



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201536805 A

(43) 公開日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 01 日

(21) 申請案號：103126989 (22) 申請日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 06 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)  
A61P37/00 (2006.01)

(30) 優先權：2013/08/09 美國 61/864,217  
2013/08/15 美國 61/866,416  
2013/08/23 美國 61/869,519  
2013/11/22 美國 61/907,525

(71) 申請人：宏觀基因股份有限公司 (美國) MACROGENICS, INC. (US)  
美國

(72) 發明人：強生 萊斯利 JOHNSON, LESLIE S. (US)；黃 玲 HUANG, LING (US)；尚 坎  
帕納 SHAH, KALPANA (US)；波維尼 愛利歐 BONVINI, EZIO (US)；摩爾 保  
羅 MOORE, PAUL (GB)；陳 蔚 CHEN, WEI (CA)

(74) 代理人：李文賢

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：7 共 113 頁

## (54) 名稱

具有結合 CD 3 2 B 和 CD 7 9 b 能力的雙特異性單價 F c 雙抗體及其用途

BI-SPECIFIC MONOVALENT FC DIABODIES THAT ARE CAPABLE OF BINDING CD32B AND CD79B AND USES THEREOF

## (57) 摘要

本發明涉及雙特異性單價 Fc 雙抗體，其包含免疫球蛋白 Fc 結構域(“雙特異性單價 Fc 雙抗體”)，並由三條多肽鏈構成，並且其具有至少一個對 CD32B 的表位具有特異性的結合位點和一個對 CD79b 的表位具有特異性的結合位點(即，“CD32B x CD79b 雙特異性單價 Fc 雙抗體”)。本發明涉及的雙特異性單價 Fc 雙抗體具有同時結合 CD32B 和 CD79b 的能力。本發明涉及這類組合物、涉及包含這類雙特異性單價 Fc 雙抗體的藥物組合物、並涉及其在炎性疾病或狀況(特別是在系統性紅斑狼瘡(SLE)和移植物抗宿主病中)的治療上的用途。

The present invention is directed to bi-specific monovalent that comprise an immunoglobulin Fc Domain (“bi-specific monovalent Fc diabodies”) and are composed of three polypeptide chains and that possess at least one binding site specific for an epitope of CD32B and one binding site specific for an epitope of CD79b (i.e., a “CD32B x CD79b bi-specific monovalent Fc diabody”). The bi-specific monovalent Fc diabodies of the present invention are capable of simultaneous binding to CD32B and CD79b. The invention is directed to such compositions, to pharmaceutical compositions that contain such bi-specific monovalent Fc diabodies and to methods for their use in the treatment of inflammatory diseases or conditions, and in particular, systemic lupus erythematosus (SLE) and graft vs. host disease.

CH2 . . . 結構域  
CH3 . . . 結構域  
VL . . . 結構域  
VH . . . 結構域

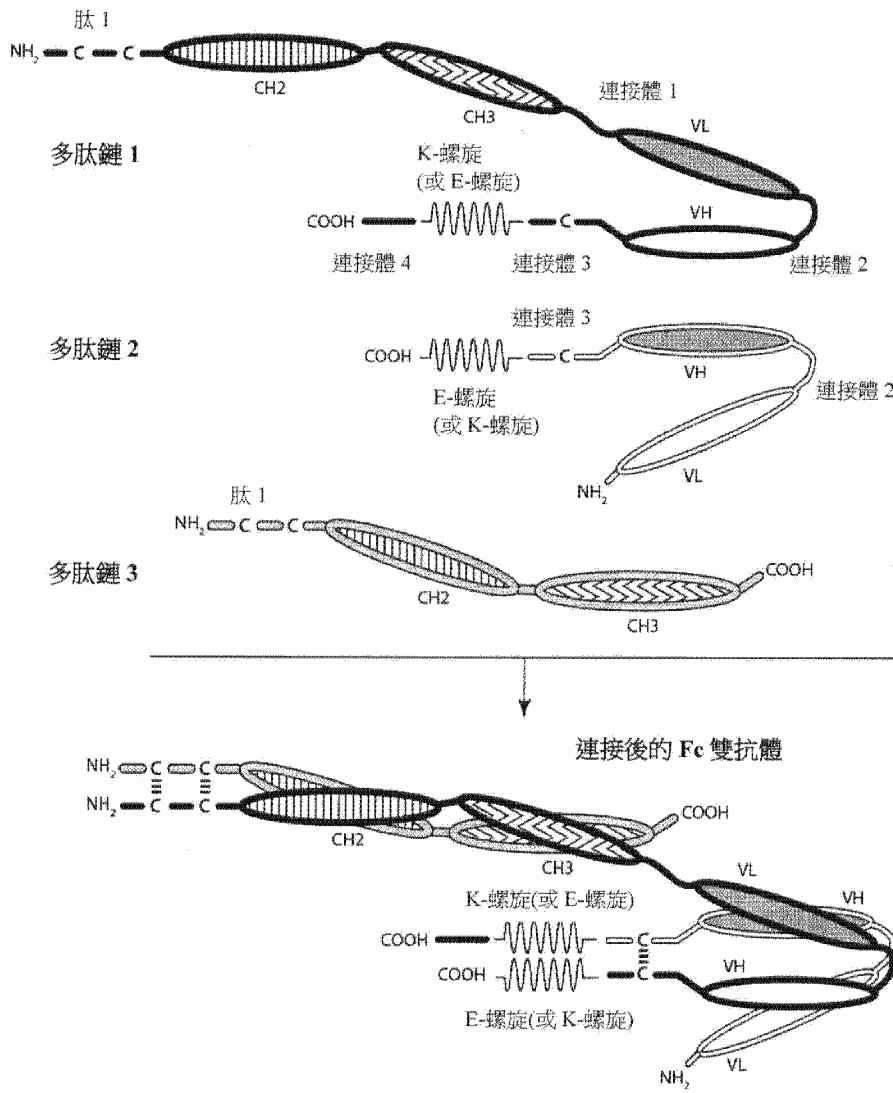


圖 1

## 發明摘要

※ 申請案號：103126989

C07K16/28 (2006.01)

※ 申請日：103.8.6

※IPC 分類：A61K39/395 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

具有結合 CD32B 和 CD79b 能力的雙特異性單價 Fc 雙抗體及其用途 / Bi-Specific Monovalent Fc Diabodies That Are Capable

Of Binding CD32B And CD79b And Uses Thereof

## 【中文】

本發明涉及雙特異性單價 Fc 雙抗體，其包含免疫球蛋白 Fc 結構域（“雙特異性單價 Fc 雙抗體”），並由三條多肽鏈構成，並且其具有至少一個對 CD32B 的表位具有特異性的結合位點和一個對 CD79b 的表位具有特異性的結合位點（即，“CD32B xCD79b 雙特異性單價 Fc 雙抗體”）。本發明涉及的雙特異性單價 Fc 雙抗體具有同時結合 CD32B 和 CD79b 的能力。本發明涉及這類組合物、涉及包含這類雙特異性單價 Fc 雙抗體的藥物組合物、並涉及其在炎性疾病或狀況（特別是在系統性紅斑狼瘡（SLE）和移植物抗宿主病中）的治療上的用途。

## 【英文】

The present invention is directed to bi-specific monovalent that comprise an immunoglobulin Fc Domain (“bi-specific monovalent Fc diabodies”) and are composed of three polypeptide chains and that possess at least one binding site

specific for an epitope of CD32B and one binding site specific for an epitope of CD79b (i.e., a “CD32B x CD79b bi-specific monovalent Fc diabody”). The bi-specific monovalent Fc diabodies of the present invention are capable of simultaneous binding to CD32B and CD79b. The invention is directed to such compositions, to pharmaceutical compositions that contain such bi-specific monovalent Fc diabodies and to methods for their use in the treatment of inflammatory diseases or conditions, and in particular, systemic lupus erythematosus (SLE) and graft vs. host disease.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 1 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

CH2 結構域

CH3 結構域

VL 結構域

VH 結構域

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

具有結合CD32B和CD79b能力的雙特異性單價Fc雙抗體及其用途  
/Bi-Specific Monovalent Fc Diabodies That Are Capable Of Binding  
CD32B And CD79b And Uses Thereof

## 【技術領域】

【0001】 本發明涉及雙特異性單價雙抗體，其包含免疫球蛋白Fc (Fragment crystallizable) 結構域(“雙特異性單價Fc雙抗體”)，由三條多肽鏈構成，並且具有至少一個對CD32B的表位具有特異性的結合位點和一個對CD79b的表位具有特異性的結合位點(即，“CD32B xCD79b Fc雙抗體”)。本發明涉及的雙特異性單價Fc雙抗體具有同時結合CD32B和CD79b的能力。本發明涉及含有這類雙特異性單價Fc雙抗體的這類組合物、藥物組合物，並涉及它們在治療炎性疾病或狀況(特別是在系統性紅斑狼瘡(SLE)和移植物抗宿主病中)的治療上的用途。

## 【先前技術】

【0002】 I. Fc $\gamma$  受體和CD32B

【0003】 抗原抗體複合物與免疫系統細胞的相互作用導致一系列應答，範圍從效應子功能，如抗體依賴性細胞毒性、肥大細胞脫粒以及吞噬作用，到免疫調節信號，如調節淋巴細胞增殖和抗體分泌。所有這些相互作用都通過抗體或免疫複合物的Fc結構域與造血細胞上特異性細胞表面受體的結合而啟動。抗體和免疫複合物觸發的細胞應答的多樣性由Fc受體的結構異質性引起。Fc受體共用結構相關的配體結合結構域，其中此結構相

關的配體結合結構域據推測介導細胞內信號傳導。

【0004】 Fc受體是免疫球蛋白基因超家族蛋白的成員。它們是能結合免疫球蛋白分子的Fc部分的表面糖蛋白。該家族的每個成員都通過Fc受體 $\alpha$ 鏈上的識別結構域識別一個或多個同種型的免疫球蛋白。

【0005】 Fc受體根據它們對免疫球蛋白亞型的特異性而界定(可參見Ravetch J.V.等學者之文獻：“*Fc Receptors*,” *Annu. Rev. Immunol.* 1991: 9: 457-92、Gerber J.S.等學者之文獻：“*Stimulatory And Inhibitory Signals Originating From The Macrophage Fc $\gamma$  Receptors*,” *Microbes and Infection* 2001: 3: 131-139、Billadeau D.D.等學者之文獻：“*ITAMs Versus ITIMs: Striking A Balance During Cell Regulation*,” *J. Clin. Invest.* 2002: 2(109): 161-1681、Ravetch J.V.等學者之文獻：“*Immune Inhibitory Receptors*,” *Science* 2000: 290: 84-89、Ravetch J.V.等學者之文獻：“*IgG Fc Receptors*,” *Annu. Rev. Immunol.* 2001: 19: 275-90、以及Ravetch J.V.學者之文獻：“*Fc Receptors: RuborRedux*,” *Cell* 1994: 78(4): 553-60)。

【0006】 能結合IgG抗體的Fc受體稱為“Fc $\gamma$ Rs”。此家族的每一成員都是完整的膜糖蛋白，具有與C2組(C2-set)免疫球蛋白-相關結構域相關的細胞外結構域、單個跨膜結構域和長度可變的胞質內結構域。有三個已知的Fc $\gamma$ Rs，稱為Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RII(CD32)以及Fc $\gamma$ RIII(CD16)。這三個受體由不同的基因編碼；然而，這三個家族成員之間的廣泛同源性表明：它們或許通過基因複製而來源於共同的祖先。

【0007】 Fc $\gamma$ RII(CD32)蛋白是40 KDa完整膜糖蛋白，並且此膜糖蛋白由於對單體Ig的低親和性( $10^6 M^{-1}$ )而僅結合複合的IgG。於此，受體是存

在於所有造血細胞上的最廣泛表達的FcγR，並且於此之造血細胞包括單核細胞、巨噬細胞、B細胞、NK細胞、嗜中性粒細胞、肥大細胞以及血小板。FcγRII在其免疫球蛋白結合鏈中僅具有2個免疫球蛋白樣區，因此對IgG的親和性比FcγRI低得多。有三種人類FcγRII基因（即，FcγRIIA(CD32A)、FcγRIIB(CD32B)、以及FcγRIIC(CD32C)），並此三種人類FcγRII基因中全部都結合聚集體或免疫複合物種的IgG。

**【0008】** FcγRIIA和FcγRIIB胞質結構域中的明顯差異對受體連接產生了兩種功能上不同的應答。基本差異是，結合IgG Fc區後，FcγRIIA同種型引發導致免疫系統啟動（例如：吞噬作用、呼吸爆發等）的細胞內信號傳導，而結合IgG Fc區後，FcγRIIB同種型引發導致免疫系統受到減弱或抑制（例如：抑制B細胞啟動等）的信號。

**【0009】** 這類啟動信號和抑制信號都在FcγR與IgG Fc區連接後通過FcγR轉導。這些完全相反的功能由不同的受體同種型之間的結構差異造成。被稱為免疫受體酪氨酸啟動基序（Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif；ITAMs）或免疫受體酪氨酸抑制基序（Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif；ITIMS）的受體的胞質信號傳導結構域中的兩個不同的結構域導致不同的應答。不同的胞質酶向這些結構的募集指示FcγR介導的細胞應答的結果。含有ITAM的FcγR複合物包括FcγRI、FcγRIIA以及FcγRIIA，而含有ITIM的複合物僅包括FcγRIIB。

**【0010】** 人類嗜中性粒細胞表達FcγRIIA基因。通過免疫複合物或特异性抗體交聯而進行的FcγRIIA聚集用來聚集ITAM與促進ITAM磷酸化的受體相關激酶。ITAM磷酸化充當Syk激酶的停靠位點，Syk激酶的啟動導致

下游底物（例如PI<sub>3</sub>K）的啟動。細胞啟動導致促炎介質的釋放。

**【0011】** FcγRIIB基因表達於B淋巴細胞上；其細胞外結構域與FcγRIIA具有96%的同一性，並以不可辨別的方式結合IgG複合體。ITIM在FcγRIIB的胞質結構域中的存在限定了FcγR的這種抑制性亞類。已經確定了這種抑制的分子基礎。當FcγRIIB以免疫複合物的IgG免疫球蛋白的Fc區的方式與啟動受體共連接時，FcγRIIB ITIM變成磷酸化的，並吸引肌醇多磷酸5'-磷酸酶（SHIP）的SH2結構域，該酶水解由於含有ITAM的FcγR介導的賴氨酸激酶啟動而釋放的磷酸肌醇信使，從而防止細胞內Ca<sup>++</sup>的流入。因此，FcγRIIB和啟動受體的這類交聯抑制了啟動受體的活性，並因此抑制細胞回應性。在B細胞上，B細胞啟動、B細胞增殖以及抗體分泌受到抑制或中止。從而在抗原檢測開始時，發生單體IgG抗原鍵合，並且，結合抗體的Fc區結合啟動FcγR的ITAM，從而介導免疫系統的啟動。隨著宿主應答的進行，形成能結合FcγRIIB的多聚IgG抗原免疫複合物（因此共連接這類複合物與啟動受體），從而導致免疫應答的抑制和最終停止（可參見美國專利第8,445,645號、第8,217,147號、第8,216,579號、8,216,574號、第8,193,318號、第192,737號、第8,187,593號、第8,133,982號、第8,044,180號、第8,003,774號、7,960,512號、第7,786,270號、第7,632,497號、第7,521,542號、第7,425,619號與第7,355,008號，以及美國專利公開第2012/0276094號、第2012/0269811號、第2012/0263711號、第2012/0219551號、第2012/0213781號、第2012/0141476號、第2011/0305714號、第2011/0243941號、第2010/0322924號、第2010/0254985號、第2010/0196362號、第2010/0174053號、第2009/0202537號、第2009/0191195號、第2009/0092610號、第2009/0076251



號、第 2009/0074771 號、第 2009/0060910 號、第 2009/0053218 號、第 2009/0017027 號、第 2009/0017026 號、第 2009/0017023 號、第 2008/0138349 號、第 2008/0138344 號、第 2008/0131435 號、第 2008/0112961 號、第 2008/0044429 號、第 2008/0044417 號、第 2007/0077246 號、第 2007/0036799 號、第 2007/0014795 號、第 2007/0004909 號、第 2005/0260213 號、第 2005/0215767 號、第 2005/0064514 號、第 2005/0037000 號與第 2004/0185045 )。

## 【0012】 II. B細胞受體和CD79b

【0013】 B細胞是負責產生抗體的免疫系統細胞。B細胞對抗原的應答是正常免疫系統的基本組成部分。B細胞具有特異性細胞表面受體，即，B細胞受體 (B-cell receptor ; “BCR”)。如果B細胞遇到能與其結合的BCR的抗原，則會刺激B細胞增殖並產生對結合抗原具有特異性的抗體。為了對抗原產生有效應答，還需要BCR相關蛋白和T細胞援助。抗原/BCR複合物被內在化，並且對抗原進行蛋白分解加工。一小部分抗原保持與B細胞表面上的主要組織相容性複合物-II (“MHC-II”) 分子複合，其中複合物可以被T細胞識別。被這類抗原呈遞啟動的T細胞分泌多種誘導B細胞成熟的淋巴因數。

【0014】 通過BCR進行的信號傳導在抗體的產生、自體免疫以及免疫耐受性的建立方面發揮重要作用 (可參見下列文獻 : Gauld, S.B., “BCell Antigen Receptor Signaling: Roles In Cell Development And Disease,” Science 2002: 296(5573): 1641-1642)。結合自身抗原但仍然在骨髓中的成熟B細胞通過凋亡而消除。相比之下，成熟B細胞上的抗原結合導致啟動、增殖、無反應性以及凋亡。所觀察到的具體功能應答取決於B細胞是否通過其他表面受體和被啟動的特定信號轉導途徑接受共刺激信號。

