

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033658**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.13

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)

(21) Номер заявки
201690325

(22) Дата подачи заявки
2014.08.06

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ Fc-ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬ CD32B И CD79b, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **61/864,217; 61/866,416; 61/869,519;
61/907,525**

(32) **2013.08.09; 2013.08.15; 2013.08.23;
2013.11.22**

(33) **US**

(43) **2016.09.30**

(86) **PCT/US2014/049848**

(87) **WO 2015/021089 2015.02.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Джонсон Лесли С., Хуанг Линг, Шах
Калпана, Бонвини Эцио, Мур Пол А.,
Чен Вей (US)**

(74) Представитель:
**Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,
Строкова О.В. (RU)**

(56) **WO-A1-2012018687**

VERI et al. Therapeutic Control of B Cell Activation via Recruitment of Fc Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function with a Novel Bispecific Antibody Scaffold, Arthritis & Rheumatism, 01 July 2010 (01.07.2010), vol. 62, Pgs. 1933-1943, entire document.

US-A1-20100174053

US-A1-20130295121

(57) Изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат Fc-домен иммуноглобулина ("биспецифические моновалентные Fc-диатела"), состоят из трех полипептидных цепей и которые имеют по меньшей мере один сайт связывания, специфический для эпитопа CD32B, и один сайт связывания, специфический для эпитопа CD79b (т.е. "CD32B×CD79b биспецифическое моновалентное Fc-диатело"). Биспецифические моновалентные Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением способны одновременно связываться с CD32B и CD79b. Настоящее изобретение относится к таким композициям, к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные Fc-диатела, а также к способам их применения в лечении воспалительных заболеваний или состояний и, в частности, системной красной волчанки (SLE) и заболевания "трансплантат против хозяина".

B1**033658****033658****B1**

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявкой на выдачу патента США с серийным № 61/864217 (поданной 9 августа 2013 г.; находящейся на рассмотрении); 61/866416 (поданной 15 августа 2013 г.; находящейся на рассмотрении); 61/869519 (поданной 23 августа 2013 г.; находящейся на рассмотрении) и 61/907525 (поданной 22 ноября 2013 г.; находящейся на рассмотрении), при этом каждая из данных заявок включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящая заявка содержит один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 et seq., которые раскрываются и в бумажном, и в компьютерном носителях информации, и при этом как бумажный, так и компьютерный носители информации включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диатам, которые содержат Fc-домен иммуноглобулина ("биспецифические моновалентные Fc-диата"), состоят из трех полипептидных цепей и которые имеют по меньшей мере один сайт связывания, специфический для эпитопа CD32B, и один сайт связывания, специфический для эпитопа CD79b (т.е. "CD32B×CD79b Fc-диател"). Биспецифические моновалентные Fc-диата в соответствии с настоящим изобретением способны одновременно связываться с CD32B и CD79b. Настоящее изобретение относится к таким композициям, к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные Fc-диата, и к способам их применения в лечении воспалительных заболеваний или состояний, в частности, системной красной волчанки (SLE) и заболевания "трансплантат против хозяина".

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

I. Fcγ-рецепторы и CD32B

Взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы дает в результате широкий ряд ответов, варьирующих от эффекторных функций, таких как антитело-зависимая цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодуляторных сигналов, таких как регулирование пролиферации лимфоцитов и секреция антител. Все эти взаимодействия инициируются посредством связывания Fc-домена антител или иммунных комплексов со специализированными рецепторами клеточной поверхности на гемопоэтических клетках. Разнообразие клеточных ответов, вызванных антителами и иммунными комплексами, является результатом структурной гетерогенности Fc-рецепторов. Fc-рецепторы имеют общие структурно родственные домены связывания лиганда, которые предположительно опосредуют межклеточную передачу сигнала.

Fc-рецепторы являются представителями белков суперсемейства гена иммуноглобулина. Они представляют собой поверхностные гликопротеины, которые могут связываться с Fc-частью молекул иммуноглобулина. Каждый представитель семейства распознает иммуноглобулины одного или нескольких изоформ через домен распознавания на α-цепи Fc-рецептора.

Fc-рецепторы определяют по их специфичности к подтипам иммуноглобулина (см. Ravetch J.V. et al. (1991) "Fc Receptors" Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S. et al. (2001) "Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fcγ Receptors," Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D.D. et al. (2002) "ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation" J. Clin. Invest. 2(109): 161-168; Ravetch J.V. et al. (2000) "Immune Inhibitory Receptors," Science 290:84-89; Ravetch J.V. et al. (2001) "IgG Fc Receptors" Annu. Rev. Immunol. 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) "Fc Receptors: Rubor Redux" Cell, 78(4): 553-60).

Fc-рецепторы, которые способны связываться с IgG антителами, называют "FcγR". Каждый представитель этого семейства является интегрированным в мембрану гликопротеином, имеющим внеклеточные домены, родственные иммуноглобулин-подобным доменам типа C2, один трансмембранный домен и внутрицитоплазматический домен варьирующей длины. Известны три FcγR, обозначаемые FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) и FcγRIII(CD16). Эти три рецептора кодируются разными генами; однако многочисленные гомологии между этими тремя представителями семейства, подтверждают, что они возникли от общего предшественника, вероятно, в результате дупликации генов.

Белки FcγRII(CD32) представляют собой 40-кДа встроенные в мембрану гликопротеины, которые связываются только с объединенными в комплекс IgG из-за низкой аффинности к мономерному Ig (10 M⁻¹). Этот рецептор является наиболее интенсивно экспрессированным FcγR, присутствующим на всех гемопоэтических клетках, в том числе моноцитах, макрофагах, В-клетках, NK-клетках, нейтрофилах, тучных клетках и тромбоцитах. FcγRII содержит только два иммуноглобулин-подобных участка в своей связывающейся с иммуноглобулином цепи и, поэтому, обладает намного более низкой аффинностью к IgG, чем FcγRI. Имеются три гена FcγRII человека (FcγRIIA(CD32A), FcγRIIB(CD32B), FcγRIIC(CD32C)), продукты каждого из которых связываются с IgG в агрегаты или иммунные комплексы.

Четко выраженные различия цитоплазматических доменов в FcγRIIA и FcγRIIB обеспечивают два функционально гетерогенных ответа на лигирование рецептора. Основное различие заключается в том,

что при связывании с Fc-участком IgG изоформа FcγRIIA инициирует межклеточную передачу сигнала, приводящую к активации иммунной системы (например, фагоцитоз, окислительный всплеск и т.д.), тогда как изоформа FcγRIIB при связывании с Fc-участком IgG инициирует сигналы, которые приводят к ослаблению или ингибированию иммунной системы (например, ингибированию активации В-клеток и т.д.).

Такие активирующие и ингибиторные сигналы трансдуцируются через FcγR после лигирования к Fc-участку IgG. Эти диаметрально противоположные функции являются результатом структурных различий между различными изоформами рецептора. Два разных домена среди цитоплазматических доменов передачи сигнала рецептора, называемых иммунорецепторными тирозиновыми активирующими мотивами (ITAM) или иммунорецепторными тирозиновыми ингибирующими мотивами (ITIM), обуславливают разные ответы. Рекрутинг различных цитоплазматических ферментов в этих структурах обеспечивает исход опосредованных FcγR клеточных ответов. Содержащие ITAM комплексы FcγR включают в себя FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIA, тогда как содержащие ITIM комплексы включают в себя только FcγRIIB.

Нейтрофилы человека экспрессируют ген FcγRIIA. Кластеризация FcγRIIA с помощью иммунных комплексов или поперечного сшивания специфических антител служит агрегации ITAM с ассоциированными с рецепторами киназами, которые облегчают фосфорилирование ITAM. Фосфорилирование ITAM выполняет роль локирующего сайта для киназы Syk, активация которой приводит к активации нижележащих субстратов (например, PI₃K). Клеточная активация ведет к высвобождению провоспалительных медиаторов.

Ген FcγRIIB экспрессируется в В-лимфоцитах; его внеклеточный домен является на 96% идентичным по отношению к FcγRIIA и связывается с комплексами IgG неявно выраженным образом. Присутствие ITIM в цитоплазматическом домене FcγRIIB определяет этот ингибиторный подкласс FcγR. Была установлена молекулярная основа этого ингибирования. Если FcγRIIB становится лигированным совместно с активирующим рецептором посредством Fc-участков иммуноглобулинов IgG иммунных комплексов, то ITIM FcγRIIB становится фосфорилированным и привлекает домен SH2 инозитолполифосфат-5'-фосфатазы (SHIP), которая гидролизует фосфоинозитольные мессенджеры, высвобождаемые в результате опосредованной содержащим ITAM FcγR активации тирозинкиназы, что в результате предотвращает инфлюкс межклеточного Ca⁺⁺. Таким образом, такое поперечное сшивание FcγRIIB и активирующего рецептора тормозит активность активирующего рецептора и, таким образом, ингибирует ответность клетки. Таким образом, в В-клетках активация В-клеток, пролиферация В-клеток и секреция антитела затормаживается или прекращается. Таким образом, в начале выявления антигена происходит связывание мономерного IgG с антигеном, и Fc-участки связанных антител связываются с ITAM активирующих FcγR с опосредованием активации иммунной системы. С прогрессированием ответа хозяина формируются иммунные комплексы мультимерного IgG с антигеном, которые способны связываться с FcγRIIB (соответственно, с совместным лигированием таких комплексов с активирующим рецептором), что ведет к ослаблению и абсолютному прекращению иммунного ответа (см., например, патенты Соединенных Штатов Америки №№ 8445645; 8217147; 8216579; 8216574; 8193318; 8192737; 8187593; 8133982; 8044180; 8003774; 7960512; 7786270; 7632497; 7521542; 7425619; 7355008 и публикации патентных документов Соединенных Штатов Америки №№ 2012/0276094; 2012/0269811; 2012/0263711; 2012/0219551; 2012/0213781; 2012/0141476; 2011/0305714; 2011/0243941; 2010/0322924; 2010/0254985; 2010/0196362; 2010/0174053; 2009/0202537; 2009/0191195; 2009/0092610; 2009/0076251; 2009/0074771; 2009/0060910; 2009/0053218; 2009/0017027; 2009/0017026; 2009/0017023; 2008/0138349; 2008/0138344; 2008/0131435; 2008/0112961; 2008/0044429; 2008/0044417; 2007/0077246; 2007/0036799; 2007/0014795; 2007/0004909; 2005/0260213; 2005/0215767; 2005/0064514; 2005/0037000; 2004/0185045).

II. В-клеточный рецептор и CD79b

В-клетки являются клетками иммунной системы, которые отвечают за продуцирование антител. В-клеточный ответ на антиген является важным компонентом нормальной иммунной системы. В-клетка обладает специализированными рецепторами клеточной поверхности (В-клеточными рецепторами; "BCR"). Если В-клетка встречает антиген, способный связываться с этим BCR клетки, то В-клетка стимулируется к пролиферации и продуцированию антител, специфических к связываемому антигену. Для создания эффективного ответа на антигены также необходимы ассоциированные с BCR белки и помощь Т-клеток. Комплекс антиген/BCR интернализируется, и антиген подвергается протеолизу. Небольшая часть антигена остается в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости-II ("МНС-II") на поверхности В-клеток, где комплекс может быть распознан Т-клетками. Т-клетки, активированные такой презентацией антигена, секретируют ряд лимфокинов, индуцирующих созревание В-клеток.

Передача сигнала через BCR играет важную роль в образовании антител, в аутоиммунитете и в установлении иммунологической толерантности (Gauld, S.B. et al. (2002) "B Cell Antigen Receptor Signaling: Roles In Cell Development And Disease", Science 296(5573):1641-1642). Незрелые В-клетки, которые связывают собственные антигены, еще в костном мозге элиминируются путем апоптоза. В противоположность этому, связывание антигена в зрелых В-клетках приводит к активации, пролиферации, нечувствительности и апоптозу. Конкретный наблюдаемый функциональный ответ зависит от того, получает ли В-

клетка костимулирующие сигналы через другие поверхностные рецепторы, и от конкретных путей передачи сигнала, которые активируются.

