

REPUBLICA DE COLOMBIA



PATENTE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-052454- -00000-0000

EXPEDIENTE No. —

Fecha: 2016-03-01 11:37:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Contiene los documentos relativos a la solicitud de Patente de invención de: ^{3J}

Título: DIACUERPOS FC MONOVALENTES
BIESPECÍFICOS QUE SON CAPACES DE UNIRSE
A CD32B Y CD79B Y USOS DE LOS MISMOS

Solicitante: MACROGENICS, INC.

De: ROCKVILLE, MARYLAND, ESTADOS UNIDOS

Apoderado: MAURICIO JARAMILLO C.

Bogotá, D.C., Marzo de 2016

WF- 9911



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO


No. 16-052454- -00000-0000

Fecha: 2016-03-01 11:37:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

ción

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

SV

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2014/049848	Fecha 06.08.2014
Publicación Internacional No.		WO/2015/021089	Fecha 12.02.2015
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
DIACUERPOS FC MONOVALENTES BIESPECÍFICOS QUE SON CAPACES DE UNIRSE A CD32B Y CD79B Y USOS DE LOS MISMOS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 39/395 (2006.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. ☐ Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1. MACROGENICS, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		9640 Medical Center Drive	No. TELÉFONO
CIUDAD		Rockville	CORREO ELECTRÓNICO
DEPARTAMENTO/ESTADO		Maryland	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos	
7	INVENTOR (ES) ☐ Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. JOHNSON		Leslie, S.	Estados Unidos
2. HUANG		Ling	Estados Unidos
3. SHAH		Kalpana	Estados Unidos
4. BONVINI		Ezio	Estados Unidos
5. MOORE		Paul, A.	Estados Unidos
6. CHEN		Wei	Estados Unidos
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Estados Unidos	Maryland	Rockville	9640 Medical Center Drive
2. Estados Unidos	Maryland	Rockville	9640 Medical Center Drive
3. Estados Unidos	Maryland	Rockville	9640 Medical Center Drive
4. Estados Unidos	Maryland	Rockville	9640 Medical Center Drive
5. Estados Unidos	Maryland	Rockville	9640 Medical Center Drive
6. Estados Unidos	Maryland	Rockville	9640 Medical Center Drive
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en hoja de información complementaria.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ X APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
JARAMILLO CAMPUZANO		MAURICIO	C.C. 80.421.942 T.P. 74.555
DIRECCIÓN	Calle 67 NO. 7 – 35, oficina 1204		No. TELÉFONO 3192900 Ext. 214
CIUDAD	Bogotá D.C.		CORREO ELECTRÓNICO dbotero@gpzlegal.com
PAÍS	Colombia		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL

10	DECLARACIÓN(ES) DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
	1. Estados Unidos	US	61/866,416	2013.08.15
	2. Estados Unidos	US	61/864,217	2013.08.09
	3. Estados Unidos	US	61/869,519	2013.08.23
	4. Estados Unidos	US	61/907,525	2013.11.22

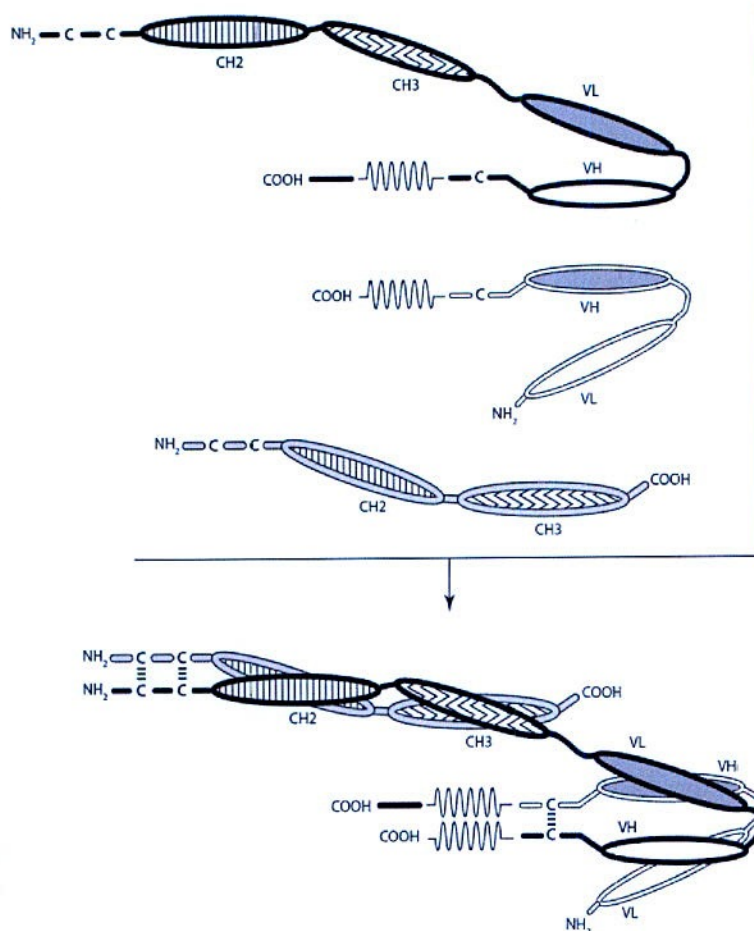
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.	

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.	

13	REDUCCIÓN DE TASAS
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.	
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐	
Si aplica, debe aportar los soportes de acuerdo a lo que se indica en el numeral 18 - Documentos que acompañan la solicitud	

14	RESUMEN
El presente invento se dirige a diacuerpos monovalentes biespecíficos que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos") y se componen de tres cadenas de polipéptidos y que poseen al menos un sitio de unión específico para un epítipo de CD32B y un sitio de unión específico para un epítipo de CD79b (p.ej., un "diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del presente invento son capaces de unirse simultáneamente a CD32B y CD79b. El invento se dirige a dichas composiciones, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos y a métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, y en particular, lupus eritomatoso sistémico (SLE) y enfermedad de injerto contra huésped.	

15 FIGURA CARACTERISTICA



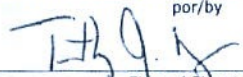
16	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N°	Fecha
17	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		

18 DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano	Documentación Jurídica
1. X Descripción N° de folios: 61 2. X Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 13 3. X Dibujos y/o figuras N° folios: 8 4. X Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. X Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. X Anexo formato digital.	9. X Poderes, si fuera el caso. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del invento al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. X Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

GOMEZ PINZON ZULTA

ATTORNEY

PODER	POWER OF ATTORNEY
Yo(nosotros), abajo firmado(s) / I(we), the undersigned	
MacroGenics, Inc.	
domiciliado(s) en / of	
9640 Medical Center Drive, Rockville, Maryland, USA	
por el presente nombro a: Mauricio Jaramillo Campuzano con T.P. 74.555, Paula Samper Salazar con T.P. 56.190 and/or José Luis Suarez Parra con T.P. 65.826, para que en obediencia a lo dispuesto por el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, actúen en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. Además, confiero(conferimos) poder a los abogados para obtener la protección de mi (nuestra) Propiedad Industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo(amos) a dichos apoderados para que me(nos) representen ante cualesquiera entidades o personas ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, denominaciones de origen, nombres de dominio, registros sanitarios, variedades vegetales y registros de todo tipo ante el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria, y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, acciones de infracciones, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, la impugnación de registros sanitarios de terceros y en general los juicios civiles, penales, acciones administrativas o contencioso-administrativas relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.	In due compliance with the terms of paragraph 1st of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint Mauricio Jaramillo Campuzano with T.P. 74.555, Paula Samper Salazar with T.P. 56.190 and/or José Luis Suarez Parra with T.P. 65.826, domiciled at Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as my (our) representatives for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of the court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or temporal or definitive impediment. In addition, I (we) grant a Power of Attorney to obtain protection of my(our) Industrial Property and against the unfair competition, for which purpose I(we) authorize the said attorneys to represent me(us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, especially those administrative and judicial, in all matters concerning the following: a) Granting of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, denominations of origin, domain names, public health registrations, vegetal varieties and all kind of registrations before the Instituto Colombiano Agropecuario - ICA; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition protection, to the consumer, oppositions, administrative or court cancellation, nullity, infringement, custom procedures, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, to challenge public health registrations granted to third parties, and in general the civil, penal and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me(us) or against me(us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, ratify acts done by representatives without a power of attorney.
25 Oct 2012 Dado y firmado hoy / Given and signed this Rockville, Maryland, USA. en / in Timothy J. Mayer, Ph.D., Senior Director, Intellectual Property, MacroGenics, Inc. por/by  Firma / Signature	

Genetics Services Americas, Inc. • www.genetics.com

Teléfono: (773) 319-0000 • Fax: (773) 321-0200
Correo: info@genetics.com • web@genetics.com

Teléfono: (940) 313-2011 • Fax: (940) 313-0811
E-mail: info@genetics.com • web@genetics.com

ACINITAS

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>5</u>
--	----------------------------------	------------------------

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código	2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA			
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:	
Expediente: 16-52454-0		Solicitante / <i>Quejoso / Demandante / otros.</i>	
Prueba excluida: cd			
Nº. de Pruebas excluidas: 1			
Fecha de emisión de la Prueba:			
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO			
Nº. de bloque:		Otras especificaciones:	
Nº. de rodante:			
Nº. de estante:			
Nº. de archivador:			
Nº. de entrepaño:			
Nº. de gaveta:			
Nº. de caja:			
IMPORTANTE: - El material gráfico o especial que se encuentra dentro o anexo a las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códigos, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.			
Observaciones:		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro	
El cd contiene: 5 Archivos en formato pdf, procesados y cargados al sistema		Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro	

mafoa
JV

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0010724

Bogotá D.C., Febrero 08 de 2016 - 10:22:25

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCAS S.A.

NI 830.121.797

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	777276850	05/02/2016	272.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	80.000.00	80.000.00
			\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-052454- -00000-0000

Fecha: 2016-03-01 11:37:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 8 de 2016 - 10:22:26

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0010725

Bogotá D.C., Febrero 08 de 2016 - 10:22:25

RECIBIDO DE : GOMEZ PINZON ASEMARCA S.A.

NI 830.121.797

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	777276850	05/02/2016	272.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
3 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	40.000.00	120.000.00
			\$120.000.00

SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-052454- -00000-0000

Fecha: 2016-03-01 11:37:27
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 8

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 8 de 2016 - 10:22:26



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-052454-00000-0000

Fecha: 2016-03-01 11:37:27

Tra 11 PATENTEIYII

Act 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 8

Ir

DIACUERPOS FC MONOVALENTES BIESPECÍFICOS QUE SON CAPACES DE
UNIRSE A CD32B Y CD79B Y USOS DE LOS MISMOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad a las Aplicaciones de Patente de los Estados Unidos Nro. 61/864,217 (presentada el 9 de agosto de 2013; pendiente); 61/866,416 (presentada el 15 de agosto de 2013; pendiente); 61/869,519 (presentada el 23 de agosto de 2013; pendiente); y 61/907,525 (presentada el 22 de noviembre de 2013; pendiente), cada una de las cuales se incorpora en el presente como referencia en su totalidad.

REFERENCIA A LISTAS DE SECUENCIA

Esta solicitud incluye una o más Listas de secuencia conforme a 37 C.F.R. 1.821 *et seq.*, que se divulgan en medios en papel y legibles en computadora, y cuyas divulgaciones en papel y legibles en computadora se incorporan en el presente como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

CAMPO DEL INVENTO

El presente invento se dirige a diacuerpos monovalentes biespecíficos que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina ("Diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos") y se componen de tres cadenas polipeptídicas que poseen, al menos, un sitio de unión específico para un epítipo de CD32B y un sitio de unión específico para un epítipo de CD79b (p.ej., un "diacuerpo Fc CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del presente invento son capaces de una unión simultánea a CD32B y CD79b. El invento se dirige a dichas composiciones, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos y a métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, y en particular, lupus eritematoso sistémico (SLE, según siglas en inglés) y enfermedad del injerto contra el huesped.

DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL RELACIONADO

Los receptores Fc γ y CD32B

La interacción de los complejos de antígenos-anticuerpos con células del sistema inmune deriva en una amplia gama de respuestas, que van desde funciones de efector, como citotoxicidad dependiente de anticuerpos, degranulación de mastocitos y fagocitosis a señales inmunomodulatorias, como regular la proliferación de linfocitos y la secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión del dominio Fc de anticuerpos o complejos inmunes a receptores especializados de la superficie celular sobre las células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares disparadas por anticuerpos y complejos inmunes deriva de la heterogeneidad estructural de los receptores Fc. Los receptores Fc comparten dominios de unión de ligandos relacionados en forma estructural que media en forma presunta la señal intracelular.

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

Los receptores Fc se definen mediante su especificidad para subtipos de inmunoglobulina (ver, Ravetch J.V. et al. (1991) "*Fc Receptors*," Annu. Rev. Immunol. 9:457-92; Gerber J.S. et al. (2001) "*Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fc γ Receptors*," Microbes and Infection, 3:131-139; Billadeau D.D. et al. (2002) "*ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation*," J. Clin. Invest. 2(109):161-1681; Ravetch J.V.

et al. (2000) "*Immune Inhibitory Receptors*," *Science* 290:84-89; Ravetch J.V. *et al.* (2001) "*IgG Fc Receptors*," *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-90; Ravetch J.V. (1994) "*Fc Receptors: Rubor Redux*," *Cell*, 78(4): 553-60).

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

Las proteínas FcγRII(CD32) son glicoproteínas de membrana integral 40KDa que unen solamente el IgG complejo debido a una baja afinidad para el Ig monomérico (10^6 M^{-1}). Este receptor es el FcγR expresado más ampliamente, presente en todas las células hematopoyéticas, incluidos los monocitos, macrófagos, células B, células NK, neutrofilos, células mastoides y plaquetas. FcγRII tiene solamente dos regiones similares a la inmunoglobulina en su cadena de unión de inmunoglobulina y, por lo tanto, una afinidad mucho menor para IgG que para FcγRI. Existen tres genes FcγRII humanos (FcγRIIA(CD32A), FcγRIIB(CD32B), FcγRIIC(CD32C)), los que unen IgG en agregados o complejos inmunes.

Las diferencias distintivas en los dominios citoplásmicos de FcγRIIA y FcγRIIB crean dos respuestas heterogéneas en forma funcional a la unión del receptor. La diferencia fundamental es que, al momento de la unión a una región Fc IgG, la isoforma FcγRIIA inicia la señal

intracelular que lleva a la activación del sistema inmune (p.ej., fagocitosis, estallido respiratorio, etc.), mientras que, al momento de la unión con una región Fc IgG, la isoforma FcγRIIB inicia señales que llevan a una atenuación de la inhibición del sistema inmune (p.ej., inhibir la activación de la célula B, etc.).

Dichas señales de activación e inhibitorias se transducen a través de FcγRs luego de la ligación a una región Fc IgG. Estas funciones opuestas diametralmente derivan de diferencias estructurales entre las distintas isoformas del receptor. Dos dominios distintos dentro de los dominios de la señal citoplásmica del receptor llamados Motivos de Activación de Inmunoreceptores basados en Tirosina (ITAMs, según siglas en inglés) o Motivos de Inhibición de Inmunoreceptores basados en Tirosina (ITIMs, según siglas en inglés) dan cuenta de las diferentes respuestas. El reclutamiento de las diferentes enzimas citoplásmicas a estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solamente incluyen FcγRIIB.

Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. Los cluster de FcγRIIA a través de complejos inmunes o unión cruzada de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con quinasas asociadas con el receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, y su activación deriva en una activación de sustratos secuencia abajo (p.ej., PI₃K). La activación celular lleva a la liberación de mediadores proinflamatorios.