**【0015】** BCR由膜免疫球蛋白構成，膜免疫球蛋白與CD79的非共價結合的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亞基（分別為“CD79a”和“CD79b”）形成BCR複合物。CD79a和CD79b是信號轉導亞基，其含有信號轉導所需的保守的免疫受體酪氨酸啟動基序（“ITAM”）（可參見Dylke, J.等學者之文獻：“*Role of the extracellular and transmembrane domain of Ig-alpha/beta in assembly of the B cell antigen receptor (BCR),*” *Immunol. Lett.* 2007: 112(1): 47-57、以及Cambier, J.C.學者之文獻：“*New Nomenclature For The Reth Motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL),*” *Immunol. Today* 1995: 16: 110）。BCR複合物通過多價抗原進行的聚集啟動CD79a和CD79b ITAM的轉磷酸作用和受體相關激酶的啟動（可參見DeFranco, A.L.學者之文獻：“*The Complexity Of Signaling Pathways Activated By The BCR,*” *Curr. Opin. Immunol.* 1997: 9: 296-308、Kurosaki, T.學者之文獻：“*Molecular Mechanisms In B-Cell Antigen Receptor Signaling,*” *Curr. Opin. Immunol.* 1997: 9: 309-318、以及Kim, K.M.等學者之文獻：“*Signalling Function Of The B-Cell Antigen Receptors,*” *Immun. Rev.* 1993: 132: 125-146）。磷酸化的ITAM募集其他效應子，如， $PI_3K$ 、 $PLC-\gamma$ 以及Ras/MAPK途徑的成員。這些信號傳導事件是造成B細胞增殖以及啟動標記（如，MHC-II和CD86）表達增加的原因，需要此種啟動標記來引發B細胞隨後與T輔助（“ $T_h$ ”）細胞相互作用。

**【0016】** III. 炎性疾病或疾病狀況

**【0017】** 炎症是身體的白細胞和化學劑保護我們的身體免遭外來物質如細菌和病毒感染的過程。其特徵通常是受影響的區域疼痛、腫脹、發熱和發紅。被稱為細胞因數和前列腺素的化學劑控制這一過程，並以有序

和自我限制的級聯釋放到血液或受影響的組織中。化學劑的這種釋放增加向損傷或感染區域的血液流量，並可以導致發紅和發熱。一些化學劑引起流體向組織中的洩漏，從而引起腫脹。這種保護過程可以刺激神經並引起疼痛。當在相關區域中發生有限期的一段時間時，這些變化對身體有利。

**【0018】** 炎性疾病或疾病狀況反映了免疫系統對身體自身細胞和組織的攻擊（即“自體免疫”應答）。存在許多以不同方式影響身體的自體免疫病。例如，在患有多發性硬化症的個體中大腦受到影響，在患有克羅恩病的個體中腸受到影響，以及在患有類風濕性關節炎的個體中各種關節的滑膜、骨和軟骨受到影響。隨著自體免疫病的發展，可能導致一種或多種身體組織的破壞、器官的異常生長或器官功能的改變。自體免疫病可能僅影響一個器官或組織類型或可能影響多個器官和組織。通常受到自體免疫病影響的器官和組織包括紅細胞、血管、結締組織、內分泌腺（例如：甲狀腺或胰腺）、肌肉、關節以及皮膚。自體免疫病的實例包括但不限於橋本氏甲狀腺炎、惡性貧血、阿狄森氏病、1型糖尿病、類風濕性關節炎、系統性紅斑狼瘡（SLE）、皮肌炎、斯耶葛蘭氏綜合症、皮肌炎、紅斑狼瘡、多發性硬化症、自體免疫內耳疾病、重症肌無力、賴特綜合症、格雷夫斯病、自體免疫性肝炎、家族性腺瘤性息肉病以及潰瘍性結腸炎。

**【0019】** 當身體的正常保護性免疫系統通過攻擊其存在有利於身體的外來細胞或組織（例如：排斥移植物（宿主抗宿主疾病））或引入的移植物的免疫活性細胞排斥免疫抑制宿主的細胞（移植物抗宿主病）而引起損傷時，也可以發生炎性疾病或疾病狀況（可參見DePaoli, A.M.等學者之文獻：“*Graft-Versus-Host Disease And Liver Transplantation,*” *Ann. Intern. Med.*

1992: 117: 170-171、Sudhindran, S.等學者之文獻：“*Treatment Of Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation With Basiliximab Followed By Bowel Resection,*” *Am J Transplant.* 2003: 3: 1024-1029、Pollack, M.S.等學者之文獻：“*Severe, Late-Onset Graft-Versus-Host Disease In A Liver Transplant Recipient Documented By Chimerism Analysis,*” *Hum. Immunol.* 2005: 66: 28-31、Perri, R.等學者之文獻：“*Graft Vs. Host Disease After Liver Transplantation: A New Approach Is Needed,*” *Liver Transpl.* 2007: 13: 1092-1099、Mawad, R.等學者之文獻：“*Graft-Versus-Host Disease Presenting With Pancytopenia After En Bloc Multiorgan Transplantation: Case Report And Literature Review,*” *Transplant Proc.* 2009: 41: 4431-4433、以及Akbulut, S.等學者之文獻：“*Graft-Versus-Host Disease After Liver Transplantation: A Comprehensive Literature Review,*” *World J. Gastroenterol.* 2012: 18(37): 5240-5248)。

【0020】 儘管最近在治療這類疾病或疾病狀況方面取得了進展，但是對能治療或預防炎性疾病或疾病狀況的組合物的需要仍然存在。

【0021】 IV. 雙特異性雙抗體

【0022】 完整的未修飾抗體（例如：IgG）結合抗原表位的能力取決於免疫球蛋白輕鏈和重鏈（即分別為VL結構域和VH結構域）上可變結構域的存在。雙抗體的設計基於單鏈Fv構建體（scFv）（可參見Holliger等學者之文獻：“*Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,*” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 1993: 90: 6444-6448、Hollinger等發明人之美國專利公開第US 2004/0058400號、Mertens等發明人之美國專利公開第US

2004/0220388號、Alt等學者之文獻：FEBS Lett. 1999: 454(1-2): 90-94、Lu, D.等學者之文獻：“*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. 2005: 280(20): 19665-19672、Mertens等發明人之PCT專利國際公開第WO 02/02781號、Olafsen, T.等學者之文獻：“*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,*” Protein Eng Des Sel. 2004: 17(1): 21-27、Wu, A.等學者之文獻：“*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange,*” Protein Engineering 2001: 14(2): 1025-1033、Asano等學者之文獻：“*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region,*” Abstract 3P-683, J. Biochem. 2004: 76(8): 992、Takemura, S.等學者之文獻：“*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,*” Protein Eng. 2000: 13(8): 583-588、以及Baeuerle, P.A.等學者之文獻：“*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,*” Cancer Res. 2009: 69(12): 4941-4944)。

【0023】 抗體輕鏈和抗體重鏈的相互作用，特別是其VL結構域和VH結構域的相互作用，形成了抗體表位結合位點之一。相比之下，scFv構建體包含抗體的單個多肽鏈中所含的VL和VH結構域，其中結構域被長度足以允許兩個結構域自組裝成功能性表位結合位點的靈活連接體隔開。如果由於連接體的長度不足（小於約12個氨基酸殘基）使VL和VH結構域的自組裝變

得不可能，則兩個scFv構建體彼此相互作用，形成雙價分子，在此雙價分子中，一條鏈的VL結構域與另一條鏈的VH結構域結合（可參見Marvin等學者之文獻：“*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,*” *Acta Pharmacol. Sin.* 2005: 26:649-658）。

【0024】 天然抗體僅能結合一個表位種類（即，單特異性），儘管它們能結合該種類的多個拷貝（即，表現出二價或多價）。現有技術已經指出產生在能夠結合兩種或多種不同表位種類（即，除了二價或多價外還表現出雙特異性或多特異性）方面不同于這類天然抗體的雙抗體的能力（可參見Holliger等學者之文獻：“*Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,*” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 1993: 90: 6444-6448、Hollinger等發明人之美國專利公開第US 2004/0058400號、Mertens等發明人之美國專利公開第US 2004/0220388號、Alt等學者之文獻：*FEBS Lett.* 1999: 454(1-2): 90-94、Lu, D.等學者之文獻：“*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.* 2005: 280(20): 19665-19672、Mertens等發明人之PCT專利國際公開第WO 02/02781號、Mertens, N.等學者之文獻：“*New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives,*” In: *NOVEL FRONTIERS IN THE PRODUCTION OF COMPOUNDS FOR BIOMEDICAL USE*, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208、Wu, A.等學者之文獻：“*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain*

*Exchange*,” *Protein Engineering* 2001: 14(2): 1025-1033、Asano等學者之文獻：“*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region*,” Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 2004: 76(8): 992、Takemura, S.等學者之文獻：“*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” *Protein Eng.* 2000: 13(8): 583-588、以及Baeuerle, P.A.等學者之文獻：“*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*,” *Cancer Res.* 2009: 69(12): 4941-4944)。

【0025】 非單特異性雙抗體的提供帶來了明顯優勢：共連接和共定位表達不同表位的細胞的能力。二價雙抗體因此具有廣泛的應用，包括治療和免疫診斷。二價使得在各種應用中設計和改造雙抗體時具有很大的靈活性，提供對多聚抗原的增強的親和力、不同抗原的交聯、以及依賴於兩個靶抗原的存在定向靶向特定細胞類型。由於它們提高的化合價、低解離率以及從迴圈中快速清除（因為雙抗體尺寸小，處於或低於約50 kDa），本領域已知的雙抗體分子還在腫瘤造影領域表現出特定用途（可參見Fitzgerald等學者之文獻：“*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*,” *Protein Eng.* 1997: 10: 1221）。特別重要的是，不同細胞的共連接，例如細胞毒性T細胞與腫瘤細胞的交聯（可參見Staerz等學者之文獻：“*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*,” *Nature* 1985: 314: 628-631、以及Holliger等學者之文獻：“*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” *Protein Eng.* 1996: 9: 299-305）。

【0026】 雙抗體表位元結合結構域也可以被引導至任何免疫效應細胞如CD3、CD16、CD32或CD64的表面決定簇，其表達於T淋巴細胞、天然殺傷（NK）細胞或其他單核細胞上。在許多研究中，據發現，與效應細胞決定簇例如Fc $\gamma$ 受體（Fc $\gamma$ R）結合的雙抗體也啟動效應細胞（可參見Holliger等學者之文獻：“*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” *Protein Eng.* 1996: 9: 299-305、Holliger等學者之文獻：“*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.* 1999: 59: 2909-2916、PCT專利國際公開第WO 2006/113665號、PCT專利國際公開第WO 2008/157379號、PCT專利國際公開第WO 2010/080538號、PCT專利國際公開第WO 2012/018687號、以及PCT專利國際公開第WO 2012/162068）。通常，效應細胞啟動通過抗原結合抗體與效應細胞經Fc-Fc $\gamma$ R相互作用的結合而觸發；因此，就這一點而言，本發明涉及的雙抗體分子可以不依賴它們是否包含Fc結構域而表現出Ig樣功能（例如：如同在本領域已知的或本文示例的任何效應功能測定（如，ADCC測定）中所測定的）。通過交聯腫瘤細胞和效應細胞，雙抗體不僅使效應細胞臨近腫瘤細胞，而且還導致有效的腫瘤殺傷（可參見Cao等學者之文獻：“*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*,” *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003: 55: 171-197）。

【0027】 然而，實現上述優勢的費用很高。這類非單特異性雙抗體的形成需要成功組裝兩條或多條獨特而不同的多肽（即，這樣的形成要求雙抗體通過不同多肽鏈種類的異源二聚化而形成）。這一事實與單特異性雙抗



體相反，其通過相同多肽鏈的同源二聚化而形成。為了形成非單特異性雙抗體，必須提供至少兩條不同的多肽（即，兩個多肽種類），且這類多肽的同源二聚化導致無活性分子（可參見Takemura, S.等學者之文獻：*“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,”* Protein Eng. 2000: 13(8): 583-588），因此這類多肽的產生必須以防止相同種類多肽之間的共價結合的方式實現（可參見Takemura, S.等學者之文獻：*“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,”* Protein Eng. 2000: 13(8): 583-588）。因此，現有技術教導了這類多肽的非共價結合（可參見Olafsen等學者之文獻：*“Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,”* Prot. Engr. Des. Sel. 2004: 17: 21-27、Asano等學者之文獻：*“A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region,”* Abstract 3P-683, J. Biochem. 2004: 76(8): 992、Takemura, S.等學者之文獻：*“Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,”* Protein Eng. 2000: 13(8): 583-588、以及Lu, D.等學者之文獻：*“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. 2005: 280(20): 19665-19672）。

**【0028】** 然而，現有技術認識到，由非共價結合的多肽構成的雙特異性雙抗體不穩定，且易於解離成非功能性單體（可參見Lu, D.等學者之文

獻：“*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. 2005: 280(20): 19665-19672)。

【0029】 在面對這種挑戰時，現有技術已經成功地研發了穩定的共價結合的異源二聚非單特異性雙抗體（可參見PCT專利國際公開第WO 2006/113665號、PCT專利國際公開第WO/2008/157379號、PCT專利國際公開第WO 2010/080538號、PCT專利國際公開第WO 2012/018687號、PCT專利國際公開第WO/2012/162068號、Johnson, S.等學者之文獻：“*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. 2010: 399(3): 436-449、Veri, M.C.等學者之文獻：“*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,*” Arthritis Rheum. 2010: 62(7): 1933-1943、Moore, P.A.等學者之文獻：“*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,*” Blood 2011: 117(17): 4542-4551)。此類方法涉及將一個或多個半胱氨酸殘基工程化到每一種所用多肽種類中。例如，已經證明，向這類構建體的C末端添加半胱氨酸殘基允許多肽鏈之間的二硫鍵合，從而穩定所得的異源二聚體，而不干擾二價分子的結合特性。

【0030】 儘管有樣的成功，但是穩定的功能性異源二聚非單特異性的產生仍然可以通過仔細考慮和放置多肽鏈中所用的結構域而得到進一步改

善。本發明因此涉及特異性多肽的提供，此特異性多肽經特別設計以通過共價鍵合，形成能同時結合CD32B 和CD79b的異源二聚Fc雙抗體。

### 【發明內容】

【0031】 本發明涉及包含免疫球蛋白Fc區的CD32B x CD79b雙特異性單價雙抗體（“CD32B x CD79b 雙特異性單價Fc雙抗體”）。本發明涉及的CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體由三條多肽鏈構成（“第一”、“第二”以及“第三”多肽鏈），其中第一多肽鏈和第二多肽鏈彼此共價鍵合，並且第一多肽鏈和第三多肽鏈彼此共價鍵合。這類共價鍵合例如通過位於每一條多肽鏈中的半胱氨酸殘基的二硫鍵合進行。本發明涉及的CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第一多肽鏈和第二多肽鏈以異源二聚體的方式彼此結合，形成一個對CD32B的表位具有特異性的結合位點和一個對CD79b的表位具有特異性的結合位點。本發明涉及的CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體因此是單價的，因為它們僅能結合CD32B表位元的一個拷貝和結合CD79b表位元的一個拷貝，但是雙特異性的，因為單個雙抗體能同時結合CD32B的表位和結合CD79b的表位。本發明涉及的雙特異性單價Fc雙抗體具有同時結合CD32B和CD79b的能力。本發明涉及這類CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體，並涉及含有這類雙特異性單價Fc雙抗體的藥物組合物。本發明還涉及這類雙抗體在炎性疾病或狀況（特別是系統性紅斑狼瘡（SLE）和移植物抗宿主病）的治療上的用途。

【0032】 具體而言，本發明提供了雙特異性單價Fc雙抗體，其中雙特異性單價Fc雙抗體具有特異性結合CD32B的表位和結合CD79b的表位元的能力，並具有IgG Fc結構域，其中雙特異性單價Fc雙抗體包含第一多肽鏈、

第二多肽鏈以及第三多肽鏈，其中第一多肽鏈和第二多肽鏈彼此共價鍵合，並且第一多肽鏈和第三多肽鏈彼此共價鍵合，並且其中：

A. 第一多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：

i. 結構域1，包含：

1. 亞結構域1A，其包含含半胱氨酸的肽（特別是，具有序列**SEQ ID NO:1**（肽1）的肽）；以及
2. 亞結構域1B，其包含IgG Fc結構域的多肽部分（最優選是，具有IgG免疫球蛋白Fc區的CH2和CH3結構域）；

ii. 結構域2，包含：

1. 亞結構域2A，其包含具有結合CD32B的VL結構域（VL<sub>CD32B</sub>）（序列**SEQ ID NO:11**）的能力之單克隆抗體；以及
2. 亞結構域2B，其包含具有結合CD79b的VH結構域（VH<sub>CD79b</sub>）（序列**SEQ ID NO:14**）的能力之單克隆抗體；

其中，亞結構域2A和2B是由肽連接體（特別是具有序列**SEQ ID NO:4**的肽連接體2彼此隔開）；

iii. 結構域3，其中結構域3是E螺旋（E-coil）結構域（序列**SEQ ID NO:7**）或K螺旋（K-coil）結構域（序列**SEQ ID NO:8**），其中結構域3與結構域2是由肽連接體（特別是具有序列**SEQ ID NO:5**的肽連接體）彼此隔開；以及

iv. C末端間隔肽（特別是具有序列**SEQ ID NO:6**的間隔肽）；

B. 第二多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：

i. 結構域1，包含：

1. 亞結構域1A，其包含具有結合CD79b的VL結構域（VL<sub>CD79b</sub>）（序列**SEQ ID NO:13**）的能力之單克隆抗體；以及
  2. 亞結構域1B，其包含具有結合CD32B的VH結構域（VH<sub>CD32B</sub>）（序列**SEQ ID NO:12**）的能力之單克隆抗體；
 

