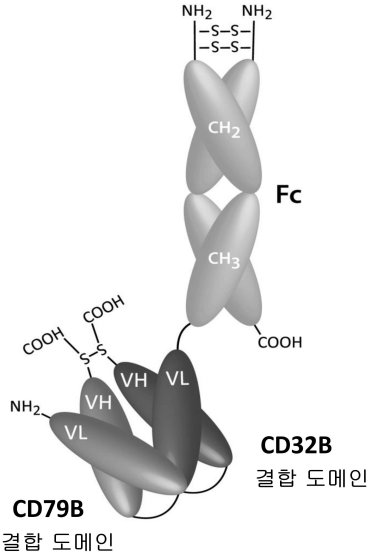
도면3c


폴리펩타이드 사슬 1
COOH
CH3
CH2
펩타이드 1
K-코일
(또는 E-코일)
링커 2
VH
VL
NH2
링커 1
폴리펩타이드 사슬 2
COOH
E-코일
(또는 K-코일)
링커 2
VH
VL
NH2
폴리펩타이드 사슬 3
CH3
COOH
CH2
펩타이드 1
NH2
조립된 Fc 디아바디

도면3d

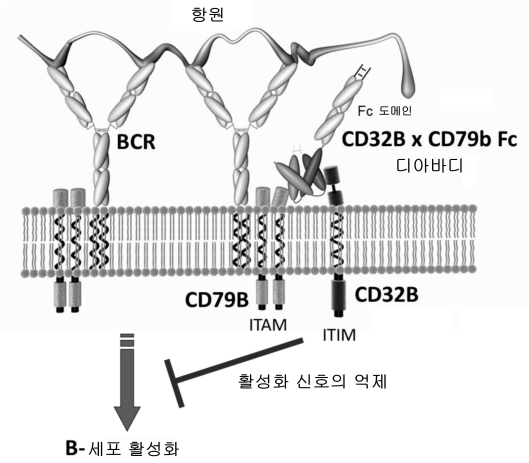

폴리펩타이드 사슬 1
COOH
CH3
CH2
K-코일
(또는 E-코일)
링커 3 또는
스페이서-링커 3
링커 2
VH
VL
NH2
링커 1
폴리펩타이드 사슬 2
COOH
E-코일
(또는 K-코일)
링커 2
VH
VL
NH2
폴리펩타이드 사슬 3
CH3
COOH
CH2
링커 3
NH2
조립된 Fc 디아바디 (버전 1)

