(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119947742 A
(43)申请公布日 2025.05.06

(21)申请号 202380065082.5
(22)申请日 2023.07.17
(30)优先权数据
63/368,740 2022.07.18 US
63/476,687 2022.12.22 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2023/057293 2023.07.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/018369 EN 2024.01.25
(71)申请人 安科英纳特私人有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州
(72)发明人 理查德·贝里
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞
(51)Int.Cl.
A61K 38/20(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 14/54(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)

权利要求书29页 说明书90页
序列表（电子公布） 附图109页

(54)发明名称

IL-12 Fc融合蛋白及其用途

(57)摘要

本发明涉及新型、非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12Fc融合蛋白和异二聚体IL-12Fc融合蛋白的组合物,以及制备和使用此类组合物的方法。

CN 119947742 A

1.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域的C末端共价附接至所述第一接头结构域的N末端,并且所述第一接头结构域的C末端共价附接至所述第一Fc结构域的N末端,

ii)所述第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第一Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且

iv)所述变体IL-12p35亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:

i)所述IL-12p40亚基结构域的C末端共价附接至所述第二接头结构域的N末端,并且所述第二接头结构域的C末端共价附接至所述第二Fc结构域的N末端,

ii)所述第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第二Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且

iv)所述IL-12p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

2.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域的C末端共价附接至所述第一接头结构域的N末端,并且所述第一接头结构域的C末端共价附接至所述第一Fc结构域的N末端,

ii)所述第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第一Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且

iv)所述变体IL-12p35亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/

K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:

i)所述IL-12p40亚基结构域的C末端共价附接至所述第二接头结构域的N末端,并且所述第二接头结构域的C末端共价附接至所述第二Fc结构域的N末端,

ii)所述第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第二Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且

iv)所述IL-12p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

3.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:

i)所述第一Fc结构域的C末端共价附接至所述第一接头结构域的N末端,并且所述第一接头结构域的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基结构域的N末端,

ii)所述第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第一Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且

iv)所述变体IL-12p35亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:

i)所述第二Fc结构域的C末端共价附接至所述第二接头结构域的N末端,并且所述第二接头结构域的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基结构域的N末端,

ii)所述第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第二Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且

iv)所述IL-12p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

4.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:

i)所述第一Fc结构域的C末端共价附接至所述第一接头结构域的N末端,并且所述第一接头结构域的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基结构域的N末端,

ii)所述第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第一Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且

iv)所述变体IL-12p35亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:

i)所述第二Fc结构域的C末端共价附接至所述第二接头结构域的N末端,并且所述第二接头结构域的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基结构域的N末端,

ii)所述第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,

iii)所述第二Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且

iv)所述IL-12p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

5.如权利要求1-4中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

6.如权利要求1-5中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域进一步包含C177S取代突变。

7.一种非天然存在的IL-12变体,其包含:

a)变体IL-12p35亚基,其中所述变体IL-12p35亚基包含第一氨基酸取代突变,其中所述第一氨基酸取代选自由以下组成的组:Y40A、Y40E、Y40G、Y40P、Y40R、Y40S、K170A、K170P、K170T;和

b)IL-12p40亚基。

8.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40A;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168D、K168E、K168I、K168M、K168Q、K168T、K170A、K170L和K170T。

9.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40E;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

10.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40G;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

11.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40P;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。

12.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40S;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。

13.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170A;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

14.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170P;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

15.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170T;

ii)所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

16.如权利要求7所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含SEQ ID NO:24、34、103、104、109、179、180、183、185、186、194、196、233、234、238、240、243、245和248-278中的任一者。

17.如权利要求7-16中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

18.如权利要求7-17中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述IL-12p40亚基包括变体IL-12p40亚基,其中所述变体IL-12p40亚基包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

19.如权利要求7-18中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述IL-12p40亚基包含SEQ ID NO:4、88、89和90中的任一者。

20.如权利要求7-19中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述非天然存在的IL-12变体进一步包含与所述变体IL-12p35亚基和/或所述IL-12p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中所述Fc结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基

酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽("XTEN")或(iv)聚乙二醇(PEG)。

21.如权利要求7-20中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基的N末端。

22.如权利要求21所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述非天然存在的IL-12变体进一步包含接头结构域,所述接头结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中所述变体IL-12p35亚基的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基的N末端。

23.如权利要求7-20中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述IL-12p40亚基的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基的N末端。

24.如权利要求23所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述非天然存在的IL-12变体进一步包含接头结构域,所述接头结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中所述IL-12p40亚基的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基的N末端。

25.如权利要求7-24中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体I1-12p35亚基包含一个或多个额外氨基酸取代。

26.一种组合物,其包含如权利要求7-25中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,所述组合物用于治疗受试者的癌症。

27.一种或多种核酸,其编码如权利要求7-25中任一项所述的非天然存在的IL-12变体。

28.一种宿主细胞,其包含如权利要求27所述的一种或多种核酸。

29.一种产生非天然存在的IL-12变体的方法,所述方法包括:

在产生所述非天然存在的变体的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中:

i)所述一种或多种核酸或载体包括如权利要求27所述的一种或多种核酸,并且

ii)所述变体IL-12p35亚基的至少一个取代突变与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。

30.如权利要求29所述的方法,其进一步包括分离和/或纯化所述非天然存在的IL-12变体。

31.如权利要求29或30所述的方法,其中所述非天然存在的IL-12变体进一步包含与所述变体IL-12p35亚基和/或所述IL-12p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中所述Fc结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽("XTEN")或(iv)聚乙二醇(PEG)。

32.如权利要求29-31中任一项所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体

对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

35.如权利要求32所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

37.如权利要求29-31中任一项所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

38.如权利要求37所述的方法,其中所述测定包括IL-12HEK报告基因测定。

39.如权利要求29-31中任一项所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述测定包括以下中的一个或多个:(i)细胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测

定。

41.如权利要求29-40中任一项所述的方法,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

42.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域的C末端共价附接至所述第一Fc结构域的N末端,

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域包含第一氨基酸取代突变,并且

iii)所述第一氨基酸取代突变选自由以下组成的组:Y40A、Y40E、Y40G、Y40P、Y40R、Y40S、K170A、K170P、K170T;和

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中所述IL-12p40亚基结构域的C末端共价附接至所述第二Fc结构域的N末端,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

43.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40A;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168D、K168E、K168I、K168M、K168Q、K168T、K170A、K170L和K170T。

44.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40E;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

45.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40G;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

46.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40P;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。

47.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40S;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。

48.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170A;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

49.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170P;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

50.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170T;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

51.如权利要求42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:24、34、103、104、109、179、180、183、185、186、194、196、233、234、238、240、243、245和248-278中的任一者。

52.如权利要求42-51中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

53.如权利要求42-51中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域包括变体IL-12p40亚基结构域,其中所述变体IL-12p40亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

54.如权利要求42-53中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域包含SEQ ID NO:4、88、89和90中的任一者。

55.如权利要求42-54中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;并且

ii)所述第二Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

56.如权利要求42-55中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一融合构建体进一步包含接头结构域;

ii)所述接头结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且

iii)所述变体IL-12p35亚基结构域的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述第一Fc结构域的N末端。

57.如权利要求42-56中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第二融合构建体进一步包含接头结构域;

ii)所述接头结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且

iii)所述IL-12p40亚基结构域的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述第二Fc结构域的N末端。

58.如权利要求42-57中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚

基结构域包含一个或多个额外氨基酸取代。

59.一种组合物,其包含如权利要求42-58中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,所述组合物用于治疗受试者的癌症。

60.一种或多种核酸,其编码如权利要求42-58中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白。

61.一种宿主细胞,其包含如权利要求60所述的一种或多种核酸。

62.一种产生异二聚体Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:

在产生所述异二聚体Fc融合蛋白的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中:

i)所述一种或多种核酸或载体包括如权利要求60所述的一种或多种核酸,并且

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域的至少一个取代突变与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。

63.如权利要求62所述的方法,其进一步包括分离和/或纯化所述异二聚体Fc融合蛋白。

64.如权利要求62或63所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

65.如权利要求64所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

66.如权利要求65所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

67.如权利要求64所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

68.如权利要求67所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

69.如权利要求62或63所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

70.如权利要求69所述的方法,其中所述测定包括IL-12HEK报告基因测定。

71.如权利要求62或63所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白刺激IFNγ产

生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

72.如权利要求71所述的方法,其中所述测定包括以下中的一个或多个:(i)细胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

73.如权利要求62-72中任一项所述的方法,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

74.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中:

i)所述第一Fc结构域的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基结构域的N末端,

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域包含第一氨基酸取代突变,并且

iii)所述第一氨基酸取代突变选自由以下组成的组:Y40A、Y40E、Y40G、Y40P、Y40R、Y40S、K170A、K170P、K170T;和

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中所述第二Fc结构域的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基结构域的N末端,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

75.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40A;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168D、K168E、K168I、K168M、K168Q、K168T、K170A、K170L和K170T。

76.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40E;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

77.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40G;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

78.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40P;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。

79.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为Y40S;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。

80.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170A;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

81.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170P;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

82.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一氨基酸取代突变为K170T;

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变;并且

iii)所述第二取代突变选自由以下组成的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

83.如权利要求74所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:24、34、103、104、109、179、180、183、185、186、194、196、233、234、238、240、243、245和248-278中的任一者。

84.如权利要求74-83中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

85.如权利要求74-84中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域包括变体IL-12p40亚基结构域,其中所述变体IL-12p40亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

86.如权利要求74-85中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域包含SEQ ID NO:4、88、89和90中的任一者。

87.如权利要求74-86中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;并且

ii)所述第二Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

88.如权利要求74-87中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第一融合构建体进一步包含接头结构域;

ii)所述接头结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且

iii)所述第一Fc结构域的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基结构域的N末端。

89.如权利要求74-88中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述第二融合构建体进一步包含接头结构域;

ii)所述接头结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且

iii)所述第二Fc结构域的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基结构域的N末端。

90.如权利要求74-89中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含一个或多个额外氨基酸取代。

91.一种组合物,其包含如权利要求74-90中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,所述组合物用于治疗受试者的癌症。

92.一种或多种核酸,其编码如权利要求74-90中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白。

93.一种宿主细胞,其包含如权利要求92所述的一种或多种核酸。

94.一种产生异二聚体Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:

在产生所述异二聚体Fc融合蛋白的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中:

i)所述一种或多种核酸或载体包括如权利要求92所述的一种或多种核酸,并且

ii)所述变体IL-12p35亚基结构域的至少一个取代突变与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。

95.如权利要求94所述的方法,其进一步包括分离和/或纯化所述异二聚体Fc融合蛋白。

96.如权利要求94或95所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

97.如权利要求96所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

98.如权利要求97所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

99.如权利要求96所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

100.如权利要求99所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

101.如权利要求94或95所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白的效力与参

考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

102.如权利要求101所述的方法,其中所述测定包括IL-12HEK报告基因测定。

103.如权利要求94或95所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

104.如权利要求103所述的方法,其中所述测定包括以下中的一个或多个:(i)细胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

105.如权利要求94-104中任一项所述的方法,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

106.一种非天然存在的IL-12变体,其包含:

a)变体IL-12p35亚基,其中所述变体IL-12p35亚基包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A;和

b)IL-12p40亚基。

107.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含两个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

108.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含三个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

109.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含四个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

110.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含五个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

111.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含六个或更多个由以下组成的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

112.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A和D126A。

113.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A和P127A。

114.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A和T43A。

115.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A、D126A和P127A。

116.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A、T43A、D126A和P127A。

117.如权利要求106-116中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述IL-12p40亚基包括变体IL-12p40亚基。

118.如权利要求117所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p40亚基包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

119.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO 24-86和SEQ ID NO:103-166,并且所述IL-12p40亚基包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90。

120.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87和SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,并且所述IL-12p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90中的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

121.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少96%序列同一性的氨基酸序列,并且所述IL-12p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90中的任一者具有至少96%序列同一性的氨基酸序列。

122.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少97%序列同一性的氨基酸序列,并且所述IL-12p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:

4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90中的任一者具有至少97％序列同一性的氨基酸序列。

123.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少98％序列同一性的氨基酸序列,并且所述IL-12p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90中的任一者具有至少98％序列同一性的氨基酸序列。

124.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少99％序列同一性的氨基酸序列,并且所述IL-12p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90中的任一者具有至少99％序列同一性的氨基酸序列。

125.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166,并且所述IL-12p40亚基由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90。

126.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含SEQ ID NO:87,并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

127.如权利要求106-126中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基的所述一个或多个氨基酸取代与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

128.如权利要求106-127中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述非天然存在的IL-12变体进一步包含与所述变体IL-12p35亚基和/或所述IL-12p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中所述Fc结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽(“XTEN”)或(iv)聚乙二醇(PEG)。

129.如权利要求106-128中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基的N末端。

130.如权利要求129所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述非天然存在的IL-12变体进一步包含接头,所述接头包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中所述变体IL-12p35亚基的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述IL-12p40亚基的N末端。

131.如权利要求106-128中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述IL-12p40亚基的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基的N末端。

132.如权利要求131所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述非天然存在的IL-12变

体进一步包含接头结构域,所述接头结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中所述IL-12p40亚基的C末端共价附接至所述接头结构域的N末端,并且所述接头结构域的C末端共价附接至所述变体IL-12p35亚基的N末端。

133.如权利要求106-132中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含额外氨基酸取代。

134.一种组合物,其包含如权利要求106-133中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,所述组合物用于治疗受试者的癌症。

135.一种或多种核酸,其编码如权利要求106-133中任一项所述的非天然存在的IL-12变体。

136.一种宿主细胞,其包含如权利要求135所述的一种或多种核酸。

137.一种产生非天然存在的IL-12变体的方法,所述方法包括:

在产生所述非天然存在的IL-12变体的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中所述一种或多种核酸或载体包括如权利要求135所述的一种或多种核酸。

138.如权利要求137所述的方法,其进一步包括分离和/或纯化所述产生的非天然存在的IL-12变体。

139.如权利要求137或138中任一项所述的方法,其中所述非天然存在的IL-12变体进一步包含与所述变体IL-12p35亚基和/或所述IL-12p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中所述Fc结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽(“XTEN”)或(iv)聚乙二醇(PEG)。

140.如权利要求137-139中任一项所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体对白介素-12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

141.如权利要求140所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

142.如权利要求141所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

143.如权利要求140所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

144.如权利要求143所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

145.如权利要求137-139中任一项所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至

约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

146.如权利要求145所述的方法,其中所述测定包括IL-12HEK报告基因测定。

147.如权利要求137-139中任一项所述的方法,其中所述产生的非天然存在的IL-12变体刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

148.如权利要求147所述的方法,其中所述测定包括以下中的一个或多个:(i)细胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

149.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含七个或更多个由以下组成的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

150.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A和R129A。

151.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A和K168A。

152.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A和K170A。

153.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A、P127A和R129A。

154.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含

氨基酸取代Y40A、P127A和K168A。

155.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含氨基酸取代Y40A、P127A和K170A。

156.如权利要求106所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含在氨基酸残基Y40、D126、P127、R129、K168或K170中的任一者处的非丙氨酸取代突变。

157.如权利要求156所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述在氨基酸残基Y40处的取代突变选自由以下组成的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

158.如权利要求156所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述在氨基酸残基D126处的取代突变选自由以下组成的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

159.如权利要求156所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述在氨基酸残基P127处的取代突变选自由以下组成的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

160.如权利要求156所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述在氨基酸残基R129处的取代突变选自由以下组成的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

161.如权利要求156所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述在氨基酸残基K168处的取代突变选自由以下组成的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

162.如权利要求156所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述在氨基酸残基K170处的取代突变选自由以下组成的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

163.如权利要求156所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含SEQ ID NO:177-198中的任一者。

164.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中所述变体IL-12p35亚基结构域的C末端共价附接至所述第一Fc结构域的N末端;和

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中所述IL-12p40亚基结构域的C末端共价附接至所述第二Fc结构域的N末端,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

165.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

166.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含两个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

167.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含三个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

168.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含四个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

169.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含五个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

170.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含六个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

171.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和D126A。

172.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和P127A。

173.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和T43A。

174.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、D126A和P127A。

175.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、T43A、D126A和P127A。

176.如权利要求164-175中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域包括变体IL-12p40亚基结构域。

177.如权利要求176所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p40亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

178.如权利要求164-177中任一项所述的异二聚化Fc融合蛋白,其中所述第一Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,并且所述第二Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

179.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166;

ii)所述第一Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90;并且

iv)所述第二Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

180.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

181.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96%序列同一性的氨基酸序列。

182.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。

183.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

184.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

185.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166;

ii)所述第一Fc结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;

iii)所述IL-12p40亚基结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90;并且

iv)所述第二Fc结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

186.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:87,并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

187.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含七个或更多个由以下组成的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

188.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和R129A。

189.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K168A。

190.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K170A。

191.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和R129A。

192.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和K168A。

193.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域

包含氨基酸取代Y40A、P127A和K170A。

194.如权利要求164所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含在氨基酸残基Y40、D126、P127、R129、K168或K170中的任一者处的非丙氨酸取代突变。

195.如权利要求194所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基Y40处的取代突变选自由以下组成的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

196.如权利要求194所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基D126处的取代突变选自由以下组成的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

197.如权利要求194所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基P127处的取代突变选自由以下组成的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

198.如权利要求194所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基R129处的取代突变选自由以下组成的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

199.如权利要求194所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基K168处的取代突变选自由以下组成的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

200.如权利要求194所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基K170处的取代突变选自由以下组成的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

201.如权利要求194所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:177-198中的任一者。

202.如权利要求164-201中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含额外氨基酸取代。

203.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中所述变体IL-12p35亚基结构域的N末端共价附接至所述第一Fc结构域的C末端;和