其中，亞結構域 1A 和 1B 是由肽連接體（特別是具有序列 **SEQ ID NO:4** 的肽連接體 2）彼此隔開；以及
- ii. 結構域2，其中結構域2是K螺旋結構域（序列**SEQ ID NO:8**）或E螺旋結構域（序列**SEQ ID NO:7**），其中結構域2與結構域1是由肽連接體（特別是具有序列**SEQ ID NO:5**的肽連接體）彼此隔開；且其中第一多肽鏈的結構域3和第二多肽鏈的結構域2不都是E螺旋結構域或不都是K螺旋結構域；以及
- C. 第三多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：
- i. 結構域1，其包含：
    1. 亞結構域1A，其包含含半胱氨酸的肽（特別是具有序列**SEQ ID NO:1**（肽1）的肽連接體）；以及
    2. 亞結構域1B，其包含IgG Fc結構域的多肽部分（最優選，具有IgG免疫球蛋白Fc區的CH2和CH3結構域）；

其中：

- a. 第一多肽鏈和第三多肽鏈的IgG Fc結構域的多肽部分形成IgG Fc結構域；
- b. 第一多肽鏈的VL結構域和第二多肽鏈的VH結構域形成具有特異性結合CD32B表位元的能力之抗原結合結構域；以及

- c. 第一多肽鏈的VH結構域和第二多肽鏈的VL結構域形成具有特異性結合CD79b表位元的能力之抗原結合結構域。

【0033】 本發明還提供了雙特異性單價Fc雙抗體，其中雙特異性單價Fc雙抗體具有特異性結合CD32B的表位和結合CD79b的表位元的能力，並具有IgG Fc結構域，其中雙特異性單價Fc雙抗體包含第一多肽鏈、第二多肽鏈以及第三多肽鏈，其中第一多肽鏈和第二多肽鏈彼此共價鍵合，且第一多肽鏈和第三多肽鏈彼此共價鍵合，以及其中：

A. 第一多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：

i. 結構域1，包含：

1. 亞結構域1A，其包含含半胱氨酸的肽（特別是具有序列**SEQ ID NO:1**（肽1）的肽連接體）；以及
2. 亞結構域1B，其包含IgG Fc結構域的多肽部分（最優選，具有IgG免疫球蛋白Fc區的CH2和CH3結構域）；

ii. 結構域2，包含：

1. 亞結構域2A，其包含具有結合CD79b的VL結構域（VL<sub>CD79b</sub>）（序列**SEQ ID NO:13**）的能力之單克隆抗體；以及
2. 亞結構域2B，其包含具有結合CD32B的VH結構域（VH<sub>CD32B</sub>）（序列**SEQ ID NO:12**）的能力之單克隆抗體；

其中，亞結構域2A和2B是由肽連接體（特別是具有序列**SEQ ID NO:4**的肽連接體）彼此隔開；

iii. 結構域3，其中結構域3是E螺旋結構域（序列**SEQ ID NO:7**）或K螺旋結構域（序列**SEQ ID NO:8**），其中結構域3與結構域2是由肽（特

別是具有序列**SEQ ID NO:5**的肽連接體) 隔開; 以及

iv. C末端間隔肽 (特別是具有序列**SEQ ID NO:6**的間隔肽);

B. 第二多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含:

i. 結構域1, 包含:

1. 亞結構域1A, 其包含具有結合CD32B的VL結構域(VL<sub>CD32B</sub>)(序列**SEQ ID NO:11**) 的能力之單克隆抗體; 以及

2. 亞結構域1B, 其包含具有結合CD79b的VH結構域(VH<sub>CD79b</sub>)(序列**SEQ ID NO:14**) 的能力之單克隆抗體;

其中, 亞結構域 1A 和 1B 是由肽連接體 (特別是具有序列 **SEQ ID NO:4** 的肽連接體) 彼此隔開;

ii. 結構域2, 其中結構域2是K螺旋結構域 (序列**SEQ ID NO:8**) 或E螺旋結構域 (序列**SEQ ID NO:7**), 其中結構域2與結構域1是由肽連接體 (特別是具有序列**SEQ ID NO:5**的肽連接體) 彼此隔開; 且其中, 第一多肽鏈的結構域3和第二多肽鏈的結構域2並不都是E螺旋結構域或並不都是K螺旋結構域; 以及

C. 第三多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含:

i. 結構域1, 其包含:

1. 亞結構域1A, 其包含含半胱氨酸的肽 (特別是具有序列**SEQ ID NO:1** (肽1) 的肽連接體); 以及

2. 亞結構域1B, 其包含IgG Fc結構域的多肽部分 (最優選, 具有IgG免疫球蛋白Fc區的CH2和CH3結構域);

其中:

- a. 第一多肽鏈和第三多肽鏈的Fc結構域的多肽部分形成IgG Fc區；
- b. 第一多肽鏈的VL結構域和第二多肽鏈的VH結構域形成具有特異性結合CD79b的表位元的能力之抗原結合結構域；以及
- c. 第一多肽鏈的VH結構域和第二多肽鏈的VL結構域形成具有特異性結合CD32B的表位元的能力之抗原結合結構域。

【0034】 本發明還涉及所有這類雙特異性單價Fc雙抗體的實施方案，其中第一多肽鏈的結構域1包含不同於第三多肽鏈的結構域1的序列的序列。

【0035】 本發明還涉及所有這類雙特異性單價Fc雙抗體的實施方案，其中第一多肽鏈的亞結構域1B具有氨基酸序列SEQ ID NO:9，且第三多肽鏈的亞結構域1B具有氨基酸序列SEQ ID NO:10。

【0036】 本發明還涉及所有這類雙特異性單價Fc雙抗體的實施方案，其中第一多肽鏈的亞結構域1B具有氨基酸序列SEQ ID NO:10，且第三多肽鏈的亞結構域1B具有氨基酸序列SEQ ID NO:9。

【0037】 本發明還涉及所有這類雙特異性單價Fc雙抗體的實施方案，其中第一多肽鏈的結構域1和/或第三多肽鏈的結構域1包含表現出與Fc $\gamma$ 受體的結合發生改變的變異的CH2-CH3序列。

【0038】 本發明還涉及所有這類雙特異性單價Fc雙抗體的實施方案，其中第一多肽鏈的結構域3包含E螺旋（序列SEQ ID NO:7），且第二多肽鏈的結構域2包含K螺旋（序列SEQ ID NO:8）。

【0039】 本發明還涉及所有這類雙特異性單價Fc雙抗體的實施方案，其中第一多肽鏈的結構域3包含K螺旋（序列SEQ ID NO:8），且第二多



肽鏈的結構域2包含E螺旋（序列**SEQ ID NO:7**）。

**【0040】** 本發明還提供了包含IgG免疫球蛋白Fc的雙特異性單價雙抗體（雙特異性單價Fc雙抗體），其中雙特異性單價Fc雙抗體包含：

1. 具有氨基酸序列**SEQ ID NO:15**的第一多肽鏈；
2. 具有氨基酸序列**SEQ ID NO:16**的第二多肽鏈；以及
3. 具有氨基酸序列**SEQ ID NO:17**的第三多肽鏈，其中第三多肽鏈的氨基酸殘基1-10是肽1（序列**SEQ ID NO:1**），且第三多肽鏈的氨基酸殘基11-227是IgG抗體Fc區的CH2和CH3結構域（序列**SEQ ID NO:10**）；

其中，第一多肽鏈和第二多肽鏈彼此通過第一二硫鍵共價鍵合；且第一多肽鏈和第三多肽鏈彼此通過第二二硫鍵共價鍵合。

**【0041】** 本發明還提供了包含任何上述雙特異性單價Fc雙抗體和生理上可接受的載體的藥物組合物。

**【0042】** 本發明還提供了這類藥物組合物在治療炎性疾病或疾病狀況中的用途，具體而言，炎性疾病或疾病狀況是自體免疫病，特別是，其中自體免疫病是系統性紅斑狼瘡（SLE）。

**【0043】** 本發明還提供了這類藥物組合物在治療炎性疾病或疾病狀況中的用途，具體而言，其中炎性疾病或疾病狀況是移植物抗宿主病（GvHD）。

### **【圖式簡單說明】**

**【0044】**

圖1說明優選的雙特異性單價Fc雙抗體的三條多肽鏈和共價結合鏈的

結構。

圖2說明可選的雙特异性單價Fc雙抗體的三條多肽鏈和共價結合鏈的結構。

圖3A-3B顯示優選的CD32B xCD79b Fc雙抗體和非Fc CD32B xCD79b (ABD)雙抗體抑制人類初級B細胞增殖的能力。

圖4A-4B顯示優選的CD32B xCD79b Fc雙抗體、非Fc CD32B xCD79b (ABD)雙抗體以及非Fc CD32B xCD79b雙抗體抑制幼稚 (naïve) B細胞 (圖4A) 和記憶B細胞 (圖4B) 中的信號傳導的能力。

圖5A-5C顯示優選的CD32B xCD79b Fc雙抗體或非Fc CD32B xCD79b (ABD)雙抗體抑制SLE細胞增殖的能力。據發現，這類抑制與疾病狀態無關。

圖6A-6B顯示優選的CD32B xCD79b Fc雙抗體或非Fc CD32B xCD79b雙抗體體內調節B細胞應答的能力，並顯示優選的CD32B xCD79b Fc雙抗體的意料不到的優越性。

圖7顯示優選的CD32B xCD79b Fc雙抗體降低小鼠異源GvHD的能力。

### 【實施方式】

【0045】 本申請要求美國專利申請第61/864,217號 (2013年8月9日提交；未決)、第61/866,416號 (2013年8月15日提交；未決)、第61/869,519號 (2013年8月23日提交；未決) 以及第61/907,525號 (2013年11月22日提交；未決) 的優先權，並且前述每一申請案之揭露內容均通過引用以其整體併入本文。

【0046】 本申請包括一個或多個序列表，此序列表以紙本及電腦可讀介質的形式揭露，並且通過引用將其之紙本和電腦可讀揭露內容以其整體

併入本文。

**【0047】** 本發明涉及雙特異性單價雙抗體 (diabody)，其包含免疫球蛋白Fc結構域 (“雙特異性單價Fc雙抗體”)，並且由三條多肽鏈構成，且具有至少一個對CD32B的表位具有特異性的結合位點和一個對CD79b的表位具有特異性的結合位點 (即，“CD32B xCD79b Fc雙抗體”)。本發明涉及的雙特異性單價Fc雙抗體具有同時結合CD32B和CD79b的能力。本發明涉及含有這類雙特異性單價Fc雙抗體的組合物、藥物組合物以及涉及其在炎性疾病或狀況 (特別是在系統性紅斑狼瘡 (SLE) 和移植物抗宿主病中) 的治療上的用途。

**【0048】** 如上所述，CD79b由B細胞表達，因此表達於響應抗原識別而增殖的細胞上。具有以免疫特異性結合CD79b的能力之雙抗體是具有結合這類B細胞的能力。CD32B是FcγR，且表達於B細胞上。具有以免疫特異性結合FcγRIIB(CD32B)的能力之抗體，特別是結合FcγRIIB但不實質上干擾或妨礙Fc結合的抗體，其是具有增強FcγRIIB與免疫複合物的啟動受體共連接的能力。具有結合CD32B和CD79b兩者的能力之雙特異性單價Fc雙抗體具有回應不需要的B細胞啟動、B細胞增殖以及抗體分泌而抑制或妨礙宿主的免疫系統的能力。這類雙特異性單價Fc雙抗體因此能用在炎性疾病和病症的治療上。

**【0049】 I. 第一實施例之CD32B x CD79b Fc雙抗體**

**【0050】** 於此，CD32B xCD79b Fc雙抗體稱為“Fc”雙抗體，原因在於它們包含Fc結構域。如圖1所示，這類Fc雙抗體由三條多肽鏈構成，其中第一多肽鏈和第二多肽鏈彼此共價鍵合，且第一多肽鏈和第三多肽鏈彼此鍵

合。第一多肽鏈的VL結構域與第二多肽鏈的VH結構域相互作用，從而形成對第一抗原（即CD32B或CD79b）具有特異性的第一功能性抗原結合位點。同樣地，第二多肽鏈的VL結構域與第一多肽鏈的VH結構域相互作用，從而形成對第二抗原（即CD79b或CD32B，取決於對第一抗原的確定）具有特異性的第二功能性抗原結合位點。因此，第一多肽鏈和第二多肽鏈VL和VH結構域的選擇是協調的，從而這兩條多肽鏈共同包含具有結合CD32B和CD79b的能力之VL結構域和VH結構域（即，它們包含VL<sub>CD32B</sub>/VH<sub>CD32B</sub>和VL<sub>CD79b</sub>/VH<sub>CD79b</sub>）（圖1）。VL和VH結構域中的每一者和將VL和VH結構域分隔的間插連接體共同稱為分子的抗原結合結構域。

**【0051】** 此Fc雙抗體的Fc結構域可以是完整的Fc區（例如完整的IgG區）或僅僅是完整Fc區的片段。儘管本發明涉及的雙特異性單價Fc雙抗體的Fc結構域可以具有結合一個或多個Fc受體（例如FcγR（s））的能力，但更優選的是，這類Fc結構域會使與FcγRIA（CD64）、FcγRIIA（CD32A）、FcγRIIB（CD32B）、FcγRIIIA（CD16a）或FcγRIIIB（CD16b）的結合減少（相對於野生型Fc區所表現出的結合），或會實質上消除這類Fc結構域結合這類受體的能力。本發明涉及的雙特異性單價Fc雙抗體的Fc結構域可以包括完整Fc區的一些或所有CH2結構域和/或一些或所有CH3結構域，或可以包含變異的CH2和/或變異的CH3序列（相對於完整Fc區的CH2或CH3結構域，其可以包括例如一個或多個插入和/或一個或多個缺失）。本發明涉及的雙特異性單價Fc雙抗體的Fc結構域可以包含非Fc多肽部分，或可以包含非天然的完整Fc區的一部分，或可以包含CH2和/或CH3結構域的非天然存在的取向（諸如，例如兩個CH2結構域或兩個CH3結構域，或按N末端到C末

端的方向，CH3結構域連接於CH2結構域等）。

**【0052】** 優選CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第一多肽鏈包含（在N末端到C末端的方向上）：氨基末端，含半胱氨酸的肽（肽1），IgG Fc結構域（優選為抗體Fc區的CH2和CH3結構域，最優選為會使與FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或FcγRIIIB (CD16b)的結合減少（相對於野生型Fc區所表現出的結合）或會實質上消除這類Fc結構域結合這類受體的能力之抗體Fc區的CH2和CH3結構域），第一間插間隔肽（連接體1），具有結合CD32B或CD79b的VL結構域（即，VL<sub>CD32B</sub>或VL<sub>CD79b</sub>），第二間插間隔肽（連接體2），單克隆抗體的能具有結合CD79b（如果這類第一多肽鏈含有VL<sub>CD32B</sub>）或CD32B（如果這類第一多肽鏈含有VL<sub>CD79b</sub>）的VH結構域的能力之單克隆抗體，含半胱氨酸的第三間插間隔肽（連接體3），促進異源二聚體的（heterodimer-promoting）結構域，以使對促進異源二聚體的結構域的穩定化得到改善之任選的第四間隔肽（連接體4），以及C末端（圖1）。

**【0053】** 優選CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第二多肽鏈包含（在N末端到C末端的方向上）：氨基末端，具有結合CD79b或CD32B的VL結構域（VL<sub>CD79b</sub>或VL<sub>CD32B</sub>，取決於針對於雙抗體的第一多肽鏈所選的VL結構域）的能力之單克隆抗體，間插連接體肽（連接體2），具有結合CD32B（如果這類第二多肽鏈含有VL<sub>CD79b</sub>）或CD32B（如果這類第二多肽鏈含有VL<sub>CD32B</sub>）的VH結構域的能力之單克隆抗體，含半胱氨酸的間隔肽（連接體3），促進異源二聚體的結構域，以及C末端（圖1）。

**【0054】** 優選地，CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第三多肽

鏈包含（在N末端到C末端的方向上）：氨基末端，含半胱氨酸的肽（肽1），具有與第一多肽鏈的Fc結構域相同種型的IgG Fc結構域（優選為抗體Fc區的CH2和CH3 結構域），以及C末端。優選地，第三多肽鏈的Fc結構域會使與FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a) 或FcγRIIIB (CD16b)的結合減少（相對於野生型Fc區所表現出的結合），或會實質上消除這類Fc結構域結合這類受體的能力（圖1）。

**【0055】** 第一條鏈和第三條鏈的含半胱氨酸的肽（肽1）可以由相同的氨基酸序列或不同的氨基酸序列構成，並且會含有1、2、3或更多個半胱氨酸殘基。特別是，優選的肽1的氨基酸序列為序列**SEQ ID NO:1**：DKTHTCPPCP。第一間插間隔肽（連接體1）包含氨基酸序列序列**SEQ ID NO:2**：APSSS，且更優選其氨基酸序列為序列**SEQ ID NO:3**：APSSSPME。優選的第二間插間隔肽（連接體2）的序列為序列**SEQ ID NO:4**：GGGSGGGG。優選的含半胱氨酸的第三間插間隔肽（連接體3）會含有1、2、3或更多個半胱氨酸。優選的含半胱氨酸的間隔肽（連接體3）的序列為序列**SEQ ID NO:5**：GGCGGG。優選的第四間隔肽（連接體4）的序列為序列**SEQ ID NO:26**：GGG，或為序列**SEQ ID NO:6**：GGGNS。

**【0056】** 最優選的是，間插連接體肽（連接體2，其隔開這類VL和VH結構域）的長度經選擇實質上或完全防止多肽鏈的VL和VH結構域彼此結合。因此第一多肽鏈的VL和VH結構域實質上或完全不能彼此結合。同樣，第二多肽鏈的VL和VH結構域實質上或完全不能彼此結合。