El gen FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es 96 % idéntico a FcγRIIA y une los complejos IgG de manera indistinguible. La presencia de un

ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibitoria de FcγR. La base molecular de esta inhibición se ha establecido. Cuando FcγRIIB se vuelva coligado a un receptor activador mediante las regiones Fc de las inmunoglobulinas IgG de un complejo inmune, el ITIM de FcγRIIB se vuelve fosforilado y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP, según siglas en inglés), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de la quinasa de tirosina mediada por FcγR que contiene ITAM, y que en consecuencia evita el influjo de Ca⁺⁺ intracelular. Por lo tanto, dicha unión cruzada de FcγRIIB y un receptor activador amortigua la actividad del receptor del activador, y por lo tanto, inhibe la responsividad celular. Por lo tanto, en las células B, la activación de la célula B, la proliferación de la célula B y la secreción de anticuerpos se amortigua o se aborta. Por lo tanto, en el inicio de la detección de antígenos, ocurre la unión del antígeno IgG monomérico y las regiones de Fc de los anticuerpos unidos se unen a las ITAM de las FcγR activadoras para mediar la activación del sistema inmune. A medida que progresa la respuesta del huésped, se forman los complejos inmunes antígenos de IgG multiméricos que son capaces de unirse a FcγRIIB (y por lo tanto, coligando dichos complejos con un receptor de activación), lo que lleva a la amortiguación y a la cesación final de la respuesta inmune (ver, *p. ej.*, Patentes de los Estados Unidos Nro. 8,445,645; 8,217,147; 8,216,579; 8,216,574; 8,193,318; ,192,737; 8,187,593; 8,133,982; 8,044,180; 8,003,774; 7,960,512; 7,786,270; 7,632,497; 7,521,542; 7,425,619; 7,355,008 y Publicaciones de la Patente de los Estados Unidos Nro.: 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).

EL RECEPTOR DE LA CÉLULA B Y CD79b

Las células B son células del sistema inmune que son responsables de producir anticuerpos. La respuesta de la célula B al antígeno es un componente esencial del sistema inmune normal. Las células B poseen receptores de superficie celular especializada (receptores de la célula B; "BCR"). Si una célula B encuentra un antígeno capaz de unirse al BCR de la célula, la célula B será estimulada para proliferarse y producir anticuerpos específicos para el antígeno unido. Para generar una respuesta eficiente a los antígenos, las proteínas asociadas con BCR y la asistencia de la célula T también son necesarias. El complejo antígeno/BCR es internalizado, y el antígeno es procesado proteolíticamente. Una pequeña parte del antígeno sigue siendo complejo con las moléculas principales del complejo II de histocompatibilidad ("MHC-II") en la superficie de las células B, donde el complejo puede ser reconocido por las células T. Las células T activadas por dicha presentación de antígenos guardan una variedad de linfocinas que inducen la maduración de la célula B.

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

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

El BCR se compone de una inmunoglobulina de membrana que, junto con las subunidades α y β asociadas en forma no covalente de CD79 ("CD79a" y "CD79b," respectivamente), forman el complejo BCR. CD79a y CD79b son subunidades de transducción de señales que contienen un motivo de activación en base a tirosina de inmunoreceptor conservado ("ITAM") necesario para la transducción de señal (Dylke, J. et al. (2007) *"Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR),"* Immunol. Lett. 112(1):47-57; Cambier, J.C. (1995) *"New Nomenclature For The Reth Motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL),"* Immunol. Today 16:110). El agregado del complejo de BCR mediante el antígeno multivalente inicia la transfosforilación de los ITAM de CD79a y CD79b y la activación de las quinasas asociadas al receptor (DeFranco, A.L. (1997) *"The Complexity Of Signaling Pathways Activated By The BCR,"* Curr. Opin. Immunol. 9:296-308; Kurosaki, T. (1997) *"Molecular Mechanisms In B-Cell Antigen Receptor Signaling,"* Curr. Opin. Immunol. 9:309-318; Kim, K.M. et al. (1993) *"Signalling Function Of The B-Cell Antigen Receptors,"* Immun. Rev. 132:125-146). Los ITAM fosforilados reclutan efectores adicionales como PI₃K, PLC- γ y los miembros de la ruta Ras/MAPK. Estos eventos de señalización son responsables de la proliferación de la célula B y la expresión en aumento de los marcadores de activación (Como MHC-II y CD86) que se

requieren para imprimir las células B para sus interacciones posteriores con las células T auxiliares ("T_h").

Enfermedades o trastornos inflamatorios

La inflamación es un proceso por el que los glóbulos blancos del cuerpo y los químicos protegen nuestros cuerpos de la infección mediante sustancias extrañas, como bacterias y virus. Se caracteriza generalmente por dolor, hinchazón, calor y enrojecimiento del área afectada. Los químicos conocidos como citocinas y prostaglandinas controlan este proceso, y se liberan en una cascada ordenada y autolimitante en los tejidos sanguíneos o afectados. Esta liberación de químicos aumenta el flujo sanguíneo al área de la lesión o infección, y puede derivar en enrojecimiento y calor. Algunos de los químicos provocan una filtración de fluidos en los tejidos, lo que deriva en hinchazón. Este proceso potencial puede estimular los nervios y provocar dolor. Estos cambios, cuando ocurren durante un periodo limitado en el área relevante, trabajan a beneficio del cuerpo.

Las enfermedades o trastornos inflamatorios reflejan un ataque del sistema inmune en las células y el tejido propios del cuerpo (p.ej., una respuesta "autoinmune"). Existen muchos trastornos autoinmunes diferentes que afectan al cuerpo de formas diferentes. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en individuos con la enfermedad de Crohn, y el sinovio, el hueso y el cartílago de varias articulaciones son afectados en individuos con artritis reumatoidea. A medida que los trastornos autoinmunes avanzan en la destrucción de uno o más tipos de tejidos corporales, el crecimiento anormal de un órgano o cambios en la función de los órganos pueden aparecer. El trastorno autoinmune puede afectar a solamente

un órgano o tipo de tejido o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por los trastornos autoinmunes incluyen glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conectivos, glándulas endocrinas (p. ej., la tiroides o el páncreas), músculos, articulaciones y piel. Los ejemplos de trastornos autoinmunes incluyen, entre otros, la tiroiditis de Hashimoto, la anemia perniciosa, la enfermedad de Addison, la diabetes tipo 1, la artritis reumatoidea, lupus eritomatoso sistémico (SLE), dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, lupus eritomatoso, esclerosis múltiple, enfermedad autoinmune del oído interno myasthenia gravis, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, hepatitis autoinmune, poliposis adenomatosa familiar y colitis ulcerativa.

Las enfermedades o trastornos inflamatorios también pueden aumentar cuando el sistema inmune en general protector del cuerpo provoca daños atacando células o tejidos extraños, cuya presencia es beneficiosa para el cuerpo (p.ej., el rechazo de trasplantes (huésped versus enfermedad huésped)) o del rechazo de las células de un huésped inmunosuprimido mediante células inmunocompetentes de un injerto de trasplante introducido (enfermedad de injerto contra huésped) (DePaoli, A.M. et al. (1992) "Graft-Versus-Host Disease And Liver Transplantation," Ann. Intern. Med. 117:170-171; Sudhindran, S. et al. (2003) "Treatment Of Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation With Basiliximab Followed By Bowel Resection," Am J Transplant. 3:1024-1029; Pollack, M.S. et al. (2005) "Severe, Late-Onset Graft-Versus-Host Disease In A Liver Transplant Recipient Documented By Chimerism Analysis," Hum. Immunol. 66:28-31; Perri, R. et al. (2007) "Graft Vs. Host Disease After Liver Transplantation: A New Approach Is Needed," Liver Transpl. 13:1092-1099; Mawad, R. et al. (2009) "Graft-Versus-Host Disease Presenting With

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

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

Diacuerpos biespecíficos

La capacidad de un anticuerpo intacto no modificado (p.ej., un IgG) de unirse a un epítipo de un antígeno depende de la presencia de dominios variables en las cadenas pesadas y luz inmunoglobulina (p.ej., los dominios VL y VH, respectivamente). El diseño de un diacuerpo se basa en el constructo Fv de única cadena (scFv) (ver, p.ej., Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); EE. UU. 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By

Fusion Of Human Fc Region," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

La interacción de una cadena liviana de anticuerpos y de una cadena pesada de anticuerpos, y en particular, la interacción de sus dominios VL y VH forman uno de los sitios de unión de epítopo del anticuerpo. En contraste, el constructo de scFv incluye los dominios de VL y VH de un anticuerpo que se encuentra en una única cadena de polipéptidos en donde los dominios están separados por un vinculador flexible de un largo suficiente para permitir un auto ensamble de los dos dominios en un sitio de unión de epítopo funcional. En donde el auto ensamble de los dominios VL y VH se vuelva imposible debido a un vinculador de largo insuficiente (menos de alrededor de 12 residuos de aminoácidos), dos de los constructos scFv interactúan con el otro para formar una molécula bivalente en la que el dominio VL de una cadena se asocia con el dominio VH de la otra (revisado en Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Los anticuerpos naturales son capaces de unir solamente a una especie de epítopo (p.ej., monoespecífico), aunque pueden unir multiples copias de esa especie (p.ej., exhibir bivalencia o multivalencia). El material ha notado la capacidad de producir diacuerpos que difieren de dichos anticuerpos naturales en ser capaces de unir dos o más especies epítopos diferentes (p.ej., exhibir biespecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (ver, p.ej., Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small

Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 90:6444-6448; EE. UU. 2004/0058400 (Hollinger et al.); EE. UU. 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Mertens, N. et al., "New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives," En: 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).

La provisión de diacuerpos no monoespecíficos ofrece una ventaja significativa: la capacidad de coligar y colocalizar células que expresan diferentes epítopes. Los diacuerpos bivalentes por lo tanto, tienen una amplia gama de aplicaciones, incluidas la terapia y el inmunodiagnóstico. La bivalencia permite una gran flexibilidad en el diseño y la ingeniería del diacuerpo en varias aplicaciones, ofreciendo una avidéz mejorada para antígenos multiméricos, la unión cruzada de diferentes antígenos y un objetivo dirigido a

tipos de células específicas que descansan en la presencia de ambos antígenos objetivo. Debido a su valencia en aumento, las bajas tasas de disociación y una eliminación rápida de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, en o por debajo de los ~50 kDa), moléculas de diacuerpo conocidas en el material también han presentado el uso particular en el campo de las imágenes de tumores (Fitzgerald et al. (1997) *"Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris,"* Protein Eng. 10:1221). Tiene particular importancia el coligado de diferentes células, por ejemplo, la unión cruzada de células T citotóxicas para células tumorales (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).

Los dominios de unión de epítipo del anticuerpo también pueden ser dirigidos a una superficie determinante de cualquier célula de efector inmune como CD3, CD16, CD32, o CD64, que se expresan en linfocitos T, células asesinas naturales (natural killer) (NK) u otras células mononucleares. En muchos estudios, la unión de diacuerpos a determinantes celulares de efector, p.ej., receptores Fcγ (FcγR), también se encontró para activar la célula efectora (Holliger et al. (1996) *"Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,"* Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) *"Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins,"* Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Generalmente, la activación de la célula efectora se active mediante la

unión de un anticuerpo unido a antígeno a una célula efectora mediante la interacción de Fc-FcγR; por lo tanto, en este respecto, las moléculas de diacuerpos del invento pueden mostrar una funcionalidad similar a Ig independientemente de si incluyen un dominio Fc (p.ej., según se analiza en el ensayo de la función efectora conocida en el material o ejemplificada en el presente (p.ej., ensayo ADCC)). Mediante el tumor de enlace cruzado y las células efectoras, el diacuerpo no solamente lleva la célula efectora a la proximidad de las células tumorales sino que también lleva a una muerte efectiva del tumor (ver p.ej., Cao et al. (2003) "*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*," Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

Sin embargo, las ventajas anteriores tienen un costo silencioso. La formación de dichos diacuerpos no monoespecíficos requiere del montaje exitoso de dos o más polipéptidos diferentes y distintos (p.ej., dicha formación requiere que los diacuerpos se formen a través de la heterodimerización de diferentes especies de cadena polipéptida). Este hecho se contrasta con diacuerpos mono específicos, que se forman a través de la homodimerización de cadenas polipéptidas idénticas. Debido a que al menos, dos polipéptidos diferentes (p.ej., dos especies de polipéptidos) deben proporcionarse para formar un diacuerpo no monoespecífico, y debido a que la homodimerización de dichos polipéptidos lleva a moléculas inactivas (Takemura, S. et al. (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de dichos polipéptidos debe lograrse de tal forma de prevenir la unión covalente entre polipéptidos de la misma especie (Takemura, S. et al. (2000) "*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*," Protein Eng. 13(8):583-

588). El material, por lo tanto, ha enseñado la asociación no covalente de dichos polipéptidos (ver, p.ej., 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).

Sin embargo, el material ha reconocido que los diacuerpos biespecíficos compuestos de polipéptidos asociados en forma no covalente son inestables y se disocian fácilmente en monómeros no funcionales (ver, p.ej., Lu, D. et al. (2005) *"A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,"* J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

A la luz de este desafío, el material ha tenido éxito en desarrollar diacuerpos no monoespecíficos heterodiméricos unidos en forma covalente (ver, p.ej., WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; Johnson, S. et al. (2010) *"Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion,"* J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) *"Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory*

Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551). Dichos enfoques incluyen la ingeniería de uno o más residuos de cisteína en cada una de las especies de polipéptidos empleada. Por ejemplo, el agregado de un residuo de cisteína al extremo C de dichos constructos se ha mostrado para permitir la unión de disulfuro entre las cadenas de polipéptidos, estabilizando el heterodímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.

Independientemente de dicho éxito, la producción de monoespecíficos, heterodiméricos funcionales y estables pueden mejorarse aún más mediante la cuidadosa consideración y colocación de los dominios empleados en las cadenas polipéptidas. El presente invento por lo tanto, se dirige a la provision de polipéptidos específicos que se diseñan particularmente para formar, a través de la unión covalente, los diacuerpos Fc heterodiméricos que son capaces de unir simultáneamente CD32B y CD79b.

SUMARIO DEL INVENTO

El invento se dirige a diacuerpos monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b que incluyen una region Fc de inmunoglobulinas ("diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b del invento se componen de tres cadenas polipéptidas (una "primera", "segunda" y "tercera" cadena polipéptida), en donde la primera y la segunda cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra, y la primera y la tercera cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra. Dichas uniones covalentes son, por ejemplo, mediante la unión de disulfuro de residuos de

cisteína ubicados dentro de cada cadena de polipéptidos. Las primeras y segundas cadenas de polipéptidos de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b del invento se asocian entre sí de forma heterodimérica para formar un sitio específico de unión para un epítotope de CD32B y un sitio específico de unión para un epítotope de CD79b. Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b del invento, por lo tanto, son monovalentes en tanto que son capaces de unirse a solamente una copia de un epítotope de CD32B y a solo una copia de un epítotope de CD79b, pero biespecíficos en tanto que un diacuerpo único puede unirse simultáneamente al epítotope de CD32B y al epítotope de CD79b. Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del presente invento son capaces de unirse simultáneamente a CD32B y a CD79b. El invento es dirigido a dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b, y a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos. El invento es dirigido adicionalmente a métodos para el uso de dichos diacuerpos en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios y, en particular, lupus eritomatoso sistémico (SLE) y enfermedad de injerto contra huésped.