BCR состоит из мембранного иммуноглобулина, который вместе с нековалентно связанными субъединицами α и β в CD79 ("CD79a" и "CD79b", соответственно) образует комплекс BCR. CD79a и CD79b представляют собой передающие сигнал субъединицы, которые содержат консервативный иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив ("ITAM"), необходимый для передачи сигнала (Dylke, J. et al. (2007) "Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR)", *Immunol. Lett.* 112(1):47-57; Cambier, J.C. (1995) "New Nomenclature For The Reth Motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL)" *Immunol. Today* 16:110). Агрегация комплекса BCR мультивалентным антигеном инициирует трансфосфорилирование ITAM в CD79a и CD79b и активацию рецептор-ассоциированных киназ (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). Фосфорилированные ITAM вовлекают дополнительные эффекторы, такие как PI_3K , PLC- γ и представители пути Ras/MAPK. Данные события передачи сигнала отвечают как за пролиферацию В-клеток, так и за усиленную экспрессию маркеров активации (таких как MHC-II и CD86), которые необходимы при праймировании В-клеток для их последующих взаимодействий с Т-хелперами ("T_h") клетками.

III. Воспалительные заболевания или состояния

Воспаление является процессом, с помощью которого белые кровяные клетки организма и химические вещества защищают наши организмы от инфицирования чужеродными субстанциями, такими как бактерии и вирусы. Оно, как правило, характеризуется болью, отеком, жаром и покраснением пораженной области. Химические вещества, известные как цитокины и простагландины контролируют этот процесс и высвобождаются в упорядоченном и локальном каскаде в кровь или пораженные ткани. Такое высвобождение химических веществ усиливает ток крови к области повреждения или инфекции и в результате может приводить к покраснению и жару. Некоторые из химических веществ вызывают истечение жидкости в ткани, что приводит к отеку. Этот защитный процесс может возбуждать нервы и вызывать боль. Такие изменения, если происходят в течение ограниченного периода в соответствующей области, приносят пользу организму.

Воспалительные заболевания или состояния отражают атаку иммунной системы на собственные клетки и ткань организма (т.е. "аутоиммунный" ответ). Существует много различных аутоиммунных нарушений, которые поражают организм различными путями. Например, головной мозг поражается у индивидуумов рассеянным склерозом, кишечник поражается у индивидуумов болезнью Крона, синовиальная оболочка, кость и хрящ различных суставов поражаются у индивидуумов ревматоидным артритом. Аутоиммунные нарушения могут привести к развитию разрушения одного или нескольких типов тканей организма, патологическому росту органа или к изменениям в функции органа. Аутоиммунное нарушение может поражать только один орган или тип ткани или может поражать несколько органов и тканей. Органы и ткани, обычно поражаемые аутоиммунными нарушениями, включают в себя красные кровяные клетки, кровеносные сосуды, соединительные ткани, эндокринные железы (например, щитовидную железу или поджелудочную железу), мышцы, суставы и кожу. Примеры аутоиммунных нарушений включают в себя без ограничения тиреоидит Хашимото, пернициозную анемию, болезнь Аддисона, диабет 1 типа, ревматоидный артрит, системную красную волчанку (SLE), дерматомиозит, синдром Шегрена, дерматомиозит, красную волчанку, рассеянный склероз, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, миастению гравис, синдром Рейтера, болезнь Грейвса, аутоиммунный гепатит, семейный аденоматозный полипоз и язвенный колит.

Воспалительные заболевания или состояния также могут возникать, когда в норме защитная иммунная система вызывает поражение при атаке на чужеродные клетки или ткани, присутствие которых полезно для организма (например, отторжение трансплантатов (заболевание "хозяин против хозяина")), или при отторжении клеток иммуносупрессивного хозяина иммунокомпетентными клетками введенного трансплантата (заболевание "трансплантат против хозяина") (DePaoli, A.M. et al. (1992) "Graft-Versus-Host Disease And Liver Transplantation" *Ann. Intern. Med.* 117:170-171; Sudhindran, S. et al. (2003) "Treatment Of Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation With Basiliximab Followed By Bowel Resection" *Am J Transplant.* 3:1024-1029; Pollack, M.S. et al. (2005) "Severe, Late-Onset Graft-Versus-Host Disease In A Liver Transplant Recipient Documented By Chimerism Analysis", *Hum. Immunol.* 66:28-31; Perri, R. et al. (2007) "Graft Vs. Host Disease After Liver Transplantation: A New Approach Is Needed", *Liver Transpl.* 13:1092-1099; Mawad, R. et al. (2009) "Graft-Versus-Host Disease Presenting With Pancytopenia After En Bloc Multiorgan Transplantation: Case Report And Literature Review", *Transplant Proc.* 41:4431-4433; Akbulut, S. et al. (2012) "Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation: A Comprehensive Literature Review", *World J. Gastroenterol.* 18(37): 5240-5248).

Несмотря на последние успехи в лечении таких заболеваний или состояний сохраняется потребность в композициях, способных лечить или предупреждать воспалительные заболевания или состояния.

IV. Биспецифические диатела

Способность интактного, немодифицированного антитела (например, IgG) связывать эпитоп антигена зависит от присутствия вариабельных доменов на легкой и тяжелой цепях иммуноглобулина (т.е. VL- и VH-доменов соответственно). Структура диатела основывается на одноцепочечной конструкции Fv (scFv) (см., например, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448; патентный документ США № 2004/0058400 (Hollinger et al.); патентный документ США № 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672; PCT публикацию № WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Protein Eng Des Sel.* 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", *Protein Engineering* 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region", Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", *Cancer Res.* 69(12):4941-4944).

Взаимодействие легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, а также, в частности, взаимодействие его VL- и VH-доменов образуют один из сайтов связывания антитела с эпитопом. В отличие от этого, конструкция scFv содержит VL- и VH-домены антитела, содержащиеся в одной полипептидной цепи, где домены отделяются гибким линкером с длиной, достаточной для обеспечения самосборки двух доменов в функциональный сайт связывания с эпитопом. Если самосборка VL- и VH-доменов становится невозможной из-за линкера недостаточной длины (менее приблизительно 12 аминокислотных остатков), две из конструкций scFv взаимодействуют друг с другом с образованием бивалентной молекулы, в которой VL-домен одной цепи соединяется с VH-доменом другой (обзор в Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658).

Натуральные антитела способны связываться только с эпитопом одного вида (т.е. моноспецифические), хотя они могут связывать несколько копий этого вида (т.е. проявляют бивалентность или мультивалентность). Из уровня техники известна возможность получения диател, которые отличаются от таких натуральных антител способностью связывать эпитопы двух или более разных видов (т.е. проявляющие биспецифичность или мультиспецифичность вдобавок к бивалентности или мультивалентности) (см., например, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448; патентный документ США № 2004/0058400 (Hollinger et al.); патентный документ США № 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2): 90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672; PCT публикация № WO 02/02781 (Mertens, N. et al., "New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives", In: *Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use*, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", *Protein Engineering* 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region" Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy" *Cancer Res.* 69(12):4941-4944).

Получение не являющихся моноспецифическими диател обеспечивает значительное преимущество: возможность связывать вместе и локализовать вместе клетки, которые экспрессируют различные эпитопы. Бивалентные диатела, таким образом, находят широкое применение, в том числе в терапии и иммунодиагностике. Бивалентность позволяет большую гибкость при разработке и конструировании диатела для различных применений, обеспечивая усиленную avidность к мультимерным антигенам, поперечное сшивание отличающихся антигенов и направленное нацеливание на определенные типы клеток, на основании наличия обоих целевых антигенов. Благодаря их повышенной валентности, низким степеням диссоциации и быстрому выведению из кровотока (для диател небольшого размера, равного или меньше ~50 кДа) молекулы диател, известные из уровня техники, также находят особое применение в области визуализации опухолей (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*", *Protein Eng.* 10:1221). Особенно важное значение имеет связывание вместе различающихся клеток, например, поперечное сшивание цитотоксических Т-клеток с клетками опухоли (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", *Nature* 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9: 299-305).

Домены связывания диатела с эпитопом также могут быть направлены на поверхностную детерми-

нанту какой-либо иммунной эффекторной клетки, такую как CD3, CD16, CD32 или CD64, которые экспрессируются в Т-лимфоцитах, натуральных киллерных (NK) клетках или других одноядерных клетках. Во многих исследованиях также было выявлено, что диатело связывается с детерминантами эффекторной клетки, например, с Fcγ-рецепторами (FcγR), с активацией эффекторной клетки (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; РСТ публикации №№ WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). В норме активация эффекторной клетки вызывается связыванием связанного с антигеном антитела с эффекторной клеткой путем взаимодействия Fc-FcγR; таким образом, в этом отношении молекулы диатела в соответствии с настоящим изобретением могут проявлять Ig-подобную функциональность, не зависимо от того, содержат ли они Fc-домен (например, как проанализировано любым анализом эффекторной функции, известным из уровня техники или приведенным в настоящем документе (например, анализом ADCC (антителозависимой клеточной цитотоксичности))). Путем поперечного сшивания опухолевых и эффекторных клеток диатело не только приводит эффекторную клетку в близость к опухолевым клеткам, но и обеспечивает эффективное уничтожение опухоли (см., например, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197).

Однако вышеописанные преимущества дорого обходятся. Формирование таких не являющихся моноспецифическими диател требует успешной сборки двух или более несхожих и различных полипептидов (т.е. для такого формирования требуется, чтобы диатела образовывались посредством гетеродимеризации разных видов полипептидной цепи). Это противоречит моноспецифическим диателам, которые образуются посредством гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку по меньшей мере два отличающихся полипептида (т.е. два вида полипептида) должны быть обеспечены для формирования не являющегося моноспецифическим диатела, и поскольку гомодимеризация таких полипептидов дает неактивные молекулы (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588), получение таких полипептидов должно выполняться таким образом, чтобы предотвращалось ковалентное связывание между полипептидами одного и того же вида (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588). В уровне техники, поэтому, предлагается нековалентное соединение таких полипептидов (см., например, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region," *Abstract 3P-683, J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672).

Однако из уровня техники известно, что биспецифические диатела, состоящие из нековалентно соединенных полипептидов, являются нестабильными и легко диссоциируются на нефункциональные мономеры (см., например, 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).

В отношении данной проблемы в уровне техники имеются успехи в разработке стабильных, ковалентно связанных гетеродимерных не являющихся моноспецифическими диател (см., например, РСТ публикации №№ WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Retargeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion," *J. Molec. Biol.* 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," *Arthritis Rheum.* 62(7): 1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," *Blood* 117(17):4542-4551). Такие подходы предусматривают конструирование одного или несколько цистеиновых остатков в каждом из используемых видов полипептида. Например, добавление цистеинового остатка к С-концу таких конструкций, как показали, обеспечивает дисульфидное связывание между полипептидными цепями, стабилизацию полученного в результате гетеродимера без влияния на характеристики связывания бивалентной молекулы.

Несмотря на такой успех получение стабильного, функционального гетеродимерного, не являющегося моноспецифическим диатела может быть дополнительно улучшено за счет тщательной разработки и помещения доменов, используемых в полипептидных цепях. Таким образом, настоящее изобретение относится к обеспечению специфических полипептидов, которые, в частности, сконструированы для формирования, путем ковалентного связывания, гетеродимерных Fc-диател, способных одновременно свя-

зывать CD32B и CD79b.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к CD32B×CD79b биспецифическим моновалентным диаталам, которые содержат Fc-участок иммуноглобулина ("CD32B× CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела"). CD32B×CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением состоят из трех полипептидных цепей ("первой", "второй" и "третьей" полипептидных цепей), при этом первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом. Такие ковалентные связывания представляют собой, например, дисульфидное связывание цистеиновых остатков, расположенных в каждой полипептидной цепи. Первая и вторая полипептидные цепи CD32B×CD79b биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением соединяются друг с другом гетеродимерным образом с формированием одного сайта связывания, специфического для эпитопа в CD32B, и одного сайта связывания, специфического для эпитопа в CD79b. CD32B×CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, являются моновалентными по той причине, что они способны связываться только с одной копией эпитопа в CD32B и только с одной копией эпитопа в CD79b, но биспецифическими по той причине, что одно диатело способно связываться одновременно с эпитопом в CD32B и с эпитопом CD79b. Биспецифические моновалентные Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением способны одновременно связываться с CD32B и CD79b. Настоящее изобретение относится к таким CD32B×CD79b биспецифическим моновалентным Fc-диаталам и к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные Fc-диатела. Настоящее изобретение, кроме того относится к способам применения таких диател в лечении воспалительных заболеваний или состояний и, в частности, системной красной волчанки (SLE) и заболевания "трансплантат против хозяина".