**【0057】** 第一多肽和第二多肽的促進異源二聚體的結構域彼此不同，並且經設計彼此結合，從而促進第一多肽鏈和第二多肽鏈的結合。因

此，在優選的實施方案中，這些多肽鏈之一會被改造為含有促進異源二聚體的“E螺旋”結構域，並且促進異源二聚體的“E螺旋”結構域的序列為序列

**SEQ ID NO:7 :**

**EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK**

其殘基會在pH 7時形成負電荷，而兩條多肽鏈中的另一條會被改造為含有促進異源二聚體的“K螺旋”結構域，並且促進異源二聚體的“K螺旋”結構域的序列為序列**SEQ ID NO:8 :**

**KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE**

其殘基會在pH 7時形成正電荷。這類帶電荷的結構域的存在促進第一多肽和第二多肽之間的結合，並因此促進異源二聚化。向哪條鏈提供哪種螺旋並不重要，只要在第一多肽鏈和第二多肽鏈上所用的螺旋不同從而促進這類鏈之間的異源二聚化即可。

**【0058】** 如上文所述，優選地，突變第一和第三多肽的CH2和CH3結構域，以減少（相對於野生型Fc區）或消除與FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或FcγRIIIB (CD16b)的結合。這類突變在本領域中是熟知的，包括位置234和235的氨基酸取代、位置265的取代或位置297的取代（可參見美國專利第5,624,821號，在此通過引用將其併入）。在優選的實施方案中，CH2和CH3結構域包括在位置234用丙氨酸以及在位置235用丙氨酸進行的取代。

**【0059】** 第一多肽和第三多肽的CH2和/或CH3結構域不必相同，且有利的是，將它們修飾成促進這兩條多肽之間的複合。例如，可以將氨基酸取代（優選為用包含形成‘結（knob）’的大側基的氨基酸（例如：色氨酸）

進行的取代)引入CH<sub>2</sub>或CH<sub>3</sub>結構域中，從而使得空間干擾會防止與類似突變的結構域的相互作用，並且會迫使突變的結構域與這樣的結構域配對：在此結構域中，改造進了互補或適應性突變，即‘孔(hole)’，(例如：用甘氨酸進行取代)。這類突變組可以被改造進任何包含Fc雙抗體分子的多肽對中，並且進一步改造進多肽對的多肽鏈的任何部分中。偏愛異源二聚化而不喜歡同源二聚化的蛋白質工程的方法在本領域中是熟知的，特別是相對於免疫球蛋白樣分子的改造而言，並且包括在本文中(可參見Ridgway等學者之文獻：“‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH<sub>3</sub> Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr. 1996: 9: 617-621、Atwell等學者之文獻：“Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J. Mol. Biol. 1997: 270: 26-35、和Xie等學者之文獻：“A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” J. Immunol. Methods 2005: 296: 95-101；並且前述之每一篇文獻在此通過引用以其整體併入本文)。優選地，將‘結’改造到第一多肽鏈的CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>結構域中，並將‘孔’改造到第三多肽鏈的CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>結構域中。因此‘結’會有助於防止第一多肽鏈通過其CH<sub>2</sub>和/或CH<sub>3</sub>結構域同源二聚化。因為第三多肽鏈優選含有‘孔’取代，其會與第一多肽鏈異源二聚化以及與自身同源二聚化。通過將天然IgG Fc區修飾為含有修飾T366W，產生優選的結。通過將天然IgG Fc區修飾為含有修飾T366S、L368A以及Y407V，產生優選的孔。為了有助於從最終的包含第一多肽鏈、第二多肽鏈以及第三多肽鏈的雙特異性單價Fc雙抗體中純化第三多肽鏈同源二聚體，第三多肽鏈的CH<sub>2</sub>和CH<sub>3</sub>結構域的蛋白A結合位點



優選通過位置435（H435R）的氨基酸取代而突變。為了有助於從最終的包含第一多肽鏈、第二多肽鏈以及第三多肽鏈的雙特異性單價Fc雙抗體中純化第三多肽鏈同源二聚體，第三多肽鏈的CH2和CH3的結構域的蛋白A結合位點優選通過氨基酸取代而突變。因此，第三多肽鏈同源二聚體不會結合蛋白A，而雙特異性單價Fc雙抗體會保留其通過第一多肽鏈上的蛋白A結合位點結合蛋白的能力。

**【0060】** 存在於第一多肽鏈中的抗體Fc區的CH2和CH3結構域的優選序列為序列**SEQ ID NO:9**：

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

**【0061】** 存在於第三多肽鏈中的抗體Fc區的CH2和CH3結構域的優選序列為序列**SEQ ID NO:10**：

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

**【0062】** 結合CD32B的抗體的VL結構域（VL<sub>CD32B</sub>）的優選序列為序

列SEQ ID NO:11 :

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

【0063】 結合CD32B的抗體的VH結構域 (VH<sub>CD32B</sub>) 的優選序列為序

列SEQ ID NO:12 :

EVQLVESGGG      LVQP GGSRL      SCAASGFTFS      DAWMDWVRQA  
 PGKGLEWVAE      IRNKAKNHAT      YYAESVIGRF      TISRDDAKNS  
 LYLQMNSLRA      EDTAVYYCGA      LGLDYWGQGT      LVTVSS

【0064】 結合CD79b的抗體的VL結構域 (VL<sub>CD79b</sub>) 的優選序列為序

列SEQ ID NO:13 :

DVVM TQSPLS      LPVTLGQPAS      ISCKSSQSLL      DSDGKTYLNW  
 FQQRPGQSPN      RLIYLVSKLD      SGVPDRFSGS      GSGTDFTLKI  
 SRVEAEDVGV      YYCWQGT HFP      LTFGGG TKLE      IK

【0065】 結合CD79b的抗體的VH結構域 (VH<sub>CD79b</sub>) 的優選序列為序

列SEQ ID NO:14 :

QVQLVQSGAE      VKKPGASVKV      SCKASGYTFT      SYWMNWVRQA  
 PGQGLEWIGM      IDPSDSETHY      NQKFKDRV TM      TTD TSTSTAY  
 MELRSLRSDD      TAVYYCARAM      GYWGQGT TVT      VSS

【0066】 因此，第一多肽鏈的優選序列在N末端到C末端的方向上具有以下結構：肽1、IgG Fc區的CH2-CH3結構域、連接體1、抗體的結合CD32B的VL結構域 (VL<sub>CD32B</sub>)、連接體2、抗體的結合CD79b的VH結構域 (VH<sub>CD79b</sub>)、連接體3、E螺旋結構域、連接體4以及C末端。第一多肽鏈的

氨基酸序列可為序列**SEQ ID NO:15**：

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

**【0067】** 在**SEQ ID NO:15**中，氨基酸殘基1-10是肽1（序列**SEQ ID NO:1**），氨基酸殘基11-227是IgG抗體Fc區的CH2和CH3結構域（序列**SEQ ID NO:9**），氨基酸殘基228-235是連接體1（序列**SEQ ID NO:3**），氨基酸殘基236-342是抗體的結合CD32B的VL結構域（**VL<sub>CD32B</sub>**）（序列**SEQ ID NO:11**），氨基酸殘基343-350是連接體2（序列**SEQ ID NO:4**），氨基酸殘基351-463是抗體的結合CD79b的VH結構域（**VH<sub>CD79b</sub>**）（序列**SEQ ID NO:14**），氨基酸殘基464-469是連接體3（序列**SEQ ID NO:5**），氨基酸殘基470-497是促進異源二聚體的E螺旋結構域（序列**SEQ ID NO:7**），以及氨基酸殘基498-502是連接體4（序列**SEQ ID NO:6**）。

**【0068】** 編碼第一多肽鏈的優選的多核苷酸具有序列**SEQ ID**

**NO:23 :**

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtcttcttccccca  
 aaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctgtggtggacgtgagccacgaaga  
 ccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag  
 cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtac  
 aagtgaaggttccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc  
 gagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgcct  
 ggtcaaaggcttctatcccagcgacatgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaag  
 accacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg  
 cagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc  
 ctgtctccgggtaaagccccctccagctcccctatggaagacatccagatgaccagctctccatcctccttatctgcc  
 tctgtgggagatagagtcaccatcactgtcgggcaagtcaggaaattagtggttacttaagctggctgcagcagaa  
 accaggcaaggcccctagacgcctgatctacgccgatccactttagattctggtgtccatccagggtcagtgga  
 gtgagtctgggaccgagttcacctcacatcagcagccttcagcctgaagattttgcaacctattactgtctacaat  
 attttagttatccgctcacgttcggaggggggaccaaggtggaataaaaaggaggcggatccggcggcggaggc  
 caggttcagctggtgcagctcggagctgaggtgaagaagcctggcgcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttct  
 ggttacaccttaccagctactggatgaactgggtgcgacaggcccctggacaaggccttgagtggatcggaatg  
 attgatccttcagacagtgaactcactacaatcaaaagttcaaggacagagtcacatgaccacagacacatcca  
 cgagcacagcctacatggagctgaggagcctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgagagctatgg  
 gctactgggggcaagggaccacggtcaccgtctcctccggaggatgtggcgggtggagaagtggccgcactgga  
 gaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgtgcacttgaaggaggtcgcagccctggagaaggcggc  
 gggaactct

**【0069】** 第二多肽鏈的優選的序列為序列**SEQ ID NO:16 :**

DVVMTQSPLS	LPVTLGQPAS	ISCKSSQSLI	DSDGKTYLNW
FQQRPGQSPN	RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	GS GTDFTLKI
SRVEAEDVGV	YYCWQGTHFP	LTFGGGTKLE	IKGGGSGGGG
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DAWMDWVRQA
PGKGLEWVAE	IRNKAKNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDAKNS
LYLQMNSLRA	EDTAVYYCGA	LGLDYWGQGT	LVTVSSGGCG
GGKVAALKEK	VAALKEKVAA	LKEKVAALKE	

**【0070】** 在**SEQ ID NO:16**中，氨基酸殘基1-112是抗體的結合CD79b的VL結構域（**VL<sub>CD79b</sub>**）（序列**SEQ ID NO:13**），氨基酸殘基113-120是連接體2（序列**SEQ ID NO:4**），氨基酸殘基121-236是抗體的結合CD32B的VH結構域（**VH<sub>CD32B</sub>**）（序列**SEQ ID NO:12**），氨基酸殘基237-242是連接體3（序列**SEQ ID NO:5**），以及氨基酸殘基243-270是促進異源二聚體的K螺旋結構域（序列**SEQ ID NO:8**）。

**【0071】** 編碼第二多肽鏈的優選的多核苷酸具有序列**SEQ ID NO:24**：

```

gatgttgatgactcagtcctccactctccctgcccgccacccttgacagccggcctccatctcctgcaagtcaagt
cagagcctcttagatagtgatgaaagacatattgaattggttcagcagaggccaggccaatctcaaaccgcct
aatttatctggtgtctaaactggactctggggtcccagacagattcagcggcagtggtcaggcactgattcacact
gaaaatcagcagggtggaggctgaggatgtggggtttattactgctggcaaggtacacatttccgctcacgttcg
gcggagggaccaagcttgagatcaaaggaggcggatccggcggcggaggcgaagtgcagcttgaggagtctg
gaggaggcttggtgcaacctggaggatccctgagactctctgtgccgcctctggattcacttttagtgacgcctgg
atggactgggtccgtcaggccccaggcaaggggcttgagtgggttgctgaaattagaacaaagctaaaaatcat
gcaacatactatgctgagtcgtgataggagggttcaccatctcaagagatgacgcaaaaacagtcctgtacctgca

```

aatgaacagcttaagagctgaagacactgccgtgtattactgtggggctctgggccttgactactggggccaaggc  
 accctggtgaccgtctcctccggaggatgtggcggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagtgtgctttg  
 aaagagaaggctgccgcacttaaggaaaaggctgcagccctgaaagag

【0072】 第三多肽鏈的優選的序列為序列SEQ ID NO:17：

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

【0073】 在SEQ ID NO:17中，氨基酸殘基1-10是肽1（序列SEQ ID NO:1），以及氨基酸殘基11-227是IgG抗體Fc區的CH2和CH3結構域（序列SEQ ID NO:10）。

【0074】 編碼第三多肽鏈的優選的多核苷酸具有序列SEQ ID NO:25：

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtcttctcttccccca  
 aaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaaga  
 ccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag  
 cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtac  
 aagtgcaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcccc  
 gagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgaggaggatgaccaagaaccaggtcagcctgagttgctgc  
 agtcaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaag  
 accagcctcccgtgctggactccgacggctccttctcctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg

cagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagcctctcc  
ctgtctccgggtaaa

**【0075】** 如在PCT專利國際公開第WO 2012/018687號中所公開的，為了改善雙抗體分子的體內藥代動力學特性，可以在雙抗體分子的一個或多個末端，將該分子修飾為含有血清結合蛋白的多肽部分。最優選的是，將這類血清結合蛋白的多肽部分安置于雙抗體分子的C末端處。出於這種目的，血清結合蛋白的特別優選的多肽部分是鏈球菌蛋白G的白蛋白結合結構域（ABD）。鏈球菌屬（*Streptococcus*）菌株G148的蛋白G的白蛋白結合結構域3（ABD3）是特別優選的。

**【0076】** 鏈球菌屬菌株G148的蛋白G的白蛋白結合結構域3（ABD3）由形成穩定三螺旋束的46個氨基酸殘基組成，並具有廣泛的白蛋白結合特異性（可參見Johansson, M.U.等學者之文獻：“*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules,*” *J. Biol. Chem.* 2002: 277(10): 8114-8120）。白蛋白是血漿中最豐富的蛋白，在人類中半衰期為19天。白蛋白具有幾個允許其非共價結合其他蛋白並由此延長其血清半衰期的小分子結合位點。優選的是，使用短的连接體5（如，序列**SEQ ID NO:18**：GGGS或序列**SEQ ID NO:6**：GGGNS）將這類多肽鏈的E螺旋（或K螺旋）與白蛋白結合結構域隔開。優選的白蛋白結合結構域（**ABD**）具有氨基酸序列**SEQ ID NO:19**：

LAEAKVLANR ELDKYGVSD YYKNLIDNAKS AEGVKALID  
EILAALP

**【0077】 II. 第二實施例之CD32B x CD79b Fc雙抗體**

【0078】 於此，CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體分子圖示于圖2中。此CD32B xCD79b Fc雙抗體分子具有三條多肽鏈，其中，第一多肽鏈和第二多肽鏈彼此共價鍵合，且第一多肽鏈和第三多肽鏈彼此鍵合。第二實施例中之CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體分子的結構域的順序不同於第一實施例中之CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體分子的結構域的順序。然而，在第二實施例中之CD32B x CD79b Fc雙抗體的情況下，CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第一多肽鏈的VL結構域與CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第二多肽鏈的VH結構域相互作用，從而形成對第一抗原（即，CD32B或CD79b）具有特異性的第一功能性抗原結合位點。同樣，CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第二多肽鏈的VL結構域與CD32B x CD79b雙特異性單價Fc雙抗體的第一多肽鏈的VH結構域相互作用，從而形成對第二抗原（即，CD79b或CD32B，取決於對第一抗原的確認）具有特異性的第二功能性抗原結合位點。因此，第一多肽鏈和第二多肽鏈VL和VH結構域的選擇是協調的，從而這兩條多肽鏈共同包含具有結合CD32B和CD79b的能力之VL和VH結構域（即，它們包含VL<sub>CD32B</sub>/VH<sub>CD32B</sub>和VL<sub>CD79b</sub>/VH<sub>CD79b</sub>）（圖2）。VL和VH結構域中之每一者和隔開它們的間插連接體共同稱為分子的抗原結合結構域。

【0079】 此CD32B xCD79b Fc雙抗體的第一多肽鏈在N末端到C末端的的方向上包含氨基末端、具有結合CD32B或CD79b的VL結構域（即，VL<sub>CD32B</sub>或VL<sub>CD79b</sub>）的能力之單克隆抗體、間插間隔肽（連接體2）、具有結合CD79b（如果第一多肽鏈含有VL<sub>CD32B</sub>）或CD32B（如果第一多肽鏈含有VL<sub>CD79b</sub>）的VH結構域的能力之單克隆抗體、含半胱氨酸的第三間插間隔肽（連接體



3)、促進異源二聚體的結構域、以使對促進異源二聚體的結構域(優選為E螺旋結構域)的穩定化得到改善之任選的第四間隔肽(連接體4)、含半胱氨酸的肽(肽1)、IgG Fc結構域(優選為抗體Fc區的CH2和CH3結構域),以及C末端。優選地,第一多肽鏈的Fc結構域會使與FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或FcγRIIIB (CD16b)的結合減少(相對於野生型Fc區所表現出的結合),或會實質上消除這類Fc結構域結合這類受體的能力(圖2)。

**【0080】** 此CD32B xCD79b Fc雙抗體的第二多肽鏈在N末端到C末端的的方向上包含氨基末端、具有結合CD79b或CD32B的VL結構域(即,VL<sub>CD79b</sub>或VL<sub>CD32B</sub>,取決於針對雙抗體的第一多肽鏈所選的VL結構域)的能力之單克隆抗體、間插連接體肽(連接體2)、具有結合CD32B(如果第二多肽鏈含有VL<sub>CD79b</sub>)或CD32B(如果第二多肽鏈含有VL<sub>CD32B</sub>)的VH結構域的能力之單克隆抗體、含半胱氨酸的間隔肽(連接體3)、促進異源二聚體的結構域(優選K螺旋結構域),以及C末端(圖2)。

**【0081】** 此CD32B xCD79b Fc雙抗體的第三多肽鏈在N末端到C末端的的方向上包含氨基末端、含半胱氨酸的肽(肽1)、具有與第一多肽鏈的Fc結構域相同種型的IgG Fc結構域(優選為抗體Fc區的CH2和CH3結構域)以及C末端。優選地,第三多肽鏈的Fc結構域會使與FcγRIA (CD64)、FcγRIIA (CD32A)、FcγRIIB (CD32B)、FcγRIIIA (CD16a)或FcγRIIIB (CD16b)的結合減少(相對於野生型Fc區所表現出的結合),或會實質上消除這類Fc結構域結合這類受體的能力(圖2)。