도면3e

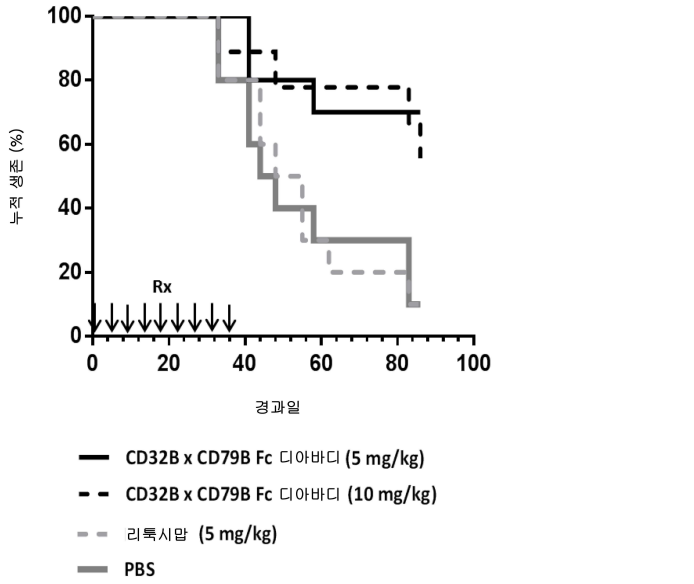


CD32B x CD79B Fc 디아바디

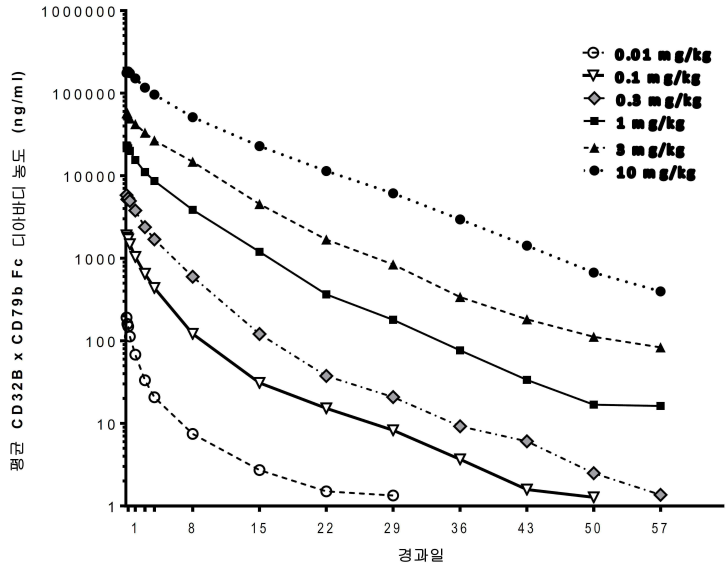
도면4



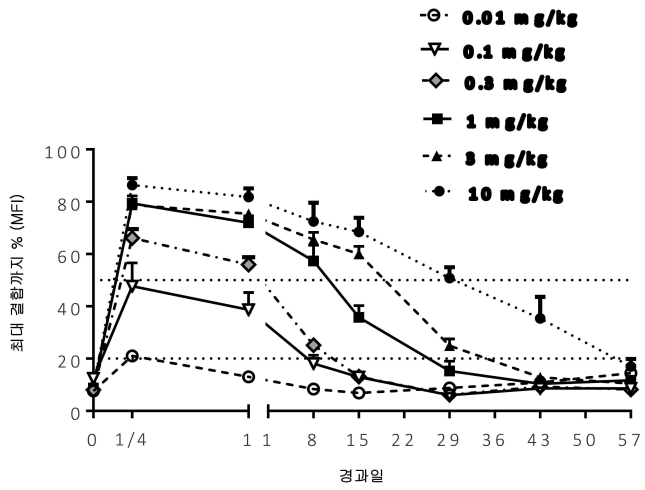
도면5


100
80
60
40
20
0
누적 생존 (%)
Rx
0
20
40
60
80
100
경과일
CD32B x CD79B Fc 디아바디 (5 mg/kg)
CD32B x CD79B Fc 디아바디 (10 mg/kg)
리툭시맙 (5 mg/kg)
PBS

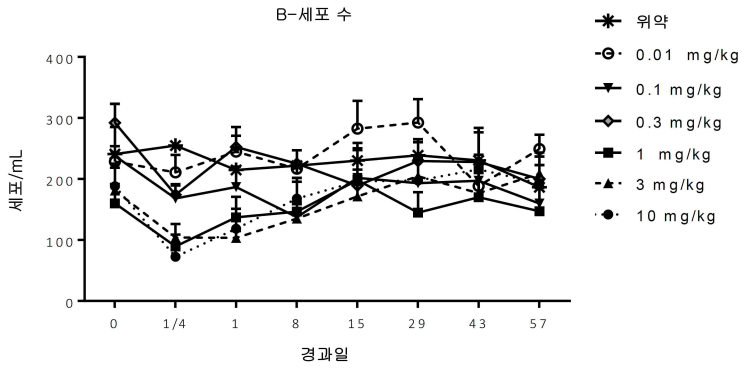
도면6


1000000
100000
10000
1000
100
10
1
평균 CD32B x CD79b Fc 디아바디 농도 (ng/ml)
0.01 mg/kg
0.1 mg/kg
0.3 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
10 mg/kg
1
8
15
22
29
36
43
50
57
경과일