Подробнее, настоящее изобретение относится к биспецифическому моновалентному Fc-диателу, при этом биспецифическое моновалентное Fc-диатело способно специфически связываться с эпитопом в CD32B и с эпитопом в CD79b, и обладает Fc-доменом IgG, при этом биспецифическое моновалентное Fc-диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, при этом первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

i) домен 1, содержащий

(1) субдомен (1A), который включает в себя содержащий цистеин пептид (в частности, пептид с последовательностью (пептида 1) SEQ ID NO: 1); и

(2) субдомен (1B), который содержит полипептидную часть Fc-домена IgG (наиболее предпочтительно, имеющий домены CH2 и CH3 Fc-участка иммуноглобулина IgG);

ii) домен 2, содержащий

(1) субдомен (2A), который содержит VL-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD32B (VL_{CD32B}) (SEQ ID NO: 11); и

(2) субдомен (2B), который содержит VH-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD79b (VH_{CD79b}) (SEQ ID NO: 14),

при этом субдомены (2A) и (2B) отделены друг от друга пептидным линкером (в частности, пептидным линкером (линкером 2) с последовательностью SEQ ID NO: 4);

iii) домен 3, при этом домен 3 является Е-спиральным доменом (SEQ ID NO: 7) или К-спиральным доменом (SEQ ID NO: 8), при этом домен 3 отделен от домена 2 пептидным линкером (в частности, пептидным линкером с последовательностью SEQ ID NO: 5); и

iv) С-концевой спейсерный пептид (в частности, спейсерный пептид с последовательностью SEQ ID NO: 6);

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

i) домен 1, содержащий

(1) субдомен (1A), который содержит VL-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD79b (VL_{CD79b}) (SEQ ID NO: 13); и

(2) субдомен (1B), который содержит VH-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD32B (VH_{CD32B}) (SEQ ID NO: 12);

при этом субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (в частности, пептидным линкером (линкером 2) с последовательностью SEQ ID NO: 4);

ii) домен 2, при этом домен 2 является К-спиральным доменом (SEQ ID NO: 8) или Е-спиральным доменом (SEQ ID NO: 7), при этом домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (в частности, пептидным линкером с последовательностью SEQ ID NO: 5) и при этом домен 3 первой полипептидной цепи и домен 2 второй полипептидной цепи не являются оба Е-спиральными доменами или оба К-спиральными доменами; и

С) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу домен 1, содержащий:

(1) субдомен (1A), который включает в себя содержащий цистеин пептид (в частности, пептидный линкер с последовательностью (пептида 1) SEQ ID NO: 1); и

(2) субдомен (1B), который содержит полипептидную часть Fc-домена IgG (наиболее предпочтительно, имеющий домены CH2 и CH3 Fc-участка иммуноглобулина IgG);

и при этом:

(a) полипептидные части Fc-доменов IgG первой и третьей полипептидных цепей формируют Fc-домен IgG;

(b) VL-домен первой полипептидной цепи и VH-домен второй полипептидной цепи формируют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом в CD32B; и

(c) VH-домен первой полипептидной цепи и VL-домен второй полипептидной цепи формируют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом в CD79b.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к биспецифическому моновалентному Fc-диателу, при этом биспецифическое моновалентное Fc-диатело способно специфически связываться с эпитопом в CD32B и с эпитопом в CD79b и имеет Fc-домен IgG, при этом биспецифическое моновалентное Fc-диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, при этом первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом,

и при этом:

A) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий:

(1) субдомен (1A), который включает в себя содержащий цистеин пептид (в частности, пептидный линкер с последовательностью (пептида 1) SEQ ID NO: 1); и

(2) субдомен (1B), который содержит полипептидную часть Fc-домена IgG (наиболее предпочтительно, имеющий домены CH2 и CH3 Fc-участка иммуноглобулина IgG);

ii) домен 2, содержащий

(1) субдомен (2A), который содержит VL-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD79b (VL_{CD79b}) (SEQ ID NO: 13); и

(2) субдомен (2B), который содержит VH-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD32B (VH_{CD32B}) (SEQ ID NO: 12);

при этом субдомены (2A) и (2B) отделены друг от друга пептидным линкером (в частности, пептидным линкером с последовательностью SEQ ID NO: 4);

iii) домен 3, при этом домен 3 является E-спиральным доменом (SEQ ID NO: 7) или K-спиральным доменом (SEQ ID NO: 8), при этом домен 3 отделен от домена 2 пептидом (в частности, пептидным линкером с последовательностью SEQ ID NO: 5); и

iv) C-концевой спейсерный пептид (в частности, спейсерный пептид с последовательностью SEQ ID NO: 6);

B) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу:

i) домен 1, содержащий:

(1) субдомен (1A), который содержит VL-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD32B (VL_{CD32B}) (SEQ ID NO: 11); и

(2) субдомен (1B), который содержит VH-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD79b (VH_{CD79b}) (SEQ ID NO: 14);

при этом субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (в частности, пептидным линкером с последовательностью SEQ ID NO: 4);

ii) домен 2, при этом домен 2 является K-спиральным доменом (SEQ ID NO: 8) или E-спиральным доменом (SEQ ID NO: 7), при этом домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (в частности, пептидным линкером с последовательностью SEQ ID NO: 5); и

при этом домен 3 первой полипептидной цепи и домен 2 второй полипептидной цепи не являются оба E-спиральными доменами или оба K-спиральными доменами; и

C) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу домен 1, содержащий:

(1) субдомен (1A), который включает в себя содержащий цистеин пептид (в частности, пептидный линкер с последовательностью (пептида 1) SEQ ID NO: 1); и

(2) субдомен (1B), который содержит полипептидную часть Fc-домена IgG (наиболее предпочтительно, имеющий домены CH2 и CH3 Fc-участка иммуноглобулина IgG); и

при этом

(a) полипептидные части Fc-доменов первой и третьей полипептидных цепей формируют Fc-участок IgG;

(b) VL-домен первой полипептидной цепи и VH-домен второй полипептидной цепи формируют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом в CD79b; и

(c) VH-домен первой полипептидной цепи и VL-домен второй полипептидной цепи формируют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом в CD32B.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к вариантам осуществления, все из которых преду-

смаатривают биспецифические моновалентные Fc-диатела, при этом домен 1 первой полипептидной цепи содержит последовательность, отличную от таковой домена 1 третьей полипептидной цепи.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к вариантам осуществления, все из которых предусматривают биспецифические моновалентные Fc-диатела, при этом указанный субдомен (1B) указанной первой полипептидной цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а указанный субдомен (1B) указанной третьей полипептидной цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к вариантам осуществления, все из которых предусматривают биспецифические моновалентные Fc-диатела, при этом указанный субдомен (1B) указанной первой полипептидной цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, а указанный субдомен (1B) указанной третьей полипептидной цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к вариантам осуществления, все из которых предусматривают биспецифические моновалентные Fc-диатела, при этом домен 1 первой полипептидной цепи и/или домен 1 третьей полипептидной цепи содержат вариантную последовательность CH2-CH3, которая проявляет измененное связывание с Fcγ-рецептором.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к вариантам осуществления, все из которых предусматривают биспецифические моновалентные Fc-диатела, при этом домен 3 первой полипептидной цепи содержит E-спираль (SEQ ID NO: 7), а домен 2 второй полипептидной цепи содержит K-спираль (SEQ ID NO: 8).

Настоящее изобретение, кроме того, относится к вариантам осуществления, все из которых предусматривают биспецифические моновалентные Fc-диатела, при этом домен 3 первой полипептидной цепи содержит K-спираль (SEQ ID NO: 8), а домен 2 второй полипептидной цепи содержит E-спираль (SEQ ID NO: 7).

Настоящее изобретение, кроме того, относится к биспецифическому моновалентному диателу, содержащему Fc иммуноглобулина IgG (биспецифическому моновалентному Fc-диателу), при этом биспецифическое моновалентное Fc-диатело содержит

(1) первую полипептидную цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15;
(2) вторую полипептидную цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и
(3) третью полипептидную цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, при этом аминокислотные остатки 1-10 указанной третьей полипептидной цепи представляют собой пептид 1 (SEQ ID NO: 1), а аминокислотные остатки 11-227 указанной третьей полипептидной цепи представляют собой домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела IgG (SEQ ID NO: 10);

при этом первая и вторая полипептидные цепи являются ковалентно связанными друг с другом первой дисульфидной связью и первая и третья полипептидные цепи являются ковалентно связанными друг с другом второй дисульфидной связью.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к фармацевтической композиции, содержащей какое-либо из вышеописанных биспецифических моновалентных Fc-диател и физиологически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению такой фармацевтической композиции в лечении воспалительного заболевания или состояния, особенно воспалительного заболевания или состояния, являющегося аутоиммунным заболеванием, и, в частности аутоиммунного заболевания, являющегося системной красной волчанкой (SLE).

Настоящее изобретение, кроме того, относится к применению такой фармацевтической композиции в лечении воспалительного заболевания или состояния, особенно воспалительного заболевания или состояния, являющегося заболеванием "трансплантат против хозяина" (GvHD).

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны три полипептидных цепи предпочтительного биспецифического моновалентного Fc-диатела и структура ковалентно связанных цепей;

на фиг. 2 показаны три полипептидных цепи альтернативного биспецифического моновалентного Fc-диатела и структура ковалентно связанных цепей;

на фиг. 3A-3B показана способность предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела и не являющегося Fc CD32B×CD79b (ABD) диатела ингибировать пролиферацию первичных В-клеток человека;

на фиг. 4A-4B показана способность предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела, не являющегося Fc CD32B×CD79b (ABD) диатела и не являющегося Fc CD32B×CD79b диатела ингибировать передачу сигнала в наивных В-клетках (фиг. 4A) и В-клетках памяти (фиг. 4B);

на фиг. 5A-5C показана способность предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела или не являющегося Fc CD32B×CD79b (ABD) диатела ингибировать пролиферацию клеток SLE. Было установлено, что такое ингибирование не зависит от статуса заболевания;

на фиг. 6A-6B показана способность предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела или не являющегося Fc CD32B×CD79b диатела модулировать В-клеточный ответ *in vivo*, а также продемонстрировано

неожиданное преимущество предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела;

на фиг. 7 показана способность предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела снижать ксеногенное GvHD у мыши.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат Fc-домен иммуноглобулина ("биспецифические моновалентные Fc-диатела"), состоят из трех полипептидных цепей и которые имеют по меньшей мере один сайт связывания, специфический для эпитопа CD32B, и один сайт связывания, специфический для эпитопа CD79b (т.е. "CD32B×CD79b Fc-диатело"). Биспецифические моновалентные Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением способны одновременно связываться с CD32B и CD79b. Настоящее изобретение относится к таким композициям, к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные Fc-диатела, и к способам их применения в лечении воспалительных заболеваний или состояний и, в частности, системной красной волчанки (SLE) и заболевания "трансплантат против хозяина".

Как указывается выше, CD79b экспрессируется В-клетками и, таким образом, экспрессируется в клетках, которые пролиферируют в ответ на распознавание антигена. Антитела, способные иммуноспецифически связываться с CD79b, способны связываться с такими В-клетками. CD32B представляет собой FcγR и экспрессируется в В-клетках. Антитела, способные иммуноспецифически связываться с FcγRIIB(CD32B), и, в частности, такие антитела, которые связываются с FcγRIIB без существенного влияния или затруднения связывания Fc, способны усиливать способность FcγRIIB совместного лигирования с активирующими рецепторами иммунных комплексов. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело, которое способно связываться как с CD32B, так и с CD79b, обладает способностью ингибировать или ослаблять иммунную систему хозяина в ответ на нежелательную активацию В-клеток, пролиферацию В-клеток и секрецию антител. Такие биспецифические моновалентные Fc-диатела, таким образом, применимы в лечении воспалительных заболеваний и нарушений.

I. Предпочтительные CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением

Предпочтительные CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением называются "Fc-диателами", поскольку они содержат Fc-домен. Как схематически показано на фиг. 1, такие Fc-диатела состоят из трех полипептидных цепей, из которых первая и вторая полипептидные цепи являются ковалентно связанными друг с другом, а также первая и третья полипептидные цепи являются связанными друг с другом. VL-домен первой полипептидной цепи взаимодействует с VH-доменом второй полипептидной цепи с формированием первого функционального сайта связывания антигена, который является специфическим для первого антигена (т.е. либо CD32B, либо CD79b). Подобным образом, VL-домен второй полипептидной цепи взаимодействует с VH-доменом первой полипептидной цепи с формированием второго функционального сайта связывания антигена, который является специфическим для второго антигена (т.е. либо CD79b, либо CD32B, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор VL- и VH-доменов первой и второй полипептидных цепей является координированным так, что две полипептидные цепи вместе содержат VL- и VH-домены, способные связываться с CD32B и CD79b (т.е. они содержат VL_{CD32B}/VH_{CD32B} и VL_{CD79b}/VH_{CD79b}) (фиг. 1). В совокупности каждый такой VL- и VH-домен и промежуточный линкер, который их отделяет, называют антигенсвязывающим доменом молекулы.