**【0082】 III. 藥物組合物**

**【0083】** 本發明涉及的組合物包括可用於製造藥物組合物（例如：不純的或非無菌的組合物）和藥物組合物（即，適合施用于物件或患者的組合物）的散裝（bulk）藥物組合物，其可用來製備單位劑型。這類組合物包含預防有效量或者治療有效量的CD32BxCD79b Fc雙抗體，且特別是本文公開的任何CD32B xCD79b Fc雙抗體，或這類劑以及藥學上可接受的載體的組合。優選地，這類組合物更包含預防有效量或者治療有效量的一種或多種本發明的分子和藥學上可接受的載體。

**【0084】** 本發明還涉及這樣的藥物組合物，其包含前述之CD32B xCD79b Fc雙抗體、對特定自體免疫或炎性疾病抗原具有特異性的第二治療抗體（例如：自體免疫或炎性疾病抗原特異性的單克隆抗體）、以及藥學上可接受的載體。

**【0085】** 在具體實施方案中，術語“藥學上可接受的”表示獲得聯邦政府或州政府管理結構的許可或列於美國藥典（U.S. Pharmacopeia）或其他通常獲得認可的藥典中，供用於動物，特別是用於人類。術語“載體”指與治療劑一起施用的稀釋劑、佐劑（例如：完全和不完全弗氏佐劑）、賦形劑或媒介。這類藥用載體可以是無菌液體，如，水和油（其包括石油、動物油、植物油或合成來源的油，例如：花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等）。當靜脈內施用藥物組合物時，水是優選的載體。鹽水溶液和含水右旋糖以及甘油溶液可以用作液體載體，特別是對於可注射溶液而言。合適的藥用賦形劑包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、米、麵粉、滑石粉（chalk）、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石、氯化鈉、脫脂乳粉（dried skim milk）、甘油、丙烯、1,2-乙二醇、水、乙醇等。若需要，組合物也可以含

有小量濕潤劑或乳化劑或pH緩衝劑。這些組合物可以採用溶液、懸浮劑、乳劑、片劑、丸劑、膠囊、粉劑、緩釋製劑等形式。

**【0086】** 通常，本發明涉及之組合物的成分被單獨提供或以單位劑型的形式混合在一起，例如：作為標明活性劑量的密封容器中的凍乾粉或無水濃縮物，其中密封容器例如：安剖或袋（sachette）。當通過輸注施用組合物時，其可以用含有無菌的藥物級水或鹽水的輸注瓶分配。如果通過注射施用前述之組合物，則可以提供一安剖注射用無菌水或鹽水，以便可以在施用前混合前述之組分。

**【0087】** 可以將根據本發明的組合物配製為中性或鹽形式。藥學上可接受的鹽包括但不限於用陰離子形成的鹽，以及用陽離子形成的鹽。其中，前述之陰離子例如：來源於鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的陰離子，並且前述之陽離子例如：來自氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、組氨酸、普魯卡因等的陽離子。

**【0088】** 本發明還提供了藥物包裝或試劑盒，其包含一個或多個容器，此容器單獨填充前述之CD32B xCD79b Fc雙抗體，或填充前述之雙抗體和藥學上可接受的載體。另外，用於治療疾病的一種或多種其他預防性或治療性劑也可以包括於藥物包裝或試劑盒中。本發明還提供了藥物包裝或試劑盒，其包含一個或多個容器，此容器填充以本發明涉及之藥物組合物的一種或多種成分。任選地與這類容器關聯的可以是採用管理藥物或生物產品的製造、使用或銷售的政府機構規定的佈告（notice）供施用於人類，其中此佈告反映了管理機構許可製造、使用或銷售。

【0089】 本發明提供了用於上述方法中的試劑盒。在一實施方案中，試劑盒包含本發明涉及的一種或多種分子。在另一實施方案中，試劑盒還包含一個或多個容器中的可用於治療自體免疫病或炎性疾病的一種或多種其他預防劑或治療劑。在另一實施方案中，試劑盒還包含結合與自體免疫病或炎性疾病相關的自體免疫病或炎性疾病抗原的一種或多種抗體。在某些實施方案中，其他預防劑或治療劑是化學治療劑。在其他實施方案中，預防劑或治療劑是生物治療劑或激素治療劑。

#### 【0090】 IV. 組合物的用途

【0091】 根據本發明的CD32B xCD79b Fc雙抗體能治療與CD79b表達相關或特徵為CD79b表達或與具有針對該疾病的B細胞組分有關或特徵為具有針對疾病的B細胞組分的任何疾病或疾病狀況。因此，包含這類分子的藥物組合物可以用於診斷或治療自體免疫病或炎性疾病或疾病狀況，而無限制。

【0092】 因此其可以用於治療、預防或減緩B細胞介導的疾病或病症的發展和/或改善B細胞介導的疾病或病症的症狀，包括移植排斥、移植物抗宿主病（GvHD）和系統性紅斑狼瘡（SLE）。

#### 【0093】 V. 給藥方法

【0094】 通過向物件施用有效量的根據本發明的藥物組合物，可以提供根據本發明的組合物用來治療、預防和改善與疾病、病症或感染相關的一種或多種症狀。在優選的方面，這類組合物基本上是純的（即基本上不含限制其效果或產生不期望的副作用的物質）。在具體實施方案中，對象是動物，優選哺乳動物，如非靈長類（例如：牛、馬、貓科動物、犬科動物、

齧齒動物等)或靈長類(例如,猴子,如食蟹猴(cynomolgous monkey)、人類等)。在優選的實施方案中,物件是人類。

**【0095】** 各種送遞系統是已知的,並且可以用於施用根據本發明的組合物,例如封裝於脂質體中、微粒、微膠囊、能表達抗體或融合蛋白的重組細胞、受體介導的內吞作用(可參見Wu等學者之文獻:“*Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,*” J. Biol. Chem. 1987: 262: 4429-4432),構建核酸作為逆轉錄病毒或其他載體的一部分等。

**【0096】** 施用根據本發明之雙特異性單價Fc雙抗體的方法包括但不限於胃腸外施用(例如:真皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內以及皮下)、硬腦膜外以及粘膜(例如:鼻內和口腔途徑)。在具體實施方案中,肌肉內、靜脈內或皮下施用根據本發明的分子。組合物可以通過任何方便途徑施用,例如:通過輸注或大丸劑注射、通過上皮膜或粘膜與皮膚膜(例如口腔粘膜、直腸和腸粘膜等)吸收,並且可以與其他生物活性劑一起施用。給藥可以是全身的或局部的。另外,也可以應用肺給藥,例如:通過使用吸入器或噴霧器和具有霧化劑的製劑。可參見例如美國專利第6,019,968號、第5,985,320號、第5,985,309號、第5,934,272號、第5,874,064號、第5,855,913號、第5,290,540號、和第4,880,078號;和PCT專利國際公開第WO 92/19244號、第WO 97/32572號、第WO 97/44013號、第WO 98/31346號、和第WO 99/66903號,並且上述每一專利都通過引用以其整體併入本文。

**【0097】** 本發明的一實施例還使得根據本發明的CD32B x CD79b Fc雙抗體被包裝於標有這類分子的量的密封的容器(如:安剖或袋)中。在

一實施方案中，根據本發明的CD32B x CD79b Fc雙抗體作為凍幹無菌粉或無水濃縮物提供於密封容器中，並且可以用例如水或鹽水重構至施用於個體的適當濃度。優選地，根據本發明的CD32B x CD79b Fc雙抗體作為凍幹無菌粉提供於密封容器中，其單位劑量為至少5  $\mu\text{g}$ ，更優選地為至少10  $\mu\text{g}$ 、至少15  $\mu\text{g}$ 、至少25  $\mu\text{g}$ 、至少50  $\mu\text{g}$ 、至少100  $\mu\text{g}$ 或至少200  $\mu\text{g}$ 。

**【0098】** 根據本發明的凍幹的CD32B x CD79b Fc雙抗體應當在其最初的容器中儲存於2-8°C之間，並且前述之分子應當在重構後的12小時內、優選在6小時內、在5小時內、在3小時內或在1小時內施用。在可選的實施方案中，根據本發明的CD32B x CD79b Fc雙抗體以液體的形式提供於標明前述之分子、融合蛋白或綴合分子的量和濃度的密封容器中。優選地，根據本發明的液體形式的CD32B x CD79b Fc雙抗體提供於這樣的密封容器中：並且在容器中之分子存在的濃度為至少1  $\mu\text{g/ml}$ ，更優選地為至少2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、至少5  $\mu\text{g/ml}$ 、至少10  $\mu\text{g/ml}$ 、至少50  $\mu\text{g/ml}$ 或至少100  $\mu\text{g/ml}$ 。

**【0099】** 可以通過標準的臨床技術，確定根據本發明的CD32B x CD79b Fc雙抗體的有效治療、預防或改善與病症相關的一種或多種症狀的量。待用於製劑中的精確劑量還取決於給藥途徑和疾病狀況的嚴重程度，並且應當根據從業者的判斷和每一患者的情況決定。有效劑量可以根據來源於體外或動物模型測試系統的劑量應答曲線來推斷。

**【0100】** 對於所包括的CD32B x CD79b Fc雙抗體而言，施用于患者的劑量通常為至少約0.01  $\mu\text{g/kg}$ 對象體重、至少約0.05  $\mu\text{g/kg}$ 對象體重、至少約0.1  $\mu\text{g/kg}$ 對象體重、至少約0.2  $\mu\text{g/kg}$ 對象體重、至少約0.5  $\mu\text{g/kg}$ 對象體重、至少約1  $\mu\text{g/kg}$ 對象體重、至少約2  $\mu\text{g/kg}$ 對象體重、至少約5  $\mu\text{g/kg}$ 對象

體重、至少約10 µg/kg對象體重、至少約20 µg/kg對象體重、至少約50 µg/kg對象體重、至少約0.1 mg/kg對象體重、至少約1 mg/kg對象體重、至少約5 mg/kg對象體重、至少約10 mg/kg對象體重、至少約30 mg/kg對象體重、至少約50 mg/kg對象體重、至少約75 mg/kg對象體重、至少約100 mg/kg對象體重、至少約125 mg/kg對象體重、至少約150 mg/kg對象體重或更多。

【0101】 通過修飾如脂質化增強雙特異性單價Fc雙抗體的吸收和組織滲透，可以減少或改變根據本發明之雙特異性單價Fc雙抗體的給藥劑量和頻率。

【0102】 在一實施方案中，可以計算施用于患者的根據本發明之CD32B x CD79b Fc雙抗體的劑量，供用作單一劑治療。在另一實施方案中，根據本發明的雙特異性單價Fc雙抗體與其他治療組合物聯合使用，並且施用于患者的劑量低於當這類雙特異性單價Fc雙抗體分子作為單一劑治療使用時的劑量。

【0103】 在具體實施方案中，可能期望將根據本發明的藥物組合物局部施用於需要治療的區域，這可以通過以下方式實現，例如但不限於局部輸注、注射或移植物手段，其中此移植物是多孔的、非多孔的或明膠材料，且其包括膜（如：矽橡膠（sialastic）膜）或纖維。優選地，當施用根據本發明的分子時，必須小心施用分子不吸收的材料。

【0104】 在另一實施方案中，可以在泡（vesicle）（特別是脂質體）中送遞前述之組合物（可參見Langer學者之文獻：“*New Methods Of Drug Delivery*,” Science 1990: 249: 1527-1533、Treat等學者之文獻：IN LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER,

Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, 1989: pp. 353- 365、以及 Lopez-Berestein學者之文獻：期刊同上, pp. 317-327；通常出處同上)。在另一實施方案中，可以在控釋系統或緩釋系統中送遞前述之組合物。可以使用本領域技術人員已知的任何技術產生包含根據本發明的一種或多種分子的緩釋製劑。可參見美國專利第4,526,938號、PCT專利國際公開第WO 91/05548號、PCT專利國際公開第WO 96/20698號、Ning等學者之文獻：  
*“Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,”* Radiotherapy & Oncology 1996: 39: 179-189、Song等學者之文獻：*“Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,”* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 1995: 50: 372-397、Cleek等學者之文獻：*“Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,”* Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 1997: 24: 853-854、以及Lam等學者之文獻：*“Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,”* Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 1997: 24: 759-760，並且上述之每一者均通過引用以其整體併入。在一實施方案中，可以將泵用於控釋系統中（可參見Langer學者之文獻：出處同上、Sefton學者之文獻：*“Implantable Pumps,”* CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 1987: 14: 201-240、Buchwald等學者之文獻：*“Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis,”* Surgery 1980: 88: 507-516、以及 Saudek等學者之文獻：*“A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable*



*Medication System For Insulin Delivery*,” N. Engl. J. Med. 1989: 321: 574-579)。在另一實施方案中，可以用聚合物材料實現抗體的控釋（可參見文獻：MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida 1974、文獻：CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York 1984、Levy等學者之文獻：“*Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate*,” Science 1985: 228: 190-192、During等學者之文獻：“*Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization*,” Ann. Neurol. 1989: 25: 351-356、Howard等學者之文獻：“*Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits*,” J. Neurosurg. 1989: 7(1): 105-112)、美國專利第5,679,377號、美國專利第5,916,597號、美國專利第5,912,015號、美國專利第5,989,463號、美國專利第5,128,326號、PCT專利國際公開第WO 99/15154號、以及PCT專利國際公開第WO 99/20253號)。緩釋製劑所用的聚合物的實例包括但不限於聚(2-甲基丙烯酸羥乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、乙烯-乙基乙酸酯共聚物 (poly(ethylene-co-vinyl acetate))、聚(甲基丙烯酸)、聚乙醇酸交酯 (PLG)、聚酞、聚(N-乙基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚交酯 (PLA)、丙交酯-乙交酯共聚物 (PLGA) 以及聚原酸酯 (polyorthoeste)。在另一實施方案中，可使控釋系統接近治療靶標（例如：肺）放置，因此僅需要全身劑量的一部分（可參見Goodson學者之文獻：IN MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, 期刊同上, 1984,;

vol. 2, pp. 115-138)。在另一實施方案中，根據Dunn等人之發明（參見美國專利第U.S. 5,945,155號），使用可用作控釋移植物的聚合物組合物。該特定方法基於聚合物系統中生物活性材料原位控釋的治療效果。移植通常發生于患者身體內需要治療的任何地方。在另一實施方案中，使用非聚合物持續送遞系統，由此物件身體內的非聚合物移植物被用作藥物送遞系統。一旦移植到身體中，移植物的有機溶劑會從組合物中消散、分散或過濾到周圍組織液中，並且非聚合物材料會逐漸凝結或沉澱，形成固體微孔基質（參見美國專利第U.S. 5,888,533號）。

【0105】 控釋系統在Langer學者之文獻中（“*New Methods Of Drug Delivery*,” *Science* 1990: 249: 1527-1533）有論述。可以使用本領域技術人員已知的任何技術來生產包含根據本發明的一種或多種治療劑的緩釋製劑。參見美國專利第4,526,938號、PCT專利國際公開第WO 91/05548和WO 96/20698號、Ning等學者之文獻：“*Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel*,” *Radiotherapy & Oncology* 1996: 39: 179-189、Song等學者之文獻：“*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions*,” *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 1995: 50: 372-397、Cleek等學者之文獻：“*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application*,” *Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1997: 24: 853-854、以及Lam等學者之文獻：“*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery*,” *Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 1997: 24: 759-760，並且上述每一者均通過引用以

其整體併入本文。

**【0106】** 在根據本發明的組合物是編碼根據本發明的雙特異性單價Fc雙抗體的核酸的具體實施方案中，通過將核酸構建為適合的核酸表達載體的一部分，並例如通過使用逆轉錄病毒載體（參見美國專利第4,980,286號），或通過直接注射或通過使用微粒轟擊（例如：杜邦公司（Dupont）之Biolistic基因槍）或塗覆以脂質或細胞表面受體或轉染劑，或使其與已知進入細胞核的同源框樣肽連接（可參見Joliot等學者之文獻：“*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*,” Proc. Natl. Acad.Sci. (U.S.A.) 1991: 88: 1864-1868）等施用前述之核酸，以便其變成細胞內的，使得核酸可以體內施用，以促進其編碼的雙特異性單價Fc雙抗體的表達。可選地，可以將細胞引入細胞內並通過同源重組整合到宿主細胞DNA中，以進行表達。

**【0107】** 用治療有效量或預防有效量的根據本發明的CD32B x CD79b Fc雙抗體治療物件，可以包括單一治療，或優選可以包括一系列治療。在優選的實例中，用根據本發明的分子治療對象，每週一次，持續約1-10周，優選2-8周，更優選約3-7周，甚至更優選約4、5或6周。在其他實施方案中，施用根據本發明的藥物組合物，一日一次，一日兩次或一日三次。在其他實施方案中，施用前述之藥物組合物，一週一次，一周兩次，每兩週一次，一月一次，每六週一次，每兩月一次，一年兩次或一年一次。應當認識到，用於治療的分子的有效劑量可以隨著具體治療的過程增加或降低。

**【0108】** 已經按通常的方式描述了本發明，通過參考下述範例，會更

容易地理解本發明，下述範例以示例的方式提供，而非意圖限制本發明，除非另有說明。

**【0109】 範例1：構建CD32BxCD79b雙特異性單價 Fc雙抗體和對照雙抗體**

**【0110】** 表1包含優選的已經表達和純化的CD32B xCD79b Fc雙抗體多肽鏈的序列列表。另外，產生了兩個對照雙抗體：一個是針對CD32B和FITC的雙特異性單價雙抗體，另一是針對CD79b和FITC的雙特異性單價雙抗體。

表1

第一實施例之 CD32B xCD79b 雙特異性 Fc 雙抗體	取代多肽（在 N 末端到 C 末端的方 向上）
<p>第一多肽鏈 (SEQ ID NO:15)</p>	<p>SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:14 SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:7 SEQ ID NO:6</p>
<p>第二多肽鏈 (SEQ ID NO:16)</p>	<p>SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:12 SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:8</p>
<p>第三多肽鏈 (SEQ ID NO:17)</p>	<p>SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:10</p>