En detalle, el invento ofrece un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, en el que el diacuerpo Fc monovalente biespecífico es capaz de unirse en forma específica a un epítotope de CD32B y a un epítotope de CD79b, y posee un dominio Fc IgG, en el que el diacuerpo Fc monovalente biespecífico incluye una cadena de polipéptidos, una segunda cadena de polipéptidos y una tercera cadena de polipéptidos, en el que la primera y segunda cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra, y la primera y tercera cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra, y en donde:

la primera cadena de polipéptidos incluye, en la dirección terminal N a terminal C:

un Dominio 1, que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un péptido que contiene cisteína (en especial, un péptido que tiene la secuencia de (Péptido 1) **SEC ID NRO:1**); y

un subdominio (1B), que incluye una parte de polipéptido de un dominio Fc IgG (preferiblemente, tener dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG);

un dominio 2, que incluye:

un subdominio (2A), que incluye un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VL_{CD32B}) (**SEC ID NRO:11**); y

un subdominio (2B), que incluye un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VH_{CD79b}) (**SEC ID NRO:14**),

En el que los subdominios (2A) y (2B) se separan del otro mediante un vinculador de péptidos (en especial, un vinculador de péptidos (vinculador 2) que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:4**);

un dominio 3, en el que el dominio 3 es un dominio E-coil (**SEC ID NRO:7**) o un dominio K-coil (**SEC ID NRO:8**), en donde el dominio 3 se separa del dominio 2 mediante un vinculador de péptidos (en especial, un vinculador de péptidos que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:5**); y

un péptido de espaciador terminal C (en especial, un péptido de espaciador que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:6**);

la segunda cadena de polipéptidos incluye, en la dirección terminal N a terminal C:

un dominio 1, que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VL_{CD79b}) (**SEC ID NRO:13**); y

un subdominio (1B), que incluye un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VH_{CD32B}) (**SEC ID NRO:12**);

En donde los subdominios (1A) y (1B) se separan del otro mediante un vinculador de péptidos (en especial, un vinculador de péptidos (vinculador 2) que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:4**);

un dominio 2, en donde el dominio 2 es un dominio K-coil (**SEC ID NRO:8**) o un dominio E-coil (**SEC ID NRO:7**), en donde el dominio 2 se separa del dominio 1 mediante el vinculador de péptidos (en especial, un vinculador de péptidos que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:5**); y en donde el dominio 3 de la primera cadena de polipéptidos y el dominio 2 de la segunda cadena de polipéptidos no son dominios E-coil o dominios K-coil; y

la tercera cadena de polipéptidos incluye, en la dirección de terminal N a terminal C, un dominio 1 que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un péptido que contiene cisteína (en especial, un vinculador de péptidos que tiene la secuencia de (Péptido 1) **SEC ID NRO:1**); y

un subdominio (1B), que incluye una parte de polipéptidos de un dominio Fc IgG (preferentemente, tener dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG);

Y en donde:

las partes de polipéptidos de los dominios Fc IgG de la primera y tercera cadena de polipéptidos forman el dominio Fc IgG;

un dominio VL de la primera cadena de polipéptidos y el dominio VH de la segunda cadena de polipéptidos forman

un dominio de unión de antígenos capaz de unirse en forma específica a un epítoto de CD32B; y

el dominio VH de la primera cadena de polipéptidos y el dominio VL de la segunda cadena de polipéptidos forman un dominio de unión de antígenos capaz de unirse en forma específica a un epítoto de CD79b.

El invento, adicionalmente, ofrece un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, en donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico es capaz de unirse en forma específica a un epítoto de CD32B y a un epítoto de CD79b, y posee un dominio Fc IgG, en donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico incluye una primera cadena de polipéptidos, una segunda cadena de polipéptidos y una tercera cadena de polipéptidos, en donde la primera y la segunda cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra, y la primera y tercera cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra, y en donde:

la primera cadena de polipéptidos incluye, en la dirección terminal N a terminal C:

un dominio 1, que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un péptido que contiene cisteína (en especial, un vinculador de péptido que tiene la secuencia de (Péptido 1) **SEC ID NRO:1**); y

un subdominio (1B), que incluye una porción de polipéptido de un dominio Fc IgG (preferentemente, tener dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG);

un dominio 2, que incluye:

un subdominio (2A), que incluye un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VL_{CD79b}) (**SEC ID NRO:13**); y

un subdominio (2B), que incluye un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VH_{CD32B}) (**SEC ID NRO:12**);

En donde los subdominios (2A) y (2B) se separan del otro mediante un vinculador de péptidos (en especial, un vinculador de péptidos que tienen la secuencia de **SEC ID NRO:4**);

un dominio 3, en donde el dominio 3 es un dominio E-coil (**SEC ID NRO:7**) o un dominio K-coil (**SEC ID NRO:8**), en donde el dominio 3 se separa del dominio 2 mediante un péptido (en especial, un vinculador de péptidos que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:5**); y

un péptido de espaciador de terminal C (en especial, un péptido de espaciador que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:6**);

la segunda cadena de polipéptidos incluye, en la dirección terminal N a terminal C:

un dominio 1, que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VL_{CD32B}) (**SEC ID NRO:11**); y

un subdominio (1B), que incluye un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VH_{CD79b}) (**SEC ID NRO:14**);

En donde los subdominios (1A) y (1B) se separan del otro mediante un vinculador de péptidos (en especial, un vinculador de péptidos que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:4**);

un dominio 2, en donde el dominio 2 es un dominio K-coil (**SEC ID NRO:8**) o un dominio E-coil (**SEC ID NRO:7**), en donde el dominio 2 se separa del dominio 1 mediante un vinculador de péptidos (en especial, un vinculador de péptidos que tiene la secuencia de **SEC ID NRO:5**); y en donde el dominio 3 de la primera cadena de polipéptidos y el dominio 2 de la segunda cadena de polipéptidos no son dominios E-coil o K-coil; y

la tercera cadena de polipéptidos incluye, en la dirección terminal N a terminal C, un dominio 1 que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un péptido que contiene cisteína (en especial, un vinculador de péptidos que tiene la secuencia de (Péptido 1) **SEC ID NRO:1**); y

un subdominio (1B), que incluye una porción de polipéptidos de un dominio Fc IgG (preferentemente, tener dominios CH2 y CH3 de una región Fc de inmunoglobulina IgG);

Y en donde:

las porciones de polipéptidos de los dominios Fc de la primera y tercera cadena de polipéptidos forman la region Fc IgG;

el dominio VL de la primera cadena de polipéptidos y el dominio VH de la segunda cadena de polipéptidos forman un dominio de unión de antígenos capaz de unirse específicamente a un epítipo de CD79b; y

el dominio VH de la primera cadena de polipéptidos y el dominio VL de la segunda cadena de polipéptidos forman un dominio de unión de antígenos capaz de unirse específicamente a un epítipo de CD32B.

El invento asimismo involucra los modos de realización de todos los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos, en donde el dominio 1 de la primera cadena de polipéptidos incluye una secuencia diferente del dominio 1 de la tercera cadena de polipéptidos.

El invento además involucra la realización de dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en donde dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:9**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:10**.

El invento asimismo involucra la realización de dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en donde

dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:10**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:9**.

El invento asimismo involucra la realización de dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos, en donde el dominio 1 de la primera cadena de polipéptidos y/o el dominio 1 de la tercera cadena de polipéptidos incluye una secuencia variante de CH2-CH3 que exhibe una unión alterada a un receptor Fcγ.

El invento asimismo involucra las realizaciones de dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en donde el dominio 3 de la primera cadena de polipéptidos incluye un E-coil (**SEC ID NRO:7**), y el dominio 2 de la segunda cadena de polipéptidos incluye un K-coil (**SEC ID NRO:8**).

El invento asimismo involucra las realizaciones de dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos en donde el dominio 3 de la primera cadena de polipéptidos que incluye un K-coil (**SEC ID NRO:8**), y el dominio 2 de la segunda cadena de polipéptidos incluye un E-coil (**SEC ID NRO:7**).

El invento asimismo involucra un diacuerpo monovalente biespecífico que incluye un Fc de inmunoglobulina IgG (diacuerpo Fc monovalente biespecífico), en donde el diacuerpo Fc monovalente biespecífico incluye:

una primera cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:15**;

Una segunda cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:16**; y

una tercera cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:17**, en donde los residuos de aminoácidos 1-10 de dicha tercera cadena de polipéptidos son Péptido 1 (**SEC ID NRO:1**), y residuos de aminoácidos 11-227 de dicha tercera cadena de polipéptidos

son los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos IgG (**SEC ID NRO:10**);

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

El invento asimismo ofrece una composición farmacéutica que incluye cualquiera de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos que se describen anteriormente y un portador aceptable en forma fisiológica.

El invento asimismo se ofrece para el uso de la composición farmacéutica en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inflamatorio, en especial en donde la enfermedad o trastorno inflamatorio es una enfermedad autoinmune y, en particular, en donde la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico (SLE).

El invento asimismo se ofrece para el uso de dicha composición farmacéutica en el tratamiento de una enfermedad o trastorno farmacéutico, en especial en donde la enfermedad o trastorno inflamatorio es una enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).

Breve descripción de los gráficos:

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

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

Las Figuras 3A-3B muestran la capacidad del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido y un diacuerpo no Fc

CD32B x CD79b (ABD) para inhibir la proliferación de las células B humanas primarias.

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

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

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO:

El presente invento se dirige a diacuerpos monovalentes biespecíficos que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos") y se componen de tres cadenas de polipéptidos y que poseen al menos, un sitio de unión específico para un epítipo de CD32B y un sitio de unión específico para un epítipo de CD79b (p.ej., un diacuerpo Fc "CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del presente invento son capaces de la unión simultánea a CD32B y CD79b. El invento se dirige a dichas composiciones, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos y a métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades o

trastornos inflamatorios, y en particular, lupus eritomatoso sistémico (SLE) y enfermedad de injerto contra huésped.

Según se indica anteriormente, CD79b se expresa mediante las células B, y por lo tanto, se expresa en células que están proliferando en respuesta al reconocimiento de antígenos. Los anticuerpos capaces de unirse en forma inmuno-específica a CD79b son capaces de unirse a dichas células B. CD32B es un FcγR y se expresa en células B. Los anticuerpos capaces de unirse en forma inmuno-específica a FcγRIIB(CD32B) y en particular, dichos anticuerpos que se unen a FcγRIIB sin interferir en forma sustancial o impedir la unión de Fc son capaces de aumentar la capacidad de FcγRIIB de coligar con receptores de activación de complejos inmunes. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico que es capaz de unirse a CD32B y CD79b, tiene la capacidad de inhibir o amortiguar un sistema inmune huésped en respuesta a una activación de la célula B no deseada, la proliferación de la célula B y la secreción de anticuerpos. Dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos, por lo tanto, tienen la utilidad en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios.

Diacuerpos Fc CD32B x CD79b preferidos del presente invento

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b preferidos del presente invento se denominan anticuerpos "Fc", debido a que incluyen un dominio Fc. Como se muestra en forma esquemática en la **Figura 1**, dichos diacuerpos Fc se componen de tres cadenas de polipéptidos, de los cuales la primera y la segunda cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra, y la primera y tercera cadena de polipéptidos se unen a la otra. El dominio VL de la primera cadena de polipéptidos interactúa con el dominio VH de la segunda cadena de polipéptidos para formar un primer sitio de unión

funcional que es específico para el primer antígeno (*p.ej.*, CD32B o CD79b). Asimismo, el dominio VL de la segunda cadena de polipéptidos interactúa con el dominio VH de la primera cadena de polipéptidos para formar un segundo sitio de unión de antígenos que es específico para el segundo antígeno (*p.ej.*, CD79b o CD32B, dependiendo de la identidad del primer antígeno). Por lo tanto, la selección de los dominios VL y VH de la primera y segunda cadena de polipéptidos se coordinan, de manera que las dos cadenas de polipéptidos incluyen en forma colectiva a los dominios VL y VH capaces de unirse a CD32B y CD79b (*p.ej.*, incluyen VL_{CD32B}/VH_{CD32B} y VL_{CD79b}/VH_{CD79b}) (**Figura 1**). En forma colectiva, cada dominio VL y VH, y el vinculador interviniente que los separa se mencionan como el Dominio de unión de antígenos de la molécula.

El dominio Fc de los diacuerpos Fc del presente invento puede ser una región Fc completa (*p.ej.*, una región Fc IgG completa) o solamente un fragmento de una región Fc completa. Aunque el dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del presente invento puede poseer la capacidad de unirse a uno o más receptores Fc (*p.ej.*, FcγR(s)), preferentemente dicho dominio Fc provocará una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (relativo a la unión exhibida mediante una región Fc sin manipular) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc de unirse a dichos receptores. El dominio Fc de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del presente invento puede incluir algunos o todos los dominios CH2 y/o algunos o todos los dominios CH3 de una región Fc completa, o puede incluir una secuencia variante CH2 y/o variante CH3 (que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más eliminaciones respecto de los dominios CH2 o CH3 de una región Fc completa). El dominio Fc de los diacuerpos Fc

monovalente biespecífico del presente invento puede incluir porciones de polipéptidos no Fc, o puede incluir porciones de regiones Fc completas no naturales, o puede incluir orientaciones que ocurren en forma no natural de los dominios CH2 y/o CH3 (como por ejemplo, dos dominios CH2 o dos dominios CH3, o en la dirección de terminal N a terminal C, un dominio CH3 vinculado a un dominio CH2, etc.).

La primera cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b preferido incluye (en la dirección de terminal N a terminal C): una terminación amínica, un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc IgG (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos, y más preferentemente los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos que provocará la unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (relativo a la unión exhibida mediante una región Fc sin manipular) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dichos receptores, un primer péptido de espaciador interviniente (Vinculador 1), el dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B o CD79b (p.ej., VL_{CD32B} o VL_{CD79b}), un segundo péptido de espaciador interviniente (Vinculador 2), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (si dicha primera cadena de polipéptidos contiene VL_{CD32B}) o CD32B (si dicha primera cadena de polipéptidos contiene VL_{CD79b}), un tercer péptido de espaciador interviniente que contiene cisteína (Vinculador 3), un dominio que promueve el heterodímero, un cuarto péptido de espaciador opcional (Vinculador 4) para proporcionar una estabilización mejorada al dominio de promoción de heterodímero y un extremo C (**Figura 1**).

La segunda cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b preferido incluye (en

la dirección de terminal N a terminal C): una terminación amínica, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b o a CD32B (p.ej., VL_{CD79b} o VL_{CD32B}, dependiendo del dominio VL seleccionado para la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo), un péptido de vinculador interviniente (vinculador 2), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (si dicha segunda cadena de polipéptidos contiene VL_{CD79b}) o CD32B (si dicha segunda cadena de polipéptidos contiene VL_{CD32B}), un péptido espaciador que contiene cisteína (Vinculador 3), un dominio que promueve un heterodímero, y un extremo C (**Figura 1**).

La tercera cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b preferido incluye (en la dirección terminal N a terminal C): una terminación amínica, un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc IgG (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos) que tiene el mismo isotipo que el dominio Fc de la primera cadena de polipéptidos y un extremo C. Preferentemente, el dominio Fc de la tercera cadena de polipéptidos provocará una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (relativa a la unión exhibida mediante una región Fc sin manipular) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dichos receptores (**Figura 1**).

El péptido que contiene cisteína (Péptido 1) de la primera y tercera posición puede ser incluido de la misma secuencia de aminoácidos o de diferentes secuencias de aminoácidos, y contendrá 1, 2, 3 o más residuos de cisteína. Un péptido 1 preferido en forma particular tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO:1**): DKTHTCP₂PCP. El primer péptido de espaciador interviniente (Vinculador 1) incluye la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO:2**): APSSS, y más

preferentemente tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO:3**): APSSSPME. Un segundo péptido de espaciador interviniente preferido (Vinculador 2) que tiene la secuencia es **SEC ID NRO:4**: GGGSGGGG. El tercer péptido de espaciador interviniente que contiene cisteína preferida (Vinculador 3) contendrá 1, 2, 3 o más cisteínas. Un péptido de espaciador que contiene cisteína preferida (Vinculador 3) que tiene la secuencia es **SEC ID NRO:5**: GGCGGG. Un cuarto péptido de espaciador preferido (Vinculador 4) tiene la secuencia GGG o es **SEC ID NRO:6**: GGGNS.

Más preferentemente, el largo del péptido de vinculador interviniente (Vinculador 2, que separa dichos dominios VL y VH) se selecciona para evitar en forma sustancial o completa los dominios VL y VH de la cadena de polipéptidos de unirse a la otra. Por lo tanto, los dominios VL y VH de la primera cadena de polipéptidos son incapaces en forma sustancial o completa de unirse a la otra. Asimismo, los dominios VL y VH de la segunda cadena de polipéptidos son incapaces en forma sustancial o completa de unirse a la otra.