Fc-доменом Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может быть либо полный Fc-участок (например, полный Fc-участок IgG), либо только фрагмент полного Fc-участка. Хотя Fc-домен биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может обладать способностью связываться с одним или несколькими Fc-рецепторами (например, FcγR), более предпочтительно такой Fc-домен будет обуславливать пониженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого Fc-участком дикого типа) или будет существенно элиминировать способность такого Fc-домена связываться с таким рецептором(ами). Fc-домен биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может включать в себя частично или полностью домен CH2 и/или частично или полностью домен CH3 полного Fc-участка или может содержать вариантную последовательность CH2 и/или вариантную последовательность CH3 (которые могут включать в себя, например, одну или несколько вставок и/или одну или несколько делеций в отношении доменов CH2 или CH3 полного Fc-участка). Fc-домен биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может содержать не являющиеся Fc полипептидные части, или может содержать части не встречающихся в природе полных Fc-участков, или может содержать не встречающиеся в природе ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например, два домена CH2 или два домена CH3, или в направлении от N-конца к С-концу домен CH3, связанный с доменом CH2, и т.д.).

Первая полипептидная цепь предпочтительного CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела содержит (в направлении от N-конца к С-концу) аминоконец, содержащий цистеин пептид (пептид 1), Fc-домен IgG, предпочтительно, домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела и, наиболее предпочтительно, домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела, которые будут обуславливать пониженное связыва-

вание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого Fc-участком дикого типа), или будут существенно элиминировать способность такого Fc-домена связываться с таким рецептором(ами), первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), VL-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD32B, либо с CD79b (т.е. либо с VL_{CD32B}, либо с VL_{CD79b}), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), VH-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD79b (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{CD32B}), либо с CD32B (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{CD79b}), содержащий цистеин третий промежуточный спейсерный пептид (линкер 3), обеспечивающий гетеродимер домен, необязательный четвертый спейсерный пептид (линкер 4) для обеспечения улучшенной стабилизации обеспечивающего гетеродимер домена и С-конец (фиг. 1).

Вторая полипептидная цепь предпочтительного CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела содержит (в направлении от N-конца к С-концу): аминоконец, VL-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD79b, либо с CD32B (т.е. либо с VL_{CD79b}, либо с VL_{CD32B}, в зависимости от VL-домена, выбранного для первой полипептидной цепи диатела), промежуточный линкерный пептид (линкер 2), VH-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD32B (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{CD79b}), либо с CD32B (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{CD32B}), содержащий цистеин спейсерный пептид (линкер 3), обеспечивающий гетеродимер домен и С-конец (фиг. 1).

Третья полипептидная цепь предпочтительного CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела содержит (в направлении от N-конца к С-концу) аминоконец, содержащий цистеин пептид (пептид 1), Fc-домен IgG (предпочтительно, домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела) с тем же изотипом, что и Fc-домен первой полипептидной цепи и С-конец. Предпочтительно Fc-домен третьей полипептидной цепи будет обуславливать пониженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого Fc-участком дикого типа) или будет существенно элиминировать способность такого Fc-домена связываться с таким рецептором(ами) (фиг. 1).

Содержащий цистеин пептид (пептид 1) первой и третьей нитей может состоять из одной и той же аминокислотной последовательности или из разных аминокислотных последовательностей и будет содержать 1, 2, 3 или больше цистеиновых остатков. Особенно предпочтительный пептид 1 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 1): DKTHTCPPCP. Первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 2): APSSS и более предпочтительно имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 3): APSSSPME. Предпочтительный второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) имеет последовательность SEQ ID NO: 4: GGGSGGGG. Предпочтительный содержащий цистеин третий промежуточный спейсерный пептид (линкер 3) будет содержать 1, 2, 3 или больше цистеинов. Предпочтительный содержащий цистеин спейсерный пептид (линкер 3) имеет последовательность SEQ ID NO: 5: GGCGGG. Предпочтительный четвертый спейсерный пептид (линкер 4) имеет последовательность GGG или SEQ ID NO: 6: GGGNS.

Наиболее предпочтительно длину промежуточного линкерного пептида (линкера 2, который разделяет такие VL- и VH-домены) выбирают так, чтобы практически или полностью предотвратить связывание VL- и VH-доменов полипептидной цепи друг с другом. Таким образом, VL- и VH-домены первой полипептидной цепи практически или полностью не способны связываться друг с другом. Подобным образом, VL- и VH-домены второй полипептидной цепи практически или полностью не способны связываться друг с другом.

Обеспечивающие гетеродимер домены первого и второго полипептидов отличаются друг от друга и разрабатываются в соединении друг с другом так, чтобы обеспечивать соединение первой и второй полипептидных цепей. Таким образом, согласно предпочтительному варианту осуществления одна из этих полипептидных цепей будет сконструирована с содержанием обеспечивающего гетеродимер "Е-спирального" домена (SEQ ID NO: 7):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

остатки которого будут формировать отрицательный заряд при pH 7, тогда как другая из двух полипептидных цепей будет сконструирована с содержанием обеспечивающего гетеродимер "К-спирального" домена (SEQ ID NO: 8):

KVAALEKEKVAALEKEKVAALEKEKVAALEK

остатки которого будут формировать положительный заряд при pH 7. Присутствие таких заряженных доменов обеспечивает соединение первого и второго полипептидов и, таким образом, способствует гетеродимеризации. Несущественно, какая спираль предусматривается на какой цепи, поскольку спирали, используемые в первой и второй полипептидных цепях, отличаются так, чтобы обеспечивать гетеродимеризацию между такими цепями.

Как указывается выше, домены CH2 и CH3 первого и третьего полипептидов предпочтительно являются мутировавшими для снижения (относительно Fc-участка дикого типа) или элиминирования связывания с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b).

Такие мутации хорошо известны из уровня техники и включают в себя аминокислотные замены в положениях 234 и 235, замену в положении 265 или замену в положении 297 (см., например, патент США № 5624821, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Согласно предпочтительному варианту осуществления домены CH2 и CH3 включают в себя замену в положении 234 аланином и 235 аланином.

Домены CH2 и/или CH3 первого и третьего полипептидов не должны быть идентичными и преимущественно являются модифицированными для способствования образованию комплекса между двумя полипептидами. Например, аминокислотная замена (предпочтительно замена аминокислотой, содержащей объемную боковую группу, образующую "выступ", например, триптофан) может быть введена в домен CH2 или CH3 так, что стерическое взаимодействие будет препятствовать взаимодействию с подобным образом мутировавшим доменом и будет заставлять мутировавший домен спариваться с доменом, в котором была сконструирована комплементарная или аккомодирующая мутация, т.е. "впадина" (например, замена глицином). Такой набор мутаций может быть сконструирован в любой паре полипептидов, содержащих молекулу Fc-диатела, и, кроме того, сконструирован в любой части полипептидных цепей указанной пары. Способы конструирования белков для обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации, хорошо известны из уровня техники, в частности, что касается конструирования подобных иммуноглобулину молекул, и охватываются настоящим документом (см., например, Ridgway et al. (1996) "Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CHS Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35, и Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101; каждый из которых тем самым включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Предпочтительно "выступ" конструируют в доменах CH2-CH3 первой полипептидной цепи, а "впадину" конструируют в доменах CH2-CH3 третьей полипептидной цепи. Таким образом, "выступ" будет помогать в препятствовании первой полипептидной цепи гомодимеризоваться посредством своих доменов CH2 и/или CH3. Поскольку третья полипептидная цепь предпочтительно содержит замену "впадину", она будет гетеродимеризоваться с первой полипептидной цепью, а также гомодимеризоваться сама с собой. Предпочтительный выступ создают путем модификации нативного Fc-участка IgG с содержанием модификации T366W. Предпочтительную впадину путем модификации нативного Fc-участка IgG с содержанием модификации T366S, L368A и Y407V. Для обеспечения отделения гомодимера третьей полипептидной цепи от финального биспецифического моновалентного Fc-диатела, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, в сайт связывания для белка А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно вводят мутацию путем аминокислотной замены в положении 435 (H435R). Для обеспечения отделения гомодимера третьей полипептидной цепи от финального биспецифического моновалентного Fc-диатела, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, в сайт связывания для белка А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно вводят мутацию путем аминокислотной замены. Таким образом, гомодимер третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком А, тогда как биспецифическое моновалентное Fc-диатело сохранит свою способность связываться с белком посредством сайта связывания для белка А на первой полипептидной цепи.

Предпочтительной последовательностью для доменов CH2 и CH3 Fc-участка антитела, присутствующей в первой полипептидной цепи, является (SEQ ID NO: 9)

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

Предпочтительной последовательностью для доменов CH2 и CH3 Fc-участка антитела, присутствующей в третьей полипептидной цепи, является (SEQ ID NO: 10)

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

Предпочтительной последовательностью для VL-домена антитела, которое связывает CD32B (VL_{CD32B}), является (SEQ ID NO: 11)