**【0111】** 據發現，上述CD32B xCD79b Fc雙抗體具有同時結合CD32B

和結合CD79b的能力。據發現，對照之CD32B x FITC雙抗體具有同時結合CD32B和結合FITC的能力。據發現，對照之CD79bx FITC雙抗體具有同時結合CD79b和結合FITC的能力。CD32B x CD79b Fc雙抗體是由三條多肽鏈（每一所述氨基酸序列的一條鏈）構成的異源三聚體。形成雙特異性單價雙抗體的方法提供於PCT專利國際公開第WO 2006/113665號、第WO 2008/157379號、第WO 2010/080538號、第WO 2012/018687號、第WO 2012/162068號以及第WO 2012/162067號中。

**【0112】** 為了進一步證明此CD32B xCD79b Fc雙抗體的優勢，還製備了兩個含有非Fc的CD32B xCD79b雙抗體。這兩個雙抗體每個都由兩條多肽鏈構成，不同在於多個雙抗體中之一者（CD32B xCD79b (ABD)雙抗體）含有白蛋白結合結構域，而另一者（CD32B xCD79b雙抗體）則不含有白蛋白結合結構域：

**【0113】 一、CD32B xCD79b(ABD)雙抗體**

**【0114】** CD32B xCD79b (ABD)雙抗體由第一多肽鏈形成，第一多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：結合CD32B的抗體的VL結構域（VL<sub>CD32B</sub>）、連接體2、結合CD79b的抗體的VH結構域（VH<sub>CD79b</sub>）、連接體3、E螺旋結構域、連接體5、白蛋白結合結構域以及C末端。第二多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含結合CD79b的抗體的VL結構域（VL<sub>CD79b</sub>）、連接體2、結合CD32B的抗體的VH結構域（VH<sub>CD32B</sub>）、連接體3、K螺旋結構域以及C末端。這類多肽的氨基酸序列如下：

**【0115】 第一多肽鏈的氨基酸序列SEQ ID NO:20：**

DIQMTQSPSS      LSASVGDRVT      ITCRASQEIS      GYLSWLQQKP

GKAPRRLIYA	ASTLDSGVPS	RFSGSESGTE	FTLTISSLQP
EDFATYYCLQ	YFSYPLTFGG	GTKVEIKGGG	SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG	ASVKVSCKAS	GYTFTSYWMN	WVRQAPGQGL
EWIGMIDPSD	SETHYNQKFK	DRVTMTTDTTS	TSTAYMELRS
LRSDDTAVYY	CARAMGYWGQ	GTTVTVSSGG	CGGGEVAALE
KEVAALEKEV	AALEKEVAAL	EKGGGSLAEA	KVLANRELDK
YGVSDYYKNL	IDNAKSAEGV	KALIDEILAA	LP

**【0116】 第二多肽鏈的氨基酸序列SEQ ID NO:21：**

DVVMTQSPLS	LPVTLGQPAS	ISCKSSQSLL	DSDGKTYLNW
FQQRPGQSPN	RLIYLVSKLD	SGVPDRFSGS	SGGTDFTLKI
SRVEAEDVGV	YYCWQGTTFP	LTFGGGTKLE	IKGGGSGGGG
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DAWMDWVRQA
PGKGLEWVAE	IRNKAKNHAT	YYAESVIGRF	TISRDDAKNS
LYLQMNSLRA	EDTAVYYCGA	LGLDYWGQGT	LVTVSSGGCG
GGKVAALKEK	VAALKEKVAA	LKEKVAALKE	

**【0117】 二、CD32B xCD79b雙抗體**

**【0118】** CD32B xCD79b雙抗體與CD32B xCD79b (ABD)雙抗體的不同之處在於不具有白蛋白結合結構域。因此這類雙抗體由第一多肽鏈形成，第一多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：結合CD32B的抗體的VL結構域 (VL<sub>CD32B</sub>)、連接體2、結合CD79b的抗體的VH結構域 (VH<sub>CD79b</sub>)、連接體3、E螺旋結構域、以及C末端。第二多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：結合CD79b的抗體的VL結構域 (VL<sub>CD79b</sub>)、連接體2、結合CD32B的抗體的VH結構域 (VH<sub>CD32B</sub>)、連接體3、K螺旋結構域以及C末端。此雙

抗體的第一多肽鏈的氨基酸序列是序列SEQ ID NO:22：

DIQMTQSPSS	LSASVGDRV T	ITCRASQEIS	GYLSWLQQKP
GKAPRRLIYA	ASTLDSGVPS	RFSGSESGTE	FTLTISLQP
EDFATYYCLQ	YFSYPLTFGG	GTKVEIKGGG	SGGGGQVQLV
QSGAEVKKPG	ASVKVSCKAS	GYTFTSYWMN	WVRQAPGQGL
EWIGMIDPSD	SETHYNQKFK	DRV TMTT DTS	TSTAYMELRS
LRSDDTAVYY	CARAMGYWGQ	GTTVTVSSGG	CGGGEVAALE
KEVAALEKEV	AALEKEVAAL	EK	

【0119】 雙抗體的第二多肽鏈的氨基酸序列是序列SEQ ID NO:21，其如上文所示。

【0120】 範例2：CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體抑制人類初級B細胞增殖

【0121】 為了進一步證明根據本發明的CD32B xCD79b Fc雙抗體阻礙或抑制免疫系統的能力，在存在從兩個供體獲得的初級人類B細胞的情況下，溫育上述第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體。在存在山羊抗人類IgM Fc  $\mu$  F(ab)<sub>2</sub> (5  $\mu$ g/ml) 和不同濃度的CD32B x CD79b Fc 雙抗體或CD32B xCD79b ABD雙抗體的情況下，48小時後，通過<sup>3</sup>H-TdR的攝取，監控增殖。結果示於圖3A（供體1）和圖3B（供體2）中，並顯示在存在CD32B xCD79b Fc雙抗體或CD32B xCD79b (ABD)雙抗體的情況下，B細胞增殖顯著減少。

【0122】 範例3：CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體抑制幼稚B細胞和記憶B細胞中的信號傳導

【0123】 為了進一步證明根據本發明的CD32B xCD79b Fc雙抗體阻礙或抑制B細胞的免疫系統信號傳導的能力，在存在單獨的山羊抗人類IgM Fc  $\mu$  (anti- $\mu$ ) (30  $\mu$ g/ml) 或還存在上述第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體的情況下，將純化的幼稚或記憶B細胞溫育30分鐘。由圖4A（幼稚B細胞）和圖4B（記憶B細胞）可以看出，CD32B xCD79b Fc雙抗體、CD32B xCD79b (ABD)雙抗體或CD32B xCD79b雙抗體的存在都明顯降低B細胞信號傳導。

【0124】 範例4：CD32B xCD79b雙特異性單價 Fc雙抗體抑制SLE患者B細胞增殖

【0125】 為了進一步證明根據本發明的CD32B xCD79b Fc雙抗體阻礙或抑制B細胞的免疫系統信號傳導的能力，在存在單獨的山羊抗人類IgM Fc  $\mu$ 或還存在上述第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體的情況下，溫育患有系統性紅斑狼瘡（SLE）的患者的B細胞。通過<sup>3</sup>H-TdR的吸收監控增殖。

【0126】 如圖5A所示，據發現CD32B xCD79b Fc雙抗體具有結合CD32B和CD79b的能力。圖5B表明，提供山羊抗人類IgM（GAH anti- $\mu$ ）使B細胞的增殖相對於對照增加，以及額外施用CD32B xCD79b Fc雙抗體或CD32B xCD79b (ABD)雙抗體顯著抑制這類增殖的程度。

【0127】 據發現，CD32B xCD79b Fc雙抗體或CD32B xCD79b (ABD)雙抗體降低患有SLE的個體的B細胞增殖程度的能力與賴疾病狀態無關。相對於在僅存在山羊抗人類IgM的情況下所觀察到的增殖，患有活性或非活性SLE的患者中B細胞增殖降低的程度約為40%，並因此與疾病狀態無關（圖5C）。圖5C進一步證明，第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體比CD32B



xCD79b (ABD)雙抗體提供了更強的抑制。

**【0128】 範例5：CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體體內調節B細胞應答**

**【0129】** 為了進一步證明根據本發明的CD32B xCD79b Fc雙抗體阻礙或抑制B細胞的免疫系統信號傳導的能力，將人類PBMC注射到免疫缺陷NSG小鼠中（參見Aglino, A.等學者之文獻：“*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* 2008: 123(9): 2222-2227、Sanchez, P.V.等學者之文獻：“*A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia,*” *Leukemia* 2009: 23(11): 2109-2117、Racki, W.J.等學者之文獻：“*NOD-ScidIL2rgamma(Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection,*” *Transplantation* 2010: 89(5): 527-536、Choi, B.等學者之文獻：“*Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2Rγ(Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan,*” *J. Clin. Immunol.* 2011: 31(2): 253-264、Sartelet, H.等學者之文獻：“*Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/Il2rg Null (NSG) Mice,*” *In Vivo* 2012: 26(1): 19-29、Spranger, S.等學者之文獻：“*NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies in vivo,*” *J. Transl. Med.* 2012: 10: 30、以及von Bonin, M.等學者之文獻：“*in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice,*” *PLoS One.* 2013: 8(4): e60680)。  
給動物施用對照媒介（100 μl磷酸緩衝鹽水（PBS）

/動物，q3d x 2周)、第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體（100 μl/動物，q3d x 2周）或CD32B xCD79b雙抗體（僅由兩條多肽鏈構成，並且含有白蛋白結合結構域）。在第7天和第14天，如通過ELISA檢測血漿中人類IgM（圖6A）或人類IgG（圖6B）的存在，兩者都指示移植物抗宿主病的發作。

**【0130】** 接受對照媒介的小鼠表現出高水準的人類IgM和人類IgG。相比之下，在接受第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體的小鼠中，基本上未檢測到這類抗體（圖6A和圖6B）。已接受CD32B xCD79b雙抗體的小鼠，與接受對照媒介的小鼠相比，表現出人類IgM和人類IgG水準減少，但是這類水準基本上高於接受CD32B xCD79b Fc雙抗體的水準。這些發現證明，雙特異性單價CD32B xCD79b雙抗體具有治療用途和效力，但是根據本發明第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體出人意外地優於這類非Fc雙抗體，並且具有甚至更強的治療用途和效力（圖6A和圖6B）。

**【0131】 範例6：CD32B xCD79b雙特異性單價Fc雙抗體降低小鼠中的異源GvHD**

**【0132】** 為了進一步證明根據本發明的CD32B xCD79b Fc雙抗體阻礙或抑制B細胞的免疫系統信號傳導的能力，將人類PBMC（ $5 \times 10^6$ 個細胞，靜脈內注射）注射到免疫缺陷NOD.scid IL2ry空（null）NSG小鼠中。給動物施用對照媒介（100 μl磷酸緩衝鹽水（PBS）/動物）、第一實施例的CD32B xCD79b Fc雙抗體（5 mg/kg或10 mg/kg）或抗CD20抗體（利妥昔單抗（rituximab）；5 mg/kg；按劑量給藥一次）。隨時間測定小鼠的累積存活率。如圖7所示，相對於接受PCS對照或利妥昔單抗的小鼠，接受任一劑量的CD32B xCD79b Fc雙抗體的動物表現出顯著增強的存活率。

**【0133】** 通過引用將本說明書提到的所有出版物和專利併入本文中，併入的程度如同具體且單獨指出通過引用以其整體併入每一個體出版物或專利申請。儘管結合具體實施方案已經描述了本發明，但是應當理解到，通常遵循本發明的原理，可對其進行進一步修飾，且本申請意圖涵蓋本發明的任意變型、用途或適應性變化，並包括屬於本發明所屬領域的已知的或慣常的實踐的、與本公開內容的這類偏離，並且可以應用於本文所示的基本特徵。

**【符號說明】**

**【0134】**

CH2 CH2結構域

CH3 CH3結構域

VL VL結構域

VH VH結構域

SLE 系統性紅斑狼瘡

**【序列表】** (請換頁單獨記載)

<110> 宏觀基因股份有限公司

<120> 具有能結合CD32B和CD79b能力的雙特異性單價Fc雙抗體及其用途

<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> 26



<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu

1

5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 連接體2

<400> 4

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1

5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 連接體3

<400> 5

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1

5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 連接體4

<400> 6



Gly Gly Gly Asn Ser

1 5

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 促進異源二聚體的E螺旋結構域

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 8

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 促進異源二聚體的K螺旋結構域

<400> 8

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

1

5

10

15

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

20

25

<210> 9

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 存在於第一多肽鏈中的抗體Fc區的CH2和CH3結構域

&lt;400&gt; 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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 存在於第三多?鏈中的抗體Fc區的CH2和CH3結構域

&lt;400&gt; 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> Artificial Sequence

<220>

<223> 結合CD32B的抗體的VL結構域

<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

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 結合CD32B的抗體的VH結構域

&lt;400&gt; 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> Artificial Sequence

<220>

<223> 結合CD79b的抗體的VL結構域

<400> 13

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



100

105

110

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 結合CD79b的抗體的VH結構域

&lt;400&gt; 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> Artificial Sequence

<220>

<223> 第一多肽鏈

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> 第二多肽鏈

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> 第三多肽鏈

<400> 17

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

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

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Pro Gly Lys

225

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 連接體5

<400> 18

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 白蛋白結合結構域 (ABD)

<400> 19

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45



<210> 20

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD32B xCD79b(ABD)雙抗體的第一多肽鏈

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> CD32B xCD79b (ABD)雙抗體的第二多肽鏈

<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



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> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 編碼序號SEQ ID NO:15之第一多肽鏈的多核苷酸

<400> 23

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc 60

ttcctctcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac

240

cgtgtgttca gctcctcac cgtcctgac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggtct ccaacaaage cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag

420

aaccaggtca gcctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc	540
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	660
ctctccctgt ctccgggtaa agccccctcc agctccccta tggaagacat ccagatgacc	720
cagtctccat cctccttacc tgcctctgtg ggagatagag tcaccatcac ttgtcgggca	780
agtcaggaaa ttagtggtta cttaaagctgg ctgcagcaga aaccaggcaa ggccccctaga	840
cgctgatct acgccgcacc cactttagat tctggtgtcc catccaggtt cagtggcagt	900
gagtctggga ccgagttcac cctcaccacc agcagccttc agcctgaaga ttttgaacc	960
tattactgtc tacaatattt tagttatccg ctcacgttcg gaggggggac caaggtggaa	1020
ataaaaggag gcggatccgg cggcggaggc caggttcagc tggtcagtc tggagctgag	1080
gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc tctgcaagg ctctgggta 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 ggcaaggac cacggtcacc 1380

gtctcctccg gaggatgtgg cggaggagaa gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct 1440

ttggagaagg aggtcgctgc actgaaaag gaggtcgcag ccctggagaa aggcggcggg

1500

aactct

1506

<210> 24

<211> 810

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 編碼SEQ ID NO:16之第二多肽鏈的多核苷酸

<400> 24

gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttgaca gccggcctcc	60
atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg	120
tttcagcaga ggccaggcca atctccaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac	180
tctgggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaac	240
agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acatttccg	300
ctcacgttcg gcggaggac caagcttgag atcaaaggag gcggatccgg cggcggaggc	360
gaagtgcagc ttgtggagtc tggaggaggc ttggtgcaac ctggaggatc cctgagactc	420
tcttgtgccg cctctggatt cacttttagt gacgcctgga tggactgggt ccgtcaggcc	480
ccaggcaagg ggcttgagtg gggtgctgaa attagaaca aagctaaaaa tcatgcaaca	540
tactatgctg agtctgtgat agggagggtc accatctcaa gagatgacgc caaaaacagt	600
ctgtacctgc aatgaacag ctaagagct gaagacactg ccgtgtatta ctgtggggct	660
ctgggccttg actactgggg ccaaggcacc ctggtgaccg tctctccgg aggatgtggc	720

ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca 780

cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag  
810

<210> 25

<211> 681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 編碼SEQ ID NO:17之第三多肽鏈的多核苷酸

<400> 25

gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc 60

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac  
240

cgtgtggtea ggcctctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300  
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360  
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag  
 420  
 aaccaggtca gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480  
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 540  
 gagggctcct tcttctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600  
 aacgtttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc 660  
 ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 26

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 連接體4

<400> 26

Gly Gly Gly

1

## 申請專利範圍

1. 一種雙特異性單價Fc雙抗體，其中該雙特異性單價Fc雙抗體具有特異性結合CD32B的表位和結合CD79b的表位元的能力，並且具有IgG Fc結構域，其中該雙特異性單價Fc雙抗體包含第一多肽鏈、第二多肽鏈以及第三多肽鏈，其中該第一多肽鏈和該第二多肽鏈彼此共價鍵合，且該第一多肽鏈和該第三多肽鏈彼此共價鍵合；

其中，該第一多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：

- i. 結構域 1，包含：

- (1) 亞結構域 1A，其包含含半胱氨酸的肽（序列 **SEQ ID NO:1**）；以及

- (2) 亞結構域 1B，其包含該 IgG Fc 結構域的多肽部分，其中該 IgG Fc 結構域具有 IgG 免疫球蛋白 Fc 區的 CH2 和 CH3 結構域；

- ii. 結構域 2，包含：

- (1) 亞結構域 2A，其包含具有結合該 CD32B 的 VL 結構域（VL<sub>CD32B</sub>）的能力之單克隆抗體（序列 **SEQ ID NO:11**）；  
以及