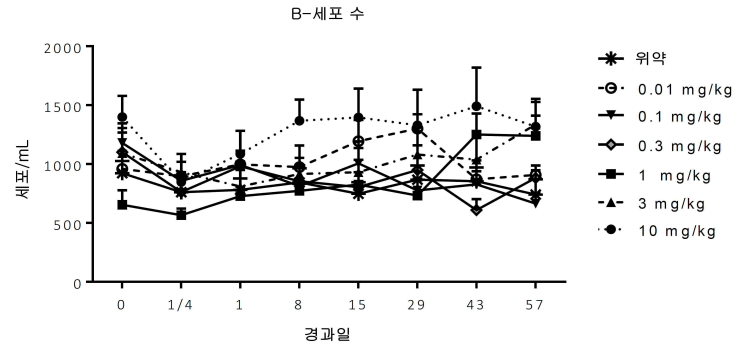
도면7



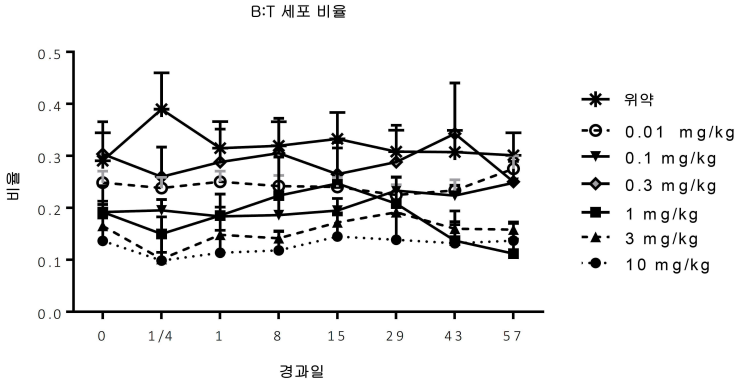
도면8a



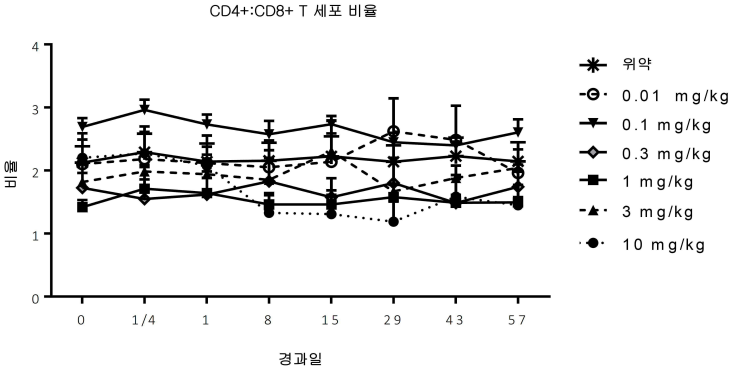
도면8b



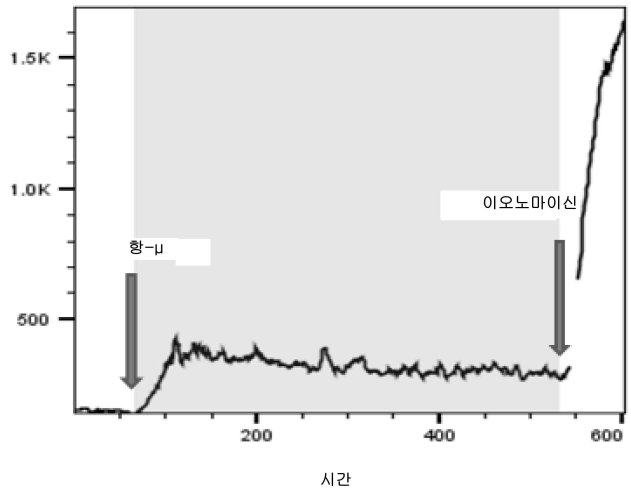
도면8c



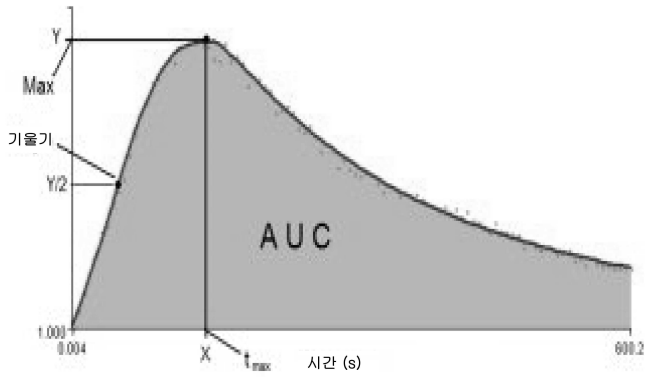
도면8d



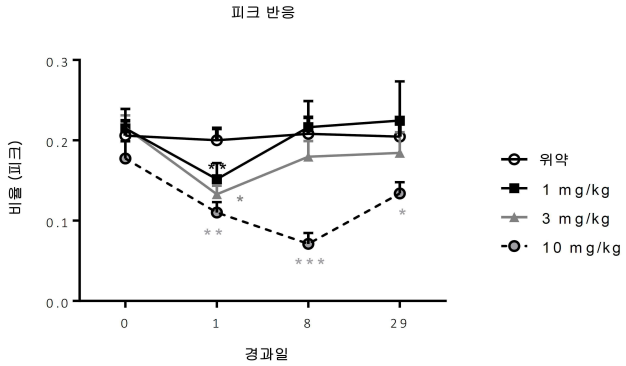
도면9a



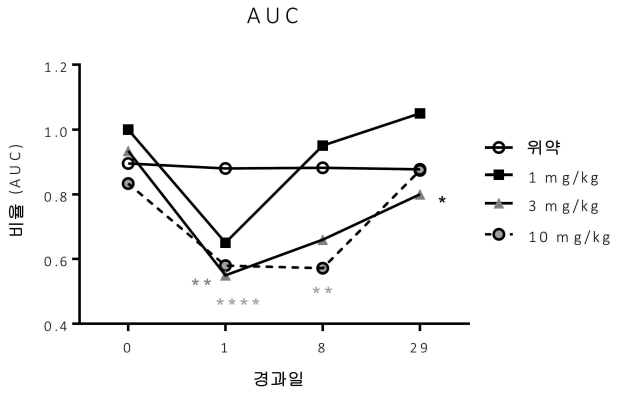
도면9b



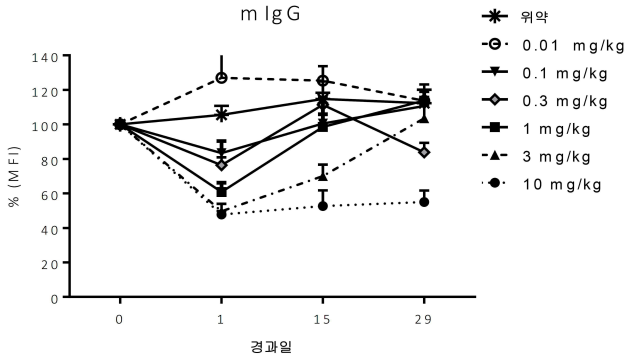
도면9c



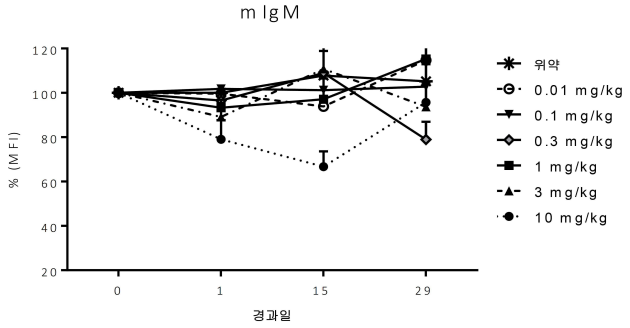
도면9d



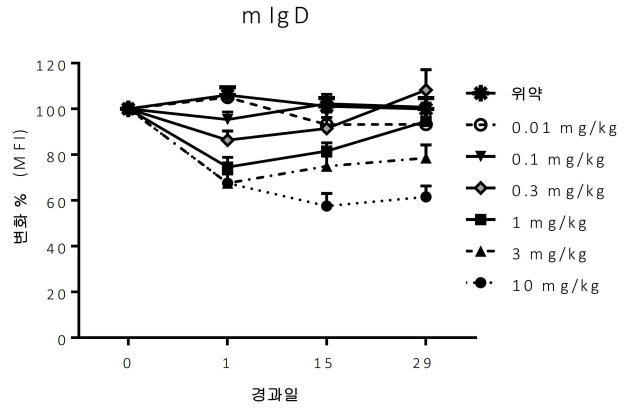
도면10a



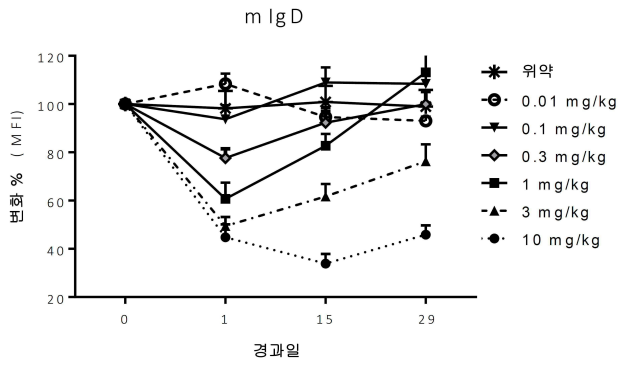
도면10b



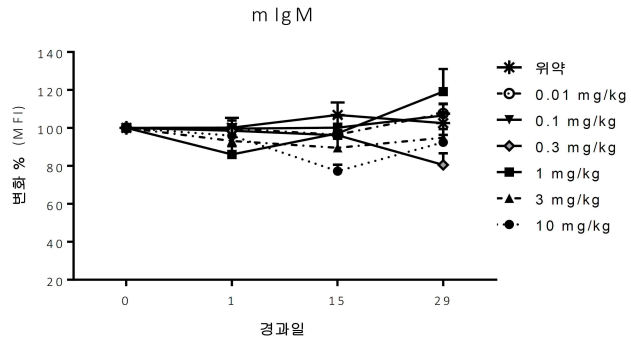
도면10c



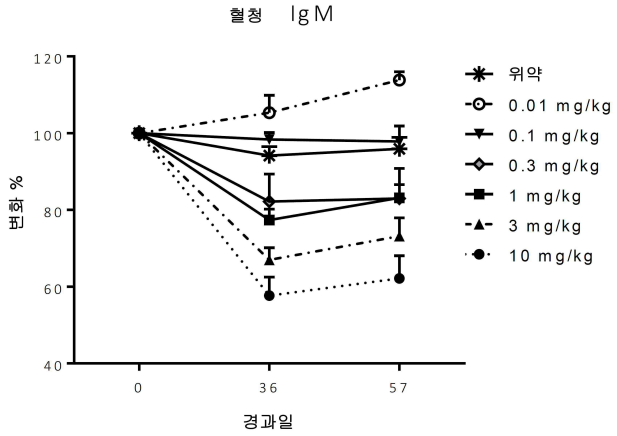
도면11a



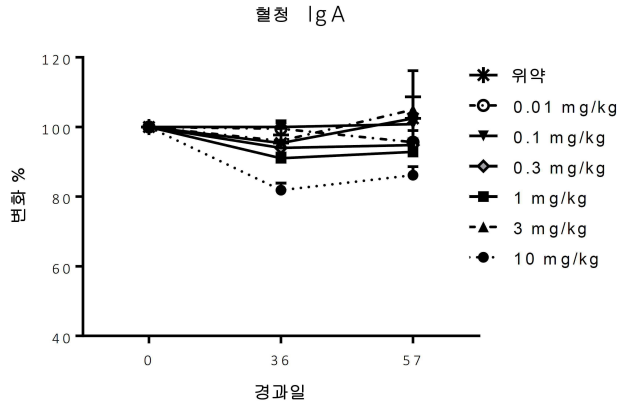