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中所述IL-12p40亚基结构域的N末端共价附接至所述第二Fc结构域的C末端,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

204.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

205.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含两个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

206.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含三个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

207.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含四个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

208.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含五个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

209.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含六个或更多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

210.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和D126A。

211.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和P127A。

212.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和T43A。

213.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、D126A和P127A。

214.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、T43A、D126A和P127A。

215.如权利要求203-214中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域包括变体IL-12p40亚基结构域。

216.如权利要求215所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p40亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

217.如权利要求203-216中任一项所述的异二聚化Fc融合蛋白,其中所述第一Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ IDNO:13,并且所述第二Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

218.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166;

ii)所述第一Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90;并且

iv)所述第二Fc结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

219.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

220.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96%序列同一性的氨基酸序列。

221.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。

222.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

223.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中:

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99％序列同一性的氨基酸序列；

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99％序列同一性的氨基酸序列；并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99％序列同一性的氨基酸序列。

224.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中：

i)所述变体IL-12p35亚基结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成：SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166；

ii)所述第一Fc结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13；

iii)所述IL-12p40亚基结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90；并且

iv)所述第二Fc结构域由选自由以下组成的组的氨基酸序列组成：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

225.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中：

i)所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:87，并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自由以下组成的组的氨基酸取代：Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A；

ii)所述第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99％序列同一性的氨基酸序列；

iii)所述IL-12p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99％序列同一性的氨基酸序列；并且

iv)所述第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99％序列同一性的氨基酸序列。

226.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含七个或更多个由以下组成的氨基酸取代：Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

227.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和R129A。

228.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K168A。

229.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K170A。

230.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和R129A。

231.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和K168A。

232.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述变体IL-12p35亚基结构域

包含氨基酸取代Y40A、P127A和K170A。

233.如权利要求203所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含在氨基酸残基Y40、D126、P127、R129、K168或K170中的任一者处的非丙氨酸取代突变。

234.如权利要求233所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基Y40处的取代突变选自由以下组成的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

235.如权利要求233所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基D126处的取代突变选自由以下组成的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

236.如权利要求233所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基P127处的取代突变选自由以下组成的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

237.如权利要求233所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基R129处的取代突变选自由以下组成的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

238.如权利要求233所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基K168处的取代突变选自由以下组成的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

239.如权利要求233所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述在氨基酸残基K170处的取代突变选自由以下组成的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

240.如权利要求233所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:177-198中的任一者。

241.如权利要求203-240中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含额外氨基酸取代。

242.一种组合物,其包含如权利要求164-241中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,所述组合物用于治疗受试者的癌症。

243.一种或多种核酸,其编码如权利要求164-241中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白。

244.一种宿主细胞,其包含如权利要求243所述的一种或多种核酸。

245.一种产生异二聚体Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:

在产生所述异二聚体Fc融合蛋白的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中所述核酸或载体包括如权利要求243所述的一种或多种核酸,

其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白与参考IL-12的半衰期相比增加了半衰期,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

246.如权利要求245所述的方法,其进一步包括分离和/或纯化所述产生的异二聚体Fc融合蛋白。

247.如权利要求245或246中任一项所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白

对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

248.如权利要求247所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

249.如权利要求248所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

250.如权利要求247所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

251.如权利要求250所述的方法,其中所述测定包括SPR测定。

252.如权利要求245或246中任一项所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

253.如权利要求252所述的方法,其中所述测定包括IL-12HEK报告基因测定。

254.如权利要求245或246中任一项所述的方法,其中所述产生的异二聚体Fc融合蛋白刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中所述参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

255.如权利要求254所述的方法,其中所述测定包括以下中的一个或多个:(i)细胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

256.一种非天然存在的IL-12变体,其包含:

a)变体IL-12p35亚基,其中所述变体IL-12p35亚基包含第一氨基酸取代突变,其中所述第一氨基酸取代突变选自由以下组成的组:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40S和Y40T;和

b)IL-12p40亚基。

257.如权利要求256所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基进一步包含第二取代突变,其中所述第二取代突变选自由以下组成的组:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、P127A、P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R、P127S、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

258.如权利要求256所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基包含SEQ ID NO:199-247或SEQ ID NO:279-290中的任一者。

259.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中所述变体IL-12p35亚基结构域的C末端共价附接至所述第一Fc结构域的N末端;并且所述变体IL-12p35亚基结构域包含第一氨基酸取代突变,其中所述第一氨基酸取代选自由以下组成的组:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40S和Y40T;和

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中所述IL-12p40亚基结构域的C末端共价附接至所述第二Fc结构域的N末端,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

260.如权利要求259所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变,其中所述第二取代突变选自由以下组成的组:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、P127A、P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R、P127S、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

261.如权利要求259所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:199-247或SEQ ID NO:279-290中的任一者。

262.一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:

a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中所述变体IL-12p35亚基结构域的N末端共价附接至所述第一Fc结构域的C末端;并且所述变体IL-12p35亚基结构域包含第一氨基酸取代突变,其中所述第一氨基酸取代突变选自由以下组成的组:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40S和Y40T;和

b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中所述IL-12p40亚基结构域的N末端共价附接至所述第二Fc结构域的C末端,

任选地其中所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进所述第一Fc结构域和所述第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

263.如权利要求262所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含第二取代突变,其中所述第二取代突变选自由以下组成的组:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、P127A、P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R、P127S、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

264.如权利要求262所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域包含SEQ ID NO:199-247或SEQ ID NO:279-290中的任一者。

265.如权利要求106-119、149-163或256-258中任一项所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述变体IL-12p35亚基进一步包含C74S取代突变。

266.如权利要求265所述的非天然存在的IL-12变体,其中所述IL-12p40亚基包括变体IL-12p40亚基,其中所述变体IL-12p40亚基包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

267.如权利要求164-241或259-264中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述变体IL-12p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

268.如权利要求267所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IL-12p40亚基结构域包括变体IL-12p40亚基结构域,其中所述变体IL-12p40亚基结构域包含一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

IL-12 Fc融合蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年12月22日提交的美国临时申请号63/476,687和2022年7月18日提交的美国临时申请号63/368,740的优先权,所述美国临时申请中的每一个以引用的方式整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,所述序列表以XML格式以电子方式提交并且特此以引用的方式整体并入。XML副本创建于2023年7月17日,名为54100_4001.xml,并且大小为336,708字节。

背景技术

[0005] 本申请通常涉及用于调节白介素12(IL-12)介导的信号转导的组合物和方法。具体而言,本公开提供了新型、非天然存在的IL-12变体多肽和融合蛋白,其中IL-12 p35亚基包含降低对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力的新型氨基酸取代,以及制备和使用非天然存在的IL-12变体多肽和融合蛋白的方法。

[0006] IL-12是强效促炎细胞因子,其由抗原呈递细胞,诸如例如树突状细胞、巨噬细胞和中性粒细胞产生。IL-12属于IL-12细胞因子家族。IL-12细胞因子家族的独特之处在于它们包含异二聚体细胞因子。IL-12由alpha-(α-)亚基(由IL12A基因编码;本文中也称为“IL-12 p35亚基”;前体序列-SEQ ID NO:1(如图1所示);成熟序列-SEQ ID NO:2(如图1所示))和beta-(β-)亚基(由IL12B基因编码;本文中也称为“IL-12 p40亚基”);前体序列-SEQ ID NO:3(如图1所示);成熟序列-SEQ ID NO:4(如图1所示)组成,它们组装形成70,000道尔顿(70kDa)二硫键连接的异二聚体。IL-12 p35和p40亚基组装后,形成具有生物活性的IL-12异二聚体。IL-12的受体IL-12R是一种I型细胞因子受体,其包含β-1亚基(IL-12Rβ1-SEQ ID NO:5(如图2所示);胞外结构域-SEQ ID NO:6(如图2所示))和β-2亚基(IL-12Rβ2-SEQ ID NO:7(如图2所示);胞外结构域-SEQ ID NO:8(如图2所示))。IL-12 p40亚基对IL-12Rβ1具有结合亲和力,而IL-12 p35亚基对IL-12Rβ2具有结合亲和力。

[0007] IL-12与IL-12R的结合导致胞内信号转导子和转录活化子4(STAT4)的磷酸化并且触发信号传导通路,其:(i)诱导TH1细胞分化,(ii)增加T细胞和自然杀伤(NK)细胞的活化和细胞毒性能力,(iii)抑制或重新编程免疫抑制细胞,诸如例如肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和髓系衍生抑制细胞(MDSC)以及(iv)诱导大量干扰素γ(IFNγ)的产生,IFNγ具有细胞抑制性/细胞毒性、抗血管生成性,并且可上调肿瘤细胞上的主要组织相容性复合体(MHC)1类和MHC 2类分子以实现免疫识别。

[0008] 因此,IL-12在临床前研究中已证明对一系列恶性肿瘤具有强效抗肿瘤活性。然而,由于循环免疫细胞的过度活化,在人体中全身性施用野生型IL-12可能导致严重的毒性,包括试验中死亡。此外,由于靶标介导的药物处置,活化的免疫细胞发生细胞增殖导致施用的IL-12血清半衰期较短。据报道,人IL-12的生物活性形式(即,包含IL-12 p35亚基和IL-12 p40亚基的异二聚体复合物)在作为治疗化合物施用时体内半衰期低至5小时。近年

来,细胞因子工程化已成为有前途的策略,可定制具有期望活性和降低毒性的细胞因子。因此,需要额外方法来改善IL-12的特性以用于治疗剂。具体而言,对于新型IL-12变体多肽和/或融合蛋白存在未满足的需求,其(i)以改良的结合效率或亲和力与IL-12R结合,使得维持IL-12的治疗性质(例如,识别和消除靶细胞,诸如例如癌细胞)并且降低或消除IL-12的负面副作用和(ii)增加血清半衰期。

发明内容

[0009] 在一个方面中,本公开提供了一种非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基,其中变体IL-12 p35亚基包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A;和b)IL-12 p40亚基。

[0010] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含两个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0011] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含三个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0012] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含四个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0013] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含五个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0014] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含六个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0015] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含七个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0016] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A和D126A。

[0017] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A和P127A。

[0018] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A和T43A。

[0019] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A、D126A和P127A。

[0020] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A、T43A、D126A和P127A。

[0021] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A和R129A。

[0022] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A和K168A。

[0023] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A和K170A。

[0024] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A、

P127A和R129A。

[0025] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A、P127A和K168A。

[0026] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含氨基酸取代Y40A、P127A和K170A。

[0027] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基Y40处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基Y40处的取代突变选自包括以下的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

[0028] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:177-187中的任一者。

[0029] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基D126处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基D126处的取代突变选自包括以下的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

[0030] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基P127处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基P127处的取代突变选自包括以下的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

[0031] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基R129处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基R129处的取代突变选自包括以下的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

[0032] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基K168处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K168处的取代突变选自包括以下的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

[0033] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基K170处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K170处的取代突变选自包括以下的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V和K170W。

[0034] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含选自包括以下的组的第一取代突变:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

[0035] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变。

[0036] 在进一步的实施方案中并且根据上文,第二取代突变选自包括以下的组:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、P127A、P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R、P127S、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、

R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V和K170W。

[0037] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:199-247或SEQ ID NO:279-290中的任一者。

[0038] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基可进一步包含C74S取代突变。

[0039] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基包括变体IL-12 p40亚基。

[0040] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p40亚基包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0041] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166,并且IL-12 p40亚基包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90。

[0042] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,并且IL-12 p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0043] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少96%序列同一性的氨基酸序列,并且IL-12 p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少96%序列同一性的氨基酸序列。

[0044] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少97%序列同一性的氨基酸序列,并且IL-12 p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。

[0045] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少98%序列同一性的氨基酸序列,并且IL-12 p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

[0046] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列,并且IL-12 p40亚基包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0047] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166,并且IL-12 p40亚基由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89

和SEQ ID NO:90。

[0048] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:87,并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0049] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基的一个或多个氨基酸取代与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期,其中参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0050] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,非天然存在的IL-12变体进一步包含与变体IL-12 p35亚基和/或IL-12 p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中Fc结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽("XTEN")或(iv)聚乙二醇(PEG)。

[0051] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,其中变体IL-12 p35亚基的C末端共价附接至IL-12 p40亚基的N末端。

[0052] 在进一步的实施方案中并且根据上文,非天然存在的IL-12变体进一步包含接头,所述接头包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中变体IL-12 p35亚基的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至IL-12 p40亚基的N末端。

[0053] 在进一步的实施方案中,根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基的N末端。

[0054] 在进一步的实施方案中并且根据上文,非天然存在的IL-12变体进一步包含接头结构域,所述接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中IL-12 p40亚基的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基的N末端。

[0055] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基包含额外氨基酸取代。

[0056] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,提供非天然存在的IL-12变体用于治疗受试者的癌症。

[0057] 在另一方面,本公开提供了一种或多种核酸,其编码根据上文方面和实施方案中的任一者的非天然存在的IL-12变体。

[0058] 在另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包含编码根据上文方面和实施方案中的任一者的非天然存在的IL-12变体的一种或多种核酸。

[0059] 在另一方面,本公开提供了一种产生非天然存在的IL-12变体的方法,所述方法包括:在产生非天然存在的IL-12变体的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中一种或多种核酸或载体包括上文方面和实施方案中所述的一种或多种核酸。

[0060] 在进一步的实施方案中并且根据上文,方法进一步包括分离和/或纯化产生的非天然存在的IL-12变体。

[0061] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,非天然存在的IL-12变体进一步包含与变体IL-12 p35亚基和/或IL-12 p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中Fc结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽("XTEN")或(iv)聚乙二醇(PEG)。

[0062] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的非天然存在的IL-12变体对白介素-12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变,其中参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0063] 在进一步的实施方案中并且根据上文,产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

[0064] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0065] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

[0066] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0067] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的非天然存在的IL-12变体的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

[0068] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括IL-12HEK报告基因测定。

[0069] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的非天然存在的IL-12变体刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约

500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

[0070] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括以下中的一个或多个:(i)胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

[0071] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端;任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0072] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0073] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含两个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0074] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含三个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0075] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含四个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0076] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含五个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0077] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含六个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0078] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含七个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0079] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和D126A。

[0080] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和P127A。

[0081] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和T43A。

[0082] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取

代Y40A、D126A和P127A。

[0083] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、T43A、D126A和P127A。

[0084] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和R129A。

[0085] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K168A。

[0086] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K170A。

[0087] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和R129A。

[0088] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和K168A。

[0089] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和K170A。

[0090] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基Y40处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基Y40处的取代突变选自包括以下的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

[0091] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:177-187中的任一者。

[0092] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基D126处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基D126处的取代突变选自包括以下的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

[0093] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基P127处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基P127处的取代突变选自包括以下的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

[0094] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基R129处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基R129处的取代突变选自包括以下的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

[0095] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基K168处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K168处的取代突变选自包括以下的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

[0096] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基K170处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K170处的

取代突变选自包括以下的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V和K170W。

[0097] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含选自包括以下的组的第一取代突变:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

[0098] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含第二取代突变。

[0099] 在进一步的实施方案中并且根据上文,第二取代突变选自包括以下的组:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、P127A、P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R、P127S、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V和K170W。

[0100] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:199-247或SEQ ID NO:279-290中的任一者。

[0101] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域可进一步包含C74S取代突变。

[0102] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域包括变体IL-12 p40亚基结构域。

[0103] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p40亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0104] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,第一Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,并且第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0105] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166;第一Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;IL-12 p40亚基结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90;并且第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0106] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有

至少95％序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95％序列同一性的氨基酸序列。

[0107] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少96％序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96％序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少96％序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96％序列同一性的氨基酸序列。

[0108] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少97％序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97％序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少97％序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97％序列同一性的氨基酸序列。

[0109] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少98％序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98％序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少98％序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98％序列同一性的氨基酸序列。

[0110] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少99％序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99％序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99％序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99％序列同一性的氨基酸序列。

[0111] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166;第一Fc结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;IL-12 p40亚基结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90;并且第二Fc结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0112] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:87,并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自包括以下的组的氨

基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0113] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含额外氨基酸取代。

[0114] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的N末端共价附接至第一Fc结构域的C末端;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域的N末端共价附接至第二Fc结构域的C末端;任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0115] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0116] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含两个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0117] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含三个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0118] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含四个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0119] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含五个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0120] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含六个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0121] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含七个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0122] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和D126A。

[0123] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和P127A。

[0124] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和T43A。

[0125] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、D126A和P127A。

[0126] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、T43A、D126A和P127A。

[0127] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和R129A。

[0128] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K168A。

[0129] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A和K170A。

[0130] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和R129A。

[0131] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和K168A。

[0132] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含氨基酸取代Y40A、P127A和K170A。

[0133] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基Y40处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基Y40处的取代突变选自包括以下的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

[0134] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:177-187中的任一者。

[0135] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基D126处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基D126处的取代突变选自包括以下的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

[0136] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基P127处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基P127处的取代突变选自包括以下的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

[0137] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基R129处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基R129处的取代突变选自包括以下的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

[0138] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基K168处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K168处的取代突变选自包括以下的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

[0139] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基K170处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K170处的取代突变选自包括以下的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V和K170W。

[0140] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包

含选自包括以下的组的第一取代突变:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。

[0141] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含第二取代突变。

[0142] 在进一步的实施方案中并且根据上文,第二取代突变选自包括以下的组:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、P127A、P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R、P127S、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

[0143] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:199-247或SEQ ID NO:279-290中的任一者。