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA
ASTLDGVPVS RFGSGESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
GTKVEIK
```

Предпочтительной последовательностью для VH-домена антитела, которое связывает CD32B (VH_{CD32B}), является (SEQ ID NO: 12)

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE
 IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLQMNLSRA EDTAVYYCGA
 LGLDYWGQGT LTVVSS

Предпочтительной последовательностью для VL-домена антитела, которое связывает CD79b (VL_{CD79b}), является (SEQ ID NO: 13):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLWV FQQRPGQSPN
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
 LTFGGGKLE IK

Предпочтительной последовательностью для VH-домена антитела, которое связывает CD79b (VH_{CD79b}), является (SEQ ID NO: 14):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
 IDPSDSETHY NQKFKDRVMT TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM
 GYWGQGT T VSS

Таким образом, предпочтительная последовательность для первой полипептидной цепи имеет следующую структуру в направлении от N-конца к C-концу: пептид 1, домен CH2-CH3 Fc-участка IgG, линкер 1, VL-домен антитела, которое связывает CD32B (VL_{CD32B}), линкер 2, VH-домен антитела, которое связывает CD79b (VH_{CD79b}), линкер 3, E-спиральный домен, линкер 4 и C-конец. Аминокислотной последовательностью такого предпочтительного полипептида является (SEQ ID NO: 15)

DKTHTCPPCP APEAAGGSPV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPSSREEMTK NQVSLWCLVK
 GFYPDSIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT QSPSSLSASV
 GDRVITTCRA SQEISGYLSW LQKPKGKAPR RLIYAASTLD SGVPSRFSGS
 ESGTEFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQYFSYP LTFGGGKVE IKGGGSGGGG
 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
 IDPSDSETHY NQKFKDRVMT TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM
 GYWGQGT T VSSGGCGGGE VAALEKEVAA LEKEVALEK EVAALEKGGG
 NS

В SEQ ID NO: 15 аминокислотные остатки 1-10 представляют собой пептид 1 (SEQ ID NO: 1), аминокислотные остатки 11-227 представляют собой домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела IgG (SEQ ID NO: 9), аминокислотные остатки 228-235 представляют собой линкер 1 (SEQ ID NO: 3), аминокислотные остатки 236-342 представляют собой VL-домен антитела, которое связывает CD32B (VL_{CD32B}) (SEQ ID NO: 11), аминокислотные остатки 343-350 представляют собой линкер 2 (SEQ ID NO: 4), аминокислотные остатки 351-463 представляют собой VH-домен антитела, которое связывает CD79b (VH_{CD79b}) (SEQ ID NO: 14), аминокислотные остатки 464-469 представляют собой линкер 3 (SEQ ID NO: 5), аминокислотные остатки 470-497 представляют собой обеспечивающий гетеродимер E-спиральный домен (SEQ ID NO: 7), а аминокислотные остатки 498-502 представляют собой линкер 4 (SEQ ID NO: 6).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь, имеет последовательность (SEQ ID NO: 23)

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcactgaagccgccccggggaccgtcagtc
 ttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcaca
 tgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgccccgaggagcagtagacaacagcagtcac
 cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtagaag
 tgcgaaggtctccaaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaa
 gggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccccgggaggagatgaccaag
 aaccaggtcagcctgtggtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
 gacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 aacgtcttctcatgctcctgtagcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagc
 ctctccctgtctccgggtaaagcccttccagctccctatggaagacatccagatgacc
 cagctctccatcctccttatctgcctctgtgggagatagagtcaccatcacttctcgggca
 agtcaggaaaattagtggttacttaagctggctgcagcagaaaccaggcaaggccctaga
 cgcctgatctacgcgcgcatccactttagattctggtgtcccatccaggttcagtggcagt
 gagtctgggaccgagttcaccctcaccatcagcagccttcagcctgaagattttgcaacc
 tattactgtctacaatatatttagttatccgctcacgttcggaggggggaccaaggtggaa
 ataaaaggaggcgatccggcgccgagggccaggttcagctggtgagctctggagctgag
 gtgaagaagcctggcgctcagtgaaaggtctcctgcaaggctctggttacaccttacc
 agctactggatgaactgggtgcgacaggccccctggacaagggtctgagtggtcggaatg
 attgatccttcagacagtgaaactcactacaatcaaaagttcaaggacagagtcaccatg
 accacagacacatccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgac
 acggccgtgtattactgtcgagagctatgggtactgggggcaagggaccacgggtcacc
 gtctcctccggaggtatgtggcggtggagaagtggccgactggagaaagaggttgctgct
 ttggagaaggaggtcgctgcacttgaaaaggaggtcgagccctggagaaaggcgccggg
 aactct

Предпочтительной последовательностью для второй полипептидной цепи является (SEQ ID NO: 16)

DVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLW FQQRPGQSPN
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
 LTFGGGTTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
 DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAHNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS
 LYLQMNLSLRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LTVSSGGCG GSKVAALKEK
 VAALKEKVA LKEKVAALKE

В SEQ ID NO: 16 аминокислотные остатки 1-112 представляют собой VL-домен антитела, которое связывает CD79b (VL_{CD79b}) (SEQ ID NO: 13), аминокислотные остатки 113-120 представляют собой линкер 2 (SEQ ID NO: 4), аминокислотные остатки 121-236 представляют собой VH-домен антитела, которое связывает CD32B (VH_{CD32B}) (SEQ ID NO: 12), аминокислотные остатки 237-242 представляют собой линкер 3 (SEQ ID NO: 5), а аминокислотные остатки 243-270 представляют собой обеспечивающий гетеродимер К-спиральный домен (SEQ ID NO: 8).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь, имеет последовательность (SEQ ID NO: 24)

gatgttgatgactcagtcctccactctccctgcccgtcacccttgacagccggcctcc
 atctcctgcaagtcagtcagagcctcttagatagtgatggaaagacatatgttgatgg
 tttcagcagagggcagcccaatctccaaaccgcctaatttatctggtgtctaaactggac
 tctggggtcccagacagattcagcggcagtggtcaggcactgatttcacactgaaaatc
 agcaggggtggaggctgaggatgttggtgtttattactgctggcaaggtacacattttccg
 ctacagttcggcggagggaagccttgagatcaaaggagcggtccggcggcgaggc
 gaagtgcagcttgtagtctgaggagccttggtgcaacctggaggatccctgagactc
 tcttggtgccgctctgattcacttttagtgacgcctggatggactgggtccgctcaggcc
 ccaggcaagggccttgagtgggtgtgctgaaattagaaacaaagctaaaaatcatgcaaca
 tactatgctgagtcgtgataggaggttcaccatctcaagagatgacgcaaaaacagtc
 ctgtacctgcaaatgaacagcttaagagctgaagacactgccgtgtattactgtgggct
 ctgggccttgactactggggccaaggcaccctggtgacctctcctccggaggatgtggc
 ggtgaaaagtgccgcactgaaggagaaggtgctgctttgaaagagaaggtcgccgca
 cttaaggaaaaggtcgacgcctgaaagag

Предпочтительной последовательностью для третьей полипептидной цепи является SEQ ID NO: 17

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

В SEQ ID NO: 17 аминокислотные остатки 1-10 представляют собой пептид 1 (SEQ ID NO: 1), а аминокислотные остатки 11-227 представляют собой домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела IgG (SEQ ID NO: 10).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует третью полипептидную цепь, имеет последовательность (SEQ ID NO: 25)

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcgggggaccgtcagtc
 ttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcaca
 tgcgtggtggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcagtcac
 cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag
 tgcaaggtctccaacaaagccctcccaagccccatcgagaaaaccatctccaaagcaaa
 gggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgaggagatgaccaag
 aaccaggtcagcctgagttgcgcagtcgaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctgactcc
 gacggctccttctctctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgtacacgcagaagagc
 ctctccctgtctccgggtaaa

Как раскрывается в РСТ публикации № WO 2012/018687, для улучшения *sh vivo* фармакокинетических свойств молекул диатела молекулы могут быть модифицированы включением полипептидной части сывороточного связывающего белка на одном или нескольких концах молекула диатела. Наиболее предпочтительно, такая полипептидная часть сывороточного связывающего белка будет расположена на С-конце молекулы диатела. Особенно предпочтительной полипептидной частью сывороточного связывающего белка для этой цели является альбумин-связывающий домен (ABD) из стрептококкового белка G. Альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G Streptococcus штамма G148 является особенно предпочтительным.

Альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G Streptococcus штамма G148 состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильный трехспиральный узел, и обладает широкой альбумин-связывающей специфичностью (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules" J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Альбумин является наиболее распространенным белком в плазме и характеризуется периодом полувыведения у человека 19 дней. Альбумин содержит несколько низкомолекулярных сайтов связывания, которые позволяют ему некова-

лентно связываться с другими белками, и, тем самым, продлевает их периоды полувыведения из сыровотки крови. Предпочтительно короткий линкер (линкер 5) (такой как GGGS (SEQ ID NO: 18) или GGGNS (SEQ ID NO: 6)) используют для отделения E-спирали (или K-спирали) такой полипептидной цепи от альбумин-связывающего домена. Предпочтительный альбумин-связывающий домен (ABD) имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 19)

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALID EILAALP

II. Альтернативные CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением

Альтернативная молекула CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением схематически показана на фиг. 2. Такие альтернативные молекулы CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела содержат три полипептидные цепи, из которых первая и вторая полипептидные цепи являются ковалентно связанными друг с другом, и первая и третья полипептидные цепи являются связанными друг с другом. Альтернативные молекулы CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела отличаются порядком своих доменов от порядка в предпочтительных молекулах CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела. Однако, как и в случае предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела, VL-домен первой полипептидной цепи альтернативного CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела взаимодействует с VH-доменом второй полипептидной цепи альтернативного CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела с формированием первого функционального сайта связывания антигена, который является специфическим для первого антигена (т.е. либо CD32B, либо CD79b). Подобным образом, VL-домен второй полипептидной цепи альтернативного CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела взаимодействует с VH-доменом первой полипептидной цепи альтернативного CD32B×CD79b биспецифического моновалентного Fc-диатела с формированием второго функционального сайта связывания антигена, который является специфическим для второго антигена (т.е. либо CD79b, либо CD32B, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, отбор VL- и VH-доменов первой и второй полипептидных цепей является координированным так, что две полипептидные цепи вместе содержат VL- и VH-домены, способные связываться с CD32B и CD79b (т.е., они содержат VL_{CD32B}/VH_{CD32B} и VL_{CD79b}/VH_{CD79b}) (фиг. 2). В совокупности, каждый такой VL- и VH-домен, и промежуточный линкер, который их отделяет, называют антигенсвязывающим доменом молекулы.

Первая полипептидная цепь такого альтернативного CD32B×CD79b Fc-диатела содержит в направлении от N-конца к C-концу аминоконец, VL-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD32B, либо с CD79b (т.е. либо VL_{CD32B}, либо VL_{CD79b}), промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), VH-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD79b (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{CD32B}), либо с CD32B (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{CD79b}), содержащий цистеин третий промежуточный спейсерный пептид (линкер 3), обеспечивающий гетеродимер домен, необязательный четвертый спейсерный пептид (линкер 4) для обеспечения улучшенной стабилизации обеспечивающего гетеродимер домена (предпочтительно E-спирального домена), содержащий цистеин пептид (пептид 1), Fc-домен IgG (предпочтительно, домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела) и C-конец. Предпочтительно, Fc-домен первой полипептидной цепи будет обуславливать пониженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого Fc-участком дикого типа) или будет существенно элиминировать способность такого Fc-домена связываться с таким рецептором(ами) (фиг. 2).

Вторая полипептидная цепь каждого альтернативного CD32B×CD79b Fc-диатела содержит в направлении от N-конца к C-концу аминоконец, VL-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD79b, либо с CD32B (т.е. либо VL_{CD79b}, либо VL_{CD32B}, в зависимости от VL-домена, выбранного для первой полипептидной цепи диатела), промежуточный линкерный пептид (линкер 2), VH-домен моноклонального антитела, способный связываться либо с CD32B (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{CD79b}), либо с CD32B (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{CD32B}), содержащий цистеин спейсерный пептид (линкер 3), обеспечивающий гетеродимер домен (предпочтительно K-спиральный домен) и C-конец (фиг. 2).