Los dominios que promueven un heterodímero de los primeros y segundos polipéptidos difieren del otro y están diseñados para asociarse con el otro para promover la asociación de la primera y la segunda cadena de polipéptidos. Por lo tanto, en una realización preferida, una de esas cadenas de polipéptidos se diseñará para contener un dominio "E-coil" que promueve un heterodímero (**SEC ID NRO:7**):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

cuyos residuos formarán una carga negativa a un pH 7, mientras que la otra de las dos cadenas de polipéptidos será diseñada para contener un dominio "K-coil" que promueve un heterodímero (**SEC ID NRO:8**):

KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

cuyos residuos formarán una carga positiva a un pH 7. La presencia de dichos dominios cargados promueve la asociación entre el primer y el segundo polipéptido, y por lo tanto, estimula la heterodimerización. Es inmaterial qué espiral se proporciona a qué cadena, en tanto los espirales usados en la primera y segunda cadena de polipéptidos difieren, de manera que estimulan la heterodimerización entre dichas cadenas.

Según se indica anteriormente, los dominios CH2 y CH3 del primer y tercer polipéptido mutan preferentemente para reducir (relativo a la region Fc sin manipular) o eliminan la unión a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b). Dichas mutaciones se conocen bien en el material e incluyen sustituciones de aminoácidos en posiciones 234 y 235, una sustitución en la posición 265 o una sustitución en la posición 297 (ver, por ejemplo, Patente de los EE. UU. Nro. 5,624,821, incorporada en el presente mediante referencia). En una realización preferida, el dominio CH2 y CH3 incluye una sustitución en la posición 234 con alanina y 235 con alanina.

Los dominios CH2 y/o CH3 del primer y tercer polipéptido no deben ser necesariamente idénticos, y en forma ventajosa se modifican para estimular el complejo entre los dos polipéptidos. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos (preferentemente una sustitución con un aminoácido que incluye un grupo de lado robusto que forma una 'perilla', *p.ej.*, triptófano) puede introducirse en el dominio CH2 o CH3 de manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado en forma similar y obligará al dominio mutado a emparejarse con un dominio en que una mutación complementaria o de ajuste se haya diseñado, *p.ej.*, 'el agujero' (*p.ej.*, una sustitución con glicina). Dichos

conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que incluya la molécula de diacuerpo Fc, y asimismo, diseñado en cualquier porción de las cadenas de polipéptidos de dicho par. Los métodos de diseño de proteínas favorecen la heterodimerización sobre la homodimerización son conocidas en el material, en particular, con respecto al diseño de las moléculas similares a la inmunoglobulina, y se incluyen en el presente (ver p.ej., Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101; cada uno de los cuales se incorpora en el presente como referencia en su totalidad). Preferentemente, la 'perilla' se diseña en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena de polipéptidos y el 'agujero' se diseña en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena de polipéptidos. Por lo tanto, la 'perilla' ayudará a evitar que la primera cadena de polipéptidos se homodimerice a través de sus dominios CH2 y/o CH3. Como la tercera cadena de polipéptidos contiene preferentemente la sustitución del 'agujero', heterodimerizará con la primera cadena de polipéptidos, además de homodimerizará con si misma. Una perilla preferida se crea al modificar una región Fc IgG nativa para contener la modificación T366W. Un agujero preferido se crea modificando una región Fc IgG nativa para contener la modificación T366S, L368A y Y407V. Para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc monovalente biespecífico que incluye la primera, segunda y tercera cadena de polipéptidos, el sitio

de unión A de la proteína de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena de polipéptidos muta preferentemente mediante la sustitución de aminoácidos en la posición 435 (H435R). Para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc monovalente biespecífico que incluye a la primera, segunda y tercera cadena de polipéptidos, el sitio de unión A de la proteína de los dominios CH2 y CH3 de la tercera cadena de polipéptidos muta preferentemente mediante la sustitución de aminoácidos. Por lo tanto, el homodímero de la cadena de polipéptidos no se unirá a la proteína A, en tanto que el diacuerpo Fc monovalente biespecífico retendrá su capacidad de unirse a la proteína A a través del sitio de unión A de la proteína en la primera cadena de polipéptidos.

Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos presentes en la primera cadena de polipéptidos es (**SEC ID NRO:9**):

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

Una secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos presente en la tercera cadena de polipéptidos es (**SEC ID NRO:10**):

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

Una secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**) es (**SEC ID NRO:11**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQEIS GYLSWLQQKP
 GKAPRRLIYA ASTLD SGVPS RFSGSESGTE FTLTISSLQP EDFATYYCLQ
 YFSYPLTFGG GTKVEIK

Una secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD32B (**VH_{CD32B}**) es (**SEC ID NRO:12**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DAWMDWVRQA
 PGKGLEWVAE IRNKAKNHAT YYAESVIGRF TISRDDAKNS LYLQMNSLRA
 EDTAVYYCGA LGLDYWGQGT LVTVSS

Una secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD79b (**VL_{CD79b}**) es (**SEC ID NRO:13**):

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLN DSDGKTYLNW
 FQQRPGQSPN RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV
 YYCWQGTTHFP LTFGGGTKLE IK

Una secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**) es (**SEC ID NRO:14**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA
 PGQGLEWIGM IDPSDSETHY NQKFKDRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD
 TAVYYCARAM GYWGQGTTVT VSS

Por lo tanto, una secuencia preferida para la primera cadena de polipéptidos tiene la estructura, en la dirección de terminal N a terminal C, de: Péptido 1, un dominio CH2-CH3 de una región Fc IgG, Vinculador 1, un dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**), Vinculador 2, un dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**), Vinculador 3, un dominio E-coil, un Vinculador 4 y un extremo C. La secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido preferido es de (**SEC ID NRO:15**):

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMEH ALHNHYTQKS LSLSPGKAPS SSPMEDIQMT
 QSPSSLSASV GDRVITTCRA SQEISGYLSW LQQKPGKAPR RLIYAASITLD

```

SGVPSRFSGS   ESGTEFTLTI   SSLQPEDFAT   YYCLQYFSYP   LTFGGGGTKVE
IKGGGSGGGG   QVQLVQSGAE   VKKPGASVKV   SCKASGYTFT   SYWMNWVRQA
PGQGLEWIGM   IDPSDSETHY   NQKFKDRVMT   TTDSTSTAY    MELRSLRSDD
TAVYYCARAM   GYWGQGTTVT   VSSGGCGGGE   VAALEKEVAA   LEKEVAALEK
EVAALEKGGG NS

```

En **SEC ID NRO:15**, los residuos de aminoácidos 1-10 son Péptido 1 (**SEC ID NRO:1**), los residuos de aminoácidos 11-227 son los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos IgG (**SEC ID NRO:9**), los residuos de aminoácidos 228-235 son Vinculador 1 (**SEC ID NRO:3**), los residuos de aminoácidos 236-342 es el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD32B (**VL_{CD32B}**) (**SEC ID NRO:11**), los residuos de aminoácidos 343-350 son Vinculador 2 (**SEC ID NRO:4**), los residuos de aminoácidos 351-463 es el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD79b (**VH_{CD79b}**) (**SEC ID NRO:14**), los residuos de aminoácidos 464-469 son el Vinculador 3 (**SEC ID NRO:5**), los residuos de aminoácidos 470-497 son el dominio E-coil que promueve el heterodímero (**SEC ID NRO:7**), y los residuos de aminoácidos 498-502 son el vinculador 4 (**SEC ID NRO:6**).

Un polinucleótido preferido que codifica la primera cadena de polipéptidos tiene la secuencia (**SEC ID NRO:23**):

```

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgggggga
ccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctg
aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagc
acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagt
acaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagc
caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacc
agaaccaggtcagcctgtggtgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgg
agtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactc
cgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcc

```

tctccctgtctccgggtaaagcccccttccagctcccctatggaagacatccagatgaccca
 gtctccatcctccttatctgcctctgtgggagatagagtcaccatcacttgtcgggcaagt
 caggaaattagtggttacttaagctggctgcagcagaaaccagggaaggccccctagacgcc
 tgatctacgccgcacatccacttttagattctgggtgtcccatccagggttcagtggcagtgaagtc
 tgggaccgagttcacccctaccatcagcagccttcagcctgaagattttgcaacctattac
 tgtctacaatattttagttatccgctcacgttcggaggggggaccaaggtggaaataaaag
 gaggcggatccggcgccggaggccaggttcagctgggtgcagtctggagctgaggtgaagaa
 gcctggcgccctcagtgaaggtctcctgcaaggcttctgggttacacctttaccagctactgg
 atgaactgggtgcgacaggccccctggacaagggttgagtggatcggaatgattgatcctt
 cagacagtgaactcactacaatcaaaagttcaaggacagagtcaccatgaccacagacac
 atccacgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtat
 tactgtgagagctatgggctactgggggcaagggaccacgggtcacctctcctccggag
 gatgtggcggtggagaagtggccgcactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggt
 cgctgcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaaggcgccgggaactct

Una secuencia preferida para la segunda cadena de polipéptidos es (**SEC ID NRO:16**):

DVMTQSP	LPVTLGQPAS	ISCKSSQSL	DSDGKTYLNW
FQQRPGQSPN	RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	GSGTDFTLKI
YYCWQGFTHFP	LTFGGGTKLE	IKGGSGGGG	EVQLVESGGG
SCAASGFTFS	DAWMDWVRQA	PGKGLEWVAE	IRNKAKNHAT
TISRDDAKNS	LYLQMNSLRA	EDTAVYYCGA	LGLDYWGQGT
LVTVSSGGCG	GGKVAALKEK	VAALKEKVAA	LKEKVAALKE

En la **SEC ID NRO:16**, los residuos de aminoácidos 1-112 es el dominio VL de un anticuerpo que se une a CD79b (**VL_{CD79b}**) (**SEC ID NRO:13**), los residuos de aminoácidos 113-120 son el Vinculador 2 (**SEC ID NRO:4**), los residuos de aminoácidos 121-236 son el dominio VH de un anticuerpo que se une a CD32B (**VH_{CD32B}**) (**SEC ID NRO:12**), los residuos de aminoácidos 237-242 son el Vinculador 3 (**SEC ID NRO:5**), y los residuos de aminoácidos 243-270 son el dominio K-coil promotor del heterodímero (**SEC ID NRO:8**).

Un polinucleótido preferido que codifica la segunda cadena de polipéptidos tiene la secuencia (**SEC ID NRO:24**):

gatgttgatgactcagtctccactctccctgcccgtcacccttggacag
 ccggcctccatctcctgcaagtcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaagacatatt
 tgaattggtttcagcagaggccaggccaatctccaaaccgcctaatttatctggtgtctaa
 actggactctgggggtcccagacagattcagcggcagtggggtcaggcactgatttcacactg
 aaaatcagcaggggtggaggctgaggatggtgggggtttattactgctggcaagggtacacatt
 ttccgctcacgttcggcggaggggaccaagcttgagatcaaaggaggcggtaccggcggcgg
 aggcgaagtgcagcttgtggagtctggaggaggcttggtgcaacctggaggatccctgaga
 ctctcttgtgccgcctctggattcacttttagtgacgcctggatggactgggtccgtcagg
 ccccaggcaaggggcttgagtgggttgcgtgaaattagaaacaaagctaaaaatcatgcaac
 atactatgctgagtctgtgataggagggttcaccatctcaagagatgacgccccaaacagt
 ctgtacctgcaaataaacagcttaagagctgaagacactgccgtgtattactgtggggctc
 tgggccttgactactggggccaaggcaccctgggtgaccgtctcctccggaggatgtggcgg
 tggaaaagtggccgcactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaagggtcgccgcactt
 aaggaaaagggtcgagccctgaaagag

Una secuencia preferida para la tercera cadena de polipéptidos es **SEC ID NRO:17**:

DKTHTCPPCP	APEAAGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT
CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY
QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT
NQVSLSCAVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS
TVDKSRWQQG	NVFSCSV MHE	ALHNRYTQKS	LSLSPGK

En la **SEC ID NRO:17**, los residuos de aminoácidos 1-10 son el Péptido 1 (**SEC ID NRO:1**), y los residuos de aminoácidos 11-227 son los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos IgG (**SEC ID NRO:10**).

Un polinucleótido preferido que codifica la tercera cadena de polipéptidos tiene la secuencia (**SEC ID NRO:25**):

gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcgggggga
 ccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgaccctg
 aggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggta
 cgtggacggcgtggagggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagc
 acgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagt
 acaagtgcagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagc

caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacc
 aagaaccaggtcagcctgagttgcgagctcaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtgg
 agtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactc
 cgacgggtccttcttctcctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcc
 tctccctgtctccgggtaaa

Según se divulga en WO 2012/018687, para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de moléculas de diacuerpos, las moléculas pueden modificarse para contener una porción de polipéptidos de una proteína de unión de suero en uno o más de los términos de la molécula de diacuerpos. Más preferentemente, dicha porción de polipéptidos de una proteína de unión de suero se instalará en el extremo C de la molécula de diacuerpos. Una porción particularmente preferida de polipéptidos de una proteína de unión de suero para este fin es el Dominio de unión de albúminas (ABD) de la proteína G estreptocócica. Se prefiere en particular el Dominio de unión de albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa estreptococo G148.

El Dominio de unión de albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa Estreptococo G148 consiste en 46 residuos de aminoácidos que forman un manojo de tres helices y tiene una especificidad amplia de unión de albúmina (Johansson, M.U. et al. (2002) "*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules*," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). La albúmina es la proteína más abundante en el plasma y tiene una vida media de 19 días en humanos. La albúmina posee varios sitios de unión de pequeñas moléculas que le permite unir en forma no covalente a otras proteínas y por ello extienden las vidas medias del suero. Preferentemente, un vinculador corto (Vinculador 5) (como GGGS (**SEC ID NRO:18**) o GGGNS (**SEC ID NRO:6**) se emplea para separar el E-coil (o K-coil) de dicha cadena de

polipéptidos del Dominio de unión de albúminas. Un Dominio de unión de albúminas (**ABD**) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NRO:19**):

LAELAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALID EILAALP

Diacuerpos Fc alternativos CD32B x CD79b del presente invento

Una molécula de diacuerpo Fc monovalente biespecífico alternativo CD32B x CD79b del presente invento aparece en forma esquemática en la **Figura 2**. Dichas moléculas de diacuerpo Fc alternativas CD32B x CD79b poseen tres cadenas de polipéptidos, de las cuales la primera y la segunda cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra, y la primera y la tercera cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra. Las moléculas del diacuerpo Fc monovalente biespecífico alternativo CD32B x CD79b difieren en el orden de sus dominios relativos al orden presente en las moléculas del diacuerpo Fc monovalente biespecífico preferido CD32B x CD79b. Sin embargo, como en el caso del diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b, el Dominio VL de la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc monovalente biespecífico alternativo CD32B x CD79b interactúa con el dominio VH de la segunda cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc monovalente biespecífico alternativo CD32B x CD79b para formar un primer sitio de unión de antígenos funcionales que es específico para el primer antígeno (*p.ej.*, CD32B o CD79b). Asimismo, el Dominio VL de la segunda cadena de polipéptidos del diacuerpo alternativo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b interactúa con el dominio VH de la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo alternativo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b para formar un segundo sitio de unión de antígenos funcionales que sea específico para el segundo antígeno (*p.ej.*, CD79b o CD32B, dependiendo de la identidad del primer antígeno). Por lo tanto, la

selección de los dominios VL y VH de la primera y segunda cadena de polipéptidos se coordinan, de manera que las dos cadenas de polipéptidos incluyen en forma colectiva los dominios VL y VH capaces de unirse a CD32B y CD79b (*p.ej.*, incluyen VL_{CD32B}/VH_{CD32B} y VL_{CD79b}/VH_{CD79b}) (**Figura 2**). En forma colectiva, cada uno de dichos dominios VL y VH, y el vinculador interviniente que los separa, se denomina Dominio de unión de antígenos de la molécula.