[0144] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域可进一步包含C74S取代突变。

[0145] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域包括变体IL-12 p40亚基结构域。

[0146] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p40亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0147] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,第一Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,并且第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0148] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166;第一Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;IL-12 p40亚基结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90;并且第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0149] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0150] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID

NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少96%序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少96%序列同一性的氨基酸序列。

[0151] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少97%序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少97%序列同一性的氨基酸序列。

[0152] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少98%序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

[0153] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87或SEQ ID NO:103-166中的任一者具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0154] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166;第一Fc结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;IL-12 p40亚基结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90;并且第二Fc结构域由选自包括以下的组的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0155] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:87,并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A;第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99%序列同一性的氨基酸序列;IL-12 p40亚基结构域包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、

SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90具有至少99％序列同一性的氨基酸序列;并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13具有至少99％序列同一性的氨基酸序列。

[0156] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含额外氨基酸取代。

[0157] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,提供异二聚体Fc融合蛋白用于治疗受试者的癌症。

[0158] 在另一方面,本公开提供了一种或多种核酸,其编码根据上文方面和实施方案中的任一者的异二聚体Fc融合蛋白。

[0159] 在另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包含编码根据上文方面和实施方案中的任一者的异二聚体Fc融合蛋白的一种或多种核酸。

[0160] 在另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包含编码根据上文方面和实施方案中的任一者的异二聚体Fc融合蛋白的一种或多种核酸。

[0161] 在另一方面,本公开提供了一种产生异二聚体Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:在产生异二聚体Fc融合蛋白的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中一种或多种核酸或载体包括上文方面和实施方案中所述的一种或多种核酸,此外,其中产生的异二聚体Fc融合蛋白与参考IL-12的半衰期相比增加了半衰期,其中IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0162] 在进一步的实施方案中并且根据上文,方法进一步包括分离和/或纯化产生的异二聚体Fc融合蛋白。

[0163] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

[0164] 在进一步的实施方案中并且根据上文,产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10％至约100％、约10％至约50％、约20％至约70％、约30％至约80％、约40％至约90％、约50％至约100％、约20％至约50％、约40％至约70％、约30％至约60％、约40％至约100％、约20％至约80％或约10％至约90％,如通过测定所确定。

[0165] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0166] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

[0167] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0168] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至

约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

[0169] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括IL-12HEK报告基因测定。

[0170] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,其中参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白,如通过测定所确定。

[0171] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括以下中的一个或多个:(i)胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

[0172] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:(i)变体IL-12 p35亚基结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域选自包括SEQ ID NO:24、30-34、49、52、53、65、103、104、112、177-247的组,(ii)第一Fc结构域,其中第一Fc结构域选自包括SEQ ID NO:12和13的组以及(iii)接头,其中接头包含SEQ ID NO:15,变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至接头的N末端,并且接头的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:(i)(变体)IL-12 p40亚基结构域,其中(变体)IL-12 p40亚基选自包括SEQ ID NO:4、89和90的组,(ii)第二Fc结构域,其中第二Fc结构域选自包括SEQ ID NO:13和12的组以及(iii)接头,其中接头包含SEQ ID NO:15,(变体)IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至接头的N末端,并且接头的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端。

[0173] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基可进一步包含C74S取代突变,并且(变体)IL-12 p40亚基可进一步包含C177S取代突变,使得变体IL-12 p35亚基结构域和(变体)IL-12 p40亚基结构域之间的链间二硫键被去除。

[0174] 在一个方面中,本公开提供了一种非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基,其中变体IL-12 p35亚基包含第一氨基酸取代突变,其中第一氨基酸取代选自包

括以下的组:Y40A、Y40E、Y40G、Y40P、Y40R、Y40S、K170A、K170P、K170T;和b)IL-12p40亚基。

[0175] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40A;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168D、K168E、K168I、K168M、K168Q、K168T、K170A、K170L和K170T。

[0176] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40E;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

[0177] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40G;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

[0178] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40P;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。

[0179] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40S;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。

[0180] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170A;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0181] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170P;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0182] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170T;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0183] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:24、34、103、104、109、179、180、183、185、186、194、196、233、234、238、240、243、245和248-278中的任一者。

[0184] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

[0185] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基包括变体IL-12 p40亚基,其中变体IL-12 p40亚基包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0186] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基包含SEQ ID NO:4、88、89和90中的任一者。

[0187] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,非天然存在的IL-12变体进一步包含与变体IL-12 p35亚基和/或IL-12 p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中Fc结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结

构化可生物降解多肽(“XTEN”)或(iv)聚乙二醇(PEG)。

[0188] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基的C末端共价附接至IL-12 p40亚基的N末端。

[0189] 在进一步的实施方案中并且根据上文,非天然存在的IL-12变体进一步包含接头结构域,所述接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中变体IL-12 p35亚基的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至IL-12 p40亚基的N末端。

[0190] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基的N末端。

[0191] 在进一步的实施方案中并且根据上文,非天然存在的IL-12变体进一步包含接头结构域,所述接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23,并且其中IL-12 p40亚基的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基的N末端。

[0192] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体I1-12 p35亚基包含一个或多个额外氨基酸取代。

[0193] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,提供非天然存在的IL-12变体用于治疗受试者的癌症。

[0194] 在另一方面,本公开提供了一种或多种核酸,其编码根据上文方面和实施方案中的任一者的非天然存在的IL-12变体。

[0195] 在另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包含编码根据上文方面和实施方案中的任一者的非天然存在的IL-12变体的一种或多种核酸。

[0196] 在另一方面,本公开提供了一种产生非天然存在的IL-12变体的方法,所述方法包括:在产生非天然存在的变体的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中:i)一种或多种核酸或载体包括上文方面和实施方案中所述的一种或多种核酸,并且ii)变体IL-12 p35亚基的至少一个取代突变与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。

[0197] 在进一步的实施方案中并且根据上文,方法进一步包括分离和/或纯化产生的非天然存在的IL-12变体。

[0198] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,非天然存在的IL-12变体进一步包含与变体IL-12 p35亚基和/或IL-12 p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中Fc结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽(“XTEN”)或(iv)聚乙二醇(PEG)。

[0199] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的非天然存在的IL-12变体对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

[0200] 在进一步的实施方案中并且根据上文,产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约

20％至约70％、约30％至约80％、约40％至约90％、约50％至约100％、约20％至约50％、约40％至约70％、约30％至约60％、约40％至约100％、约20％至约80％或约10％至约90％，如通过测定所确定。

[0201] 在进一步的实施方案中并且根据上文，测定包括SPR测定。

[0202] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者，产生的非天然存在的IL-12变体对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平，并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的，如通过测定所确定。

[0203] 在进一步的实施方案中并且根据上文，测定包括SPR测定。

[0204] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者，产生的非天然存在的IL-12变体的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高，如通过测定所确定。

[0205] 在进一步的实施方案中并且根据上文，测定包括IL-12HEK报告基因测定。

[0206] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者，产生的非天然存在的IL-12变体刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高，如通过测定所确定。

[0207] 在进一步的实施方案中并且根据上文，测定包括以下中的一个或多个：(i)胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

[0208] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者，参考IL-12包括以下中的一个或多个：野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0209] 在一个方面中,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中:i)变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端,ii)变体IL-12 p35亚基结构域包含第一氨基酸取代突变,并且iii)第一氨基酸取代突变选自包括以下的组:Y40A、Y40E、Y40G、Y40P、Y40R、Y40S、K170A、K170P、K170T;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端,任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0210] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40A;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168D、K168E、K168I、K168M、K168Q、K168T、K170A、K170L和K170T。

[0211] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40E;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

[0212] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40G;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

[0213] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40P;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。

[0214] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40S;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。

[0215] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170A;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0216] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170P;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0217] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170T;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0218] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:24、34、103、104、109、179、180、183、185、186、194、196、233、234、238、240、243、245和248-278中的任一者。

[0219] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

[0220] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域包括变体IL-12 p40亚基结构域,其中变体IL-12 p40亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的

组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0221] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域包含SEQ ID NO:4、88、89和90中的任一者。

[0222] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,i)第一Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;并且ii)第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0223] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,i)第一融合构建体进一步包含接头结构域;ii)接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且iii)变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端。

[0224] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,i)第二融合构建体进一步包含接头结构域;ii)接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且iii)IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端。

[0225] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个额外氨基酸取代。

[0226] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,提供异二聚体Fc融合蛋白用于治疗受试者的癌症。

[0227] 在另一方面,本公开提供了一种或多种核酸,其编码根据上文方面和实施方案中的任一者的异二聚体Fc融合蛋白。

[0228] 在另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包含编码根据上文方面和实施方案中的任一者的异二聚体Fc融合蛋白的一种或多种核酸。

[0229] 在另一方面,本公开提供了一种产生异二聚体Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:在产生异二聚体Fc融合蛋白的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中:i)一种或多种核酸或载体包括上文方面和实施方案中所述的一种或多种核酸,并且ii)变体IL-12p35亚基结构域的至少一个取代突变与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。

[0230] 在进一步的实施方案中并且根据上文,方法进一步包括分离和/或纯化产生的异二聚体Fc融合蛋白。

[0231] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

[0232] 在进一步的实施方案中并且根据上文,产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

[0233] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0234] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

[0235] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0236] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

[0237] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括IL-12HEK报告基因测定。

[0238] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

[0239] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括以下中的一个或多个:(i)胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

[0240] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0241] 在一个方面中,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中:i)第一Fc结构域的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基结构域的N末端,ii)变体IL-12 p35亚基结构域包含第一氨基酸取代突变,并且iii)第一氨基酸取代突变选自包括以下的组:Y40A、

Y40E、Y40G、Y40P、Y40R、Y40S、K170A、K170P、K170T;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中第二Fc结构域的C末端共价附接至IL-12 p40亚基结构域的N末端,任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0242] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40A;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168D、K168E、K168I、K168M、K168Q、K168T、K170A、K170L和K170T。

[0243] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40E;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

[0244] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40G;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。

[0245] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40P;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。

[0246] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为Y40S;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。

[0247] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170A;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0248] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170P;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0249] 在进一步的实施方案中并且根据上文,i)第一氨基酸取代突变为K170T;ii)变体IL-12 p35亚基进一步包含第二取代突变;并且iii)第二取代突变选自包括以下的组:K168A、K168I、K168T和R129E。

[0250] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:24、34、103、104、109、179、180、183、185、186、194、196、233、234、238、240、243、245和248-278中的任一者。

[0251] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

[0252] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域包括变体IL-12 p40亚基结构域,其中变体IL-12 p40亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0253] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域包含SEQ ID NO:4、88、89和90中的任一者。

[0254] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,i)第一Fc结构域包含选自包括

以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13;并且ii)第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0255] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,i)第一融合构建体进一步包含接头结构域;ii)接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且iii)第一Fc结构域的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基结构域的N末端。

[0256] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,i)第二融合构建体进一步包含接头结构域;ii)接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23;并且iii)第二Fc结构域的C末端共价附接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端共价附接至IL-12 p40亚基结构域的N末端。

[0257] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个额外氨基酸取代。

[0258] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,提供异二聚体Fc融合蛋白用于治疗受试者的癌症。

[0259] 在另一方面,本公开提供了一种或多种核酸,其编码根据上文方面和实施方案中的任一者的异二聚体Fc融合蛋白。

[0260] 在另一方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包含编码根据上文方面和实施方案中的任一者的异二聚体Fc融合蛋白的一种或多种核酸。

[0261] 在另一方面,本公开提供了一种产生异二聚体Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:在产生异二聚体Fc融合蛋白的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中:i)一种或多种核酸或载体包括上文方面和实施方案中所述的一种或多种核酸,并且ii)变体IL-12p35亚基结构域的至少一个取代突变与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。

[0262] 在进一步的实施方案中并且根据上文,方法进一步包括分离和/或纯化产生的异二聚体Fc融合蛋白。

[0263] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白对白介素12受体β2(IL-12Rβ2)的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比发生了改变。

[0264] 在进一步的实施方案中并且根据上文,产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。

[0265] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0266] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12的结合亲和力是可检测的,如通过测定所确定。

[0267] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括SPR测定。

[0268] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白的效力与参考IL-12的效力相比降低约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

[0269] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括IL-12HEK报告基因测定。

[0270] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,产生的异二聚体Fc融合蛋白刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12刺激IFNγ产生的能力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。

[0271] 在进一步的实施方案中并且根据上文,测定包括以下中的一个或多个:(i)胞内细胞因子染色测定、(ii)基于Luminex珠的细胞因子释放测定、(iii)ELISA或(iv)ELISpot测定。

[0272] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0273] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:i)变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一接头结构域的N末端,并且第一接头结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端,ii)第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第一Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且iv)变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、

Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:i)IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二接头结构域的N末端,并且第二接头结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端,ii)第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第二Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且iv)IL-12 p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0274] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

[0275] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域进一步包含C177S取代突变。

[0276] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:i)变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一接头结构域的N末端,并且第一接头结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端,ii)第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第一Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且iv)变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:i)IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二接头结构域的N末端,并且第二接头结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端,ii)第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第二Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且iv)IL-12 p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0277] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

[0278] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域进一步包含C177S取代突变。

[0279] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建

体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:i)第一Fc结构域的C末端共价附接至第一接头结构域的N末端,并且第一接头结构域的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基结构域的N末端,ii)第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第一Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且iv)变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:i)第二Fc结构域的C末端共价附接至第二接头结构域的N末端,并且第二接头结构域的C末端共价附接至IL-12 p40亚基结构域的N末端,ii)第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第二Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且iv)IL-12 p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0280] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

[0281] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域进一步包含C177S取代突变。

[0282] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域、第一接头结构域和第一Fc结构域,其中:i)第一Fc结构域的C末端共价附接至第一接头结构域的N末端,并且第一接头结构域的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基结构域的N末端,ii)第一接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第一Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且iv)变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、Y40A/K168A、Y40A/K168D、Y40A/K168E、Y40A/K168I、Y40A/K168M、Y40A/K168Q、Y40A/K168T、Y40A/K170A、Y40A/K170L、Y40A/K170T、Y40E、Y40E/K170A、Y40E/K168A、Y40E/K168I、Y40E/K168T、Y40E/R129A、Y40G、Y40G/K170A、Y40G/K168A、Y40G/K168I、Y40G/K168T、Y40G/R129A、Y40P、Y40P/K170A、Y40P/K168A、Y40P/K168D、Y40P/K168I、Y40P/K168T、Y40R、Y40S、Y40S/K168I、Y40S/K168T、Y40S/K170A、Y40S/K170L、Y40S/K170T、Y40S/R129A、K170A、K170A/K168A、K170A/K168I、K170A/K168T、K170A/R129E、K170P、K170P/K168A、K170P/K168I、K170P/K168T、K170P/R129E、K170T、K170T/K168A、K170T/K168I、K170T/K168T和K170T/R129E;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域、第二接头结构域和第二Fc结构域,其中:i)第二Fc结构域的C末端共价附接至第二接头结构域的N末端,并且第二接头结构域的C末端共价附接至IL-12 p40亚基结构域的N末端,ii)第二接头结构域包含SEQ ID NO:15,iii)第二Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且iv)IL-12 p40亚基结构域包含SEQ ID NO:89,任选地其中第一Fc结

构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。

[0283] 在进一步的实施方案中并且根据上文,变体IL-12 p35亚基结构域进一步包含C74S取代突变。

[0284] 在进一步的实施方案中并且根据上文中的任一者,IL-12 p40亚基结构域进一步包含C177S取代突变。

[0285] 附图简述

[0286] 本发明的新型特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考以下阐述说明性实施方案的详细描述和附图将获得对本发明的特征和优点的更好理解,在这些说明性实施方案中利用了本发明的原理,并且在附图(本文也称为“Fig.”、“FIG.”、“Figure”、“Figures”、“Figs.”和“FIGs.”)中:

[0287] 图1示出了人野生型IL-12亚基α和β(前体和成熟形式序列)的序列列表。

[0288] 图2示出了人野生型IL-12Rβ1(+胞外结构域序列)和IL-12Rβ2(+胞外结构域序列)的序列列表。

[0289] 图3示出了人IgG1 Fc结构域(G1m同种异型,以及两组杵/臼(knob/hole)突变体)的示例性序列。

[0290] 图4示出了示例性结构域接头序列的列表。

[0291] 图5示出了包含一个突变的变体IL-12 p35亚基序列的列表。

[0292] 图6A和6B示出了包含两个突变的变体IL-12 p35亚基序列的列表。

[0293] 图7A和7B示出了包含三个突变的变体IL-12 p35亚基序列的列表。

[0294] 图8A和8B示出了包含四个突变的变体IL-12 p35亚基序列的列表。

[0295] 图9示出了变体IL-12 p35亚基序列的列表,所述序列包含:(i)五个突变、(ii)六个突变和(iii)C74S突变。

[0296] 图10示出了变体IL-12 p40亚基序列的列表。

[0297] 图11A-11E示出了示例性异二聚体Fc融合蛋白和相关序列的列表。

[0298] 图12示出了呈单价型式的示例性IL-12 Fc融合蛋白的示意图。

[0299] 图13示出了野生型IL-12异二聚体Fc融合蛋白(本文也称为“野生型IL-12 Fc”、“IL-12 Fcwt”或“IL-12 Fcw.t.”或“WT”)的尺寸排阻(上图)和阳离子交换(下图)色谱曲线。用于进一步纯化和/或分析而合并的级分以矩形指示。

[0300] 图14示出了纯化的野生型IL-12 Fc的还原性(+DTT;左图)和非还原性(-DTT;右图)SDS-PAGE分析。

[0301] 图15示出了IL-12和IL-12Rβ2之间的相互作用模型。IL-12 p35亚基、IL-12 p40亚基和IL-12Rβ2以卡通表示形式显示,并且选择用于突变分析的IL-12 p35亚基残基以棒状显示。