도면11b



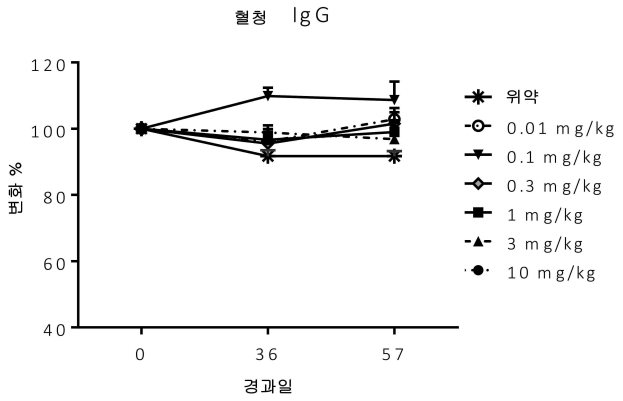
도면12a



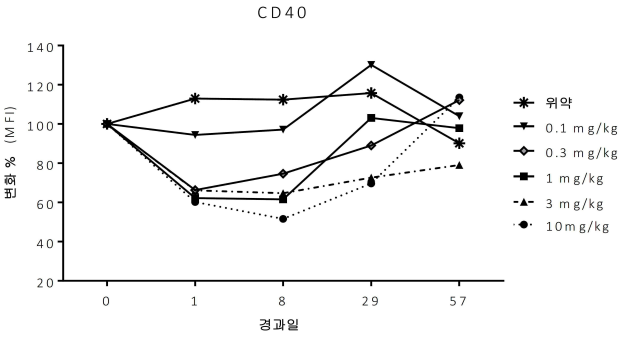
도면12b



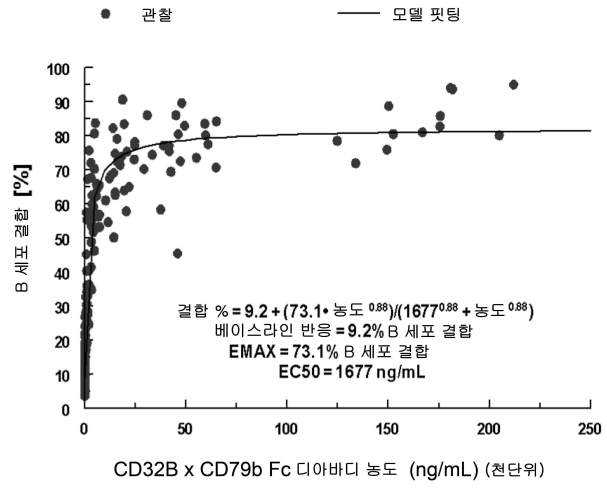
도면12c



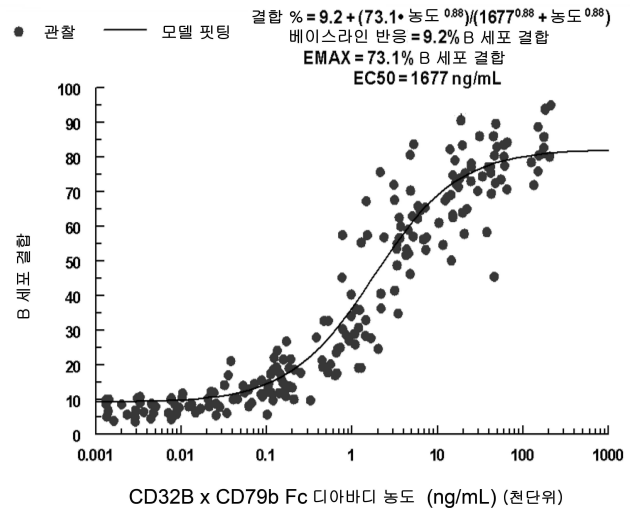
도면13



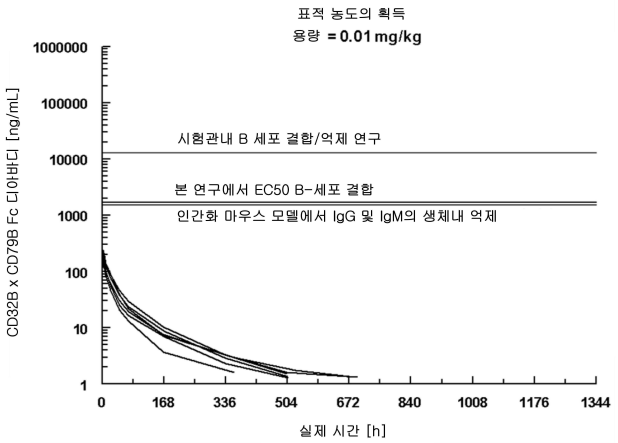
도면14a



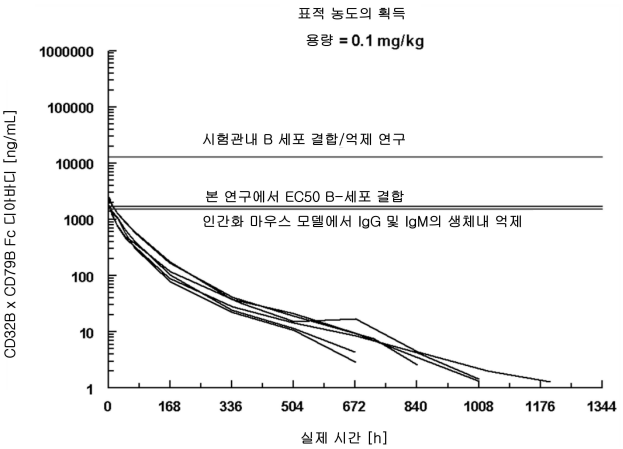
도면14b



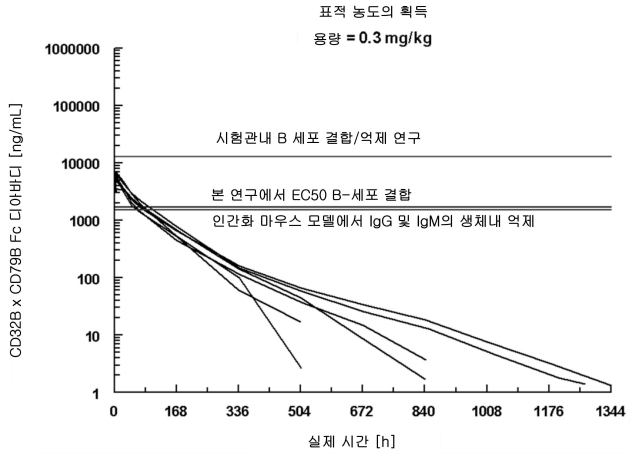
도면15a



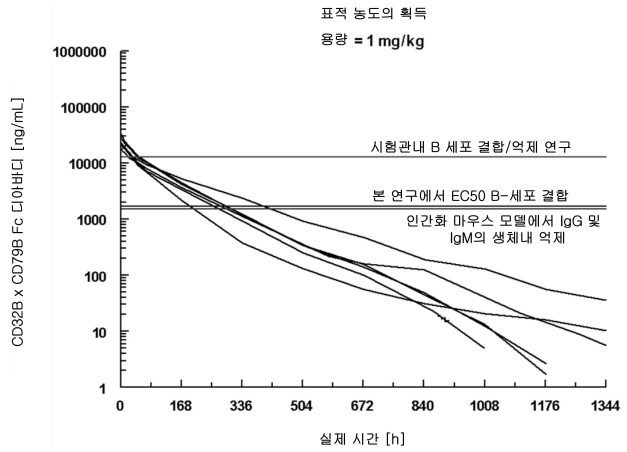
도면15b



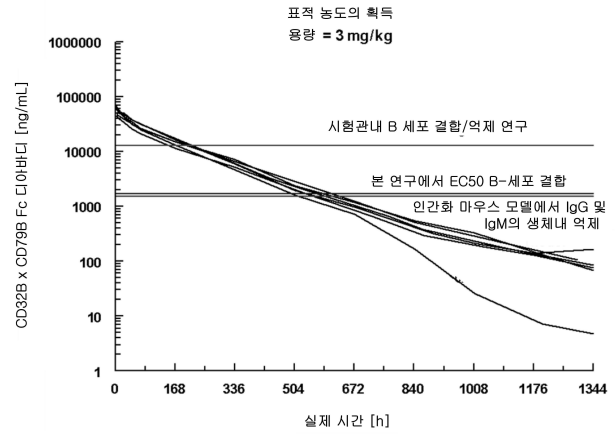
도면15c



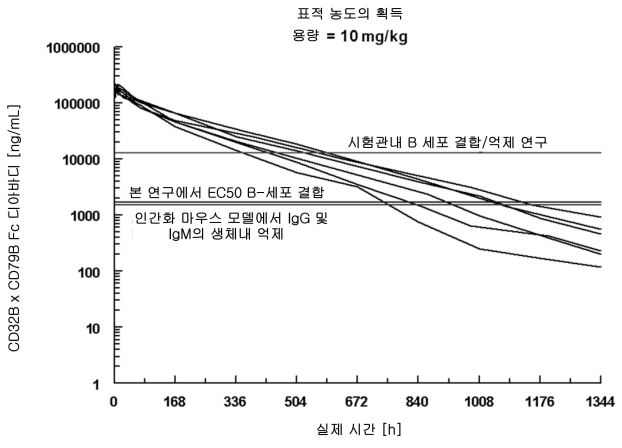
도면15d



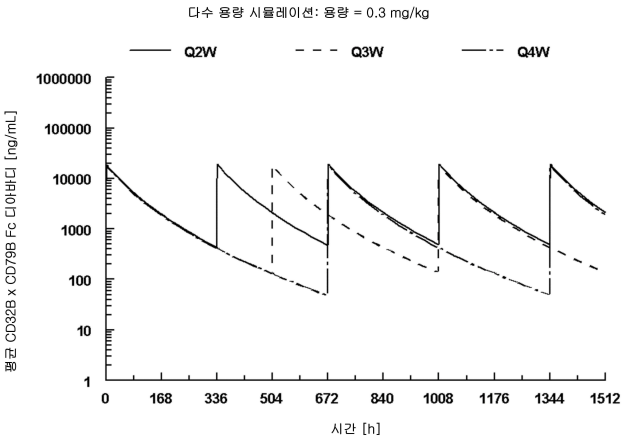
도면15e



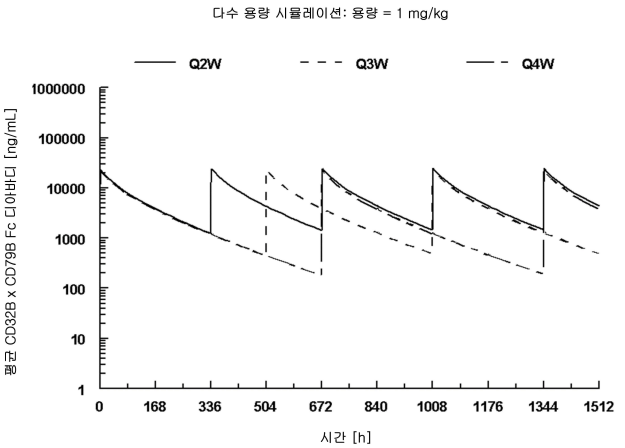
도면15f



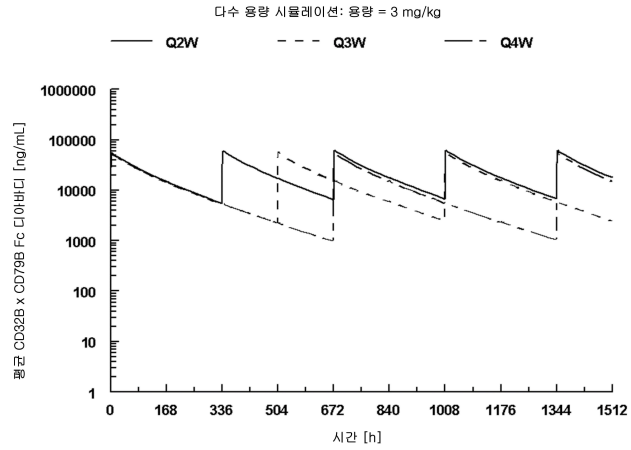