La primera cadena de polipéptidos de dicho diacuerpo Fc alternativo CD32B x CD79b, en la dirección de terminal N a terminal C, una terminación amínica, el dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B o CD79b (*p.ej.*, VL_{CD32B} o VL_{CD79b}), un péptido de espaciador interviniente (vinculador 2), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (si dicha primera cadena de polipéptidos contiene VL_{CD32B}) o CD32B (si dicha primera cadena de polipéptidos contiene VL_{CD79b}), un tercer péptido de espaciador interviniente que contiene cisteína (Vinculador 3), un dominio que promueve el heterodímero, un cuarto péptido de espaciador opcional (Vinculador 4) para ofrecer una estabilización mejorada al dominio que promueve un heterodímero (preferentemente un dominio E-coil), un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc IgG (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos y un extremo C. Preferentemente, el dominio Fc de la primera cadena de polipéptidos provocará la unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (relativa a la unión exhibida mediante una región Fc sin manipular) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dichos receptores (**Figura 2**).

La segunda cadena de polipéptidos de dicho diacuerpo Fc alternativo CD32B x CD79b incluye, en la

dirección de terminal N a terminal C, una terminación amínica, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b o CD32B (p.ej., VL_{CD79b} o VL_{CD32B}, dependiendo del dominio VL seleccionado para la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo), un péptido de vinculador interviniente (Vinculador 2), un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (si dicha segunda cadena de polipéptidos contiene VL_{CD79b}) o CD32B (si dicha segunda cadena de polipéptidos contiene VL_{CD32B}), un péptido de espaciador que contiene cisteína (Vinculador 3), un dominio que promueve un heterodímero (preferentemente un dominio K-coil), y un extremo C (**Figura 2**).

La tercera cadena de polipéptidos del diacuerpo Fc CD32B x CD79b preferido incluye, en la dirección de terminal N a terminal C, una terminación amínica, un péptido que contiene cisteína (Péptido 1), un dominio Fc IgG (preferentemente, los dominios CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos) que tienen el mismo isotipo que el dominio Fc de la primera cadena de polipéptidos y un extremo C. Preferentemente, el dominio Fc de la tercera cadena de polipéptidos provocará una unión reducida a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (relativa a la unión exhibida mediante una región Fc sin manipular) o eliminará sustancialmente la capacidad de dicho dominio Fc para unirse a dichos receptores (**Figura 2**).

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones del invento incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (p.ej., composiciones impuras o no esterilizadas) y composiciones farmacéuticas (p.ej., composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que pueden utilizarse en la preparación de formas de dosis unitarias. Dichas composiciones incluyen una

cantidad efectiva en forma profiláctica o terapéutica de diacuerpos Fc CD32B x CD79b del presente invento, y en particular cualquiera de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b divulgados en el presente o una combinación de dichos agentes y un portador aceptable en forma farmacéutica. Preferentemente, las composiciones del invento incluyen una cantidad efectiva en forma profiláctica o terapéutica de una o más moléculas del invento y un portador aceptable en forma farmacéutica.

El invento también incluye composiciones farmacéuticas que incluyen dichos diacuerpos Fc CD32B x CD79b y un segundo anticuerpo terapéutico (*p.ej.*, anticuerpo monoclonal específico de antígenos de enfermedad antiinflamatoria o autoinmune) que sea específico para un antígeno de enfermedad antiinflamatoria o autoimmune, y un portador aceptable en forma farmacéutica.

En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal, o enumerado en la Farmacopeia estadounidense u otra farmacopeia reconocida en forma general para su uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (*p.ej.*, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra la terapia. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos esterilizados, como agua y aceites, incluidos los del petróleo, animales, vegetales o de origen sintético, como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando se administra la composición farmacéutica en forma intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de glicerol y dextrosa acuosa también pueden usarse como portadores de líquidos, en particular para soluciones

inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener aumentos pequeños de agentes humedecedores o emulsificantes, o agentes de amortiguación de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, fórmulas de liberación sostenida y similares.

En general, los ingredientes de composiciones del invento se suministran en forma separada o mezclada juntas en una forma de dosis unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un contenedor sellado herméticamente, como una ampolla o bolsita que indica la cantidad del agente activo. Donde se administrará la composición mediante la infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene el agua o solución salina esterilizada de grado farmacéutico. Donde se administra la composición mediante la inyección, una ampolla de agua esterilizada para la inyección o solución salina puede proporcionarse para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones del invento pueden formularse como formas neutrales o salinas. Las sales aceptables en forma farmacéutica incluyen, entre otras, a las formadas con aniones, como los derivados de ácidos clorhídricos, fosfóricos, acéticos, oxálicos, tartáricos, etc., y los formados con cationes como los derivados de sodio, potasio, amoníaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, etanol 2-etilamino, histidina, procaina, etc.

El invento también proporciona un paquete o kit farmacéutico que incluye uno o más contenedores llenos con dichos diacuerpos Fc divulgados CD32B x CD79b solos o con dicho portador farmacéuticamente aceptable. En forma adicional, uno o más agentes terapéuticos o profilácticos útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el paquete o kit farmacéutico. El invento también proporciona un paquete o kit farmacéutico que incluye uno o más contenedores llenos con uno o más ingredientes de las composiciones farmacéuticas del invento. En forma opcional asociada con dichos contenedores, puede existir una notificación en la forma prescripta mediante una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuya notificación refleja la aprobación mediante la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

El presente invento ofrece kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una realización, un kit incluye una o más moléculas del invento. En otra realización, un kit asimismo incluye uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, útiles para el tratamiento de una enfermedad autoimmune o inflamatoria, en uno o más contenedores. En otra realización, un kit asimismo incluye uno o más anticuerpos que se unen a uno o más antígenos de la enfermedad autoimmune o inflamatoria asociados con la enfermedad autoimmune o inflamatoria. En ciertas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un quemoterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es una terapia biológica u hormonal.

Usos de las composiciones del invento

Los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del presente invento tienen la capacidad de tratar cualquier trastorno o enfermedad asociado con o caracterizado por la expresión de

CD79b o tener un componente de la célula B a la enfermedad. Por lo tanto, sin límite, las composiciones farmacéuticas que incluyen dichas moléculas pueden usarse en el diagnóstico o tratamiento de enfermedades o trastornos autoinmunes o inflamatorias.

Por lo tanto, el invento puede usarse para tratar, evitar, enlentecer la progresión de, y/o aliviar un síntoma de las enfermedades o trastornos mediados por la célula B, incluidos el rechazo del injerto, la enfermedad del injerto versus huésped (GvHD) y lupus eritomatoso sistémico (SLE).

Métodos de administración

Las composiciones del presente invento pueden proporcionarse para el tratamiento, profilaxis, y alivio de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de una composición farmacéutica del invento. En un aspecto preferido, dichas composiciones se purifican sustancialmente (p.ej., sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos colaterales no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero como un no primate (p.ej., bovino, equino, felino, canino, roedor, etc.) o un primate (p.ej., un mono como un mono cynomolgus o cangrejero, humanos, etc.). En una realización preferida, el sujeto es un humano.

Los diversos sistemas de entrega son conocidos y pueden usarse para administrar las composiciones del invento, p.ej., la encapsulación en los liposomas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, la endocitosis mediada por receptor (Ver, p.ej., Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol.

Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucléico como parte de un retroviral u otro vector, etc.

Los métodos de administración de un diacuerpo Fc monovalente biespecífico del invento incluyen, entre otros, administración parenteral (p.ej., intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso y subcutáneo), epidural, y mucosal (p.ej., rutas intranasales y orales). En una realización específica, las moléculas del invento se administran en forma intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante la infusión o la inyección del bolo, mediante la absorción a través de alineaciones epiteliales o mucocutáneas (p.ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, la administración pulmonar también puede usarse, p.ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización. Ver, p.ej., la patente de los EE. UU. Nros. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones PCT Nros. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903, cada uno de los cuales se incorpora en el presente como referencia en su totalidad.

El invento también ofrece que los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del invento se empaquen en un contenedor sellado herméticamente como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de dichas moléculas. En una realización, los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del invento se suministran como un polvo liofilizado esterilizado o concentrado libre de agua en un contenedor sellado herméticamente y puede reconstituirse, p.ej., con agua o solución salina a la concentración adecuada para la administración a un sujeto.

Preferentemente, los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del invento se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco en un contenedor sellado herméticamente a una dosis unitaria de al menos 5 µg, más preferentemente al menos 10 µg, al menos 15 µg, al menos 25 µg, al menos 50 µg, al menos 100 µg, o al menos 200 µg.

Los diacuerpos Fc liofilizados CD32B x CD79b del invento deben almacenarse entre 2 y 8 °C en su contenedor original y las moléculas deben administrarse dentro de las 12 horas, preferentemente dentro de las 6 horas, dentro de las 5 horas, dentro de las 3 horas, o dentro de 1 hora luego de ser reconstituidas. En una realización alternativa, los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del invento se suministran en forma líquida en un contenedor herméticamente sellado que indica la cantidad y la concentración de la molécula, proteína de fusión, o molécula conjugada. Preferentemente, la forma líquida de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del invento se suministra en un contenedor herméticamente sellado en que las moléculas están presentes a una concentración de al menos 1 µg/ml, más preferentemente al menos 2.5 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 50 µg/ml, o al menos 100 µg/ml.

La cantidad de diacuerpos Fc CD32B x CD79b del invento que será efectiva en el tratamiento, prevención o alivio de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración, y la seriedad del trastorno, y debe decidirse según el juicio del medico y cada circunstancia del paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse de las curvas de respuesta de la dosis derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o in vitro.

Para los diacuerpos Fc CD32B x CD79b incluidos por el invento, la dosis administrada a un paciente es generalmente de al menos alrededor de 0.01 $\mu\text{g/kg}$, al menos alrededor de 0.05 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 0.1 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 0.2 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 0.5 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 1 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 2 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 5 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 10 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 20 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 50 $\mu\text{g/kg}$, al menos de alrededor de 0.1 mg/kg, al menos de alrededor de 1 mg/kg, al menos de alrededor de 5 mg/kg, al menos de alrededor de 10 mg/kg, al menos de alrededor de 30 mg/kg, al menos de alrededor de 50 mg/kg, al menos de alrededor de 75 mg/kg, al menos de alrededor de 100 mg/kg, al menos de alrededor de 125 mg/kg, al menos de alrededor de 150 mg/kg o más del peso corporal del sujeto.

La dosis y frecuencia de administración de los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del invento pueden reducirse o alterarse al mejorar la ingesta y la penetración del tejido de los diacuerpos Fc moovalentes biespecíficos mediante modificaciones como, por ejemplo, lipidación.

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

En una realización específica, puede ser necesario administrar las composiciones farmacéuticas del invento localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede

lograrse mediante, por ejemplo, entre otros, infusión local mediante inyección, o por medio de un implante, que debe ser de material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas las membranas, como las membranas sikalastic o fibras. Preferentemente, al administrar una molécula del invento, debe tenerse cuidado de usar materiales en los que la molécula no se absorbe.

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

En aún otra realización, las composiciones pueden entregarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Toda técnica conocida para una de las habilidades en el material puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que incluyen una o más moléculas del invento. Ver, p.ej., Patente de los EE. UU. Nro. 4,526,938; publicación PCT WO 91/05548; publicación PCT WO 96/20698; Ning et al. (196) "*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel*," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions*," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al. (1997) "*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada uno de los cuales se

incorpora en el presente como referencia en su totalidad. En una realización, una bomba puede usarse en un sistema de liberación controlado (Ver 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). En otra realización, los materiales poliméricos pueden usarse para alcanzar una liberación controlada de anticuerpos (ver p.ej., MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1):105-112; Patente de los EE. UU. Nro. 5,679,377; Patente de los EE. UU. Nro. 5,916,597; Patente de los EE. UU. Nro. 5,912,015; Patente de los EE. UU. Nro. 5,989,463; Patente de los EE. UU. Nro. 5,128,326; Publicación PCT Nro. WO 99/15154; y Publicación PCT Nro. WO 99/20253). Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, entre otros, a poli(2-hidroxietil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-vinilo acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicolidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilo pirrolidona), poli(vinilo alcohol), poliacrilamida,

poli(etileno glicol), polilactidos (PLA), poli(lactido-co-glicolidos) (PLGA), y poliortoesteres. En aún otra realización, un sistema de liberación controlada puede colocarse cerca del objetivo terapéutico (p.ej., los pulmones), y por lo tanto requiere solamente una fracción de la dosis sistémica (ver, p.ej., Goodson, en *MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). En otra realización, las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada se usan según Dunn *et al.* (Ver EE. UU. 5,945,155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema de polímeros. La implantación puede ocurrir generalmente en cualquier lugar dentro del cuerpo del paciente que necesita tratamiento terapéutico. En otra realización, se usa un sistema de entrega sostenida no polimérica, en donde un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto se usa como sistema de entrega de fármacos. Al momento de la implantación en el cuerpo, el solvente orgánico del implante disipará, dispersará, o lixiviará de la composición en el fluido de tejidos circundantes, y el material no polimérico coagulará gradualmente o se precipitará para formar una matriz sólida y microporosa (Ver EE. UU. 5,888,533).

Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," *Science* 249:1527-1533). Toda técnica conocida para una de las habilidades en el material puede usarse para producir formulaciones de liberación sostenida que incluyen uno o más agentes terapéuticos del invento. Ver, p.ej., Patente de los EE. UU. Nro. 4,526,938; Publicaciones internacionales Nros. WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy*

& Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, cada uno de los cuales se incorpora en el presente como referencia en su totalidad.

En una realización específica donde la composición del invento es un ácido nucleico que codifica un diacuerpo Fc monovalente biespecífico del invento, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su diacuerpo Fc monovalente biespecífico codificado, mediante la construcción como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y la administración para que se vuelva intracelular, *p.ej.*, mediante el uso de un vector retroviral (Ver Patente de los EE. UU. Nro. 4,980,286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de un bombardeo de micropartículas (*p.ej.*, una pistola de genes; Biobalística, Dupont), o un revestimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante la administración en vínculo con un péptido similar a homeobox que se conoce que ingresa al núcleo (Ver *p.ej.*, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), etc. En forma alternativa, un ácido nucleico puede introducirse en forma intracelular y se incorpora en el ADN de la célula huésped para la expresión mediante recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad efectiva tanto terapéutica como profiláctica de los

diacuerpos Fc CD32B x CD79b del invento puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto es tratado con moléculas del invento una vez por semana entre alrededor de 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, más preferentemente entre alrededor de 3 a 7 semanas, e incluso más preferentemente alrededor de 4, 5 o 6 semanas. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas del invento se administran una vez al día, dos veces al día, o tres veces al día. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis efectiva de las moléculas usadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir en el transcurso de un tratamiento en particular.

Ahora que ya describimos en general el invento, podrá ser comprendido más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan mediante ilustraciones y no intentan limitarse al presente invento a menos que se especifique.