[0302] 图16A和16B示出了纯化的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的还原性(+DTT;16A)和非还原性(-DTT;16B)SDS-PAGE分析,其中IL-12p35亚基结构域包含一个突变,并且Fc结构域包含促进Fc结构域异二聚化的杵和臼突变。

[0303] 图17示出了SPR传感图(即,从SPR仪器生成的SPR响应(以响应单位(RU)计)与时间(以秒计)的图),其代表7.8、15.6、31.2、62.5、125、250、500、1000和2000nM IL-12Rβ2与固

定化的野生型IL-12Fc(“w.t.”;顶行)或突变体(中间行和底行)的结合,如所指示。

[0304] 图18示出了IL-12Rβ2与野生型IL-12 Fc(“w.t.”)或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白结合的SPR数据总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个突变。提供了固定在芯片上(捕获)的IL-12 Fc的量和解离常数(K_D)。如本文所用,当提及SPR测定结果时,术语“弱”是指K_D值低于所采用测定的最低可检测水平(即,无法就测定的检测下限而言准确确定K_D值)。

[0305] 图19示出了在HEK-Blue IL-12报告基因测定中,与野生型IL-12 Fc(“w.t.”)相比,市售IL-12(Miltenyi;顶行)或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个突变(中间行和底行)。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示市售IL-12或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的平均值。

[0306] 图20示出了使用HEK-Blue IL-12测定得到的市售IL-12(Miltenyi)、野生型IL-12 Fc(“w.t.”)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个突变。

[0307] 图21示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中,与野生型IL-12 Fc(“w.t.”)相比,市售IL-12(Miltenyi;顶行)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个突变(中间行和底行)。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示市售IL-12或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的平均值。

[0308] 图22示出了使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的市售IL-12(Miltenyi)、野生型IL-12 Fc(“w.t.”)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个突变。

[0309] 图23示出了纯化的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的还原性(+DTT;左图)和非还原性(-DTT;右图)SDS-PAGE分析,其中IL-12 p35亚基结构域包含二、三或四个突变,并且Fc结构域包含促进Fc结构域异二聚化的杵和臼突变。

[0310] 图24A和24B示出了在HEK-Blue IL-12报告基因测定中,与野生型IL-12 Fc(“w.t.”)相比,市售IL-12(Miltenyi)或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二、三或四个突变。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示市售IL-12或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的平均值。

[0311] 图25示出了使用HEK-Blue IL-12测定得到的市售IL-12(Miltenyi)、野生型IL-12 Fc(“w.t.”)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二、三或四个突变。

[0312] 图26示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含二、三或四个突变(顶行和底行)。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的平均值。

[0313] 图27示出了使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的野生型IL-12Fc(“w.t.”)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基包含二、三或四个突变。

[0314] 图28示出了SPR传感图(即,从SPR仪器生成的SPR响应(以响应单位(RU)计)与时间(以秒计)的图),其代表0.7、2.1、6.2、18.5、55.6、167、500nM IL-12Rβ2与固定化的野生型IL-12 Fc(“w.t.”;左)或IL-12 Fc K170A突变体(“K170A”;右)的结合,如所指示。

[0315] 图29A和29B示出了在HEK-Blue IL-12报告基因测定中,与野生型IL-12 Fc(“WT”)相比,异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二、三或四个突变。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示异二聚体IL-12 Fc突变体融合蛋白的平均值。

[0316] 图30示出了使用HEK-Blue IL-12测定得到的市售IL-12(Miltenyi)、野生型IL-12 Fc(“w.t.”)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二或三个突变。

[0317] 图31示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二或三个突变。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示异二聚体IL-12 Fc突变体融合蛋白的平均值。

[0318] 图32示出了使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12p35亚基结构域包含一、二或三个突变。

[0319] 图33示出了呈单价型式的示例性IL-12 Fc融合蛋白的示意图。

[0320] 图34示出了野生型IL-12异二聚体Fc融合蛋白(本文也称为“野生型IL-12 Fc”、“IL-12 Fc wt”或“IL-12 Fc w.t.”或“WT”)的阳离子交换(上图)和分析尺寸排阻(下图)色谱曲线。合并用于功能测定或分析的级分以矩形指示。

[0321] 图35A和35B示出了异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的还原性(+DTT;35A)和非还原性(-DTT;35B)SDS-PAGE分析,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二或三个突变。

[0322] 图36示出了在HEK-Blue IL-12报告基因测定中,与野生型IL-12 Fc(“WT”)相比,市售IL-12(Miltenyi)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二或三个突变。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示市售IL-12或异二聚体IL-12 Fc突变体融合蛋白的平均值。

[0323] 图37示出了使用HEK-Blue IL-12测定得到的市售IL-12(Miltenyi)、野生型IL-12 Fc(“w.t.”)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二或三个突变。

[0324] 图38示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中市售IL-12(Miltenyi)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二或三个突变。符号和误差线分别指示平均值和SD。就符号而言,实心圆圈显示野生型IL-12 Fc的平均值,而空心方块显示市售IL-12(Miltenyi)和异二聚体IL-12 Fc突变体融合蛋白的平均值。

[0325] 图39示出了使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的市售IL-12(Miltenyi)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一、二或三个突变。

[0326] 图40A和40B示出了在存在或不存在1、5或10ng/ml野生型IL-12 Fc或10ng/ml含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的情况下培养后,衍生自供体

(“供体245”)的CD8+T细胞上Lag-3、PD-1、CD27、CD45RA/CD45RO、TCF1、CD62L、CD39和颗粒酶B的表达,如所指示。水平线代表两次重复测量的平均值(符号)。

[0327] 图41A和41B示出了在存在或不存在1、5或10ng/ml野生型IL-12 Fc或10ng/ml含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的情况下培养后,衍生自供体(“供体247”)的CD8+T细胞上Lag-3、PD-1、CD27、CD45RA/CD45RO、TCF1、CD62L、CD39和颗粒酶B的表达,如所指示。水平线代表两次重复测量的平均值(符号)。

[0328] 图42A和42B示出了在存在或不存在1、5或10ng/ml野生型IL-12 Fc或10ng/ml含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的情况下培养后,衍生自供体(“供体245”)的CD4+T细胞上Lag-3、PD-1、CD27、CD45RA/CD45RO、TCF1、CD62L、CD39和颗粒酶B的表达,如所指示。水平线代表两次重复测量的平均值(符号)。

[0329] 图43A和43B示出了在存在或不存在1、5或10ng/ml野生型IL-12 Fc或10ng/ml含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的情况下培养后,衍生自供体(“供体247”)的CD4+T细胞上Lag-3、PD-1、CD27、CD45RA/CD45RO、TCF1、CD62L、CD39和颗粒酶B的表达,如所指示。水平线代表两次重复测量的平均值(符号)。

[0330] 图44示出了基于正文中描述的完整表型标志物组对CD8+T细胞进行的主成分分析(PCA)。使用limma“removeBatchEffect”函数去除供体批次效应,并且使用limma“plotMDS”函数分析每个功能标志物的校正MFI值以获得PCA图。与变体效力最相关的PC1组分作为箱线图显示,其中水平线代表来自三个供体样品的中值,每个样品重复进行(符号)。

[0331] 图45示出了基于正文中描述的完整表型标志物组对CD4+T细胞进行的主成分分析(PCA)。使用limma“removeBatchEffect”函数去除供体批次效应,并且使用limma“plotMDS”函数分析每个功能标志物的校正MFI值以获得PCA图。与变体效力最相关的PC2组分作为箱线图显示,其中水平线代表来自三个供体样品的中值,每个样品重复进行(符号)。

[0332] 图46示出了在注射10x10^6个新鲜分离的人PBMC和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白后十二天,1μl小鼠血浆中存在的CD4+细胞数(上图)、CD8+细胞数(中间图)和CD4:CD8比率(定义为CD4+细胞数除以CD8+细胞数;下图),如所指示。水平线代表从三只小鼠进行的测量的平均值(符号)。

[0333] 图47示出了在注射10x10^6个新鲜分离的人PBMC和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白后十二天,来源于小鼠血浆的CD4+T细胞上PD-1、Lag-3、Tim-3、CD95、Ki67、颗粒酶B和CD45RA/CD45RO的表达。水平线代表从三只小鼠进行的测量的平均值(符号)。

[0334] 图48示出了在注射10x10^6个新鲜分离的人PBMC和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白后十二天,来源于小鼠血浆的CD8+T细胞上PD-1、Lag-3、Tim-3、CD95、Ki67、颗粒酶B和CD45RA/CD45RO的表达。水平线代表从三只小鼠进行的测量的平均值(符号)。

[0335] 图49示出了在时间0小时时注射了10x10^6个新鲜分离的人PBMC和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的小鼠血浆中存在的IFNγ浓度,如所指示。IL-12 Fc以0.01mg/kg(上图)或0.1mg/kg(下图)在时间0小时时和时间168小时时注射,如向下的箭头所指示。如图表所指示,数据点是在多个时间点收集的。

[0336] 图50示出了在时间0小时时注射了10x10^6个新鲜分离的人PBMC和野生型IL-12 Fc

或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的小鼠血浆中存在的IL-12 Fc浓度,如所指示。IL-12 Fc以0.01mg/kg(上图)或0.1mg/kg(下图)在时间0小时时和时间168小时时注射,如向下的箭头所指示。如图表所指示,数据点是在多个时间点收集的。

[0337] 图51示出了在注射2.5x10^{6}个T细胞受体α常数(TRAC)敲除、1G4转导的原代T细胞和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白后七天,1μl小鼠血液中存在的CD4+细胞数和CD8+细胞数以及CD8+T细胞上颗粒酶B、Lag-3、PD-1、T-bet、CD45RA+/CD45RO-和Ki-67的表达,如所指示。水平线代表对每组五至六只小鼠进行的测量的中值(符号)。

[0338] 图52示出了在注射2.5x10^{6}个TRAC敲除、1G4转导的原代T细胞和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白后十四天,1μl小鼠血液中存在的CD4+细胞数和CD8+细胞数以及CD8+T细胞上颗粒酶B、Lag-3、PD-1、T-bet、CD45RA+/CD45RO-和Ki67的表达,如所指示。水平线代表对每组五至六只小鼠进行的测量的中值(符号)。

[0339] 图53示出了在第1天、第7天、第14天和第21天,注射了2.5x10^{6}个TRAC敲除、1G4转导的原代T细胞和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的小鼠血浆中存在的IL-12 Fc浓度,如所指示。符号和误差线分别代表经由Luminex测定对来自五至六只小鼠的血浆进行的测量的平均值和标准差。

[0340] 图54示出了在第1天、第7天、第14天和第21天,注射了2.5x10^{6}个TRAC敲除、1G4转导的原代T细胞和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的小鼠血浆中存在的IFNγ浓度,如所指示。符号和误差线分别代表经由Luminex测定对来自五至六只小鼠的血浆进行的测量的平均值和标准差。

[0341] 图55示出了在第0天、第7天和第14天,NSG小鼠(每个治疗组n=5-6)的肿瘤生长曲线,所述小鼠在第-14天皮下注射2x10^{5}个表达HLA-A2/NY-ESO-1A4变体的HCT116人结肠直肠癌细胞,然后在第0天用2.5x10^{6}个TRAC敲除、1G4转导的原代T细胞和野生型IL-12 Fc或含有IL-12 p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白进行治疗,如所指示。符号和误差线分别代表平均值和平均值的标准误差。

[0342] 图56示出了在第18天NSG小鼠(每个治疗组n=5-6)的肿瘤测量,所述小鼠在第-14天皮下注射2x10^{5}个表达HLA-A2/NY-ESO-1A4变体的HCT116人结肠直肠癌细胞,然后在第0天用2.5x10^{6}个TRAC敲除、1G4转导的原代T细胞和野生型IL-12 Fc或含有IL-12p35亚基结构域内突变的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白进行治疗,如所指示。符号代表个别小鼠的肿瘤体积,而黑线代表每个治疗组的中值。使用单因素方差分析计算统计数据。ns指示不显著,**指示P<0.01。

[0343] 图57A和57B示出了蛋白质A纯化的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的非还原性SDS-PAGE分析,其中IL-12 p35亚基结构域含有一个或两个突变,如所指示。

[0344] 图58A和58B示出了蛋白质A纯化的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的还原性SDS-PAGE分析,其中IL-12 p35亚基结构域含有一个或两个突变,如所指示。

[0345] 图59示出了活化T细胞培养基中IFNγ的AlphaLISA测量,所述活化T细胞未刺激或与蛋白质A纯化的expi-CHO培养基(“无DNA”)或20pM野生型IL-12 Fc(“WT”)或20pM异二聚

体IL-12 Fc融合蛋白一起孵育,其中IL-12 p35亚基结构域在氨基酸位置40处含有突变,如x轴上所指示。水平线指示用IL-12 Fc Y40Y治疗后产生的IFNγ的量。

[0346] 图60示出了活化T细胞培养基中IFNγ的AlphaLISA测量,所述活化T细胞未刺激或与蛋白质A纯化的expi-CHO培养基(“无DNA”)或80pM野生型IL-12 Fc(“WT”)或80pM异二聚体IL-12 Fc融合蛋白一起孵育,其中IL-12 p35亚基结构域在氨基酸位置126处含有Y40A突变和额外突变,如x轴上所指示。水平线指示用IL-12Fc Y40A/D126D治疗后产生的IFNγ的量。

[0347] 图61示出了活化T细胞培养基中IFNγ的AlphaLISA测量,所述活化T细胞未刺激或与蛋白质A纯化的expi-CHO培养基(“无DNA”)或80pM野生型IL-12 Fc(“WT”)或80pM异二聚体IL-12 Fc融合蛋白一起孵育,其中IL-12 p35亚基结构域在氨基酸位置127处含有Y40A突变和额外突变,如x轴上所指示。水平线指示用IL-12Fc Y40A/P127P治疗后产生的IFNγ的量。

[0348] 图62示出了活化T细胞培养基中IFNγ的AlphaLISA测量,所述活化T细胞未刺激或与蛋白质A纯化的expi-CHO培养基(“无DNA”)或80pM野生型IL-12 Fc(“WT”)或80pM异二聚体IL-12 Fc融合蛋白一起孵育,其中IL-12 p35亚基结构域在氨基酸位置129处含有Y40A突变和额外突变,如x轴上所指示。水平线指示用IL-12Fc Y40A/R129R治疗后产生的IFNγ的量。

[0349] 图63示出了活化T细胞培养基中IFNγ的AlphaLISA测量,所述活化T细胞未刺激或与蛋白质A纯化的expi-CHO培养基(“无DNA”)或80pM野生型IL-12 Fc(“WT”)或80pM异二聚体IL-12 Fc融合蛋白一起孵育,其中IL-12 p35亚基结构域在氨基酸位置168处含有Y40A突变和额外突变,如x轴上所指示。水平线指示用IL-12Fc Y40A/K168K治疗后产生的IFNγ的量。

[0350] 图64示出了活化T细胞培养基中IFNγ的AlphaLISA测量,所述活化T细胞未刺激或与蛋白质A纯化的expi-CHO培养基(“无DNA”)或20pM野生型IL-12 Fc(“WT”)或20pM异二聚体IL-12 Fc融合蛋白一起孵育,其中IL-12 p35亚基在氨基酸位置170处含有突变,如x轴上所指示。水平线指示用IL-12 Fc K170K治疗后产生的IFNγ的量。

[0351] 图65示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中野生型IL-12 Fc和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含Y40X单一突变体(上图)或Y40A/K168X双突变体(下图)。符号和误差线分别指示平均值和SD。

[0352] 图66示出了使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12p35亚基结构域包含一个或两个突变。

[0353] 图67示出了WT IL-12 Fc和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的热解折叠曲线,其中IL-12 p35亚基结构域包含如所指示的Y40A、D126A、R129A、P127A、K168A或K170A。实线代表三次独立重复的平均值。

[0354] 图68示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的百分比活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含如所指示的一个或两个突变。百分比活性是指在给定温度下孵育后的样品的活性(在每组的标题中指示)相对于未处理或48℃处理的样品的活性(如在每组的y轴上指示)。

[0355] 图69示出了通过差示扫描荧光法(DSF)确定的WT IL-12 Fc和异二聚体IL-12 Fc

融合蛋白的个别解链温度(TM_1和TM_2)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个或两个突变。

[0356] 图70示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中三个不同批次的WT IL-12 Fc(WT1、WT2和WT3)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个或两个突变。符号和误差线分别指示平均值和SD。

[0357] 图71示出了在四个单独供体中使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的三个不同批次的WT IL-12 Fc(WT1、WT2和WT3)和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个或两个突变。

[0358] 图72示出了以2.5:1的效应子与靶细胞比率孵育TRAC敲除、1G4转导的原代T细胞(效应子)与HLA-A2/NY-ESO A4变体/GFP转导的HCT116细胞(靶标)产生的杀伤曲线。在进行测定设置之前,将效应子与0-10ng/ml WT IL-12 Fc一起孵育过夜,如符号所指示。绘制随时间变化的剩余靶细胞数量(描绘为归一化至0h的GFP汇合度)。

[0359] 图73示出了杀伤测定结果的总结,其中以2.5:1的效应子与靶细胞比率孵育TRAC敲除、1G4转导的原代T细胞(效应子)与HLA-A2/NY-ESO A4变体/GFP转导的HCT116细胞(靶标)。在进行测定设置之前,将效应子与0-10ng/ml WT IL-12 Fc(透明条)或单一确定浓度的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白一起孵育过夜,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个或两个突变(阴影条),如所指示。条形图和误差线代表8小时时间点剩余的靶细胞数量的平均值和标准差(描绘为GFP汇合度)。水平虚线代表与0和10ng/ml WT IL-12 Fc一起孵育后剩余的靶细胞数量(分别为上部和下部水平虚线)。