- (2) 亞結構域 2B，其包含單克隆抗體能具有結合該 CD79b 的 VH 結構域（VH<sub>CD79b</sub>）（序列 **SEQ ID NO:14**），

其中，該亞結構域 2A 和該亞結構域 2B 是由肽連接體 2（序列 **SEQ ID NO:4**）隔開；

- iii. 結構域 3，其中該結構域 3 是 E 螺旋結構域（序列 **SEQ ID NO:7**）或 K 螺旋結構域（序列 **SEQ ID NO:8**），其中該結構域 3 與該結構域 2 是由肽連接體 3（序列 **SEQ ID NO:5**）隔開；以及

- iv. C 末端間隔肽（序列 **SEQ ID NO:6**）；



其中，該第二多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含：

i. 結構域 1，包含：

(1) 亞結構域 1A，其包含單克隆抗體的能結合 CD79b 的 VL 結構域 (VL<sub>CD79b</sub>) (序列 **SEQ ID NO:13**)；以及

(2) 亞結構域 1B，其包含單克隆抗體的能結合 CD32B 的 VH 結構域 (VH<sub>CD32B</sub>) (序列 **SEQ ID NO:12**)；

其中，該第二多肽鏈的該亞結構域 1A 和該第二多肽鏈的該亞結構域 1B 是由該肽連接體 2 (序列 **SEQ ID NO:4**) 隔開；

ii. 結構域 2，其中該第二多肽鏈的該結構域 2 是 K 螺旋結構域(序列 **SEQ ID NO:8**) 或 E 螺旋結構域 (序列 **SEQ ID NO:7**)，其中該第二多肽鏈的該結構域 2 與該第二多肽鏈的該結構域 1 是由該肽連接體 3 (序列 **SEQ ID NO:5**) 隔開；且其中該第一多肽鏈的該結構域 3 和該第二多肽鏈的該結構域 2 不都是 E 螺旋結構域或不都是 K 螺旋結構域；以及

其中，該第三多肽鏈在N末端到C末端的方向上包含結構域1，該第三多肽鏈的該結構域1包含：

(1) 亞結構域 1A，其包含含半胱氨酸的肽 (序列 **SEQ ID NO:1**)；以及

(2) 亞結構域 1B，其包含該 IgG Fc 結構域的多肽部分，其中該 IgG Fc 結構域具有該 IgG 免疫球蛋白 Fc 區的該 CH2 和 CH3 結構域；以及

其中：

該第一多肽鏈和該第三多肽鏈的該IgG Fc結構域的該多肽部分形成該IgG Fc結構域；

該第一多肽鏈的該VL結構域和該第二多肽鏈的該VH結構域形成具

有特異性結合該CD32B的表位元的能力之抗原結合結構域；以及

該第一多肽鏈的該VH結構域和該第二多肽鏈的該VL結構域形成具有特異性結合該CD79b的表位元的能力之抗原結合結構域。

2. 如請求項1所述的雙特異性單價Fc雙抗體，其中該第一多肽鏈的該亞結構域1B包含不同於該第三多肽鏈的該亞結構域1B的序列。
3. 如請求項1所述的雙特異性單價Fc雙抗體，其中該第一多肽鏈的該亞結構域1B具有氨基酸序列**SEQ ID NO:9**，且該第三多肽鏈的該亞結構域1B具有氨基酸序列**SEQ ID NO:10**。
4. 如請求項1所述的雙特異性單價Fc雙抗體，其中該第一多肽鏈的該亞結構域1B具有氨基酸序列**SEQ ID NO:10**，且該第三多肽鏈的該亞結構域1B具有氨基酸序列**SEQ ID NO:9**。
5. 如請求項1-2中任一項所述的雙特異性單價Fc雙抗體，其中該第一多肽鏈的該結構域1和/或該第三多肽鏈的該結構域1包含變異的CH2-CH3序列，該變異的CH2-CH3序列表現出與Fc $\gamma$ 受體的結合發生改變。
6. 如請求項1-5中任一項所述的雙特異性單價Fc雙抗體，其中該第一多肽鏈的該結構域3包含E螺旋（序列**SEQ ID NO:7**），且該第二多肽鏈的該結構域2包含K螺旋（序列**SEQ ID NO:8**）。
7. 如請求項1-5中任一項所述的雙特異性單價Fc雙抗體，其中該第一多肽鏈的該結構域3包含K螺旋（序列**SEQ ID NO:8**），且該第二多肽鏈的該結構域2包含E螺旋（序列**SEQ ID NO:7**）。
8. 一種雙特異性單價Fc雙抗體，其中該雙特異性單價Fc雙抗體具有特異性結合CD32B的表位和結合CD79b的表位元的能力，並具有IgG Fc結構

域，其中該雙特異性單價Fc雙抗體包含：

具有氨基酸序列**SEQ ID NO:15**的第一多肽鏈；

具有氨基酸序列**SEQ ID NO:16**的第二多肽鏈；以及

具有氨基酸序列**SEQ ID NO:17**的第三多肽鏈，其中該第三多肽鏈的氨基酸殘基1-10是肽1（序列**SEQ ID NO:1**），且該第三多肽鏈的氨基酸殘基11-227是IgG抗體Fc區的CH2和CH3結構域（序列**SEQ ID NO:10**）；

其中，該第一多肽鏈和該第二多肽鏈通過第一二硫鍵彼此鍵合，且該第一多肽鏈和第三多肽鏈通過第二二硫鍵彼此鍵合。

9. 一種藥物組合物，包含請求項1-8中之任一項所述的雙特異性單價Fc雙抗體以及生理上可接受的載體。
10. 一種如請求項9所述的藥物組合物在炎性疾病或狀況的治療上的用途。
11. 如請求項10所述的用途，其中該炎性疾病或狀況是自體免疫病。
12. 如請求項10所述的用途，其中該自體免疫病是系統性紅斑狼瘡。
13. 如請求項9所述的用途，其中該炎性疾病或狀況是移植物抗宿主病。

說明書附圖

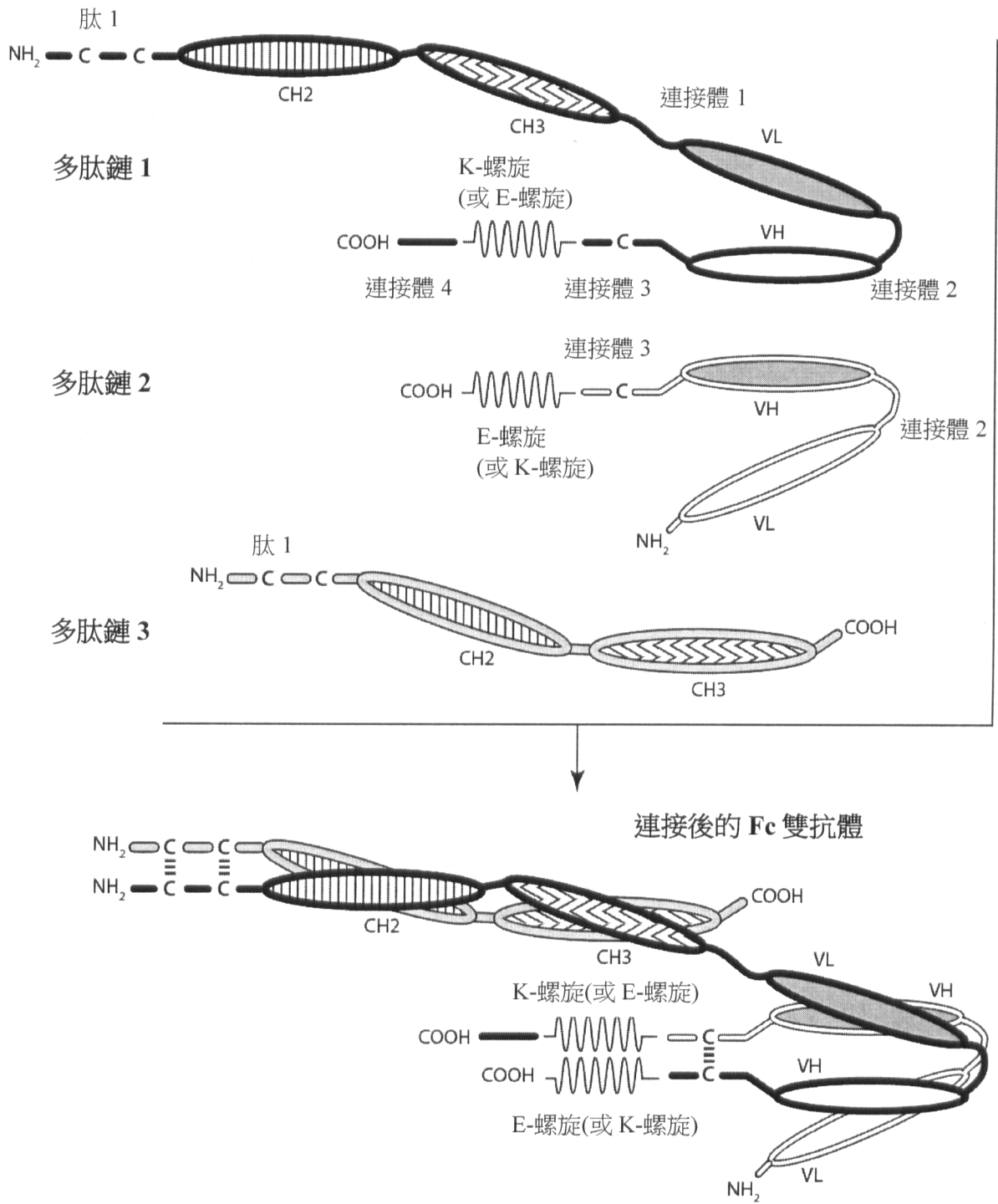


圖 1

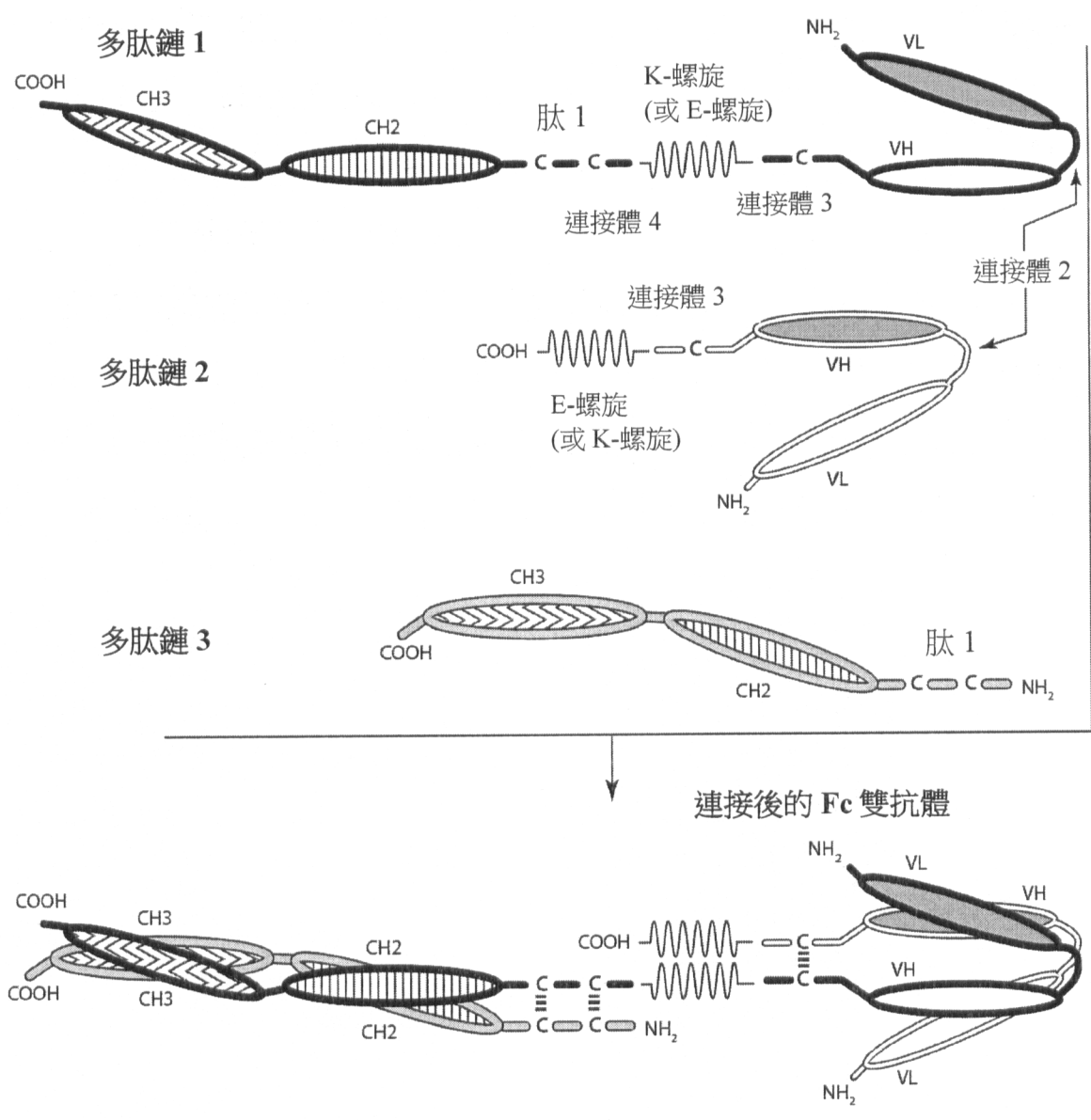


圖 2

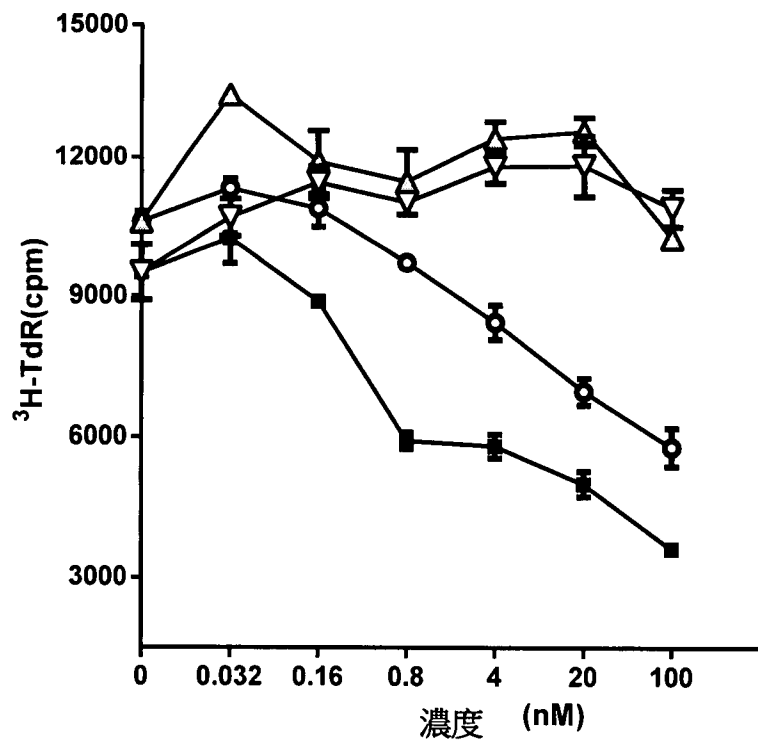
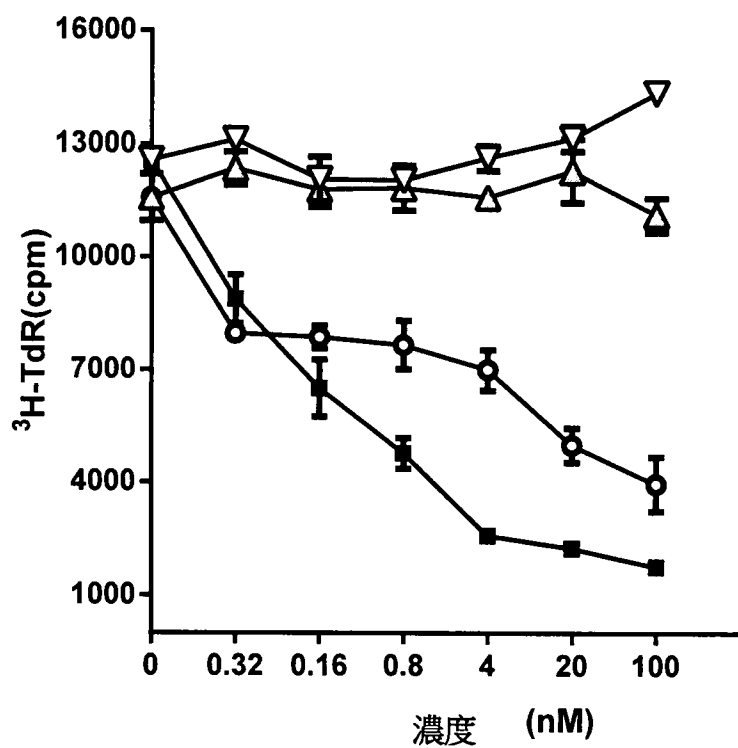


圖 3A



- ▽ CD32B x FITC 對照雙抗體
- △ CD79B x FITC 對照雙抗體
- CD32B x CD79B (ABD) 非 Fc 雙抗體
- CD32B x CD79B Fc 雙抗體