Ejemplo 1

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

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

Tabla 1

Diacuerpo Fc bienespecífico preferido CD32B x CD79b	Polipéptidos substitutivos (en la dirección de terminal N a terminal C)
Primera cadena de polipéptidos (SEC ID NRO:15)	SEC ID NRO:1 SEC ID NRO:9 SEC ID NRO:3 SEC ID NRO:11 SEC ID NRO:4 SEC ID NRO:14 SEC ID NRO:5 SEC ID NRO:7 SEC ID NRO:6
Segunda cadena de polipéptidos (SEC ID NRO:16)	SEC ID NRO:13 SEC ID NRO:4 SEC ID NRO:12 SEC ID NRO:5 SEC ID NRO:8
Tercera cadena de polipéptidos (SEC ID NRO:17)	SEC ID NRO:1 SEC ID NRO:10

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

Para demostrar más las ventajas de dicho diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b, también se prepararon dos diacuerpos CD32B x CD79b que contienen no Fc. Estos diacuerpos se componen de dos cadenas de polipéptidos, y difieren en que uno de los diacuerpos (el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD)) contiene un dominio de unión de albúminas, en tanto que el otro (el diacuerpo CD32B x CD79b) no:

Diacuerpo CD32B x CD79b (ABD)

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

Secuencia de aminoácidos de la primera cadena de polipéptidos (SEC ID NRO:20):

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQEIS	GYLSWLQQKP
GKAPRRLIYA	ASTLD SGVPS	RFSGSESGTE	FTLTISSLQP
YFSYPLTFGG	GTKVEIKGGG	SGGGGQVQLV	QSGAEVKKPG
GYTFTSYWMN	WVRQAPGQGL	EWIGMIDPSD	SETHYNQKFK
TSTAYMELRS	LRSDDTAVYY	CARAMGYWGQ	GTTVTVSSGG
KEVAALEKEV	AALEKEVAAL	EKG GGS LAEA	KVLANRELDK
IDNAKSAEGV	KALIDEILAA	LP	

Secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de polipéptidos (SEC ID NRO:21):

DVVM TQSPLS	LPVTLGQPAS	ISCKSSQSL L	DSDGKTYL NW
FQQRPGQSPN	RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	SGGTDFTLKI
			SRVEAEDVG V

```

YYCWQGTHFP    LTFGGGGTKLE    IKGGGSGGGG    EVQLVESGGG    LVQPGGSLRL
SCAASGFTFS    DAWMDWVRQA    PGKGLEWVAE    IRNKAKNHAT    YYAESVIGRF
TISRDDAKNS    LYLQMNSLRA    EDTAVYYCGA    LGLDYWGQGT    LVTVSSGGCG
GGKVAALKEK    VAALKEKVAA    LKEKVAALKE

```

Diacuerpo CD32B x CD79b

El diacuerpo CD32B x CD79b difiere del diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) en que no tiene un dominio de unión de albúminas. Por lo tanto, dicho diacuerpo se forma desde una primera cadena de polipéptidos que incluye, en la dirección de terminal N a terminal C, el dominio VL de un anticuerpo que une CD32B (**VL_{CD32B}**), Vinculador 2, el dominio VH de un anticuerpo que une CD79b (**VH_{CD79b}**), Vinculador 3, el dominio E-coil, y un extremo C. La segunda cadena de polipéptidos incluye, en la dirección de terminal N a terminal C, el dominio VL de un anticuerpo que une CD79b (**VL_{CD79b}**), Vinculador 2, el dominio VH de un anticuerpo que une CD32B (**VH_{CD32B}**), Vinculador 3, el dominio K-coil y un extremo C. La secuencia de aminoácidos de la primera cadena de polipéptidos de este diacuerpo es (**SEC ID NRO:22**):

```

DIQMTQSPSS    LSASVGDRVT    ITCRASQEIS    GYLSWLQQKP
GKAPRRLIYA    ASTLD SGVPS    RFSGSESGTE    FTLTISSLQP    EDFATYYCLQ
YFSYPLTFGG    GTKVEIKGGG    SGGGQVQLV    QSGAEVKKPG    ASVKV SCKAS
GYTFTSYWMN    WVRQAPGQGL    EWIGMIDPSD    SETHYNQKFK    DRVTMTTDT S
TSTAYMELRS    LRSDDTAVYY    CARAMGYWGQ    GTTVTVSSGG    CGGGEVAAL E
KEVAALKEK    AALEKEVAAL    EK

```

La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de polipéptidos de este diacuerpo es (**SEC ID NRO:21**, que se presenta anteriormente.

Ejemplo 2

Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b inhiben la proliferación celular B primaria humana

Para demostrar aún más la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del presente invento para

amortiguar o inhibir el sistema inmune, el diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b que se describe anteriormente fue incubado en presencia de las células B humanas primarias, obtenidas de dos donantes. Se monitoreó la proliferación mediante la ingesta de ^3H -TdR luego de 48 horas en presencia de IgM Fc μ F(ab) $_2$ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) anti humana de cabra y distintas concentraciones de un diacuerpo Fc CD32B x CD79b o un diacuerpo ABD CD32B x CD79b. Los resultados aparecen en la **Figura 3A** (Donante 1) y la **Figura 3B** (Donante 2), e indican una reducción marcada en la proliferación de la célula B en presencia del diacuerpo Fc CD32B x CD79b o el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD).

Ejemplo 3

Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b inhiben la señal en células B de memoria y Naïve

Para demostrar aún más la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del presente invento para amortiguar o inhibir la señal del sistema inmune mediante las células B, las células B de memoria o naïve purificadas fueron incubadas durante 30 minutos en presencia de IgM Fc μ (anti- μ) (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) antihumano de cabra solamente o en la presencia adicional del diacuerpo Fc preferida CD32B x CD79b descrita anteriormente. Como se vio en la **Figura 4A** (células B naïve) y la **Figura 4B** (células B de memoria), la presencia del diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b, el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) o el diacuerpo CD32B x CD79b, todo con señal de célula B marcadamente reducida.

Ejemplo 4

Diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos CD32B x CD79b inhiben la proliferación de las células B del paciente con SLE

Para demostrar aún más la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del presente invento para

amortiguar o inhibir la señal del sistema inmune mediante las células B, las células B de un paciente que sufre de lupus eritomatoso sistémico (SLE) fueron incubadas en presencia de solamente IgM Fc μ (anti- μ) antihumano de cabra o en la presencia adicional del diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b descrito anteriormente. Se monitoreó la proliferación mediante la ingesta de ^3H -TdR.

Como aparece en la **Figura 5A**, se descubrió que el diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b descrito anteriormente podía unirse a CD32B y a CD79b. La **Figura 5B**, demuestra que la provisión del IgM (GAH anti- μ) antihumano de cabra provocó una proliferación en aumento de las células B, relativo al control, y que la administración adicional del diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b descrito anteriormente o el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) inhiben en forma marcada el alcance de dicha proliferación.

Se descubrió que la capacidad del diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b descrito anteriormente o del diacuerpo CD32B x CD79b (ABD) para disminuir el alcance de la proliferación de la célula B de individuos que sufren de SLE era independiente del estado de la enfermedad. El alcance de la reducción de la proliferación de la célula B en pacientes con SLE activo o inactivo era de aproximadamente del 40 % relativo a la proliferación observada en presencia de solamente el IgM (GAH anti- μ) antihumano de cabra, y por lo tanto, era independiente del estado de la enfermedad (**Figura 5C**). La **Figura 5C** asimismo demuestra que el diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b proporcionó mayor inhibición que el diacuerpo CD32B x CD79b (ABD).

Ejemplo 5

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

Para demostrar aún más la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del presente invento para amortiguar o inhibir la señal del sistema inmune mediante las células B, la célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) humana fue inyectada en ratones NSG inmunodeficientes (Agliano, A. et al. (2008) "Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rgamma Null Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains," Int. J. Cancer 123(9):2222-2227; Sanchez, P.V. et al. (2009) "A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia," Leukemia 23(11):2109-2117; Racki, W.J. et al. (2010) "NOD-Scid IL2rgamma(Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection," Transplantation 89(5):527-536; Choi, B. et al. (2011) "Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2R γ (Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan," J. Clin. Immunol. 31(2):253-264; Sartelet, H. et al. (2012) "Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/Il2rg Null (NSG) Mice," In Vivo 26(1):19-29; Spranger, S. et al. (2012) "NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies in vivo," J. Transl. Med. 10:30; von Bonin, M. et al. (2013) "in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice," PLoS One. 8(4):e60680). Se les administró a los animales un vehículo de control (100 μ l de solución salina amortiguada de fosfato (PBS)/animal, q3d x 2 semanas), el diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b mencionado anteriormente (100 μ l/animal, q3d x 2 semanas), o un diacuerpo CD32B x CD79b (compuesto de solamente dos cepas de polipéptidos y que contienen un dominio de unión de albúminas). El plasma fue analizado mediante ELISA el día 7 y el día 14 para la

presencia de IgM humana (**Figura 6A**) o IgG humana (**Figura 6B**), indicadores del inicio de la enfermedad de injerto contra huésped.

Los ratones que recibieron el vehículo de control exhibieron altos niveles de IgM humana y de IgG humana. En contraste, dichos anticuerpos no fueron esencialmente detectados en ratones que habían recibido el diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b descrito anteriormente (**Figura 6A y Figura 6B**). Los ratones que habían recibido el diacuerpo CD32B x CD79b exhibido disminuyeron los niveles IgM humanas y IgG humanas, en comparación con ratones que recibieron el vehículo de control, pero dichos niveles, sin embargo, eran sustancialmente mayores que los que recibieron el diacuerpo Fc CD32B x CD79b. Estos descubrimientos demuestran que los diacuerpos CD32B x CD79b monovalentes biespecíficos tienen la utilidad y la efectividad terapéutica, pero que el diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b descrito anteriormente del presente invento es inesperadamente superior a dichos diacuerpos no Fc y posee una aún mayor utilidad y efectividad terapéutica (**Figura 6A y Figura 6B**).

Ejemplo 6

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

Para demostrar aún más la capacidad de los diacuerpos Fc CD32B x CD79b del presente invento para amortiguar o inhibir la señal del sistema inmune mediante las células B, se inyectó PBMC humana (5×10^6 células, inyectadas en forma intravenosa) en ratones NSG NOD.scid IL2rynull inmunodeficientes. Los animales recibieron un vehículo de control (100 μ l de solución salina amortiguada de fosfato (PBS)/animal), el diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b descrito anteriormente (a 5 mg/kg o a 10 mg/kg) o un anticuerpo anti-CD20 (rituximab; 5 mg/kg; dosificado una

vez). La supervivencia acumulativa de los ratones fue medida con el tiempo. Como aparece en la **Figura 7**, los animales que recibieron una dosis del diacuerpo Fc preferido CD32B x CD79b exhibido mejoraron en forma marcada la supervivencia; relativo a ratones que recibieron control de PCS o rituximab.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta especificación se incorporan en el presente como referencia en la misma medida que si cada publicación individual o aplicación de patente fuera indicada en forma específica e individual para ser incorporada como referencia en su totalidad. Si bien el invento ha sido descrito en relación con las realizaciones específicas de dicho invento, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales, y esta aplicación intenta cubrir las variaciones, usos o adaptaciones del invento siguiendo, en general, los principios del invento, e incluyendo dichas partidas de la presente divulgación como una práctica conocida o tradicional dentro del material al que el invento pertenece, y tal como pueda ser aplicada a las características esenciales estipuladas anteriormente.