[0360] 图74示出了如通过T细胞杀伤测定所确定的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白相对于WT IL-12 Fc的活性的插值倍数变化的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个或两个突变。

[0361] 图75示出了通过DSF确定的WT IL-12 Fc和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的个别解链温度(TM_1和TM_2)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个或两个突变。

[0362] 图76示出了使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的WT IL-12 Fc和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含一个或两个突变。

[0363] 图77示出了呈单价型式的示例性IL-12 Fc融合蛋白的示意图。

[0364] 图78A-78G示出了额外变体IL-12 p35亚基序列的列表。

[0365] 图79A-79D示出了额外示例性异二聚体Fc融合蛋白和相关序列的列表。

[0366] 图80A-80M示出了额外变体IL-12 p35亚基序列(丙氨酸突变、选择的非丙氨酸突变、选择的丙氨酸突变与选择的非丙氨酸突变的组合以及选择的非丙氨酸突变与额外非丙氨酸突变的组合)的列表。

[0367] 图81示出了“HLA-A2、β2-微球蛋白和NY-ESO-1A4变体肽的单链三聚体”和“1G4 T细胞受体β链-P2A-1G4 T细胞受体α链”的序列。

[0368] 图82示出了在原代T细胞IFNγ释放测定中两个不同构型的WT IL-12 Fc(p40-Fc(杵)/p35-Fc(臼)和p40-Fc(臼)/p35-Fc(杵))和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性,其中IL-12 p35亚基结构域包含两个突变。符号和误差线分别指示平均值和SD。

[0369] 图83示出了使用原代T细胞IFNγ释放测定得到的两个不同构型的WT IL-12 Fc(p40-Fc(杵)/p35-Fc(臼)和p40-Fc(臼)/p35-Fc(杵))和异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的EC_{50}

值和倍数变化(相对于w.t.)的总结,其中IL-12 p35亚基结构域包含两个突变。

具体实施方式

[0370] 呈现说明书是为了使本领域的普通技术人员能够制备和使用本发明,并且在专利申请及其要求的背景下提供。本文所使用的小节标题仅出于组织性目的并且不解释为限制所述主题。虽然本公开的本发明的各种实施方案已在本文显示和描述,此类实施方案仅以举例的方式提供,这对本领域的技术人员将是显而易见的。在不背离本发明的情况下本领域技术人员现可进行许多变型、变化和替换。应理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实践本文所阐述的本发明的任一者。

[0371] 本文提及的所有专利、已公布的专利申请、其他出版物和来自GenBank和其他数据库的序列均以引用的方式整体相应于相关技术并入。

[0372] I.定义

[0373] 除非另有定义,否则本文所用的技术术语和科学术语的含义都与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。为了本公开的目的,下文定义以下术语。所提供的定义旨在适用于给定的术语以及所述术语的其他衍生语言重新措辞和语法等效词。

[0374] 如本文所用,术语“蛋白质”是指至少二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个共价附接的氨基酸,其包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。当“生物功能分子”包含两种或更多种蛋白质时,诸如例如IL-12(其包含IL-12 p35多肽和IL-12 p40多肽),包含两种或更多种蛋白质的个别蛋白质可各自称为“亚基”、“单体”或“结构域”,并且生物功能分子可称为“复合物”。在一些实施方案中,功能复合物的两个或更多个蛋白质是非共价附接的。在一些实施方案中,功能复合物的两个或更多个蛋白质是共价附接的,诸如例如通过二硫键。

[0375] 如本文所用,术语“细胞因子”是指一大类蛋白质,诸如例如趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子、肿瘤坏死因子等,其由第一个细胞分泌,通过分泌的细胞因子与一个或多个细胞上的受体结合而对一个或多个细胞造成影响。细胞因子可参与自分泌、旁分泌、近分泌和/或内分泌信号传导。

[0376] 如本文所用,术语“野生型”是指自然界中发现的氨基酸序列或核苷酸序列,包括等位基因变异。野生型蛋白质具有未被有意修饰的氨基酸序列(或编码该氨基酸序列的核苷酸序列)。

[0377] 如本文所用,术语“IL-12 p35亚基”是指人野生型IL-12 p35多肽,无论是天然的还是重组的。因此,IL-12 p35亚基是指重组产生的IL-12 p35多肽、合成产生的IL-12 p35多肽以及从细胞或组织中提取的IL-12 p35。图1描绘了人野生型IL-12 p35亚基的氨基酸序列(前体:SEQ ID NO:1;成熟:SEQ ID NO:2)。在融合蛋白的背景下,IL-12

[0378] p35亚基也可称为“IL-12 p35亚基结构域”,其中IL-12 p35亚基结构域包含编码IL-12 p35亚基的氨基酸序列的至少一部分。

[0379] 如本文所用,术语“IL-12 p40亚基”是指人野生型IL-12 p40多肽,无论是天然的还是重组的。因此,IL-12 p40亚基是指重组产生的IL-12 p40多肽、合成产生的IL-12 p40多肽以及从细胞或组织中提取的IL-12 p40。图1描绘了人野生型IL-12 p40亚基的氨基酸序列(前体:SEQ ID NO:3;成熟:SEQ ID NO:4)。在融合蛋白的背景下,IL-12p40亚基也可称

为“IL-12 p40亚基结构域”,其中IL-12 p40亚基结构域包含编码IL-12 p40亚基的氨基酸序列的至少一部分。如本文所用,短语“(变体)IL-12 p40亚基”用于公开其中IL-12 p40亚基包含野生型IL-12 p40多肽或变体IL-12 p40亚基的实施方案。

[0380] 如本文所用,术语“单链”是指包含两个或更多个通过肽键线性连接的蛋白质结构域的分子。在一些实施方案中,具有生物功能的IL-12是单链IL-12复合物(sc-IL-12)(即,IL-12 p35亚基和IL-12 p40亚基融合形成单一肽链)。在进一步的实施方案中,IL-12 p35亚基的C末端连接至IL-12 p40亚基的N末端(sc-IL-12(p35/p40))。在又进一步的实施方案中,sc-IL-12(p35/p40)进一步包含接头,其中IL-12 p35亚基的C末端连接至接头的N末端,并且接头的C末端连接至IL-12p40亚基的N末端。在其他实施方案中,IL-12 p40亚基的C末端连接至IL-12 p35亚基的N末端(sc-IL-12(p40/p35))。在又进一步的实施方案中,sc-IL-12(p40/p35)进一步包含接头,其中IL-12 p40亚基的C末端连接至接头的N末端,并且接头的C末端连接至IL-12 p35亚基的N末端。

[0381] 如本文所用,术语“残基”是指蛋白质中的位置及其相关的氨基酸身份。例如,半胱氨酸252(也称为Cys252或C252)是在位置252处的残基。

[0382] 如本文所用,术语“亲本蛋白质”是指“参考”蛋白质、编码参考蛋白质的氨基酸序列或编码编码参考蛋白质的氨基酸序列的DNA序列。在一些实施方案中,参考蛋白质包括野生型蛋白质、编码野生型蛋白质的氨基酸序列和/或编码编码野生型蛋白质的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方案中,参考蛋白质包括人野生型蛋白质、编码人野生型蛋白质的氨基酸序列和/或编码编码人野生型蛋白质的氨基酸序列的核酸序列。在一些实施方案中,参考蛋白质包括与Fc结构域缀合的(人)野生型蛋白质。

[0383] 如本文所用,术语“变体蛋白质”、“蛋白质变体”或“变体”是指与亲本蛋白质的性质由于至少一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个修饰而不同的蛋白质。所述术语可指蛋白质本身、包含蛋白质的组合物、编码蛋白质的氨基酸序列或编码氨基酸序列的DNA序列。在一些实施方案中,亲本蛋白质是指野生型序列。在一些实施方案中,亲本蛋白质是指人野生型序列。因此,IL-12 p35亚基的“变体”(或IL-12 p35亚基结构域的“变体”)是指与参考IL-12 p35亚基(诸如例如(人)野生型IL-12 p35亚基)的氨基酸序列相比,存在一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个氨基酸取代、缺失和/或插入的多肽。此外,IL-12 p40亚基的“变体”(或IL-12 p40亚基结构域的“变体”)是指与参考IL-12 p40亚基(诸如例如(人)野生型IL-12 p40亚基)的氨基酸序列相比,存在一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个氨基酸取代、缺失和/或插入的多肽。

[0384] 如本文所用,术语“修饰”是指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失,或与蛋白质化学连接的部分的改变。如本文所用,术语“氨基酸修饰”是指多肽序列中的氨基酸取代、插入和/或缺失。氨基酸修饰的位置和氨基酸序列中可修饰的氨基酸的数量没有特别的限制。

[0385] 将了解,全文描述的对IL-12 p35亚基(结构域)的修饰是指对序列的成熟形式(SEQ ID NO:2)和/或其变体,而不是对前体序列(SEQ ID NO:1)所做的修饰。IL-12 p35亚基的前体序列在N末端包含额外的22个氨基酸残基,其包含以下序列:

MCPARSLLLVATLVLLDHLSLA。然而,在考虑到前体序列中的额外前导氨基酸残基而校正所述修饰的位置后,可对IL-12 p35亚基的前体形式进行所列出的对IL-12 p35亚基的成熟形式的修饰。例如,取代修饰Y40A在本文中被公开为对IL-12 p35亚基成熟序列的潜在修饰,但也可指包含Y62A的IL-12 p35亚基前体序列的取代修饰。

[0386] 类似地,全文描述的对IL-12 p40亚基(结构域)的修饰旨在是指对序列的成熟形式(SEQ ID NO:4)和/或其变体,而不是对前体序列(SEQ ID NO:3)所做的修饰。IL-12 p40亚基的前体序列在N末端包含额外的22个氨基酸残基,其包含以下序列:MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA。然而,还将了解,在考虑到前体序列中的额外前导氨基酸残基而校正所述修饰的位置后,可对IL-12 p40亚基的前体形式进行所列出的对IL-12 p40亚基的成熟形式的修饰。例如,取代修饰C177S在本文中被公开为对IL-12 p40亚基成熟序列的潜在修饰,但也可指包含C199S的IL-12 p40亚基前体序列的取代修饰。

[0387] 如本文所用,术语“氨基酸取代”或“取代”是指用不同的氨基酸替代在亲本多肽序列中特定位置处的氨基酸。例如,Y40A表示在位置40处的酪氨酸被在相同位置处的丙氨酸取代。在一些实施方案中,取代的是在特定位置处非天然存在的氨基酸,所述氨基酸在生物体内或任何生物体中都是非天然存在的。为清楚起见,经工程化以改变核酸编码序列但不改变所得氨基酸(例如,将CCU(编码脯氨酸)交换为CCC(仍然编码脯氨酸))的蛋白质不是“氨基酸取代”。换句话说,尽管产生了编码相同蛋白质的新基因,但如果蛋白质在特定位置处具有与其起始位置相同的氨基酸,则这不是氨基酸取代。

[0388] 如本文所用,术语“氨基酸插入”或“插入”是指在亲本多肽序列的特定位置处添加氨基酸残基或序列。例如,-40A表示在位置40之后和位置41之前插入丙氨酸。作为一个单独的实例,D8EPKSS或-8EPKSS表示在位置8之后和位置9之前插入序列Glu-Pro-Lys-Ser-Ser。

[0389] 如本文所用,术语“氨基酸缺失”或“缺失”是指在亲本多肽序列的特定位置处去除氨基酸或序列。例如,Y40-、Y40#、Y40()或Y40del表示在位置40处缺失酪氨酸。作为一个单独的实例,EPKSS8-、EPKSS8#、EPKSS8del表示从位置8开始缺失序列Glu-Pro-Lys-Ser-Ser。

[0390] 如本文所用,术语“非天然存在的蛋白质”或“非天然存在的蛋白质变体”是指与亲本蛋白质由于至少一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个非同型修饰而不同的变体蛋白质。例如,由于IL-12的IL-12 p35亚基在位置40处不包含丙氨酸,因此取代Y40A被视为非天然存在的IL-12 p35变体(或更通常地,非天然存在的IL-12变体)。对蛋白质的非同型修饰可称为“非天然存在的修饰”。

[0391] 如本文所用,术语“百分比(%)同一性”和“百分比(%)序列同一性”在用于两个或更多个蛋白质或核酸的背景中时,是指在比对序列并且在必要时引入间隙以实现最大百分比序列同一性之后,候选序列中的氨基酸残基(或编码氨基酸残基的核酸)与特定序列(诸如例如,亲本蛋白质的氨基酸序列)中的氨基酸残基(或编码氨基酸残基的核酸)同一的百分比,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分。为了确定百分比序列同一性的比对可通过本领域技术范围内的各种方式实现,诸如例如,使用可公开获得的计算机软件(例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件)。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括需要在所比较序列的全长上实现最大比对的任何算法。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸序列至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、

94％、95％、96％、97％、98％、99％或甚至100％同一。

[0392] 如本文所用,术语剂的“半衰期”可指相对于在施用至生物体或受试者的血清,或组织中的时间时的此类活性或相对于任何其他定义的时间点,剂失去其药理学、生理学或其他活性的一半所需的时间。“半衰期”还可指相对于在施用至生物体或受试者的血清或组织中的时间时的此类量或浓度,或相对于任何其他定义的时间点,剂的量或浓度降低施用至生物体或受试者的血清或组织中的起始量的一半所需的时间。半衰期可在血清和/或任何一种或多种所选组织中测量。

[0393] 如本文所用,术语“宿主细胞”和“重组细胞”是指可以是或已经成为任何重组载体或分离的多核苷酸的接受者的个别细胞或细胞培养物。宿主细胞可以是任何来源的转染、转化、转导或感染的细胞,包括但不限于原核细胞、真核细胞、哺乳动物细胞、禽类细胞、昆虫细胞、植物细胞或细菌细胞,或可以是可用于繁殖本文所述核酸的任何来源。宿主细胞包括用本发明的重组载体或多核苷酸在体内或体外转染或感染的细胞。包含本发明的重组载体的宿主细胞可称为“重组宿主细胞”。

[0394] 宿主细胞可包括但不限于哺乳动物、植物、昆虫、真菌和细菌的细胞。细菌细胞包括但不限于革兰氏阳性细菌(诸如例如芽孢杆菌(Bacillus)属、链霉菌属(Streptomyce)和葡萄球菌属(Staphylococcus)的菌种)的细胞,以及革兰氏阴性细菌细胞,诸如例如大肠杆菌属(Escherichia)和假单胞菌属(Pseudomona)的细胞。真菌细胞可包括但不限于酵母细胞,诸如例如酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母(Pichia pastoris)和汉逊酵母(Hansenula polymorpha)。昆虫细胞可包括但不限于果蝇属(Drosophila)的细胞和Sf9细胞。植物细胞包括但不限于来自农作物、药用或观赏植物或球茎的细胞。适用于本发明的哺乳动物细胞包括但不限于上皮细胞系(例如,猪上皮细胞)、骨肉瘤细胞系、神经母细胞瘤细胞系、上皮癌、神经胶质细胞、肝细胞系、中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)细胞、COS细胞、BHK细胞、HeLa细胞、鼠胚胎干细胞(mESC)系的D3细胞、人胚胎干细胞(例如,HS293细胞和BG01V细胞)、NIH 3T3细胞、人胚胎肾(HEK)293T细胞、人间充质干细胞(hMSCS)等。

[0395] 如本文所用,术语“细胞”、“细胞培养物”、“细胞系”和“宿主细胞”不仅是指特定的细胞、细胞培养物、细胞系或宿主细胞,还是指此种细胞、细胞培养物、细胞系或宿主细胞的后代或潜在后代,而与培养物中的转移或传代次数无关。应理解,并非所有的子代都与亲本细胞完全同一。这是因为由于突变(例如,有意或无意的突变)或环境影响(例如,甲基化或其他表观遗传修饰),某些修饰可发生在后代中,使得子代实际上可与亲本细胞不同一,但仍包括在如本文所用的术语范围内,只要子代保留与原始细胞、细胞培养物、细胞系或宿主细胞相同的功能或基本上相同的功能。

[0396] 如本文所用,术语“培养基(medium)”或“培养基(culture medium)”包括任何培养基、溶液、固体、半固体或刚性支撑物,其可支撑或容纳任何宿主细胞,包括但不限于细菌宿主细胞、酵母或真菌宿主细胞、昆虫宿主细胞、植物宿主细胞、真核宿主细胞、哺乳动物宿主细胞、CHO细胞、原核宿主细胞、大肠杆菌(E.coli)宿主细胞、假单胞菌属宿主细胞等以及细胞内容物。因此,所述术语可涵盖宿主细胞生长的培养基(例如,已被分泌多肽的培养基,包括增殖步骤之前、期间或之后的培养基)。所述术语还可涵盖含有宿主细胞裂解物的缓冲液或其他试剂,诸如例如在多核苷酸在胞内产生并且宿主细胞被裂解或破坏以释放多肽的情