도면16a



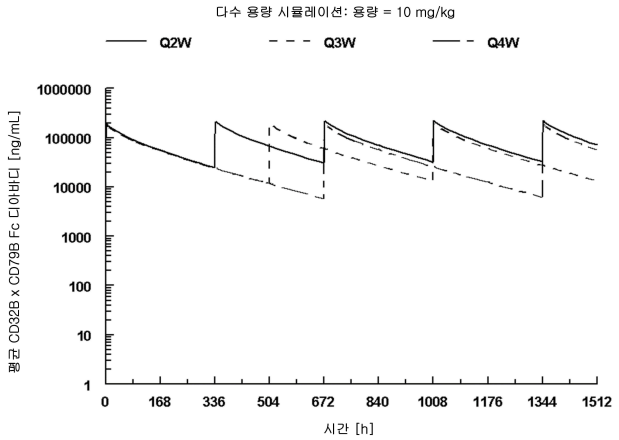
도면16b



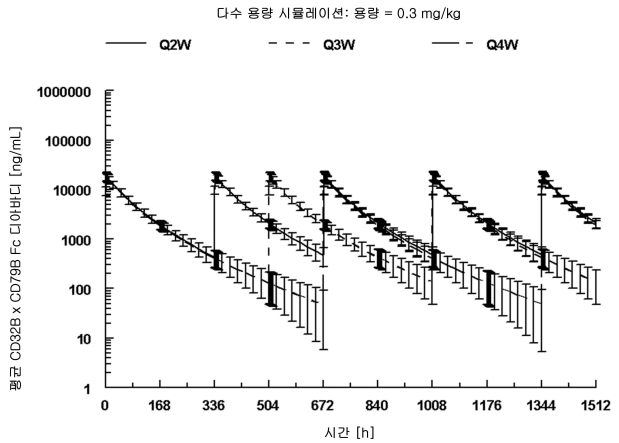
도면16c



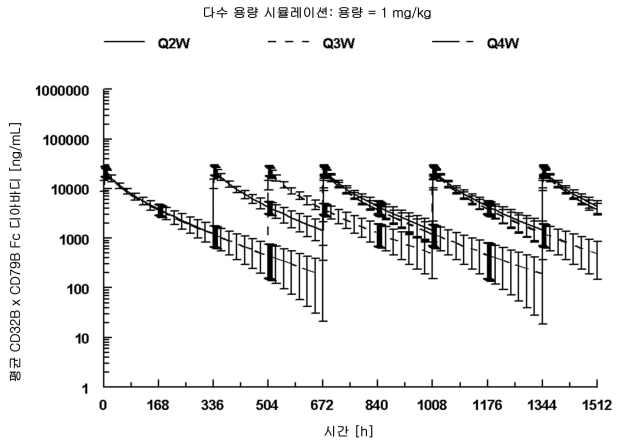
도면16d



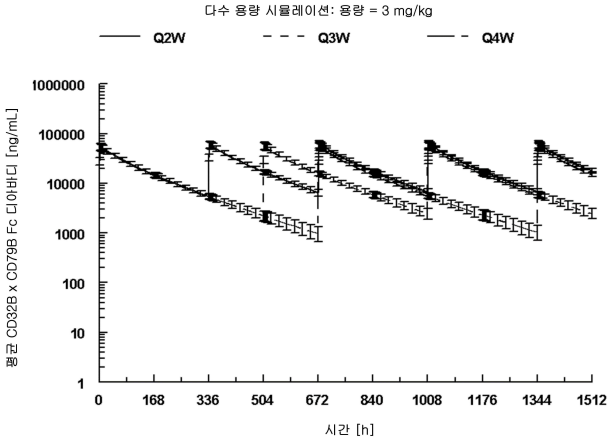
도면17a



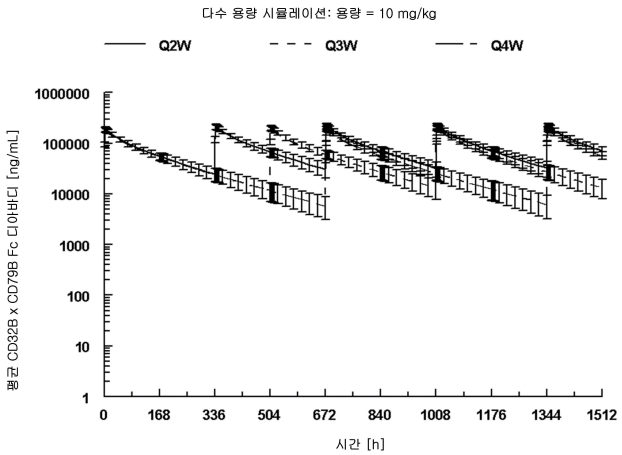
도면17b



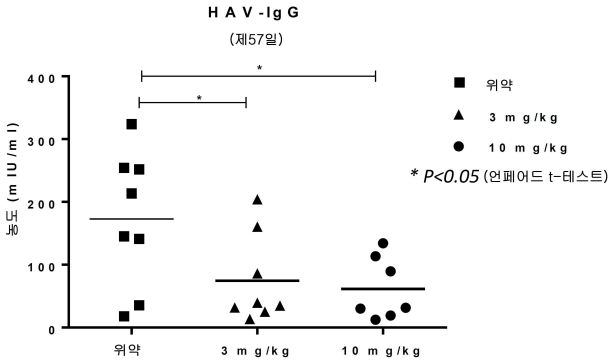
도면17c



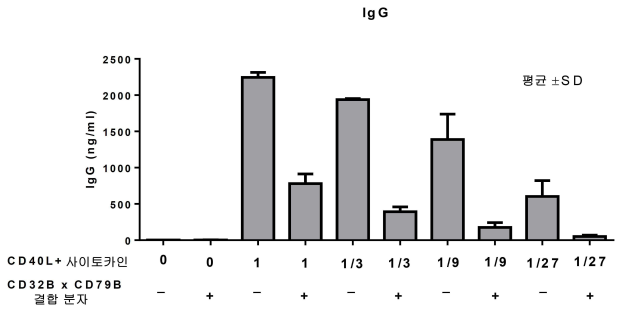
도면17d



도면18



도면19



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MacroGenics, Inc.

Chen, Wei

Moore, Paul A.

Pandya, Namish Bharat

Bonvini, Ezio

<120> Methods for the Use of CD32B x CD79B-Binding Molecules in the Treatment of Inflammatory Diseases and Disorders

<130> 1301.0145PCT

<150> US 62/432,328

<151> 2016-12-09

<150> US 62/346,717

<151> 2016-06-07

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> Human IgG CL Kappa Domain

<400> 1

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

50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 2

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<

222> (1)..(104)

<223> Human IgG CL Lambda Domain

<400> 2

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val

35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr

50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

<210> 3

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(98)

<223> Human IgG1 CH1 Domain

<400> 3

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

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val

<210> 4

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(98)

<223> Human IgG2 CH1 Domain

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val

<210> 5

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(98)

<223> Human IgG4 CH1 Domain

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> Human IgG1 Hinge Region
<400> 6
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15
<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> Human IgG2 Hinge Region
<400> 7
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(12)