Третья полипептидная цепь предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела содержит в направлении от N-конца к C-концу аминоконец, содержащий цистеин пептид (пептид 1), Fc-домен IgG (предпочтительно, домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела) с тем же изотипом, что и Fc-домен первой полипептидной цепи, и C-конец. Предпочтительно Fc-домен третьей полипептидной цепи будет обуславливать пониженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого Fc-участком дикого типа) или будет существенно элиминировать способность такого Fc-домена связываться с таким рецептором(ами) (фиг. 2).

III. Фармацевтические композиции

Композиции в соответствии с настоящим изобретением включают в себя нерасфасованные композиции лекарственных средств, применимые в изготовлении фармацевтических композиций (например, неочищенные или нестерильные композиции), и фармацевтические композиции (т.е. композиции, которые являются приемлемыми для введения субъекту или больному), которые могут быть использованы в

получении единичных дозированных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением и, в частности, любое из CD32B×CD79b Fc-диател, раскрытых в настоящем документе, или комбинацию таких средств и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одной или нескольких молекул в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие CD32B×CD79b Fc-диатела и второе терапевтическое антитело (например, специфическое к антигену аутоиммунного или воспалительного заболевания моноклональное антитело), которое является специфическим по отношению к антигену конкретного аутоиммунного или воспалительного заболевания, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно конкретному варианту осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или в другой общеизвестной фармакопее для применения для животных и, более конкретно, для людей. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательному средству или носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, в том числе масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Приемлемые фармацевтические вспомогательные средства включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерина моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, при необходимости, также может содержать незначительные количества увлажняющих или эмульгирующих средств или буферных средств для регулирования pH. Эти композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов замедленного высвобождения и т.п.

Как правило, ингредиенты композиций в соответствии с настоящим изобретением обеспечиваются либо по отдельности, либо смешанными вместе в единичную дозированную форму, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закупоренном контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если композиция подлежит введению инфузией, она может быть налита в инфузионный флакон, содержащий стерильные фармацевтической чистоты воду или солевой раствор. Если композицию вводят инъекцией, может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекции или солевого раствора для того, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут быть составлены как нейтральные или солевые формы. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя без ограничения образованные с анионами, такими как анионы, полученные из хлористоводородной, фосфорной, уксусной, щавелевой, виннокаменной кислот и т.д., а также образованные с катионами, такими как катионы, полученные из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция, железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим упаковке или набору, содержащим один или несколько контейнеров, заполненных такими раскрытыми CD32B×CD79b Fc-диателами отдельно или с таким фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, применимых для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтическую упаковку или набор. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим упаковке или набору, содержащим один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Необязательно к такому контейнеру(а) может быть присоединено уведомление в форме, предписанной правительственным органом, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, при этом уведомление показывает одобрение органом изготовления, применения или продажи для введения людям.

Настоящее изобретение относится к наборам, которые могут быть использованы в вышеприведенных способах. Согласно одному варианту осуществления набор содержит одну или несколько молекул в соответствии с настоящим изобретением. Согласно другому варианту осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, применимых для лечения аутоиммунных или воспалительных заболеваний, в одном или нескольких контейнерах. Согласно другому варианту осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько антител, которые связывают один или несколько антигенов аутоиммунного или воспалительного заболевания,

ассоциированных с аутоиммунным или воспалительным заболеванием. Согласно некоторым вариантам осуществления другим профилактическим или терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство. Согласно другим вариантам осуществления профилактическим или терапевтическим средством является биологическое или гормональное терапевтическое средство.

IV. Применения композиций в соответствии с настоящим изобретением

CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением обладают способностью лечить любое заболевание или состояние, ассоциированное с экспрессией CD79b или характеризующее таковой, или имеющее В-клеточный компонент заболевания. Таким образом, без ограничения фармацевтические композиции, содержащие такие молекулы, могут быть использованы в диагностике или лечении аутоиммунных или воспалительных заболеваний или состояний.

Таким образом, настоящее изобретение может быть использовано для лечения, предупреждения, замедления развития и/или облегчения симптомом опосредованных В-клетками заболеваний или нарушений, в том числе отторжения трансплантата, заболевания "трансплантат против хозяина" (GvHD) и системной красной волчанки (SLE).

V. Способы введения

Композиций в соответствии с настоящим изобретением могут быть обеспечены для лечения, профилактики и облегчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением. В предпочтительном аспекте такие композиции являются практически чистыми (т.е. практически не содержат веществ, которые ограничивают их эффект или приводят к нежелательным побочным эффектам). Согласно конкретному варианту осуществления субъектом является животное, предпочтительно млекопитающее, такое как не являющееся приматом (например, крупный рогатый скот, лошадиные, кошачьи, собачьи, грызуны и т.д.) или примат (например, обезьяны, такие как яванский макак, человек и т.д.). Согласно предпочтительному варианту осуществления субъектом является человек.

Известны и могут быть применены для введения композиций в соответствии с настоящим изобретением различные системы доставки, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или слитый белок, опосредованный рецепторами эндцитоз (см., например, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструкция нуклеиновой кислоты как части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения биспецифического моновалентного Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением включают в себя без ограничения парентеральное введение (например, внутридермальное, внутримышечное, внутривентральное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозальное (например, интраназальным и пероральным путями). Согласно конкретному варианту осуществления молекулы в соответствии с настоящим изобретением вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции могут быть введены любым удобным путем, например, инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую ротовой полости, ректальную и кишечную слизистую и т.д.), а также могут быть введены вместе с другими биологическими активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, также может быть использовано легочное введение, например, путем применения ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным средством. См., например, патенты США №№ 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540 и 4880078; а также PCT публикации №№ WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение также относится к CD32B×CD79b Fc-диателам в соответствии с настоящим изобретением, упакованным в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества таких молекул. Согласно одному варианту осуществления CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением обеспечиваются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере и могут быть восстановлены, например, водой или солевым раствором, до соответствующей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно, CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере с единичной дозировкой по меньшей мере 5 мкг, более предпочтительно, по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 15 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 100 мкг или по меньшей мере 200 мкг.

Лиофилизированные CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением следует хранить при 2-8°C в их оригинальном контейнере и молекулы следует вводить за 12 ч, предпочтительно за 6 ч, за 5 ч, за 3 ч или за 1 ч после восстановления. Согласно альтернативному варианту осуществления CD32B×CD79b Fc-диатела в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают в жидкой форме в герметично закрытом контейнере с указанием количества и концентрации молекула, слитого белка или

конъюгированной молекулы. Предпочтительно, жидкую форму CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают в герметично закрытом контейнере, в котором молекулы находятся в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл, более предпочтительно, по меньшей мере 2,5 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или по меньшей мере 100 мкг/мл.

Количество CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением, которое будет эффективным в лечении, предупреждении или облегчении одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением, может быть определено стандартными клиническими методиками. Точная доза, подлежащая применению в составлении, также будет зависеть от пути введения и тяжести состояния, а также будет определяться в соответствии с оценкой лечащего врача и обстоятельствами каждого больного. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых "доза-ответ", полученных с помощью тестовых систем *in vitro* или животных моделей.

Для CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением вводимая больному дозировка, как правило, составляет по меньшей мере приблизительно 0,01 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,05 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 20 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 30 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 75 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 100 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 125 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 150 мг/кг массы тела субъекта или больше.

Дозировка и частота введения биспецифических моновалентных Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением могут быть снижены или изменены путем улучшения поглощения и проницаемости через ткань биспецифических моновалентных Fc-диател с помощью модификаций, таких как, например, липидизация.

Согласно одному варианту осуществления дозировка CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением, вводимых больному, может быть рассчитана для применения в качестве единственного средства терапии. Согласно другому варианту осуществления биспецифические моновалентные Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением применяют в комбинации с другими терапевтическими композициями, и дозировка, вводимая больному, ниже, чем при применении таких молекул биспецифических моновалентных Fc-диател в качестве единственного средства терапии.

Согласно конкретному варианту осуществления может быть желательным введение фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением локально на участок, требующий лечения; это может быть достигнуто, например, без ограничения местной инфузией, инъекцией или посредством имплантата, при этом указанный имплантат является пористым, непористым или желатиновым материалом, в том числе мембранами, такими как силиконовые мембраны, или волокнами. Предпочтительно, при введении молекулы в соответствии с настоящим изобретением, следует соблюдать осторожность в применении материалов, в которых молекула не абсорбируется.