况下。

[0397] 如本文所用,术语“融合蛋白”是指至少两个蛋白质或蛋白质结构域的共价接合。融合蛋白可包含人工序列,诸如例如,结构域接头、变体Fc结构域、变体IL-12 p35亚基结构域、(变体)IL-12 p40亚基结构域等,如本文所述。如本文所用,术语“Fc融合蛋白”是指包含Fc结构域的蛋白质,所述Fc结构域通常连接(任选地通过结构域接头,如本文所述)至一个或多个不同的蛋白质结构域。在一些实施方案中,Fc结构域的C末端连接至一个或多个不同的蛋白质结构域的N末端(任选地通过结构域接头,其中Fc结构域的C末端连接至结构域接头的N末端,并且结构域接头的C末端连接至一个或多个不同的蛋白质结构域的N末端)。在一些实施方案中,Fc结构域的N末端连接至一个或多个不同的蛋白质结构域的C末端(任选地通过结构域接头,其中一个或多个蛋白质结构域的C末端连接至结构域接头的N末端,并且结构域接头的C末端连接至Fc结构域的N末端)。因此,“IL-12Fc融合”包含连接至变体IL-12 p35亚基结构域、IL-12 p40亚基结构域、变体IL-12 p40亚基结构域、sc-IL-12、sc-IL-12(p35/p40)和/或sc-IL-12(p40/p35)的Fc区(任选地通过结构域接头)。“Fc融合蛋白”可指“异二聚体Fc融合蛋白”或“同二聚体Fc融合蛋白”。

[0398] 如本文所用,术语“异二聚体Fc融合蛋白”是指包含第一融合构建体和第二融合构建体的复合物,其中第一融合构建体包含第一Fc结构域和第一IL-12亚基结构域,并且其中第二融合构建体包含第二Fc结构域和第二IL-12亚基结构域。在一些实施方案中,第一Fc结构域和第二Fc结构域包含促进第一Fc结构域和第二Fc结构域异二聚化的修饰。在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一个或多个改变Fc结合的修饰。在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一个或多个改变Fc半衰期的修饰。在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一个或多个修饰,其改变第一Fc结构域和/或第二Fc结构域与新生儿Fc受体(FcRn)的结合。在某些进一步的实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一个或多个增加半衰期和/或与FcRn的结合的修饰。在一些实施方案中,第一IL-12亚基结构域包括变体IL-12 p35亚基结构域,并且第二IL-12亚基结构域包括IL-12 p40亚基结构域或变体IL-12 p40亚基结构域。在一些实施方案中,第一IL-12亚基结构域包括IL-12 p40亚基结构域或变体IL-12 p40亚基结构域,并且第二IL-12亚基结构域包括变体IL-12 p35亚基结构域。在一些实施方案中,第一IL-12亚基结构域的C末端连接至第一Fc结构域的N末端(任选地通过结构域接头),并且第二IL-12亚基结构域的C末端连接至第二Fc结构域的N末端(任选地通过结构域接头)。在一些实施方案中,第一Fc结构域的C末端连接至第一IL-12亚基结构域的N末端(任选地通过结构域接头),并且第二Fc结构域的C末端连接至第二IL-12亚基结构域的N末端(任选地通过结构域接头)。

[0399] 如本文所用,术语“同二聚体融合蛋白”是指包含融合构建体两个同一实例的复合物,其中融合构建体的个别实例包含Fc结构域和一个或多个蛋白质结构域(任选地通过结构域接头连接)。在一些实施方案中,对于融合构建体的两个实例,Fc结构域的C末端连接至一个或多个蛋白质结构域的N末端(任选地通过结构域接头)。在一些实施方案中,对于融合构建体的两个实例,一个或多个蛋白质结构域的C末端连接至Fc结构域的N末端(任选地通过结构域接头)。在一些实施方案中,Fc结构域的同一实例包含一个或多个改变Fc结合的修饰。在一些实施方案中,Fc结构域的同一实例包含一个或多个改变Fc半衰期的修饰。在一些实施方案中,Fc结构域的同一实例包含一个或多个修饰,其改变Fc结构域的同一实例与新

生儿Fc受体(FcRn)的结合。在某些进一步的实施方案中,结构域的同一实例包含一个或多个增加半衰期和/或与FcRn的结合的修饰。

[0400] 如本文所用,术语“分离的”在用于描述本文所公开的各种多肽时,是指已从表达其的细胞(例如,宿主细胞和/或细胞系)或细胞培养物中鉴定和分离和/或回收的多肽。通常,分离的多肽将通过至少一个纯化步骤来制备。如本文所用,术语“分离的蛋白质”是指基本上不含来自细胞培养物的其他蛋白质(诸如例如宿主细胞蛋白质)的蛋白质。

[0401] 如本文所用,术语“Fc”、“Fc区”或“Fc结构域”是指包含免疫球蛋白G(IgG)分子的CH2-CH3结构域的多肽,并且在一些情况下包括全部或部分铰链以及其变体。在人IgG1的EU编号中,CH2-CH3结构域包含氨基酸231至447,并且铰链为216至230。因此,“Fc结构域”的定义包括氨基酸231-447(CH2-CH3)或216-447(铰链-CH2-CH3)两者或其片段。在这种背景下,“Fc片段”可含有来自N末端或C末端或两者的较少氨基酸,但仍保留与另一个Fc结构域或Fc片段形成二聚体的能力,这可使用标准方法检测,通常基于尺寸(例如,非变性色谱法、尺寸排阻色谱法等)。本文中,除非特别说明,否则“Fc结构域”通常是指人IgG1的CH2-CH3结构域(和任选的全部或部分铰链)。下文描述了各种人IgG1 Fc结构域,其中至少一些包含一个或多个修饰。为清楚起见,虽然本文为了简洁起见主要在人IgG1 Fc结构域的背景下讨论了修饰,但明确考虑可在对应于本文所述的人IgG1中的突变的残基位置处发生其他免疫球蛋白(诸如例如,IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM和IgE)的突变。相关领域的技术人员将能够容易地确定与本文所述的人IgG1修饰相对应的其他免疫球蛋白中的残基位置。

[0402] 如本文所用,术语“载体”是指能够转移或运输另一个核酸分子的核酸分子或序列。转移的核酸分子通常连接至(例如,插入至)载体核酸分子。通常,当与适当的控制元件缔合时,载体能够复制。术语“载体”包括克隆载体和表达载体,以及病毒载体和整合载体。“表达载体”是包含调控区、从而能够在体外和/或体内表达DNA序列及其片段的载体。载体可包括指导细胞中自主复制的序列或可包括足以允许整合至宿主细胞DNA中的序列。有用的载体包括但不限于质粒(例如,DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。有用的病毒载体包括但不限于复制缺陷型逆转录病毒和慢病毒。在一些实施方案中,载体是基因递送载体。在一些实施方案中,载体被用作基因递送媒介物以将基因转移至细胞中。

[0403] 如本文所用,就核酸分子而言,术语“重组”是指基因组、cDNA、病毒、半合成和/或合成来源的多核苷酸,其由于其自身的来源或操作,不与自然界中与其相关的多核苷酸的全部或部分相关。就蛋白质或多肽而言,所用的术语“重组”是指通过重组多核苷酸表达产生的多肽。就宿主细胞而言,所用的术语“重组”是指已引入重组多核苷酸或包含重组多核苷酸的载体的宿主细胞。

[0404] 如本文所用,术语“可操作地连接”是指两个或更多个元件(例如,多肽序列或多核苷酸序列)之间的物理或功能键联,其允许它们以其预期的方式操作。例如,感兴趣的多核苷酸和调控序列(诸如例如启动子)之间的可操作的键联是使感兴趣的多核苷酸能够表达的功能连接。在这个意义上,术语“可操作地连接”是指调控区和待转录的编码序列的定位,使得调控区有效地调控感兴趣的编码序列的转录或翻译。因此,如果启动子可介导核酸序列的转录,则其与核酸序列可操作地键联。应理解,可操作地连接的元件可以是连续的或非连续的。在多肽的背景下,“可操作地连接”是指氨基酸序列(例如,不同的区段、模块或结构

域)之间的物理键联(例如,直接或间接连接),以提供多肽的所述活性。

[0405] 如本文所用,术语“结合亲和力”是指给定分子(诸如例如非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12Fc融合蛋白)与其配体(诸如例如IL-12Rβ2)的结合“强度”和/或所述分子与其配体缔合和/或解离的速率。结合亲和力通常用解离常数(K_D)来表示。本公开的非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的结合活性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如表面等离子体共振(SPR)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、ELISpot测定、Biacore测定、KinExA测定等。

[0406] 如本文所用,术语“效力”是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白)在给定生物系统或实验环境中以一定剂量或浓度引发反应的能力。本公开的非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的效力可通过本领域已知的任何合适方法来测定,诸如例如IL-12HEK报告基因测定(例如,InvivoGen的IL-12HEK报告基因测定(目录号hkb-il12))、配体结合测定(例如,ELISA或流式细胞术)和/或功能测定。通常,效力的变化可通过图形方式显示为与对照相比响应曲线向左或向右移动。响应曲线向右移动通常指示效力降低,而响应曲线向左移动通常指示效力增加。

[0407] 如本文所用,术语“活性”是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白)在特定生物系统或实验环境中以给定剂量或浓度引发的特异性反应。本公开的非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的活性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如配体结合测定和/或功能测定。通常,活性的变化可通过图形方式显示为与对照相比响应曲线向上或向下移动。响应曲线向上移动通常指示活性增加,而响应曲线向下移动通常指示活性降低。如下文进一步详细描述的,活性的变化可或可不与效力的变化相关和/或由效力的变化引起。

[0408] 如本文所用,术语“可制造性”是指可影响以足以向个体施用的规模和数量产生和/或储存给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等的过程的任何特性。影响可制造性的特性的实例包括但不限于给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白)的稳定性、纯度、聚集水平和/或表达产量。

[0409] 如本文所用,术语“稳定性”是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白)在特定限度和/或储存和/或使用参数内保留其在制造时所具有的相同特性和特征的能力。本公开的非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的稳定性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如ELISA、西方印迹(Western blot)、Biacore测定、SDS-PAGE、尺寸排阻色谱法、动态光散射、差示扫描量热法和差示扫描荧光法。

[0410] 如本文所用,术语“表达产量”是指使用原核或真核宿主系统产生的给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体、同二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或异二聚体IL-12 Fc融合蛋白)的量或数量。蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等的

重组表达是相关领域中众所周知的。可采用任何合适的方法来量化或确定表达产量,诸如例如UV吸收测量、比色测定(例如,Bradford测定、BCA测定和Lowry测定)和荧光测定。

[0411] 如本文所用,用于治疗目的的术语“受试者”或“个体”是指任何归类为哺乳动物的动物(包括但不限于人、灵长类动物和/或非人灵长类动物)、家养动物、农场动物、动物园动物、研究动物、运动动物和/或宠物动物,诸如狗、马、猫、牛等。

[0412] 如本文所用,除非上下文中另有明确指示,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数个指示物。因此,例如,提及“一种抗原”包括抗原的混合物;提及“一种药学上可接受的载剂”包括两种或更多种此类载剂的混合物等。因此,术语“一(a)”(或“一(an)”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文可互换使用。

[0413] 此外,当在本文使用时,“和/或”应当视为具有或不具有另一者的两种特定特征或组分的每一者的具体公开。因此,本文在短语中使用的术语“和/或”诸如“A和/或B”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A(单独)”和“B(单独)”。

[0414] 如本文所用,术语“约”值(或参数)是指规定值的±10%。当提及值(或参数)的范围时,术语“约”是指规定值范围的上限的+10%和下限的-10%。在提供值的范围时,应理解在所述范围的上下限之间的每个居间值和任何其他规定的或在所述规定范围中的居间值涵盖在本公开的范围内。在规定范围包括上限和/或下限的情况下,不包括那些所包括的限值中的一个的范围也包括在本公开中。

[0415] 应了解,为清楚起见而在单独的实施方案的上下文中描述的本公开的某些特征还可与单个实施方案组合提供。相反,为了简明起见而在单个实施方案的上下文中描述的本公开的各种特征还可单独提供或以任何合适的子组合形式提供。属于本公开的实施方案的所有组合具体地涵盖在本公开中并且在本文中公开就如同每个和每一种组合均个别地和明确地公开一样。另外,各种实施方案及其元素的所有子组合也具体地涵盖在本公开中并且在本文中公开就如同每个和每一种此类子组合均个别地和明确地在本文中公开一样。

[0416] II.综述

[0417] 本发明涉及新型、非天然存在的IL-12变体和融合蛋白,其中IL-12 p35亚基包含降低对IL-12Rβ2的结合亲和力的新型氨基酸取代,以及制备和使用非天然存在的IL-12变体和融合蛋白的方法。

[0418] 如上所述,IL-12由共价连接的α链(p35亚基;IL-12 p35亚基)和β链(p40亚基;IL-12 p40亚基)构成,以形成具有生物功能的IL-12复合物。IL-12通过与由IL-12Rβ1和IL-12Rβ2构成的二聚体IL-12受体复合物结合发挥其细胞信号传导功能,从而导致STAT4磷酸化并且启动多个下游信号传导通路,包括但不限于诱导IFNγ分泌。由于循环免疫细胞过度活化,全身性施用野生型IL-12可能导致严重毒性,包括死亡。此外,由于靶标介导的药物处置,活化的免疫细胞发生细胞增殖导致施用的IL-12血清半衰期较短。

[0419] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法通过提供对IL-12Rβ2具有降低的结合亲和力的新型IL-12变体来降低与IL-12治疗相关的毒性。在进一步的实施方案中,本文所述的组合物和方法利用IL-12 Fc融合蛋白,其在更进一步的实施方案中包含此类新型IL-12变体。

[0420] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法通过提供对IL-12Rβ2具有降低的结合亲和力的新型IL-12变体来解决IL-12的短半衰期。在进一步的实施方案中,通过将新型

IL-12变体与一个或多个Fc结构域(诸如例如,一个或多个由氨基酸序列SEQ ID NO:9-13编码的Fc结构域、包含一个或多个导致与新生儿Fc受体(FcRn)的结合发生改变的修饰的Fc结构域等)、一个或多个白蛋白、一个或多个非结构化可生物降解多肽(“XTEN”)或一个或多个聚乙二醇(PEG)融合,可进一步改善半衰期。

[0421] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法通过提供对IL-12Rβ2具有降低的结合亲和力的IL-12 Fc融合蛋白来解决IL-12的短半衰期。

[0422] III.组合物

[0423] 本领域技术人员将了解,本文所述组合物的方面和实施方案中的任一者均可用于下述制造方法的方面和/或实施方案中的任一者中,或也用于下述使用方法中。

[0424] A.白介素12(IL-12)变体

[0425] 在一个方面中,本公开提供了一种非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基和b)IL-12 p40亚基。下文详细介绍了非天然存在的IL-12变体以及变体IL-12 p35亚基和IL-12 p40亚基的各种构型。

[0426] 1.p35亚基:

[0427] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基,其中变体IL-12 p35亚基包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A;和b)IL-12 p40亚基。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括Y40A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括T43A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括D126A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括P127A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括R129A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括K168A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括K170A。

[0428] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含两个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括P127A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括R129A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括P127A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括R129A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括K168A/K170A。

[0429] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含三个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括R129A/K168A/K170A。

[0430] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含四个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取

代包括Y40A/D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A/K168A/K170A。

[0431] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含五个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个

或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A/K168A/K170A。

[0432] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含六个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A。

[0433] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含七个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0434] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24(Y40A)、SEQ ID NO:25(T43A)、SEQ ID NO:26(D126A)、SEQ ID NO:27(P127A)、SEQ ID NO:28(R129A)、SEQ ID NO:29(K168A)、SEQ ID NO:30(Y40A/T43A)、SEQ ID NO:31(Y40A/D126A)、SEQ ID NO:32(Y40A/P127A)、SEQ ID NO:33(Y40A/R129A)、SEQ ID NO:34(Y40A/K168A)、SEQ ID NO:35(T43A/D126A)、SEQ ID NO:36(T43A/P127A)、SEQ ID NO:37(T43A/R129A)、SEQ ID NO:38(T43A/K168A)、SEQ ID NO:39(D126A/P127A)、SEQ ID NO:40(D126A/R129A)、SEQ ID NO:41(D126A/K168A)、SEQ ID NO:42(P127A/R129A)、SEQ ID NO:43(P127A/K168A)、SEQ ID NO:44(R129A/K168A)、SEQ ID NO:45(Y40A/T43A/D126A)、SEQ ID NO:46(Y40A/T43A/P127A)、SEQ ID NO:47(Y40A/T43A/R129A)、SEQ ID NO:48(Y40A/T43A/K168A)、SEQ ID NO:49(Y40A/D126A/P127A)、SEQ ID NO:50(Y40A/D126A/R129A)、SEQ ID NO:51(Y40A/D126A/K168A)、SEQ ID NO:52(Y40A/P127A/R129A)、SEQ ID NO:53(Y40A/P127A/K168A)、SEQ ID NO:54(Y40A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:55(T43A/D126A/P127A)、SEQ ID NO:56(T43A/D126A/R129A)、SEQ ID NO:57(T43A/D126A/K168A)、SEQ ID NO:58(T43A/P127A/R129A)、SEQ ID NO:59(T43A/P127A/K168A)、SEQ ID NO:60(T43A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:61(D126A/P127A/R129A)、SEQ ID NO:62(D126A/P127A/K168A)、SEQ ID NO:63(D126A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:64(P127A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:65(Y40A/T43A/D126A/P127A)、SEQ ID NO:66(Y40A/T43A/D126A/R129A)、SEQ ID NO:67(Y40A/T43A/D126A/K168A)、SEQ ID NO:68(Y40A/T43A/P127A/R129A)、SEQ ID NO:69(Y40A/T43A/P127A/K168A)、SEQ ID NO:70(Y40A/T43A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:71(Y40A/D126A/P127A/R129A)、SEQ ID NO:72(Y40A/D126A/P127A/K168A)、SEQ ID NO:73(Y40A/D126A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:74(Y40A/P127A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:75