圖 3B

**CD27- B 細胞(幼稚)**

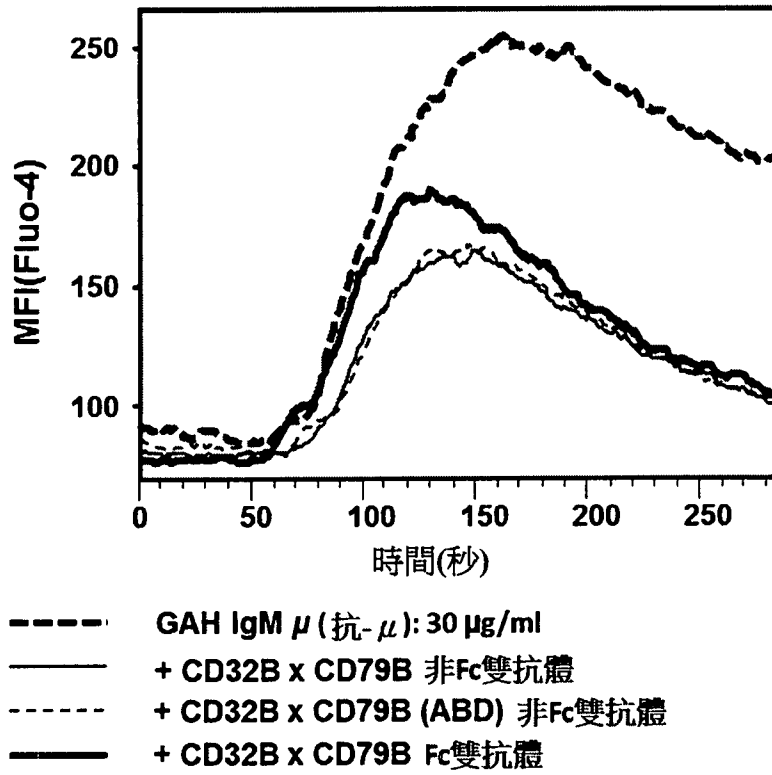


圖 4A

**CD27+ B 細胞(記憶)**

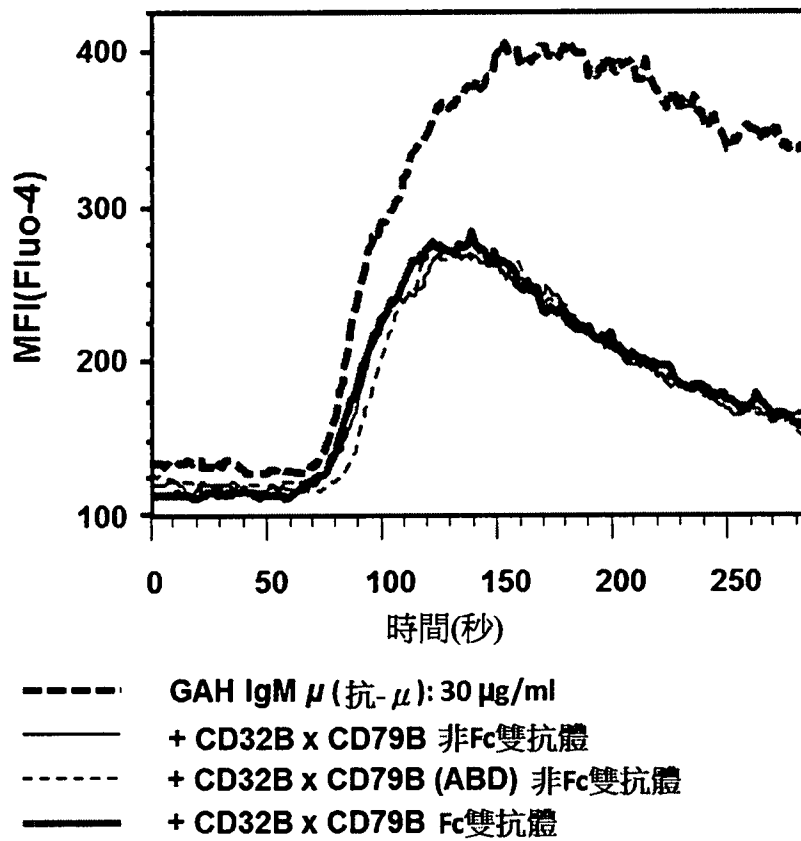


圖 4B

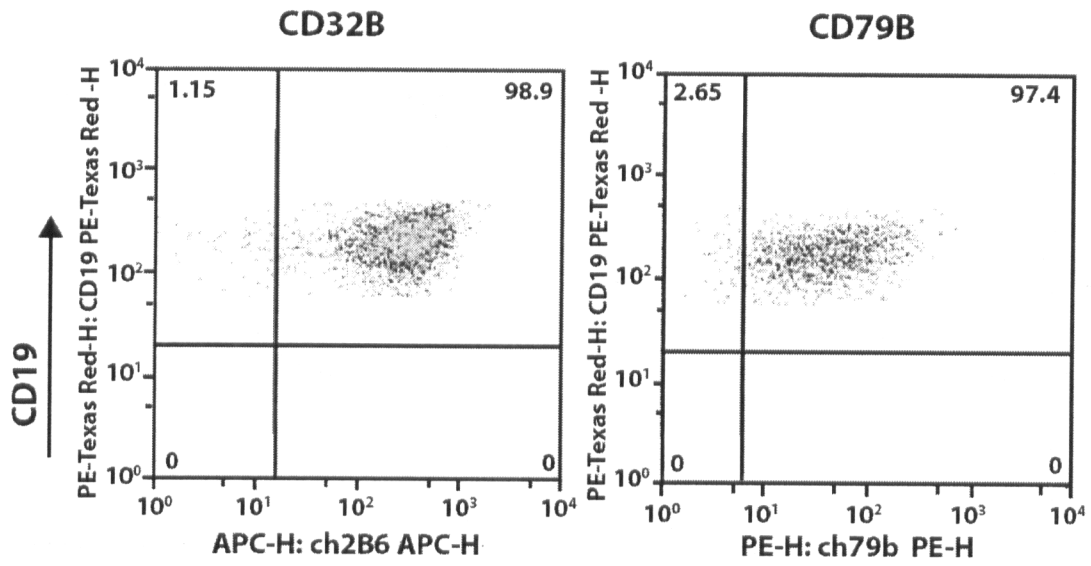


圖 5A

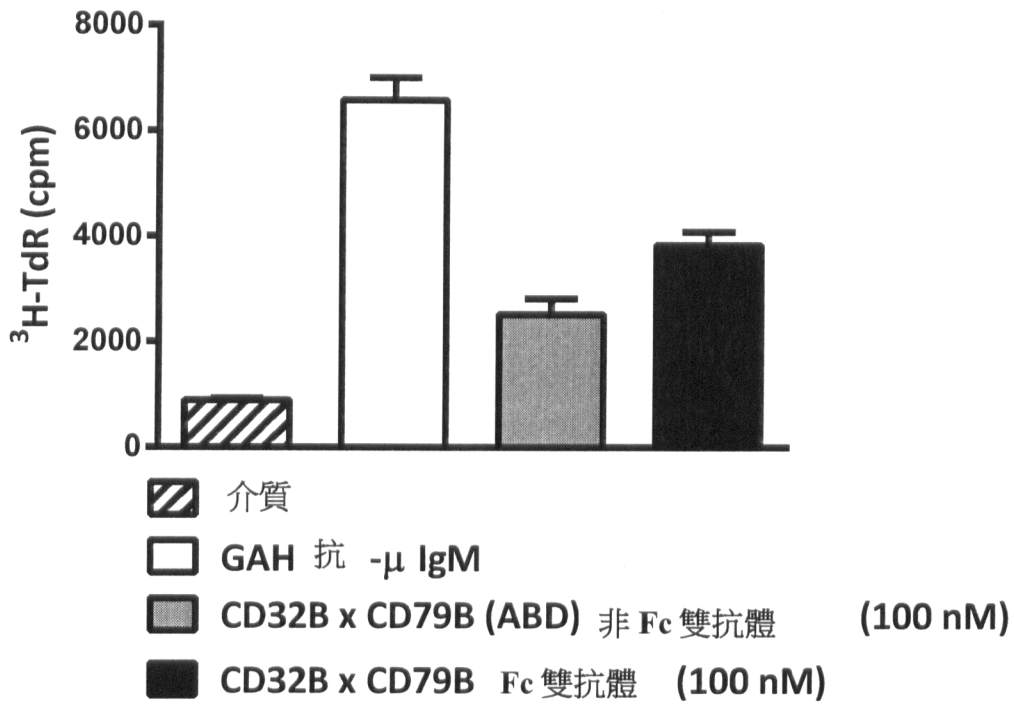


圖 5B



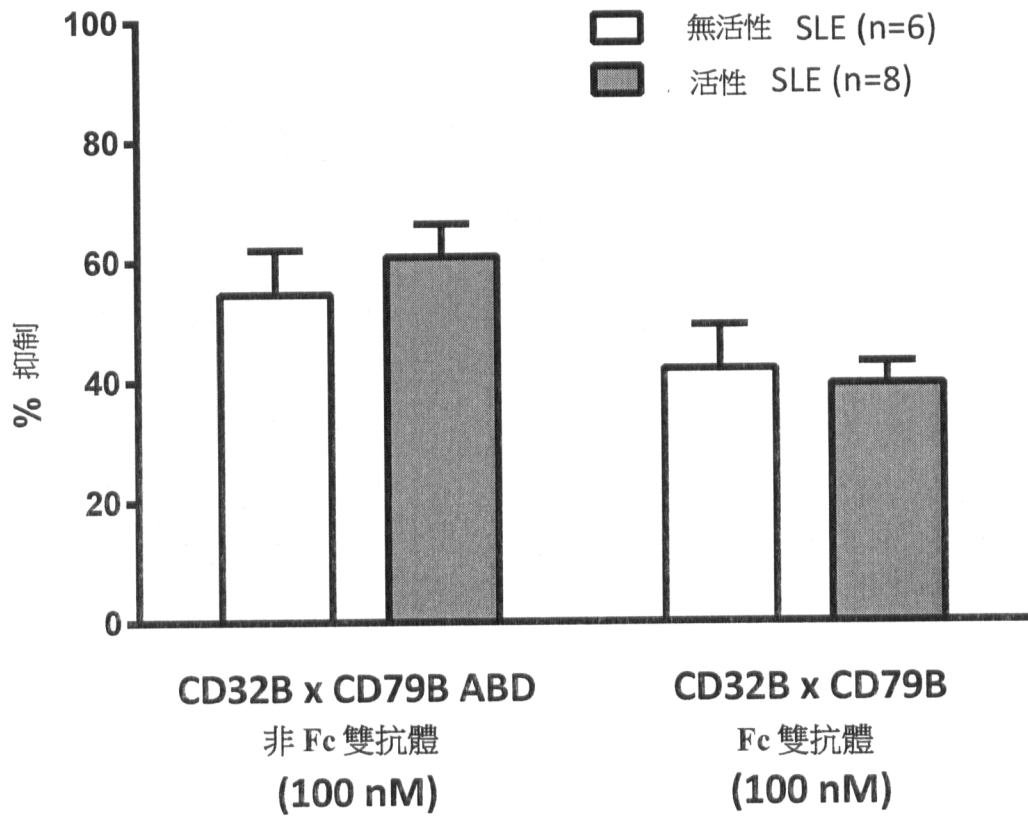


圖 5C

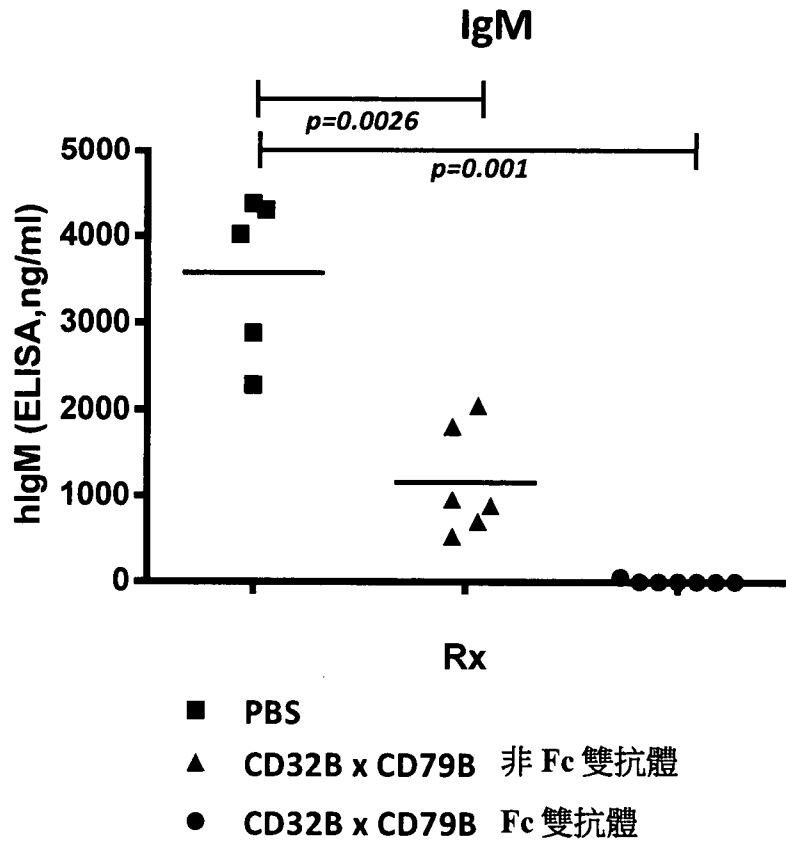


圖 6A

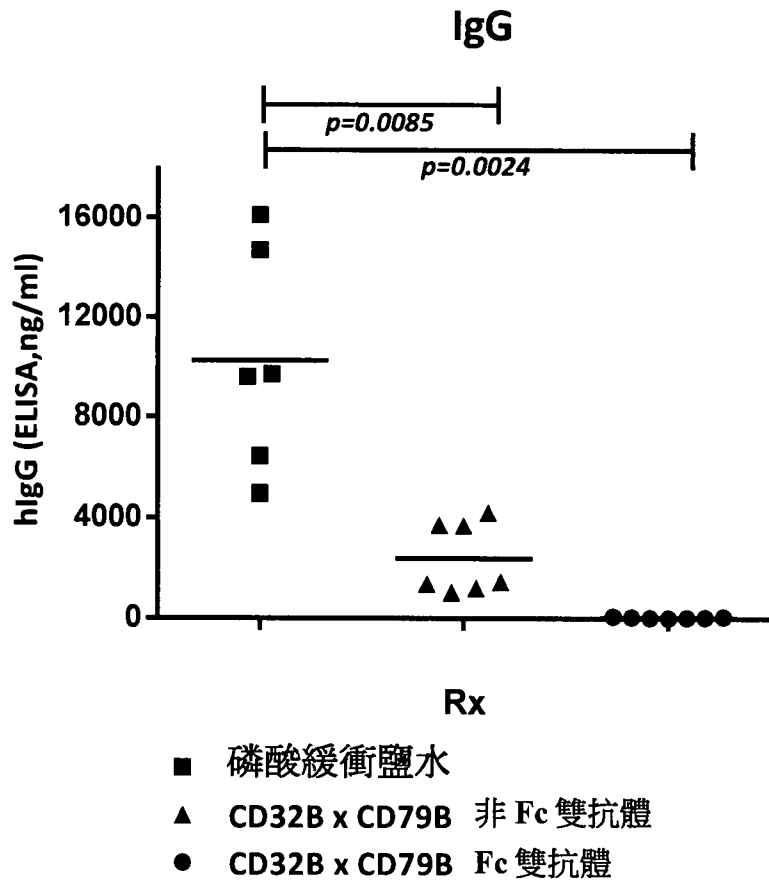


圖 6B

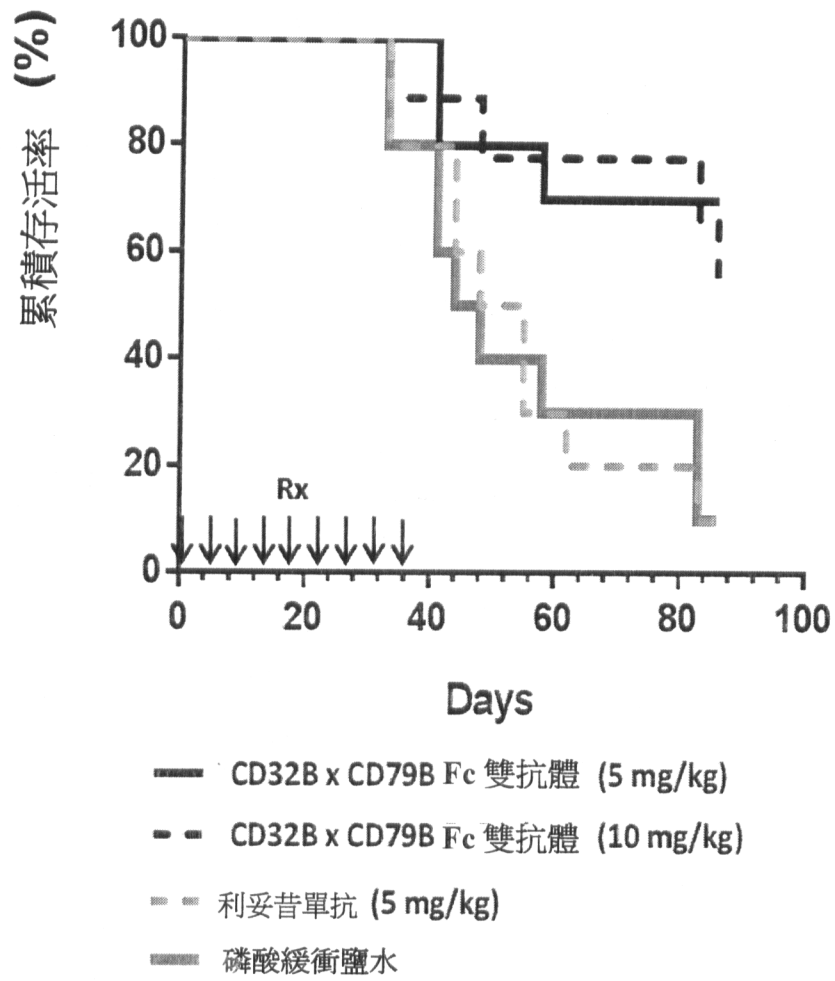


圖 7