Согласно другому варианту осуществления композиции могут быть доставлены в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; см. тот же источник).

Согласно следующему варианту осуществления композиции могут быть доставлены в системе контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения. Любая методика, известная специалисту в данной области, может быть применена для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одну или несколько молекул в соответствии с настоящим изобретением. См., например, патент США № 4526938; PCT публикацию № WO 91/05548; PCT публикацию № WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854 и Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно одному варианту осуществления может быть применен насос в системе контролируемого высвобождения (см. Langer, *supra*; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," *Surgery* 88:507-516 and Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," *N. Engl. J. Med.*

321:574-579). Согласно другому варианту осуществления полимерные материалы могут быть применены для достижения контролируемого высвобождения антител (см., например, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," *Science* 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," *Ann. Neurol.* 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," *J. Neurosurg.* 7(1):105-112); патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; РСТ публикацию № WO 99/15154 и РСТ публикацию № WO 99/20253). Примеры полимеров, применимых в составах замедленного высвобождения, включают в себя, без ограничения поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), сополимер этилена и винилацетата, поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимер лактида и гликолида (PLGA) и сложные полиортоэфиры. Согласно следующему варианту осуществления система контролируемого высвобождения может быть помещена в непосредственной близости к терапевтической цели (например, в легкие), таким образом, требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Согласно другому варианту осуществления полимерные композиции, применимые в качестве имплантатов контролируемого высвобождения, используют согласно Dunn et al. (см., патент США № 5945155). Этот конкретный способ основывается на терапевтическом эффекте *in situ* контролируемого высвобождения биоактивного материала из полимерной системы. Имплантацию, как правило, осуществлять где-либо в организме больного при необходимости терапевтического лечения. Согласно другому варианту осуществления применяют неполимерную систему замедленной доставки, при этом в качестве системы доставки лекарственного средства в организм субъекта применяют не являющийся полимерным имплантат. При имплантации в организм органический растворитель имплантата будет вымываться, распространяться или просачиваться из композиции в окружающую тканевую жидкость, а не являющийся полимерным материал будет постепенно коагулироваться или осаждаться с образованием твердой, микропористой матрицы (см. патент США № 5888533).

Системы контролируемого высвобождения раскрываются в обзоре Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," *Science* 249: 1527-1533). Любая методика, известная специалисту в данной области, может быть использована для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одно или несколько терапевтических средств в соответствии с настоящим изобретением. См., например, патент США № 4526938; публикации международных заявок №№ WO 91/05548 и WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50: 372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Согласно конкретному варианту осуществления, если композиция в соответствии с настоящим изобретением представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое моновалентное Fc-диателло в соответствии с настоящим изобретением, то нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo* для обеспечения экспрессии кодируемого ею биспецифического моновалентного Fc-диателла путем конструирования ее как части соответствующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введения его так, что он становится межклеточным, например, путем применения ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем непосредственной инъекции, или путем применения бомбардировки микрочастицами (например, генной пушкой, Biolistic, Dupont), или покрытием липидами, или рецепторами клеточной поверхности, или трансфицирующими средствами, или путем приведения его в соединение с гомеобекс-подобным пептидом, который, как известно, входит в ядро (см., например, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88: 1864-1868) и т.д. В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота может быть введена межклеточно и включена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением может включать в себя один курс лечения или, предпочтительно, может включать в себя серию курсов лечения. Согласно предпочтительному примеру субъекта лечат молекулами в соответствии с настоящим изобретением один раз в неделю в течение от приблизительно 1 до 10 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно от приблизительно 3 до 7 недель и еще более предпочтительно в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением вводят один раз в сутки, два раза в сутки или три раза в сутки. Согласно другим вариантам осуществ-

ствления фармацевтические композиции вводят один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз в месяц, один раз каждые шесть недель, один раз каждые два месяца, два раза в год или один раз в год. Также следует понимать, что эффективная дозировка молекул, применяемая для лечения, может повышаться или снижаться в ходе курса конкретного лечения.

Описываемое в целом настоящее изобретение будет легче понять с помощью ссылки на следующие примеры, которые приведены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если не указано иное.

Пример 1. Конструкция CD32B×CD79b биспецифических моновалентных Fc-диател и контрольных диател

В табл. 1 представлен перечень последовательностей полипептидных цепей предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела, которое экспрессировали и очищали. Кроме того, получали два контрольных диатела: одно биспецифическое моновалентное для CD32B и FITC, а второе биспецифическое моновалентное для CD79b и FITC.

Таблица 1	
Предпочтительное CD32B x CD79b биспецифическое Fc-диатело	Замещенные полипептиды (в направлении от N-конца к С-концу)
Первая полипептидная цепь (SEQ ID NO: 15)	SEQ ID NO: 1
	SEQ ID NO: 9
	SEQ ID NO: 3
	SEQ ID NO: 11
	SEQ ID NO: 4
	SEQ ID NO: 14
	SEQ ID NO: 5
	SEQ ID NO: 7
	SEQ ID NO: 6
Вторая полипептидная цепь (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 13
	SEQ ID NO: 4
	SEQ ID NO: 12
	SEQ ID NO: 5
Третья полипептидная цепь (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 8
	SEQ ID NO: 1
	SEQ ID NO: 10

Вышеописанное CD32B×CD79b Fc-диатело, как выяснили, способно одновременно связываться с CD32B и с CD79b. Контрольное CD32B×FITC диатело, как выяснили, способно одновременно связываться с CD32B и с FITC. Контрольное CD79b×FITC диатело, как выяснили, способно одновременно связываться с CD79b и с FITC. CD32B×CD79b Fc-диатело является гетеротримером, состоящим из трех полипептидных цепей (по одной цепи каждой приведенной аминокислотной последовательности). Способы формирования биспецифических моновалентных диател представлены в РСТ публикациях №№ WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 и WO 2012/162067.

Для дальнейшей демонстрации преимуществ такого предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела также получали два не являющиеся Fc-содержащими CD32B×CD79b диатела. Каждое из этих диател состоит из двух полипептидных цепей, и они отличаются тем, что одно из диател (CD32B×CD79b (ABD) диатело) содержит альбумин-связывающий домен, тогда как другое (CD32B×CD79b диатело) не содержит таковой.

CD32B×CD79b (ABD) диатело

CD32B×CD79b (ABD) диатело формируется из первой полипептидной цепи, которая содержит в направлении от N-конца к С-концу VL-домен антитела, который связывает CD32B (VL_{CD32B}), линкер 2, VH-домен антитела, который связывает CD79b (VH_{CD79b}), линкер 3, E-спиральный домен, линкер 5, альбумин-связывающий домен и С-конец. Вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу VL-домен антитела, который связывает CD79b (VL_{CD79b}), линкер 2, VH-домен антитела, который связывает CD32B (VH_{CD32B}), линкер 3, К-спиральный домен и С-конец. Аминокислотные последовательности таких полипептидов являются следующими:

аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи (SEQ ID NO: 20)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQKPK GKAPRRLIYA
ASTLD SGVPS RFSGESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
GTRKVEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVCKAS GYTFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVMTTDTDS TSTAYMELRS
LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAAL KEVAALKEV
AALEKEVAAL EKGGSGLAEA KVLANRELDK YGVSDYYKNL IDNAKSAEGV
KALIDEILAA LP

аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи (SEQ ID NO: 21):

DVVMTQSPSLP LPVTLGQPAS ISCKSSQSLD DSDGKTYLW FQQRPGQSPN
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
 LTFGGGKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
 DAWMDWVRQA PGKGLEWVAE IRNKAHNAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS
 LYLQMNLSRA EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSSGGCG GSKVAALKEK
 VAALKEKVAA LKEKVAALKE

CD32B×CD79b диатело

CD32B×CD79b диатело отличается от CD32B×CD79b (ABD) диатела тем, что не содержит альбумин-связывающий домен. Таким образом, такое диатело формируется из первой полипептидной цепи, которая содержит в направлении от N-конца к C-концу VL-домен антитела, который связывает CD32B (VL_{CD32B}), линкер 2, VH-домен антитела, который связывает CD79b (VH_{CD79b}), линкер 3, E-спиральный домен и C-конец. Вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу VL-домен антитела, который связывает CD79b (VL_{CD79b}), линкер 2, VH-домен антитела, который связывает CD32B (VH_{CD32B}), линкер 3, K-спиральный домен и C-конец. Аминокислотная последовательность такой первой полипептидной цепи этого диатела представляет собой (SEQ ID NO: 22):

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQEIS GYLSWLQQKP GKAPRRLIYA
 ASTLDSGVPS RFGSGESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ YFSYPLTFGG
 GTKVEIKGGG SGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSKCAS GTFTSYWMN
 WVRQAPGQGL EWIGMIDPSD SETHYNQKFK DRVMTTDTTS TSTAYMELRS
 LRSDDTAVYY CARAMGYWGQ GTTVTVSSGG CGGGEVAAL KEVAALKEK
 AALEKEVAAL EK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи этого диатела представляет собой SEQ ID NO: 21, которая представлена выше.

Пример 2. CD32B×CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела ингибируют пролиферацию первичных В-клеток человека

Для дальнейшей демонстрации способности CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением ослаблять или подавлять иммунную систему вышеописанное предпочтительное CD32B×CD79b Fc-диатело инкубировали в присутствии первичных В-клеток человека, полученных от двух доноров. Пролиферацию наблюдали с помощью поглощения H-TdR через 48 ч в присутствии козьих антител против F(ab)₂ μ Fc IgM человека (5 мкг/мл) и различных концентраций либо CD32B×CD79b Fc-диатела, либо CD32B×CD79b ABD диатела. Результаты показаны на фиг. 3А (донор 1) и на фиг. 3В (донор 2) и указывают на заметное снижение пролиферации В-клеток в присутствии CD32B×CD79b Fc-диатела или CD32B×CD79b (ABD) диатела.

Пример 3. CD32B×CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела ингибируют передачу сигнала в наивных В-клетках и В-клетках памяти

Для дальнейшей демонстрации способности CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением ослаблять или ингибировать передачу сигнала иммунной системы В-клетками очищенные наивные В-клетки и В-клетки памяти инкубировали в течение 30 мин в присутствии козьих антител против μ Fc IgM человека (антител против μ) (30 мкг/мл) отдельно или дополнительно в присутствии вышеописанного предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела. Как видно на фиг. 4А (наивные В-клетки) и на фиг. 4В (В-клетки памяти), присутствие каждого из предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела, CD32B×CD79b (ABD) диатела или CD32B×CD79b диатела заметно снижало передачу сигнала В-клетками.

Пример 4. CD32B×CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела ингибируют пролиферацию В-клеток больного SLE