(T43A/D126A/P127A/R129A)、SEQ ID NO:76(T43A/D126A/P127A/K168A)、SEQ ID NO:77(T43A/D126A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:78(T43A/P127A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:79(D126A/P127A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:80(Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A)、SEQ ID NO:81(Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A)、SEQ ID NO:82(Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:83(Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:84(Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:85(T43A/D126A/P127A/R129A/K168A)、SEQ ID NO:103(K170A)、SEQ ID NO:104(Y40A/K170A)、SEQ ID NO:105(T43A/K170A)、SEQ ID NO:106(D126A/K170A)、SEQ ID NO:107(P127A/K170A)、SEQ ID NO:108(R129A/K170A)、SEQ ID NO:109(K168A/K170A)、SEQ ID NO:110(Y40A/T43A/K170A)、SEQ ID NO:111(Y40A/D126A/K170A)、SEQ ID NO:112(Y40A/P127A/K170A)、SEQ ID NO:113(Y40A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:114(Y40A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:115(T43A/D126A/K170A)、SEQ ID NO:116(T43A/P127A/K170A)、SEQ ID NO:117(T43A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:118(T43A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:119(D126A/P127A/K170A)、SEQ ID NO:120(D126A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:121(D126A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:122(P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:123(P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:124(R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:125(Y40A/T43A/D126A/K170A)、SEQ ID NO:126(Y40A/T43A/P127A/K170A)、SEQ ID NO:127(Y40A/T43A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:128(Y40A/T43A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:129(Y40A/D126A/P127A/K170A)、SEQ ID NO:130(Y40A/D126A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:131(Y40A/D126A/K168A/K170A)、SEQID NO:132(Y40A/P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:133(Y40A/P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:134(Y40A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:135(T43A/D126A/P127A/K170A)、SEQ ID NO:136(T43A/D126A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:137(T43A/D126A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:138(T43A/P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:139(T43A/P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:140(T43A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:141(D126A/P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:142(D126A/P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:143(D126A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:144(P127A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:145(Y40A/T43A/D126A/P127A/K170A)、SEQ ID NO:146(Y40A/T43A/D126A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:147(Y40A/T43A/D126A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:148(Y40A/T43A/P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:149(Y40A/T43A/P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:150(Y40A/T43A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:151(Y40A/D126A/P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:152(Y40A/D126A/P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:153(Y40A/D126A/R129A/K168A/K170A)、SE Q ID NO:154(Y40A/P127A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:155(T43A/D126A/P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:156(T43A/D126A/P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:157(T43A/D126A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:158(T43A/P127A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:159(D126A/P127A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:160(Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K170A)、SEQ ID NO:161(Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:162(Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:163(Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:164(Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:165(T43A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A)、SEQ ID NO:166(Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A)和SEQ ID NO:86(Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K168A)(如图5-9、78和80中所示)。

[0435] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含与选自包括以下的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1(野生型前体)、SEQ ID NO:2(野生型成熟)、SEQ ID NO:24-86、SEQ ID NO:103-166和SEQ ID NO:87(C74S)(如图1、5-9、78和80中所示)。

[0436] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基Y40处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基Y40处的取代突变选自包括以下的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:177-187中的任一者。

[0437] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基D126处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基D126处的取代突变选自包括以下的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

[0438] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:199-214中的任一者。

[0439] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基P127处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基P127处的取代突变选自包括以下的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

[0440] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:279-290中的任一者。

[0441] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基R129处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基R129处的取代突变选自包括以下的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

[0442] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:215-231中的任一者。

[0443] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基K168处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K168处的取代突变选自包括以下的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

[0444] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:232-247中的任一者。

[0445] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含在氨基酸残基K170处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K170处的取代突变选自包括以下的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:188-198或306-308中的任一者。

[0446] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170L和K170T。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:248或249中的任一者。

[0447] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含:(i)选自包括以下的组的第一取代突变:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T和(ii)选自包括以下的组的第二取代突变:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

[0448] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40E,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:250-253或311中的任一者。

[0449] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40G,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:254-257或309中的任一者。

[0450] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40P,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:258-261或310中的任一者。

[0451] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:Y40S,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:262-267中的任一者。

[0452] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:K170A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168I、K168T和R129E。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:268-270中的任一者。

[0453] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:K170P,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168A、K168I、K168T和R129E。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:271-274中的任一者。

[0454] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含第一取代突变,其包括:K170T,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168A、K168I、K168T和R129E。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:275-278中的任一者。

[0455] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基可进一步包含C74S取代突变。

[0456] 除了上述新型、非天然存在的IL-12 p35变体之外,本文所公开的IL-12 p35变体

中可包括额外修饰。可被修饰的残基的非限制性实例包括:Q20、N21、Q35、E38、F39、P41、S44、E45、E46、E50、H49、K54、D55、T59、V60、E61、C63、L64、P65、E67、L68、T69、N71、S73、C74、L75、N76、E79、N85、L89、F96、M97、M98、A99、L124、M125、K128、Q130、Q135、N136、E143、Q146、N151、E153、K158、E162、E163、D165、F166、Y167、I171、R181、I182、R183、V185、T186、D188、R189、V190、M191、S192、Y193、N195、A196和S197。在一些实施方案中,上文、下文或图1、5-9、78和80中的任一者中描述的变体IL-12 p35亚基包含一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40或更多个额外氨基酸取代。在一些实施方案中,上文、下文或图1、5-9、78和80中的任一者中描述的变体IL-12 p35亚基包含约1至约5、约6至约10、约11至约15、约16至约20、约21至约25、约26至约30、约31至约35、约36至约40、约1至约10、约11至约20、约21至约30、约31至约40、约1至约20或约21至约40个额外氨基酸取代。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:87(如图9中所示),并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0457] 变体IL-12 p35亚基的突变可导致以下参数中的一个或多个的变化:(i)结合亲和力、(ii)效力、(iii)活性、(iv)可制造性或(v)稳定性;然而,前述参数(诸如例如结合亲和力)中的一个或多个的变化不一定与其他前述参数(诸如例如效力或活性)中的一个或多个的变化相关。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基中的一个或多个氨基酸取代与参考IL-12的结合亲和力相比导致对IL-12Rβ2的结合亲和力发生改变。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代与参考IL-12相比降低了变体IL-12 p35亚基与IL-12Rβ2的结合亲和力。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。在某些示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基中的一个或多个氨基酸取代不影响结合亲和力,但可导致以下参数中的一个或多个的变化:(i)效力、(ii)活性、(iii)可制造性、(iv)稳定性或(v)其任何组合。

[0458] 可使用各种测定型式来选择与感兴趣的配体结合的非天然存在的IL-12变体(例如,IL-12Rβ2和/或IL-12Rβ1)。非限制性实例包括:固相ELISA免疫测定、免疫沉淀、Biacore测定、KinExA测定、荧光活化细胞分选(FACS)、Octet测定、西方印迹分析等。本公开的非天然存在的IL-12变体的结合活性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如表面等离子体共振(SPR)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、ELISpot测定、Biacore测定、KinExA测定等。

[0459] 本领域的普通技术人员将了解,结合亲和力也可用作两种结合配偶体(例如,变体IL-12 p35亚基和IL-12Rβ2)之间非共价相互作用“强度”的量度。两种分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(K_D)来量化。反过来,可通过使用本领域中已知的合适测定(诸如例如,SPR测定)测量复合物形成和解离的动力学来确定K_D。对应于单价复合物的缔合和解离的速率常数分别称为缔合速率常数k_a(或k_{on})和解离速率常数k_d(或k_{off})。K_D通过以下等式与k_a和k_d相关:$K_D = k_d/k_a$。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定。

[0460] 如本文所用,术语“效力”是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体)在给定生物系统或实验环境中以一定剂量或浓度引发反应的能力。本公开的非天然存在的IL-12变体的效力可通过本领域已知的任何合适方法来测定,诸

如例如IL-12HEK报告基因测定(例如,InvivoGen的IL-12HEK报告基因测定(目录号hkb-il12))、配体结合测定(例如,ELISA或流式细胞术)和/或功能测定。通常,效力的变化可通过图形方式显示为与对照相比响应曲线向左或向右移动。响应曲线向右移动通常指示效力降低,而响应曲线向左移动通常指示效力增加。如本文所用,术语"活性"是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体)在特定生物系统或实验环境中以给定剂量或浓度引发的特异性反应。本公开的非天然存在的IL-12变体的活性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如配体结合测定和/或功能测定。通常,活性的变化可通过图形方式显示为与对照相比响应曲线向上或向下移动。响应曲线向上移动通常指示活性增加,而响应曲线向下移动通常指示活性降低。

[0461] 如本文所用,术语"可制造性"是指可影响以足以向个体施用的规模和数量产生和/或储存给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等的过程的任何特性。影响可制造性的特性的实例包括但不限于给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体)的稳定性、纯度、聚集水平和/或表达产量。如本文所用,术语"稳定性"是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体)在特定限度和/或储存和/或使用参数内保留其在制造时所具有的相同特性和特征的能力。本公开的非天然存在的IL-12变体的稳定性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如ELISA、西方印迹、Biacore测定、SDS-PAGE、尺寸排阻色谱法、动态光散射、差示扫描量热法和差示扫描荧光法。如本文所用,术语"表达产量"是指使用原核或真核宿主系统产生的给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如非天然存在的IL-12变体)的量或数量。蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等的重组表达是相关领域中众所周知的。可采用任何合适的方法来量化或确定表达产量,诸如例如UV吸收测量、比色测定(例如,Bradford测定、BCA测定和Lowry测定)和荧光测定。

[0462] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更多,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括SPR测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0463] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括SPR测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0464] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平,并且参考IL-12对IL-12Rβ2的结合亲和力在测定的最低可检测水平或最高可检测水平之间或与其等效(即,参考IL-12的结合亲和力可等于最低可检测水平、最高可检测水平或最低可检测水平和最高可检测水平之间的值;换句

话说,结合亲和力是“可检测的”)。在一些实施方案中,测定包括SPR测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

[0465] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基的效力与参考IL-12的效力相比降低至少约0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、0.9倍、1.0倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍、11.0倍、12.0倍、13.0倍、14.0倍、15.0倍、16.0倍、17.0倍、18.0倍、19.0倍、20.0倍、21.0倍、22.0倍、23.0倍、24.0倍、25.0倍、30.0倍、35.0倍、40.0倍、45.0倍、50.0倍、100.0倍、150.0倍、200.0倍、250.0倍、300.0倍、350.0倍、400.0倍、450.0倍、500.0倍、550.0倍、600.0倍、650.0倍、700.0倍、750.0倍、800.0倍、850.0倍、900.0倍、950.0倍、1000.0倍、2000.0倍、3000.0倍、4000.0倍、5000.0倍、6000.0倍、7000.0倍、8000.0倍、9000.0倍、10,000.0倍或更多,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0466] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基的效力与参考IL-12的效力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0467] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基与参考IL-12相比降低刺激STAT4信号传导的能力,如通过测定所确定。刺激STAT4信号传导的能力降低可指观察到的最大反应的降低和/或EC_{50}值的转变。在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体刺激STAT4信号传导的能力与参考IL-12相比降低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更多,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0468] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基刺激STAT4信号传导的能力与参考IL-12相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0469] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基与参考IL-12相比降低刺激IFNγ产生的能力,如通过测定所确定。刺激IFNγ产生的能力降低可指观察到的最大反应的降低和/或EC_{50}值的转变。在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12相比降低至少约0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、0.9倍、1.0倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍、11.0倍、12.0倍、13.0倍、14.0倍、15.0倍、16.0倍、17.0倍、18.0倍、19.0倍、20.0倍、21.0倍、22.0倍、23.0倍、24.0倍、25.0倍、30.0倍、35.0倍、40.0倍、45.0倍、50.0倍、100.0倍、150.0倍、200.0倍、250.0倍、300.0倍、350.0倍、400.0倍、450.0倍、500.0倍、550.0倍、600.0倍、650.0倍、700.0倍、750.0倍、800.0倍、850.0倍、900.0倍、950.0倍、1000.0倍、2000.0倍、3000.0倍、4000.0倍、5000.0倍、6000.0倍、7000.0倍、8000.0倍、9000.0倍、10,000.0倍或更多,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括胞内细胞因子染色测定、基于Luminex珠的细胞因子释放测定、ELISA或ELISpot测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0470] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体和/或变体IL-12 p35亚基刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括胞内细胞因子染色测定、基于Luminex珠的细胞因子释放测定、ELISA或ELISpot测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0471] 2.p40亚基:

[0472] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基,其中变体IL-12 p35亚基包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A;和b)IL-12 p40亚基。

[0473] 在一些实施方案中,IL-12 p40亚基包括变体IL-12 p40亚基。

[0474] 在一些实施方案中,IL-12 p40亚基包括变体IL-12 p40亚基,并且在进一步的实施方案中,变体IL-12 p40亚基包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0475] 在一些实施方案中,(变体)IL-12 p40亚基包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3(野生型前体)、SEQ ID NO:4(野生型成熟)、SEQ ID NO:88(C177S)、SEQ ID NO:89(C252S)和SEQ ID NO:90(C177S/C252S)(如图1和10中所示)。

[0476] 在一些实施方案中,变体IL-12 p40亚基包含与选自包括以下的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90(如图1和10中所示)。

[0477] 除了上述新型、非天然存在的IL-12 p35变体之外,本领域还已知对IL-12 p40亚基的各种修饰。可被修饰的残基的非限制性实例包括:E3、D7、E12、D14、W15、P17、D18、A19、P20、G21、E22、M23、D29、E32、E33、D34、L40、D41、Q42、S43、E45、L47、S49、T54、Q56、I55、Q56、K58、E59、F60、G61、D62、Y66、E73、H77、K84、E86、D87、G88、I89、W90、D93、K99、E100、K102、N103、K104、T105、F106、R108、E110、N113、Y114、D129、D142、Q144、E156、R159、D161、N162、K163、E164、Y165、E166、S168、D170、Q172、D174、A176、C177、P178、A179、A180、E181、S183、P185、E187、M189、H194、K195、L196、K197、N200、S204、F206、R208、D209、D214、N218、Q220、N226、Q229、E231、E235、T242、P243、S245、Y246、F247、S248、C252、Q256、K258、S259、K260、R261、E262、K264、D265、V267、D270、N281、S283、S285、R287、Q289、D290、R291、Y292、Y293和E299。在一些实施方案中,上文、下文或图1和10中的任一者中描述的(变体)IL-12 p40亚基包含一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更多个额外氨基酸取代。在一些实施方案中,上文、下文或图1和10中的任一者中描述的(变体)IL-12 p40亚基包含约1至约5、约6至约10、约11至约15、约16至约20、约21至约25、约26至约30、约31至约35、约36至约40、约41至约45、约46至约50、约51至约55、约56至约60、约1至约10、约11至约20、约21至约30、约31至约40、约41至约50、约51至约60、约1至约20、或约21至约40或约41至约60个额外氨基酸取代。

[0478] 3.单链IL-12复合物和结构域接头:

[0479] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基;和b)IL-12 p40亚基。

[0480] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体包含单链IL-12复合物(sc-IL-12),其中变体IL-12 p35亚基和(变体)IL-12 p40亚基是连接的。在进一步的实施方案中,使用结构域接头(本文中也称为“接头”或“接头结构域”)将亚基连接在一起。在又进一步的实施

方案中,接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23(如图4中所示)。

[0481] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体包含单链IL-12复合物(sc-IL-12),其中变体IL-12 p35亚基和(变体)IL-12 p40亚基是连接的。在进一步的实施方案中,IL-12 p35亚基的C末端连接至(变体)IL-12 p40亚基的N末端(sc-IL-12(p35/p40))。在又进一步的实施方案中,sc-IL-12(p35/p40)进一步包含接头结构域,其中IL-12 p35亚基的C末端连接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端连接至(变体)IL-12 p40亚基的N末端。在甚至进一步的实施方案中,接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23(如图4中所示)。

[0482] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体包含单链IL-12复合物(sc-IL-12),其中变体IL-12 p35亚基和(变体)IL-12 p40亚基是连接的。在一些实施方案中,(变体)IL-12 p40亚基的C末端连接至IL-12 p35亚基的N末端(sc-IL-12(p40/p35))。在又进一步的实施方案中,sc-IL-12(p40/p35)进一步包含接头结构域,其中(变体)IL-12 p40亚基的C末端连接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端连接至IL-12 p35亚基的N末端。在甚至进一步的实施方案中,接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23(如图4中所示)。

[0483] 在一些实施方案中,亚基不经由接头结构域附接。

[0484] 可利用本文所述的sc-IL-12复合物中的任一者来产生异二聚体IL-12 Fc融合蛋白和/或同二聚体IL-12 Fc融合蛋白,如下文进一步详细讨论的。

[0485] 4.具有改善半衰期的组合物:

[0486] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基;和b)IL-12 p40亚基。

[0487] 在一些实施方案中,提供了一种非天然存在的IL-12变体,其中变体IL-12 p35亚基的一个或多个氨基酸取代与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体的半衰期与参考IL-12的半衰期相比增加0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、0.9倍、1.0倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍或更多。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子、IL-12 Fc融合蛋白或其任何组合。

[0488] 本领域已知各种用于确定剂(诸如例如IL-12)半衰期的方法。相关领域的技术人员将能够容易地确定和采用任何数量的此类方法来确定半衰期的变化。在一些实施方案中,利用选自包括以下的组的至少一个样品来测量半衰期:(i)一个或多个血液样品、(ii)一个或多个血浆样品、(iii)一个或多个血清样品、(iv)一个或多个组织样品和(v)其任何组合。为了测量半衰期,可利用一、二、三、四、五、六、七、八、九、10或更多个样品(如上文所