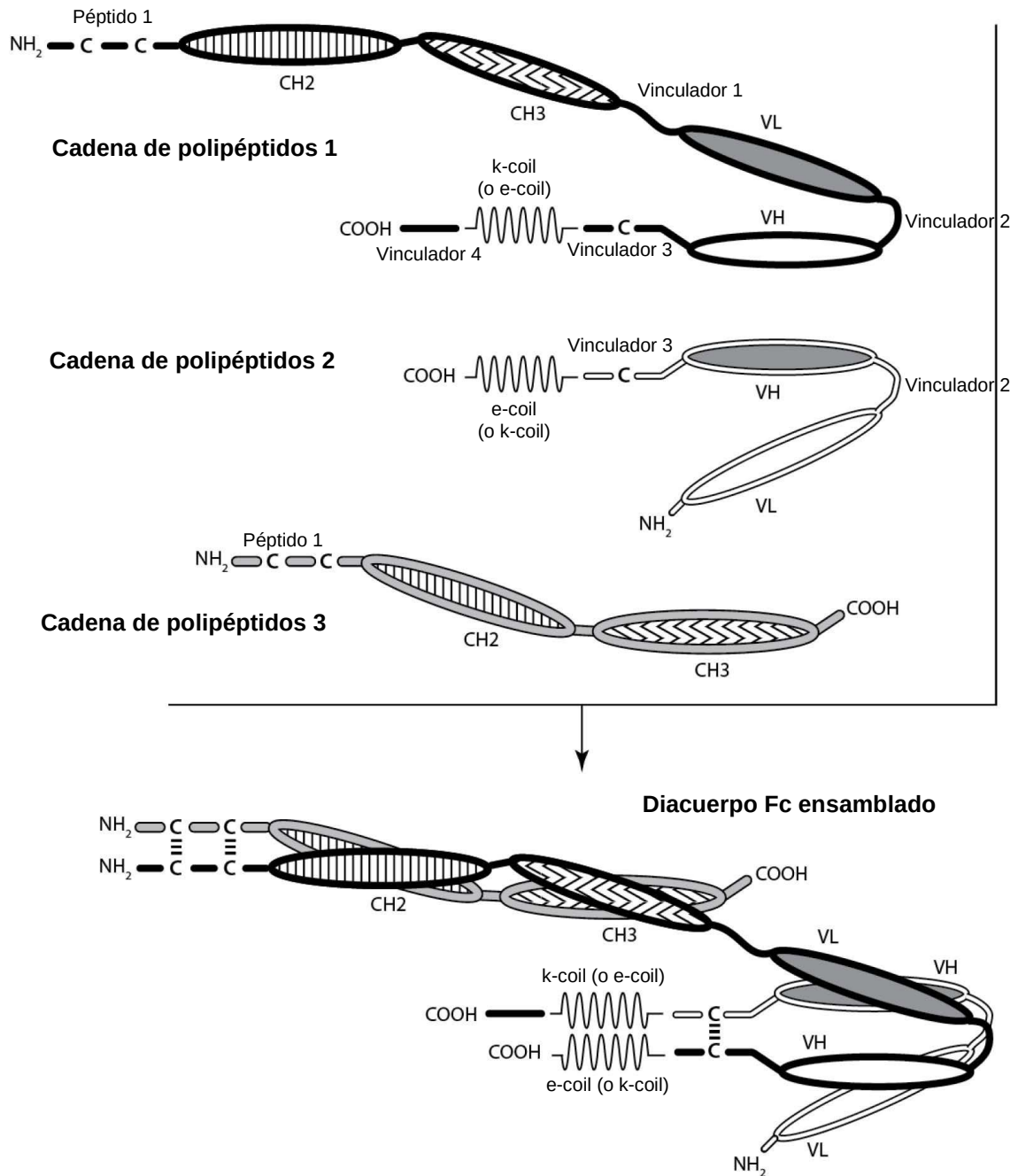


Figura 1

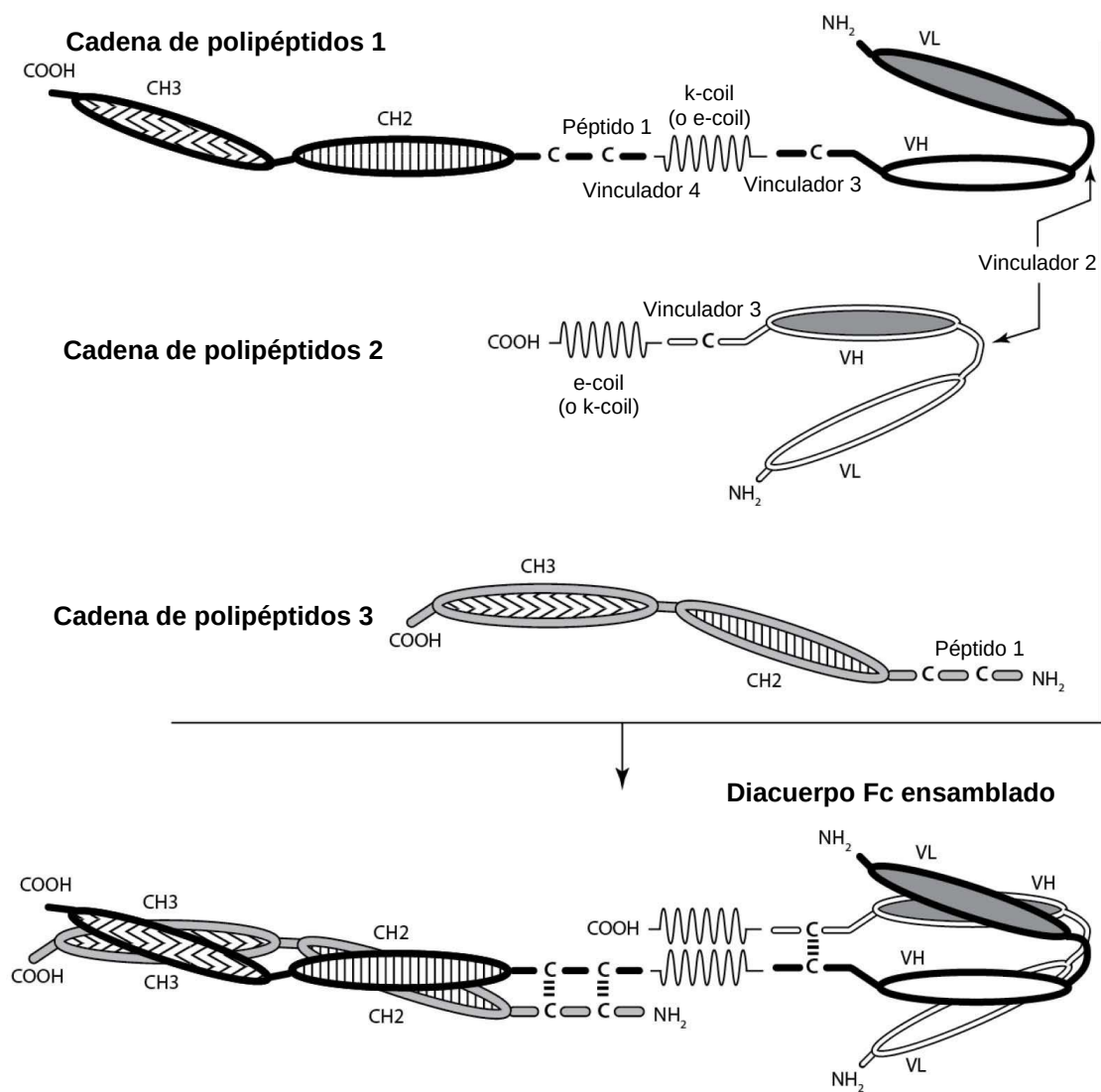


Figura 2

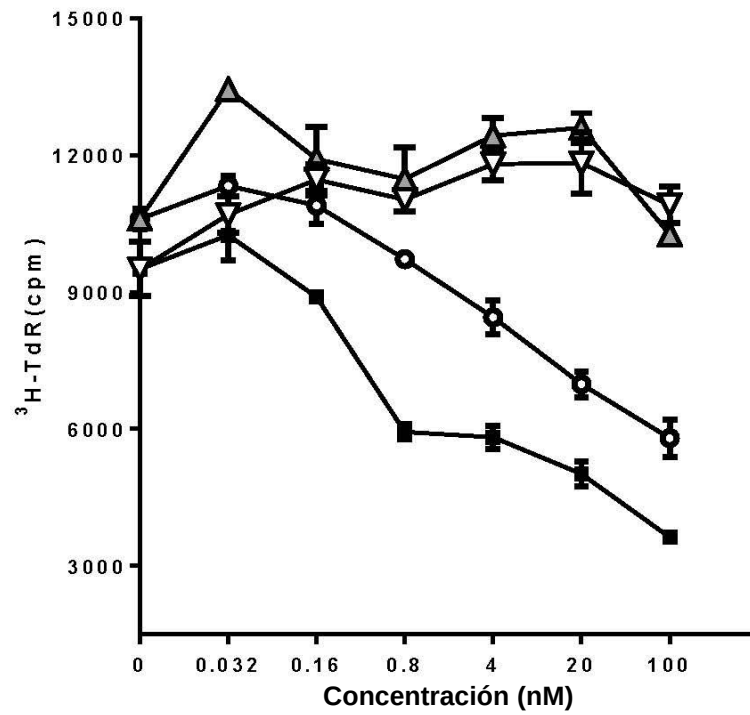


Figura 3A

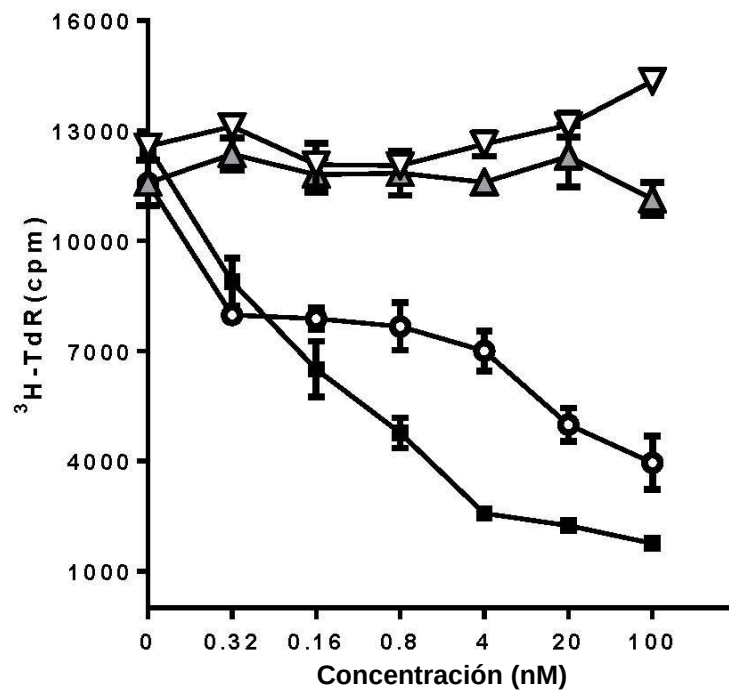


Figura 3B

- ▽ CD32B x FITC Diacuerpo de control
- ▲ CD79B x FITC Diacuerpo de control
- CD32B x CD79B (A B D) Diacuerpo no Fc
- CD32B x CD79B Diacuerpo Fc