<223> Human IgG4 Hinge Region

<400> 8

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human IgG4 Hinge Region with S228P Substitution

<400> 9

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 10

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> CH2-CH3 Domain of Human IgG1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> XAA is Lysine (K) or is absent

<400> 10

Ala Pro Glu Leu Leu 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 Thr 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 Xaa

210 215

<210> 11

<211> 216

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(216)

<223> CH2-CH3 Domain of Human IgG2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (216)..(216)

<223> XAA is Lysine (K) or is absent

<400> 11

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 12

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> CH2-CH3 Domain of Human IgG3

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> XAA is Lysine (K) or is absent

<400> 12

Ala Pro Glu Leu Leu 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 Gln Phe Lys 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 Phe 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 Thr 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 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met 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 Ile

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa

210 215

<210> 13

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> CH2-CH3 Domain of Human IgG4

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> XAA is Lysine (K) or is absent

<400

> 13

Ala Pro Glu Phe Leu 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 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 Phe 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

Gly Leu Pro Ser Ser 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 Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr 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 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 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 Leu Gly Xaa
210 215

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Preferred Intervening Spacer Peptide (Linker 1)
<400> 14
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Linker 2
<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 16
<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 2

<400> 16

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting Domain

<400> 17

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting Domain

<400> 18

Val Glu Pro Lys Ser Cys

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting Domain

<400> 19

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heterodimer-Promoting Domain

<400> 20

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> "E-coil" Heterodimer-Promoting Domain

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> "K-coil" Heterodimer-Promoting Domain

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cysteine-Containing "E-Coil" Heterodimer-Promoting Domain

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 24

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cysteine-Containing "K-Coil" Heterodimer-Promoting Domain

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cysteine-Containing Peptide (Peptide 1)

<400> 25

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cysteine-Containing Peptide (Peptide 1)

<400> 26

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Intervening Linker Peptide (Linker 3)

<400> 27

Ala Pro Ser Ser Ser

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Intervening Linker Peptide (Linker 3)

<400> 28

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu

1 5

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Spacer Peptide (Linker 4)

<400> 29

Gly Gly Gly Asn Ser

1 5

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> VL Domain of Anti-Human CD32B Antibody

<400> 30

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(116)

<223> VH Domain of Anti-Human CD32B Antibody

<400> 31

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

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(112)

<223> VL Domain of Anti-Human CD79B Antibody

<400> 32

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

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(113)

<223> VH Domain of Anti-Human CD79B Antibody

<400> 33

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

<210> 34

<211> 262

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First Polypeptide Chain of First Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Diabody

<400> 34

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
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> 35
<211> 270
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second Polypeptide Chain of First Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Diabody
<400> 35
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> 36

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First Polypeptide Chain of Second Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Diabody

<400> 36

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

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 Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys
225 230 235 240
Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
245 250 255
Ala Ala Leu Glu Lys
260

<210> 37
<211> 269
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220
><223> Second Polypeptide Chain of Second Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Diabody
<400> 37
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 Ala Ser Thr Lys

225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys

245 250 255

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

260 265

<210> 38

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH2-CH3 Domain of Knob-Bearing IgG Fc Region

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

<210> 39

<211> 502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First Polypeptide Chain of First Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Asp Ile Gln Met Thr

225 230 235 240

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> 40

<211> 1506

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding First Polypeptide Chain of First Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 40

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 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

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420

aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa agcccccttcc agctccccta tggaagacat ccagatgacc 720

cagtctccat cctccttatc tgcctctgtg ggagatagag tcaccatcac ttgtcgggca 780

agtcaggaaa ttagtggtta cttaagctgg ctgcagcaga aaccaggcaa ggcccctaga 840

cgcctgatct acgccgcatc cactttagat tctggtgtcc catccaggtt cagtggcagt 900

gagtctggga ccgagttcac cctcaccatc agcagccttc agcctgaaga ttttgcaacc 960

tattactgtc tacaatattt tagttatccg ctcacgttcg gaggggggac caaggtggaa 1020

ataaaaggag gcggatccgg cggcggaggc caggttcagc tggtgcagtc tggagctgag 1080

gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc tcctgcaagg cttctggtta 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 cggtggagaa gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct 1440

ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg 1500

aactct 1506

<210> 41

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second Polypeptide Chain of First Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 41

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> 42

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding Second Polypeptide Chain of First Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 42

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg cggcggaggc 360

gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc 420

tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc 480

ccaggcaagg ggcttgagtg ggttgctgaa attagaaaca aagctaaaaa tcatgcaaca 540

tactatgctg agtctgtgat agggaggttc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt 600

ctgtacctgc aaatgaacag cttaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct 660

ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctcctccgg aggatgtggc 720

ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca 780

cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag 810

<210> 43

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH2-CH3 Domain of Hole-Containing IgG Fc Region

<400> 43

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> 44

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third Polypeptide Chain of First Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 44

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> 45

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polynucleotide Encoding Third Polypeptide Chain of First

Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 45

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca 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

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 420

aaccaggtca gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540

gacggctcct tcttcctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 46

<211> 501

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First Polypeptide Chain of Second Exemplary CD32B x CD79B

Bispecific Fc Diabody

<400> 46

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu Asp Ile Gln Met Thr
225 230 235 240

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 Ala
450 455 460
Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
465 470 475 480
Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

485 490 495

Gly Gly Gly Asn Ser
500

<210> 47

<211> 269

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second Polypeptide Chain of Second Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 47

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 Ala Ser Thr Lys

225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys

245 250 255

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

260 265

<210> 48

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third Polypeptide Chain of Second Exemplary CD32B x CD79B Bispecific Fc Diabody

<400> 48

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