Для дальнейшей демонстрации способности CD32B×CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением ослаблять или ингибировать передачу сигнала иммунной системы В-клетками В-клетки больного, страдающего системной красной волчанкой (SLE), инкубировали в присутствии козьих антител против μ Fc IgM человека (антител против μ) отдельно или дополнительно в присутствии вышеописанного предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела. Пролиферацию наблюдали с помощью поглощения H-TdR.

Как показано на фиг. 5А, вышеописанное предпочтительное CD32B×CD79b Fc-диатело, как выяснили, способно связываться как с CD32B, так и с CD79b. На фиг. 5В продемонстрировано, что предоставление козьих антител против IgM человека (антител против μ GAH) вызывало усиление пролиферации В-клеток относительно контроля, и что дополнительное введение вышеописанного предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела или CD32B×CD79b (ABD) диатела заметно ингибировало степень такой пролиферации.

Способность вышеописанного предпочтительного CD32B×CD79b Fc-диатела или CD32B×CD79b (ABD) диатела снижать степень пролиферации В-клеток индивидуумов, страдающих от SLE, как выяснили, не зависит от статуса заболевания. Степень снижения пролиферации В-клеток у больных активной или неактивной SLE составляла приблизительно 40% относительно пролиферации, наблюдаемой в при-

сутствии только козьих антител против IgM человека (антител против μ GAH), и, таким образом, не зависела от статуса заболевания (фиг. 5C). На фиг. 5C, кроме того, продемонстрировано, что предпочтительное CD32B $\times$ CD79b Fc-диатело обеспечивало более сильное ингибирование, чем CD32B $\times$ CD79b (ABD) диатело.

Пример 5. CD32B $\times$ CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела модулируют В-клеточные ответы *in vivo*

Для дальнейшей демонстрации способности CD32B $\times$ CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением ослаблять или ингибировать передачу сигнала иммунной системы В-клетками PBMC человека инъецировали иммунодефицитным мышам NSG (Agliao, A. et al. (2008) "Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rgamma Null Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains," *Int. J. Cancer* 123(9):2222-2227; Sanchez, P.V. et al. (2009) "A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia" *Leukemia* 23(11):2109-2117; Racki, W.J. et al. (2010) "NOD-Scid IL2rgamma(Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection" *Transplantation* 89(5): 527-536; Choi, B. et al. (2011) "Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2Ry(Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan," *J. Clin. Immunol.* 31(2):253-264; Sartelet, H. et al. (2012) "Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/IL2rg Null (NSG) Mice" *In Vivo* 26(1):19-29; Spranger, S. et al. (2012) "NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies *in vivo*" *J. Transl. Med.* 10:30; von Bonin, M. et al. (2013) "in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice" *PLoS One.* 8(4):e60680). Животным вводили носитель в качестве контроля (100 мкл фосфатно-буферного солевого раствора (PBS)/животное, q3d $\times$ 2 недели), вышеописанное предпочтительное CD32B $\times$ CD79b Fc-диатело (100 мкл/животное, q3d $\times$ 2 недели) или CD32B $\times$ CD79b диатело (состоящее только из двух полипептидных нитей и содержащее альбумин-связывающий домен). Плазму анализировали с помощью ELISA в день 7 и день 14 на присутствие IgM человека (фиг. 6A) или IgG человека (фиг. 6B), оба указывали на возникновение заболевания "трансплантат против хозяина".

Мыши, получавшие носитель в качестве контроля, демонстрировали высокие уровни IgM человека и IgG человека. В отличие от этого, такие антитела существенным образом не выявлялись у мышей, которые получали вышеописанное предпочтительное CD32B $\times$ CD79b Fc-диатело (фиг. 6A и 6B). Мыши, которые получали CD32B $\times$ CD79b диатело, демонстрировали уменьшенные уровни IgM человека и IgG человека по сравнению с мышами, получавшими носитель в качестве контроля, но такие уровни были все же значительно более высокими, чем уровни у получавших CD32B $\times$ CD79b Fc-диатела. Эти результаты демонстрируют, что биспецифические моновалентные CD32B $\times$ CD79b диатела обладают терапевтической применимостью и эффективностью, а также то, что вышеописанное предпочтительное CD32B $\times$ CD79b Fc-диатело в соответствии с настоящим изобретением неожиданно превосходит такие не являющиеся Fc диатела и обладает еще большей терапевтической применимостью и эффективностью (фиг. 6A и 6B).

Пример 6. CD32B $\times$ CD79b биспецифические моновалентные Fc-диатела снижают ксеногенное GvHD у мыши

Для дальнейшей демонстрации способности CD32B $\times$ CD79b Fc-диател в соответствии с настоящим изобретением ослаблять или ингибировать передачу сигнала иммунной системы В-клетками PBMC человека (5×10^6 клеток, внутривенной инъекцией) вводили иммунодефицитным мышам NOD.scid IL2rnull NSG. Животным вводили носитель в качестве контроля (100 мкл фосфатно-буферного солевого раствора (PBS)/животное), вышеописанное предпочтительное CD32B $\times$ CD79b Fc-диатело (либо при 5 мг/кг, либо при 10 мг/кг) или антитело против CD20 (ритуксимаб; 5 мг/кг; одну дозу). Суммарную выживаемость мышей измеряли с течением времени. Как показано на фиг. 7, животные, получавшие обе дозы предпочтительного CD32B $\times$ CD79b Fc-диатела, показывали заметное повышение выживаемости, относительно мышей, получавших либо PCS в качестве контроля, либо ритуксимаб.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на выдачу патента была специально и отдельно включена посредством ссылки во всей ее полноте. Между тем, как настоящее изобретение было описано вместе с конкретными вариантами его осуществления, следует понимать, что возможны дополнительные модификации, и настоящая заявка должна охватывать любые вариации, применения или варианты настоящего изобретения, следующие, в целом, принципам настоящего изобретения и включающие такие отступления от настоящего раскрытия, как являющиеся известной или обычной практикой в области, к которой относится настоящее изобретение, и которые могут быть применены к существенным признакам, изложенным в настоящем документе выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело, способное специфически связываться с эпитопом

CD32B и с эпитопом CD79b, содержащее первую, вторую и третью полипептидные цепи, при этом указанные первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом и указанные первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, причем:

А) первая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

i) домен 1, содержащий

(1) субдомен (1A), который включает в себя содержащий цистеин пептид (SEQ ID NO: 1); и

(2) субдомен (1B), который содержит полипептидную часть Fc-домена IgG, имеющую домены CH2 и CH3;

ii) домен 2, содержащий

(1) субдомен (2A), который содержит VL-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD32B (VL_{CD32B}) (SEQ ID NO: 11); и

(2) субдомен (2B), который содержит VH-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD79b (VH_{CD79b}) (SEQ ID NO: 14),

при этом указанные субдомены (2A) и (2B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 4);

iii) домен 3, который является Е-спиральным доменом (SEQ ID NO: 7) или К-спиральным доменом (SEQ ID NO: 8), при этом указанный домен 3 отделен от указанного домена 2 пептидным линкером (SEQ ID NO: 5); и

iv) С-концевой спейсерный пептид (SEQ ID NO: 6);

В) вторая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу:

i) домен 1, содержащий

(1) субдомен (1A), который содержит VL-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD79b (VL_{CD79b}) (SEQ ID NO: 13); и

(2) субдомен (1B), который содержит VH-домен моноклонального антитела, способный связываться с CD32B (VH_{CD32B}) (SEQ ID NO: 12);

при этом указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO: 4);

ii) домен 2, который является К-спиральным доменом (SEQ ID NO: 8) или Е-спиральным доменом (SEQ ID NO: 7), при этом указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO: 5) и при этом указанный домен 3 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не являются оба Е-спиральными доменами или оба К-спиральными доменами; и

С) третья полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к С-концу домен 1, содержащий:

(1) субдомен (1A), который включает в себя содержащий цистеин пептид (SEQ ID NO: 1); и

(2) субдомен (1B), который содержит полипептидную часть Fc-домена IgG, имеющую домены CH2 и CH3;

и при этом:

(а) указанные полипептидные части Fc-доменов IgG указанных первой и третьей полипептидных цепей формируют указанный Fc-домен IgG;

(b) указанный VL-домен указанной первой полипептидной цепи и указанный VH-домен указанной второй полипептидной цепи формируют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD32B; и

(с) указанный VH-домен указанной первой полипептидной цепи и указанный VL-домен указанной второй полипептидной цепи формируют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD79b.

2. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по п.1, в котором указанный субдомен (1B) указанной первой полипептидной цепи содержит последовательность, отличную от таковой указанного субдомена (1B) указанной третьей полипептидной цепи.

3. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по п.1, в котором указанный субдомен (1B) указанной первой полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и указанный субдомен (1B) указанной третьей полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

4. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по п.1, в котором указанный субдомен (1B) указанной первой полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, а указанный субдомен (1B) указанной третьей полипептидной цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

5. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по п.1 или 2, в котором указанный домен 1 указанной первой полипептидной цепи и/или указанный домен 1 указанной третьей полипептидной цепи содержит вариант последовательности CH2-CH3 Fc-участка дикого типа, который проявляет измененное связывание с Fcγ-рецептором относительно связывания, проявляемого указанным Fc-участком дикого типа.

6. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.1-5, в котором указанный домен 3

указанной первой полипептидной цепи содержит Е-спираль (SEQ ID NO: 7), а указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит К-спираль (SEQ ID NO: 8).

7. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.1-5, при этом указанный домен 3 указанной первой полипептидной цепи содержит К-спираль (SEQ ID NO: 8), а указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит Е-спираль (SEQ ID NO: 7).

8. Биспецифическое моновалентное Fc-диатело, способное специфически связываться с эпитопом CD32B и с эпитопом CD79b, содержащее:

- (1) первую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (2) вторую полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и
- (3) третью полипептидную цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, при этом аминокислотные остатки 1-10 указанной третьей полипептидной цепи представляют собой пептид 1 (SEQ ID NO: 1), а аминокислотные остатки 11-227 указанной третьей полипептидной цепи представляют собой домены CH2 и CH3 Fc-участка антитела IgG (SEQ ID NO: 10);

при этом указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом первой дисульфидной связью, а указанные первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом второй дисульфидной связью.

9. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания или состояния, содержащая биспецифическое моновалентное Fc-диатело по любому из пп.1-8 и физиологически приемлемый носитель.

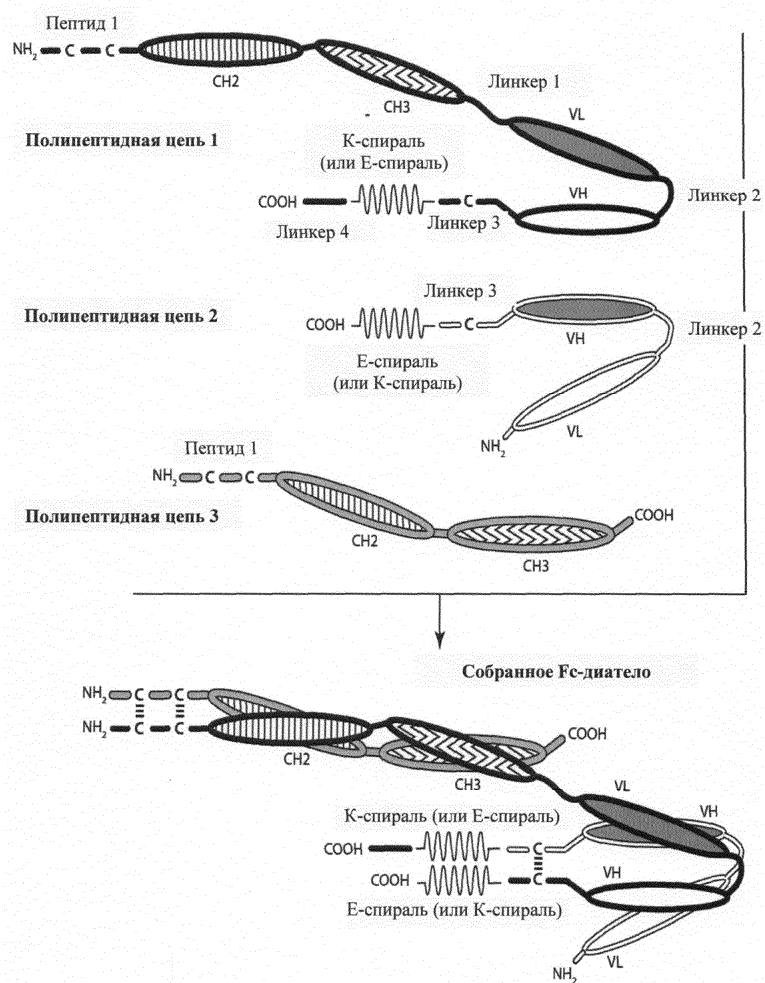
10. Применение биспецифического моновалентного Fc-диатела по любому из пп.1-8 для лечения воспалительного заболевания или состояния.

11. Применение фармацевтической композиции по п.9 для лечения воспалительного заболевания или состояния.

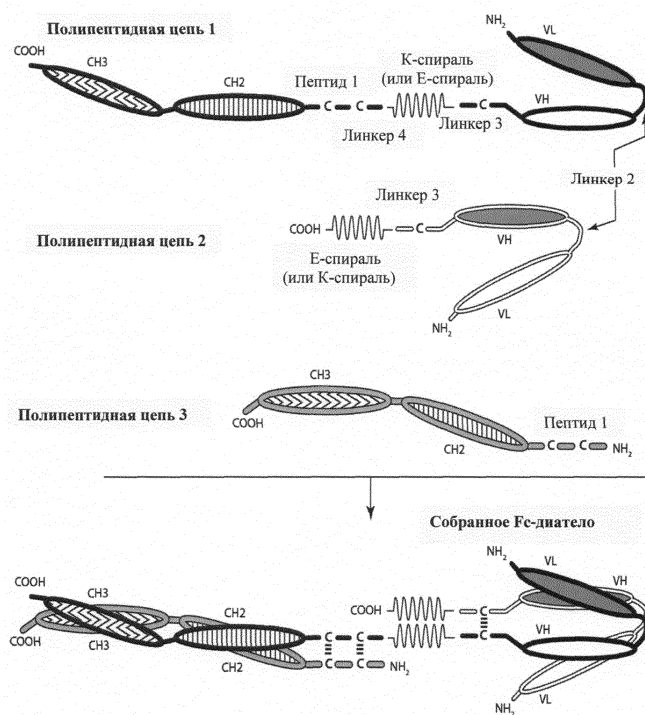
12. Применение по любому из пп.10-11, где указанным воспалительным заболеванием или состоянием является аутоиммунное заболевание.

13. Применение по п.12, где указанным аутоиммунным заболеванием является системная красная волчанка (SLE).

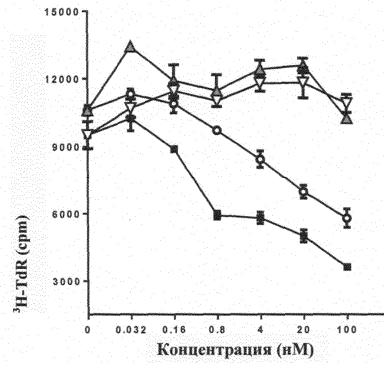
14. Применение по любому из пп.10-11, где указанным воспалительным заболеванием или состоянием является заболевание "трансплантат против хозяина" (GvHD).



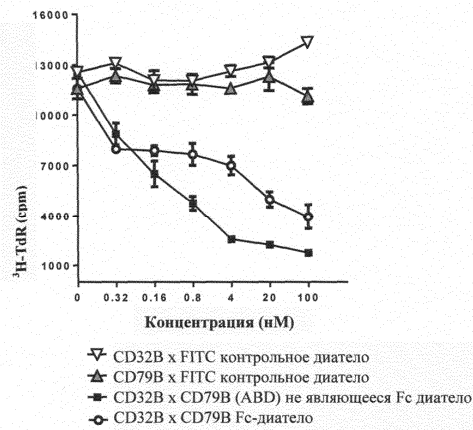
Фиг. 1



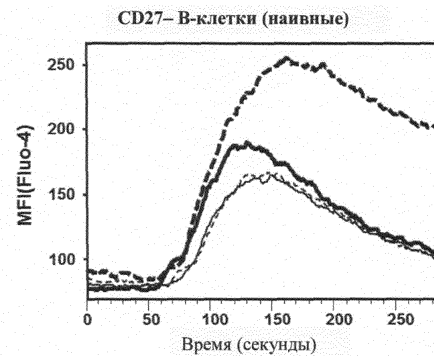
Фиг. 2



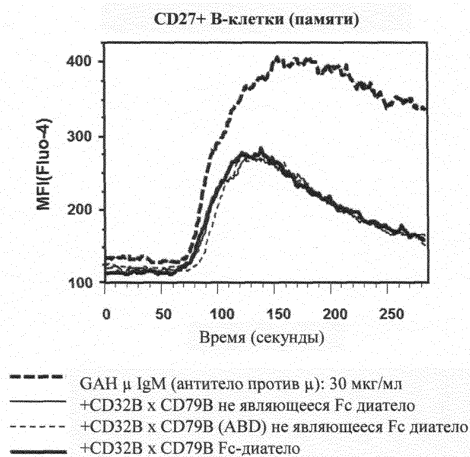
Фиг. 3А



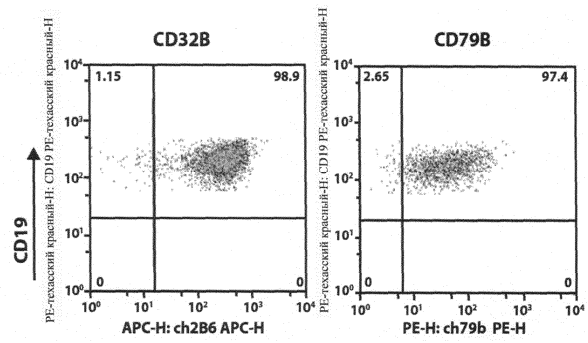
Фиг. 3В



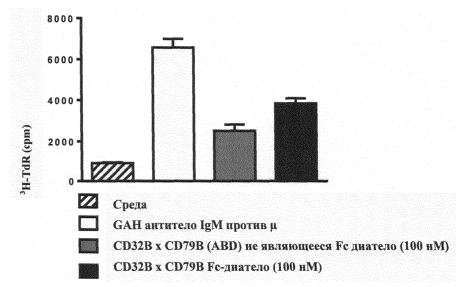
Фиг. 4А



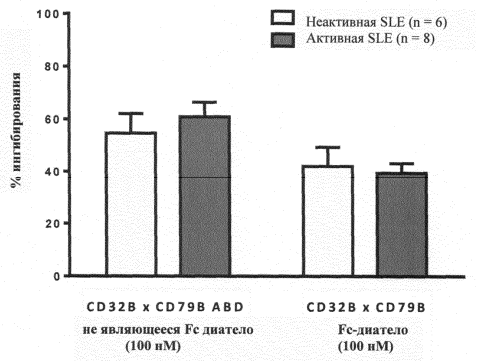
Фиг. 4В



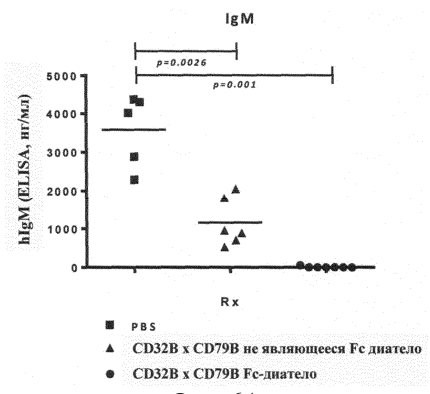
Фиг. 5А



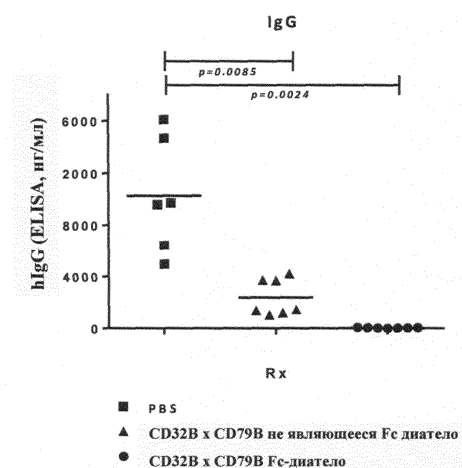
Фиг. 5В



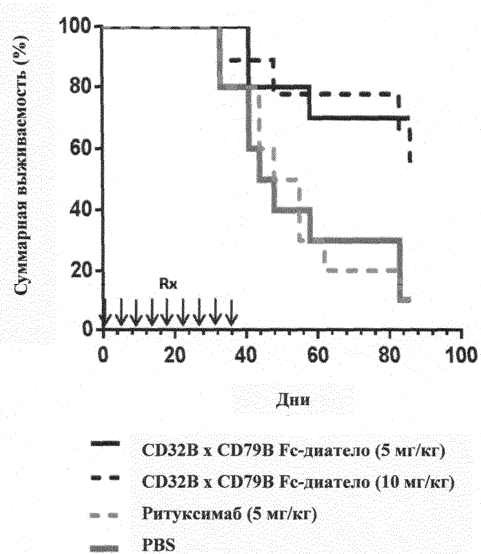
Фиг. 5С



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7