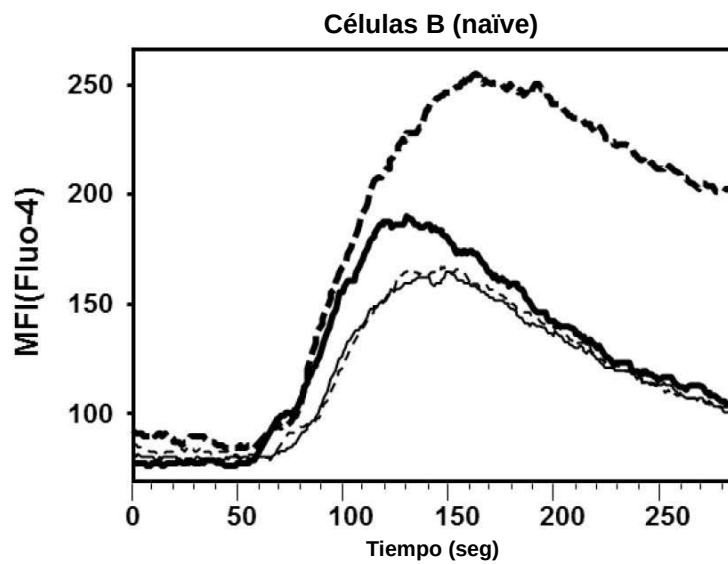


Figura 4A

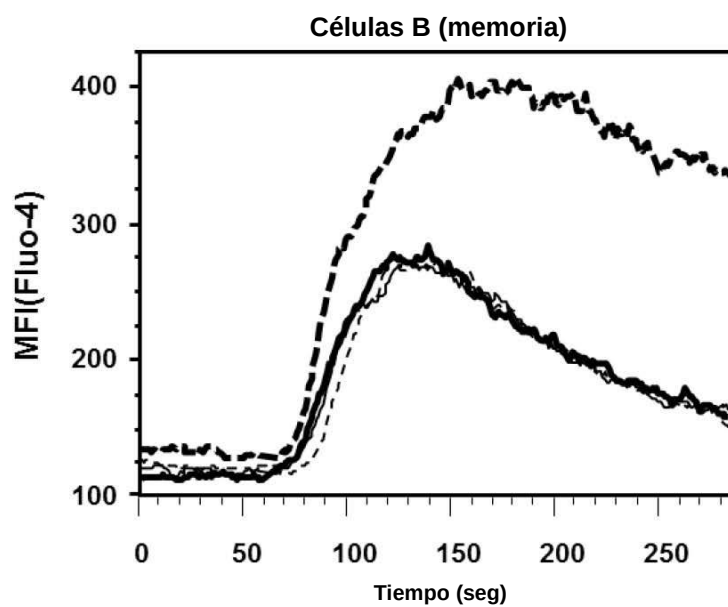


Figura 4A

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

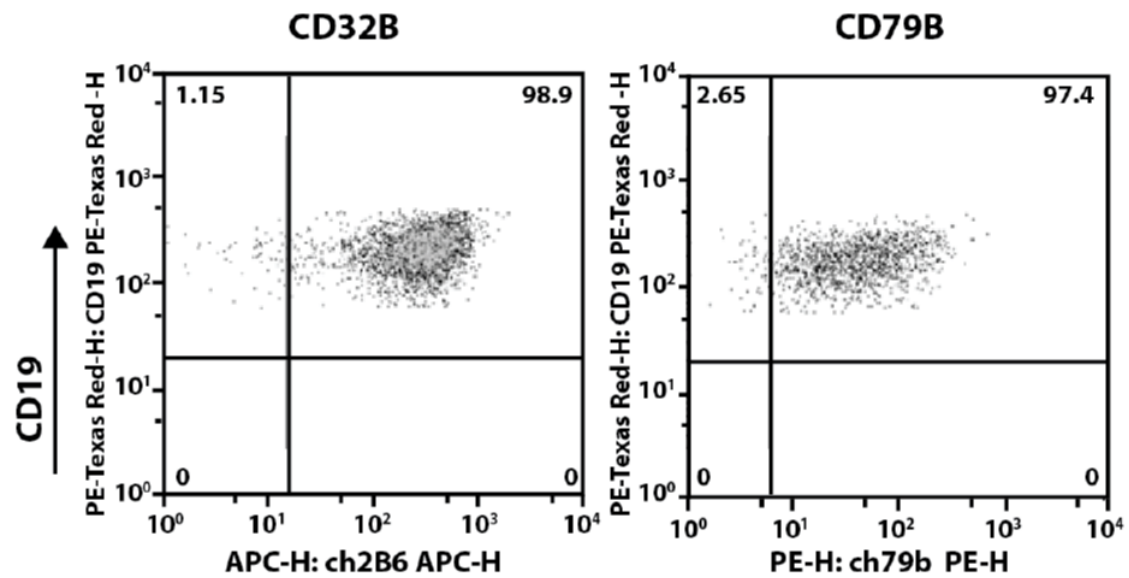


Figura 5A

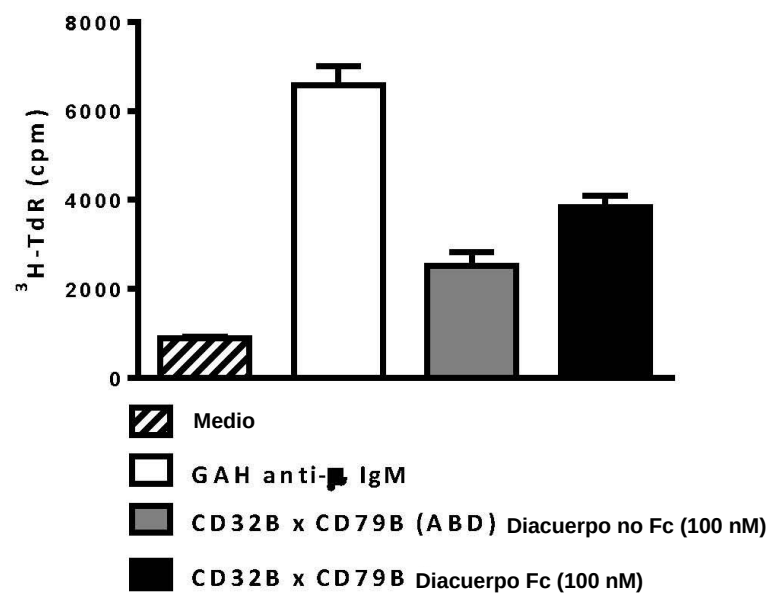


Figura 5B

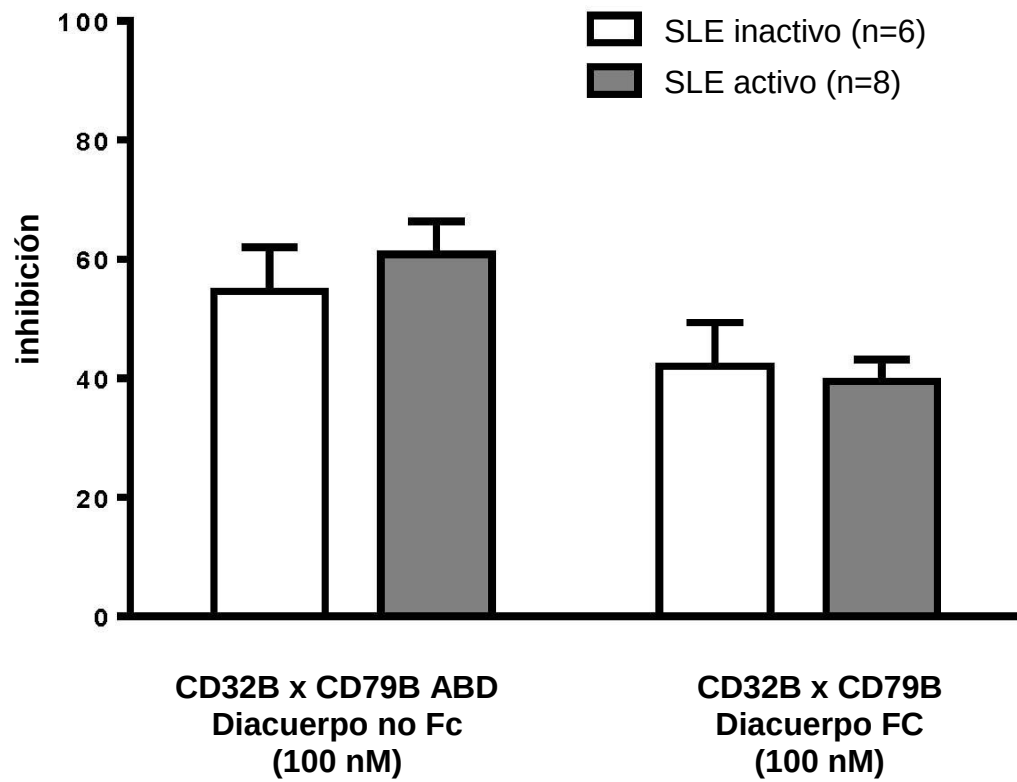


Figura 5C

7/8

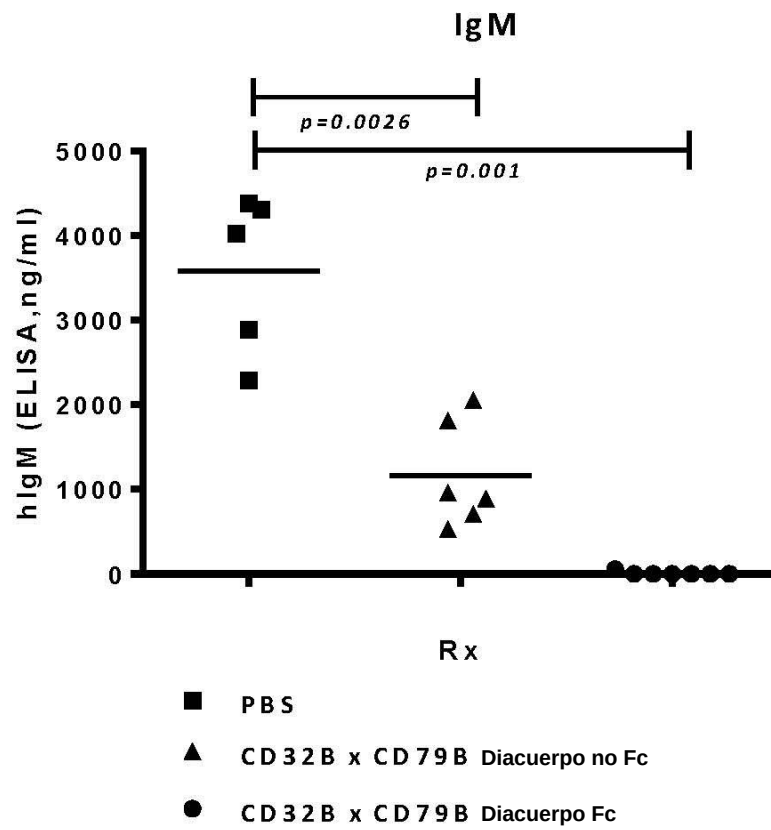


Figura 6A

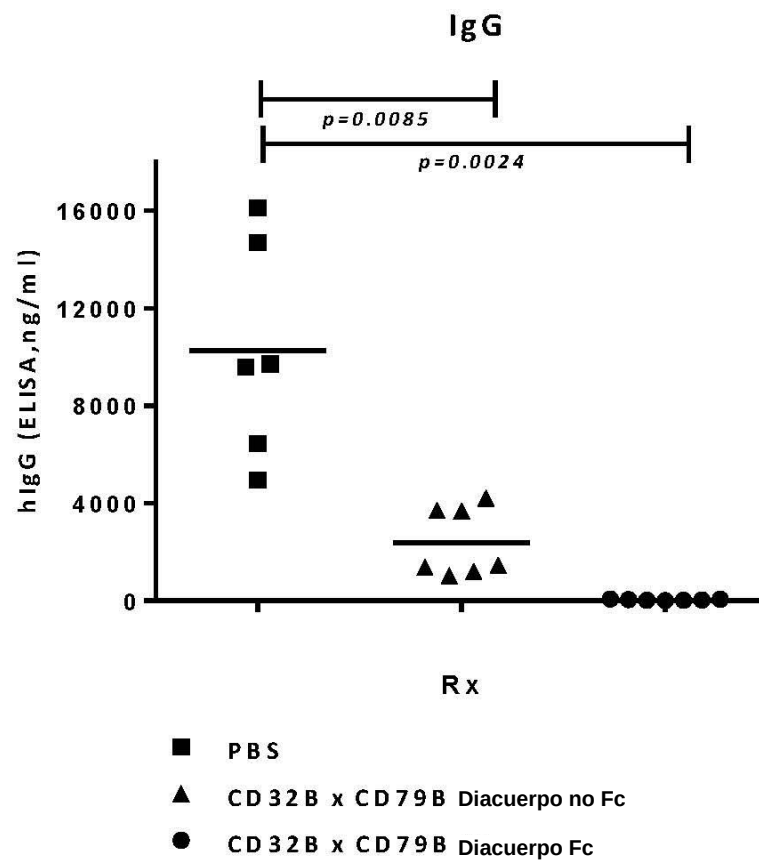


Figura 6A

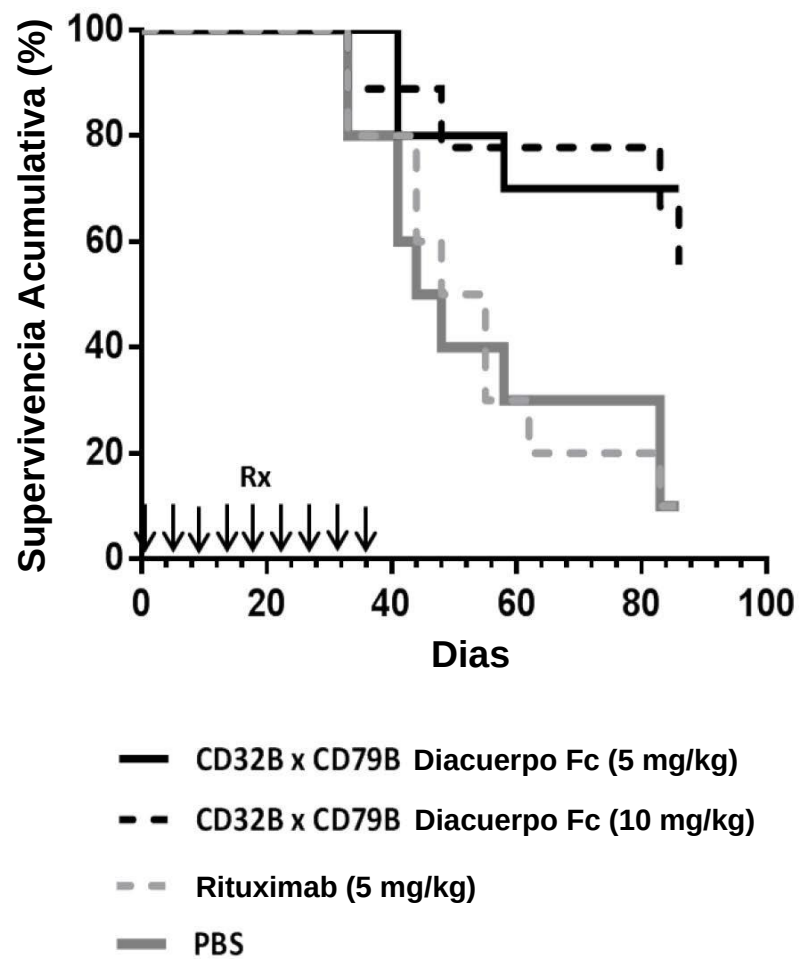


Figura 7

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MacroGenics, Inc.
Johnson, Leslie S
Huang, Ling
Shah, Kalpana
Bonvini, Ezio
Moore, Paul
Chen, Wei

<120> DIACUERPOS FC MONOVALENTES BIESPECÍFICOS QUE SON CAPACES DE UNIRSE A CD32B Y CD79B Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 1301.0110PCT

<150> US 61/864,217

<151> 2013-08-09

<150> US 61/866,416

<151> 2013-08-15

<150> US 61/869,519

<151> 2013-08-23

<150> US 61/907,525

<151> 2013-11-22

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1				5					10

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala	Pro	Ser	Ser	Ser
1				5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Glu
1				5			

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador 2

<400> 4

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador 3

<400> 5

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador 4

<400> 6

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 7
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Dominio promotor de Heterodímero de enrollamiento E

<400> 7

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 8
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Dominio promotor de Heterodímero de enrollamiento K

<400> 8

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 9

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región de anticuerpo Fc presente en la primer cadena de polipéptidos

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 10

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para los dominios CH2 y CH3 de una región de anticuerpo Fc presente en la tercer cadena de polipéptidos

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que enlaza CD32B

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que enlaza CD32B

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30

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

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia preferida para el dominio VL de un anticuerpo que enlaza CD79b

<400> 13

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser
			20					25					30		
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Asn	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70				75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
			85					90						95	
Thr	His	Phe	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia preferida para el dominio VH de un anticuerpo que enlaza CD79b

<400> 14

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Met	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		

Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 15

<211> 502

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para la primera cadena de polipéptidos

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 245 250 255
 Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser Trp Leu Gln
 260 265 270
 Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr
 275 280 285
 Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr
 290 295 300
 Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 305 310 315 320
 Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
 325 330 335
 Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val
 340 345 350
 Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 355 360 365
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met
 370 375 380
 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met
 385 390 395 400
 Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp
 405 410 415
 Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 420 425 430
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 435 440 445
 Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 450 455 460
 Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
 465 470 475 480
 Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 485 490 495
 Lys Gly Gly Gly Asn Ser
 500

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

<220>

<223> Secuencia preferida para la Segunda cadena de polipéptidos

<400> 16

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

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

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
165 170 175

Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 17

<211> 227

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia preferida para la Tercera cadena de polipéptidos

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Enlazador 5

<400> 18

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Albúmina preferida que une dominio (ABD)

<400> 19

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 20

<211> 312

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la Primera cadena de polipéptidos de
dicuerpo CD32B x CD79b (ABD)

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
 165 170 175
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 180 185 190
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 195 200 205
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 210 215 220
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu
 225 230 235 240
 Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
 245 250 255
 Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Ser Leu Ala Glu Ala Lys Val
 260 265 270
 Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
 275 280 285
 Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile
 290 295 300
 Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 305 310
 <210> 21
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la Segunda cadena de polipéptidos de
 dicuerpo CD32B x CD79b (ABD)
 <400> 21
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 130 135 140
 Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Asn Lys Ala Lys
 165 170 175
 Asn His Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Ile Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190
 Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Ala Leu Gly Leu Asp
 210 215 220
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 245 250 255
 Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 260 265 270

 <210> 22
 <211> 262
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la Primera cadena de polipéptidos de
 dicuerpo CD32B x CD79b

 <400> 22

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Glu Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 115 120 125
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 130 135 140
 Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn
 165 170 175
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 180 185 190
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 195 200 205
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 210 215 220
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu
 225 230 235 240
 Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
 245 250 255
 Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260

<210> 23

<211> 1506

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 23

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc	60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgctcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	420

aaccagggtca gacctgtggtg cctgggtcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctccccgt gctggactcc	540
gacggctcct tcttctctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	600
aacgtctttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660
ctctccctgt ctccgggtaa agcccccttc agctccccta tggaagacat ccagatgacc	720
cagtctccat cctccttata tgcctctgtg ggagatagag tcaccatcac ttgtcgggca	780
agtcaggaaa ttagtggtta cttaaagctgg ctgcagcaga aaccaggcaa ggcccctaga	840
cgctgatct acgccgcata cacttttagat tctgggtgtcc catccagggt cagtggcagt	900
gagtctggga ccgagttcac cctcaccata agcagccttc agcctgaaga ttttgcaacc	960
tattactgtc tacaatatatt tagttatccg ctacagttcg gaggggggac caagtgga	1020
ataaaaggag gcggatccgg cggcggaggc caggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag	1080
gtgaagaagc ctggcgacct agtgaaggtc tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc	1140
agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg	1200
attgatcctt cagacagtga aactcactac aatcaaaagt tcaaggacag agtcaccatg	1260
accacagaca catccacgag cacagcctac atggagctga ggagcctgag atctgacgac	1320
acggccgtgt attactgtgc gagagctatg ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc	1380
gtctcctccg gaggatgtgg cgggtggagaa gtggccgcac tggagaaaaga ggttgctgct	1440
ttggagaagg aggtcgctgc acttgaaaag gaggtcgag ccctggagaa aggcggcggg	1500
aactct	1506

<210> 24
 <211> 810
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido preferido que codifica la cadena de polipéptidos de la SEQ ID NO:16

<400> 24	
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac	180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc	240
agcagggttg aggctgagga tggtgggggt tattactgct ggcaaggtag acattttccg	300
ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg cggcggaggc	360
gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc	420

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

<210> 25
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polinucleótido preferido que codifica la cadena de polipéptidos de la SEQ ID NO:17

<400> 25	
gacaaaactc acacatgccc accgtgcca gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc	60
tctctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	120
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	240
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag	420
aaccagggtca gcttgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc	540
gacggctcct tcttctctgt cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc	660
ctctccctgt ctccgggtaa a	681

REIVINDICACIONES

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

la primera cadena de polipéptidos incluye, en la dirección de terminal N y terminal C:

un dominio 1, que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un péptido que contiene cisteína (**SEC ID NRO:1**); y

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

un dominio 2, que incluye:

un subdominio (2A), que incluye un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VL_{CD32B}) (**SEC ID NRO:11**); y

un subdominio (2B), que incluye un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VH_{CD79b}) (**SEC ID NRO:14**),

En donde dichos subdominios (2A) y (2B) se separan del otro mediante un vinculador de péptidos (Vinculador 2) (**SEC ID NRO:4**);

un Dominio 3, en donde dicho Dominio 3 es un dominio E-coil (**SEC ID NRO:7**) o un dominio K-coil (**SEC ID NRO:8**), en donde dicho dominio 3 se separa de dicho dominio 2 mediante un vinculador de péptidos (**SEC ID NRO:5**); y

un péptido de espaciador de terminal C (**SEC ID NRO:6**);

la segunda cadena de polipéptidos incluye, en la dirección de terminal N a terminal C:

un dominio 1, que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD79b (VL_{CD79b}) (**SEC ID NRO:13**); y

un subdominio (1B), que incluye un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CD32B (VH_{CD32B}) (**SEC ID NRO:12**);

En donde dichos subdominios (1A) y (1B) se separan del otro mediante un vinculador de péptidos (Vinculador 2) (**SEC ID NRO:4**);

un Dominio 2, en donde dicho dominio 2 es un dominio K-coil (**SEC ID NRO:8**) o un dominio E-coil (**SEC ID NRO:7**), en donde dicho Dominio 2 se separa de dicho Dominio 1 mediante un vinculador de péptidos (**SEC ID NRO:5**); y en donde dicho dominio 3 de dicha primera cadena de polipéptidos y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena de polipéptidos no son dominios E-coil o dominios K-coil; y

la tercera cadena de polipéptidos incluye, en la dirección de terminal N a terminal C, un dominio 1 que incluye:

un subdominio (1A), que incluye un péptido que contiene cisteína (**SEC ID NRO:1**); y

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

Y en donde:

dichas porciones de polipéptidos de los dominios Fc IgG de dicha primera y tercera cadena de polipéptidos forman dicho dominio Fc IgG;

dicho dominio VL de dicha primera cadena de polipéptidos y dicho dominio VH de dicha segunda cadena de polipéptidos forman un dominio de unión de antígenos capaz de unirse específicamente a un epítoto de CD32B; y

dicho dominio VH de dicha primera cadena de polipéptidos y dicho dominio VL de dicha segunda cadena de polipéptidos forman un dominio de unión de antígenos capaz de unirse específicamente a un epítoto de CD79b.

2. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de la reivindicación 1, en donde dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena de polipéptidos incluye una secuencia diferente de dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena de polipéptidos.

3. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de reivindicación 1, en donde dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:9**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:10**.

4. La reivindicación 1, en donde dicho subdominio (1B) de dicha primera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:10**, y dicho subdominio (1B) de dicha tercera cadena de polipéptidos tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:9**.

5. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las declaraciones 1-2, en donde dicho dominio 1 de dicha primera cadena de polipéptidos y/o dicho dominio 1 de dicha tercera cadena de polipéptidos incluye una secuencia variante de CH2-CH3 que exhibe una unión alterada a un receptor Fcγ.

6. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las declaraciones 1-5, en donde dicho dominio 3 de dicha primera cadena de polipéptidos incluye un E-coil

(**SEC ID NRO:7**), y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena de polipéptidos incluye un K-coil (**SEC ID NRO:8**).

7. El diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las declaraciones 1-5, en donde dicho dominio 3 de dicha primera cadena de polipéptidos incluye un K-coil (**SEC ID NRO:8**), y dicho dominio 2 de dicha segunda cadena de polipéptidos incluye un E-coil (**SEC ID NRO:7**).

8. Un diacuerpo Fc monovalente biespecífico, en donde dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico es capaz de unirse en forma específica a un epítoto de CD32B y a un epítoto de CD79b, y posee un dominio Fc IgG, en donde dicho diacuerpo Fc monovalente biespecífico incluye:

una primera cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:15**;

una segunda cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:16**; y

una tercera cadena de polipéptidos que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NRO:17**, en donde los residuos de aminoácidos 1-10 de dicha tercera cadena de polipéptidos son el Péptido 1 (**SEC ID NRO:1**), y los residuos de aminoácidos 11-227 de dicha tercera cadena de polipéptidos son los dominios de CH2 y CH3 de una región Fc de anticuerpos IgG (**SEC ID NRO:10**);

en donde dicha primera y segunda cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra mediante una primera unión de disulfuro, y dicha primera y tercera cadena de polipéptidos se unen en forma covalente a la otra mediante una segunda unión de disulfuro.

9. Una composición farmacéutica que incluye el diacuerpo Fc monovalente biespecífico de cualquiera de las declaraciones 1-8 y un portador aceptable en forma fisiológica.

10. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 9 en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inflamatorio.

11. El uso de la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad o trastorno inflamatorio es una enfermedad autoinmune.

12. El uso de la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad autoinmune es el lupus eritomatoso sistémico (SLE).

13. El uso de la reivindicación 9, en donde dicha enfermedad o trastorno inflamatorio es una enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).

RESUMEN

El presente invento se dirige a diacuerpos monovalentes biespecíficos que incluyen un dominio Fc de inmunoglobulina ("diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos") y se componen de tres cadenas de polipéptidos y que poseen al menos un sitio de unión específico para un epítipo de CD32B y un sitio de unión específico para un epítipo de CD79b (*p.ej.*, un "diacuerpo Fc monovalente biespecífico CD32B x CD79b"). Los diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos del presente invento son capaces de unirse simultáneamente a CD32B y CD79b. El invento se dirige a dichas composiciones, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos diacuerpos Fc monovalentes biespecíficos y a métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, y en particular, lupus eritomatoso sistémico (SLE) y enfermedad de injerto contra huésped.