述)来测量半衰期。

[0489] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体进一步包含与变体IL-12 p35亚基和/或(变体)IL-12 p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中Fc结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13(如图3中所示),(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽("XTEN")或(iv)聚乙二醇(PEG)。

[0490] 5.核酸和载体:

[0491] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了编码以下的核酸组合物:(i)非天然存在的IL-12变体、(ii)变体IL-12 p35亚基、(iii)(变体)IL-12 p40亚基、(iv)sc-IL-12复合物和(v)结构域接头,如上文所述。

[0492] 在一些实施方案中,将一种或多种编码本发明组分的核酸掺入表达盒或表达载体中。本领域技术人员应理解,表达盒通常包括遗传物质的构建体,所述遗传物质含有编码序列和足够的调控信息以指导受体细胞(体内和/或离体)中编码序列的适当转录和/或翻译。通常,表达盒可插入载体中,以靶向期望的宿主细胞和/或个体。因此,在一些实施方案中,本公开的表达盒包括如本文所公开的多肽的编码序列,所述编码序列可操作地连接至表达控制元件,诸如启动子,以及任选地,影响编码序列转录或翻译的任何其他核酸序列或其组合(诸如例如,复制起点、可选择标志物、核糖体结合位点、诱导物等)。

[0493] 在一些实施方案中,将核苷酸序列掺入表达载体中。本领域技术人员应理解,术语"载体"通常是指设计用于在宿主细胞之间转移的重组多核苷酸构建体,并且其可用于转化的目的(例如,将异源DNA引入宿主细胞中)。因此,在一些实施方案中,载体可以是复制子(诸如例如质粒、噬菌体或粘粒),可将另一个DNA区段插入其中以引起插入区段的复制。在一些实施方案中,表达载体可以是整合载体。

[0494] 在一些实施方案中,表达载体可以是病毒载体。本领域技术人员将了解,术语"病毒载体"被广泛用于指包括病毒衍生的核酸元件的核酸分子(例如,转移质粒),所述核酸元件通常促进核酸分子的转移或整合至细胞基因组中,或指介导核酸转移的病毒颗粒,并且可进一步包括溶瘤病毒(天然存在的病毒和在实验室或临床环境中重组产生或修饰的病毒)。除了感兴趣的核酸之外,病毒颗粒通常包含各种病毒组分,并且有时还包含宿主细胞组分。术语病毒载体可指能够将核酸转移至细胞中的病毒或病毒颗粒,或指被转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒含有主要衍生自病毒的结构和/或功能遗传元件。在一些实施方案中,病毒载体是杆状病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。术语"逆转录病毒载体"是指含有主要衍生自逆转录病毒的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。术语"慢病毒载体"是指含有主要衍生自慢病毒(逆转录病毒的一个属)的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒,包括长末端重复序列(LTR)。

[0495] 因此,本文还提供了含有编码本文所公开的任何非天然存在的IL-12变体、变体IL-12 p35亚基、(变体)IL-12 p40亚基、sc-IL-12复合物和/或结构域接头的一种或多种核酸的载体、质粒或病毒。核酸可包含在能够指导其在例如已用载体转化/转导的细胞中表达的所述载体内。适用于原核和真核细胞的载体是本领域已知的,并且是市售的,或可由熟练的技术人员容易地制备。

[0496] 本领域技术人员将了解,核酸组成将取决于非天然存在的IL-12变体的构型。因

此,例如,当构型需要三个氨基酸序列(例如,非天然存在的IL-12变体,其中使用结构域接头将变体IL-12 p35和(变体)IL-12 p40亚基连接)时,可将三个核酸序列掺入一个或多个表达载体中进行表达。类似地,对于其他构型,当仅需要两个核酸时,它们可掺入一个或两个表达载体中。

[0497] DNA载体可经由常规转化或转染技术引入宿主细胞(诸如例如真核细胞或原核细胞),所述技术包括但不限于以下中的一个或多个:转染、磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、刮擦加载、弹道引入、核穿孔、流体动力轰击(hydrodynamic shock)、感染等。

[0498] 本公开中可使用的病毒载体包括但不限于杆状病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、疱疹病毒、猿猴病毒40(SV40)、牛乳头瘤病毒载体等。

[0499] 6.重组细胞和细胞培养物:

[0500] 在另一方面,本文提供了细胞培养物,其包括至少一种如本文所公开的重组细胞(本文中也称为“宿主细胞”)和培养基。通常,培养基可以是任何适用于培养本文所述细胞的培养基。用于转化多种上述细胞和物种的技术是本领域已知的。因此,包括至少一种如本文所公开的重组细胞的细胞培养物也在本申请的范围内。适用于产生和维持细胞培养物的方法和系统是本领域中已知的。

[0501] 宿主细胞可用于制备目的,以繁殖一种或多种编码以下的核酸:(i)非天然存在的IL-12变体、(ii)变体IL-12 p35亚基、(iii)(变体)IL-12 p40亚基、(iv)sc-IL-12复合物和(v)结构域接头以及其组合和/或组分。宿主细胞可包括原核或真核细胞,其中特别意图产生非天然存在的IL-12变体。宿主细胞的非限制性实例包括细菌细胞(诸如例如革兰氏阳性细菌(例如芽孢杆菌属、链霉菌属和葡萄球菌属的菌种)的细胞或革兰氏阴性细菌细胞(例如大肠杆菌属和假单胞菌属的细胞))、真菌细胞或酵母细胞(例如酵母属、毕赤酵母和汉逊酵母)、昆虫细胞(例如果蝇属细胞和Sf9细胞)、植物细胞(例如来自农作物、药用或观赏植物或球茎的细胞)、哺乳动物细胞(例如上皮细胞系、骨肉瘤细胞系、神经母细胞瘤细胞系、上皮癌、神经胶质细胞、肝细胞系、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、BHK细胞、HeLa细胞、鼠胚胎干细胞(mESC)系的D3细胞、人胚胎干细胞(例如HS293细胞和BG01V细胞)、NIH 3T3细胞、人胚胎肾(HEK)293T细胞、人间充质干细胞(hMSCS)等)等。

[0502] B.异二聚体IL-12 Fc融合蛋白

[0503] 在一个方面中,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端。

[0504] 在另一方面,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的N末端共价附接至第一Fc结构域的C末端,和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域的N末端共价附接至第二Fc结构域的C末端。

[0505] 下文详细介绍了异二聚体Fc融合蛋白以及变体IL-12 p35亚基结构域、IL-12 p40亚基结构域和Fc结构域的各种构型。

[0506] 1.p35亚基结构域:

[0507] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域共价附接至第一Fc结构域的N末端或C末端,和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域共价附接至第二Fc结构域的N末端或C末端。

[0508] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括Y40A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括T43A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括D126A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括P127A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括R129A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括K168A。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代包括K170A。

[0509] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含两个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括P127A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括R129A/K168A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括Y40A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括T43A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括D126A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括P127A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括R129A/K170A。在一些实施方案中,两个或更多个氨基酸取代包括K168A/K170A。

[0510] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含三个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A。

在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括Y40A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括T43A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,三个或更多个氨基酸取代包括R129A/K168A/K170A。

[0511] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含四个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括

Y40A/T43A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括Y40A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括T43A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,四个或更多个氨基酸取代包括P127A/R129A/K168A/K170A。

[0512] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含五个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括Y40A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括T43A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,五个或更多个氨基酸取代包括D126A/P127A/R129A/K168A/K170A。

[0513] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含六个或更多个选自包括以下

的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K168A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A/K170A。在一些实施方案中,六个或更多个氨基酸取代包括T43A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A。

[0514] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含七个或更多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0515] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:24-86和SEQ ID NO:103-166(如图5-9、78和80中所示)。

[0516] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含与选自包括以下的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:24-87和SEQ ID NO:103-166(如图1、5-9、78和80中所示)。

[0517] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基Y40处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基Y40处的取代突变选自包括以下的组:Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:177-187中的任一者。

[0518] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基D126处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基D126处的取代突变选自包括以下的组:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。

[0519] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V和D126W。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:199-214中的任一者。

[0520] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基P127处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基P127处的取代突变选自包括以下的组:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。

[0521] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:P127C、P127D、P127E、P127F、P127G、P127H、P127K、P127M、P127N、P127Q、P127R和P127S。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:279-290中的任一者。

[0522] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基R129处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基R129处的取代突变选自包括以下的组:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。

[0523] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W和R129Y。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:215-231中的任一者。

[0524] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基K168处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K168处的取代突变选自包括以下的组:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。

[0525] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W和K168Y。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:232-247中的任一者。

[0526] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含在氨基酸残基K170处的取代突变。在一些进一步的实施方案中,在氨基酸残基K170处的取代突变选自包括以下的组:K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:188-198或306-308中的任一者。

[0527] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170L和K170T。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:248或249中的任一者。

[0528] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含:(i)选自包括以下的组的第一取代突变:Y40A、Y40C、Y40D、Y40E、Y40G、Y40K、Y40N、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S和Y40T,和(ii)选自包括以下的组的第二取代突变:D126A、D126C、D126E、D126F、D126G、D126I、D126K、D126L、D126M、D126N、D126P、D126Q、D126R、D126S、D126T、D126V、D126W、R129A、R129C、R129D、R129E、R129F、R129G、R129H、R129I、R129K、R129L、R129M、R129N、R129P、R129Q、R129S、R129T、R129V、R129W、R129Y、K168A、K168C、K168D、K168E、K168F、K168G、K168H、K168I、K168L、K168M、K168N、K168P、K168Q、K168S、K168T、K168W、K168Y、K170A、K170C、K170D、K170E、K170G、K170I、K170M、K170P、K170S、K170T、K170V、K170F、K170L、K170N和K170W。

[0529] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40E,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:250-253或311中的任一者。

[0530] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40G,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170A、K168A、K168I、K168T和R129A。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:254-257或309中的任一者。

[0531] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40P,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K170A、K168A、K168D、K168I和K168T。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:258-261或310中的任一者。

[0532] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:Y40S,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168I、K168T、K170A、K170L、K170T和R129A。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:262-267中的任一者。

[0533] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:K170A,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168I、K168T和R129E。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:268-270中的任一者。

[0534] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:K170P,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168A、K168I、K168T和R129E。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:271-274中的任一者。

[0535] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含第一取代突变,其包括:K170T,并且进一步包含选自包括以下的组的第二取代突变:K168A、K168I、K168T和R129E。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:275-278中的任一者。

[0536] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域可进一步包含C74S取代突变。

[0537] 除了上述新型、异二聚体Fc融合蛋白之外,相关领域中还已知对各种残基的额外修饰。可被修饰的残基的非限制性实例包括:Q20、N21、Q35、E38、F39、P41、S44、E45、E46、E50、H49、K54、D55、T59、V60、E61、C63、L64、P65、E67、L68、T69、N71、S73、C74、L75、N76、E79、N85、L89、F96、M97、M98、A99、L124、M125、K128、Q130、Q135、N136、E143、Q146、N151、E153、K158、E162、E163、D165、F166、Y167、I171、R181、I182、R183、V185、T186、D188、R189、V190、M191、S192、Y193、N195、A196和S197。在一些实施方案中,上文、下文或图1、5-9、78和80中的任一者中描述的变体IL-12 p35亚基结构域包含一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40或更多个额外氨基酸取代。在一些实施方案中,上文、下文或图1、5-9、78和80中的任一者中描述的变体IL-12 p35亚基结构域包含约1至约5、约6至约10、约11至约15、约16至约20、约21至约25、约26至约30、约31至约35、约36至约40、约1至约10、约11至约20、约21至约30、约31至约40、约1至约20或约21至约40个额外氨基酸取代。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:87(如图9中所示),并且进一步包含一、二、三、四、五、六或所有七个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A。

[0538] 变体IL-12 p35亚基结构域的突变可导致以下参数中的一个或多个的变化:(i)结合亲和力、(ii)效力、(iii)活性、(iv)可制造性或(v)稳定性;然而,前述参数(诸如例如结合亲和力)中的一个或多个的变化不一定与其他前述参数(诸如例如效力或活性)中的一个或多个的变化相关。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域中的一个或多个氨基酸取代与参考IL-12的结合亲和力相比导致对IL-12Rβ2的结合亲和力发生改变。在一些实施方案中,一个或多个氨基酸取代与参考IL-12相比降低了变体IL-12 p35亚基结构域与IL-12Rβ2的结合亲和力。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子、IL-12 Fc融合蛋白或其任何组合。在其他实施方案中,变体IL-12 p35亚基中的一个或多个氨基酸取代不影响结合亲和力,但可导致以下参数中的一个或多个的变化:(i)效力、(ii)活性、(iii)可制造性、(iv)稳定性或(v)其任何组合。

[0539] 可使用各种测定型式来选择与感兴趣的配体结合的异二聚体Fc融合蛋白(例如,IL-12Rβ2和/或IL-12Rβ1)。非限制性实例包括:固相ELISA免疫测定、免疫沉淀、Biacore测定、KinExA测定、荧光活化细胞分选(FACS)、Octet测定、西方印迹分析等。本公开的异二聚体Fc融合蛋白的结合活性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如表面等离子体共振(SPR)测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、ELISpot测定、Biacore测定、KinExA测定等。

[0540] 本领域的普通技术人员将了解,结合亲和力也可用作两种结合配偶体(例如,变体IL-12 p35亚基结构域和IL-12Rβ2)之间非共价相互作用"强度"的量度。两种分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(K_D)来量化。反过来,可通过使用本领域中已知的合适测定(诸如例如,SPR测定)测量复合物形成和解离的动力学来确定K_D。对应于单价复合物的缔合和解离的速率常数分别称为缔合速率常数k_a(或k_{on})和解离速率常数k_d(或k_{off})。K_D通过以下等式与k_a和k_d相关:$K_D = k_d/k_a$。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定。

[0541] 如本文所用,术语"效力"是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如异二聚体Fc融合蛋白)在给定生物系统或实验环境中以一定剂量或浓度引发反应的能力。本公开的异二聚体Fc融合蛋白的效力可通过本领域已知的任何合适方法来测定,诸如例如IL-12HEK报告基因测定(例如,InvivoGen的IL-12HEK报告基因测定(目录号hkb-il12))、配体结合测定(例如,ELISA或流式细胞术)和/或功能测定。通常,效力的变化可通过图形方式显示为与对照相比响应曲线向左或向右移动。响应曲线向右移动通常指示效力降低,而响应曲线向左移动通常指示效力增加。如本文所用,术语"活性"是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如异二聚体Fc融合蛋白)在特定生物系统或实验环境中以给定剂量或浓度引发的特异性反应。本公开的异二聚体Fc融合蛋白的活性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如配体结合测定和/或功能测定。通常,活性的变化可通过图形方式显示为与对照相比响应曲线向上或向下移动。响应曲线向上移动通常指示活性增加,而响应曲线向下移动通常指示活性降低。

[0542] 如本文所用,术语"可制造性"是指可影响以足以向个体施用的规模和数量产生和/或储存给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等的过程的任何特性。影响可制造性的特性的实例包括但不限于给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如异二聚体Fc融合蛋白)的稳定性、纯度、聚集水平和/或表达产量。如本文所用,术语"稳定性"是指给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如异二聚体Fc融合蛋白)在特定限度和/或储存和/或使用参数内保留其在制造时所具有的相同特性和特征的能力。本公开的异二聚体Fc融合蛋白的稳定性可通过本领域中已知的任何合适方法来测定,诸如例如ELISA、西方印迹、Biacore测定、SDS-PAGE、尺寸排阻色谱法、动态光散射、差示扫描量热法和差示扫描荧光法。如本文所用,术语"表达产量"是指使用原核或真核宿主系统产生的给定蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等(诸如例如异二聚体Fc融合蛋白)的量或数量。蛋白质、细胞因子、融合蛋白、抗体等的重组表达是相关领域中众所周知的。可采用任何合适的方法来量化或确定表达产量,诸如例如UV吸收测量、比色测定(例如,Bradford测定、BCA测定和Lowry测定)和荧光测定。

[0543] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低至少约10%、20%、30%、40%、

50％、60％、70％、80％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％或更多，如通过SPR测定所确定。在一些实施方案中，异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10％至约100％、约10％至约50％、约20％至约70％、约30％至约80％、约40％至约90％、约50％至约100％、约20％至约50％、约40％至约70％、约30％至约60％、约40％至约100％、约20％至约80％或约10％至约90％，如通过SPR测定所确定。在一些实施方案中，参考IL-12包括以下中的一个或多个：野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0544] 在一些实施方案中，异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、100％或更多，如通过测定所确定。在一些实施方案中，测定包括SPR测定。在一些实施方案中，参考IL-12包括以下中的一个或多个：野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0545] 在一些实施方案中，异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域对IL-12Rβ2的结合亲和力与参考IL-12的结合亲和力相比降低约10％至约100％、约10％至约50％、约20％至约70％、约30％至约80％、约40％至约90％、约50％至约100％、约20％至约50％、约40％至约70％、约30％至约60％、约40％至约100％、约20％至约80％或约10％至约90％，如通过测定所确定。在一些实施方案中，测定包括SPR测定。在一些实施方案中，参考IL-12包括以下中的一个或多个：野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0546] 在一些实施方案中，异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域对IL-12Rβ2的结合亲和力低于测定的最低可检测水平，并且参考IL-12对IL-12Rβ2的结合亲和力在测定的最低可检测水平或最高可检测水平之间或与其等效(即，参考IL-12的结合亲和力可等于最低可检测水平、最高可检测水平或最低可检测水平和最高可检测水平之间的值；换句话说，结合亲和力是“可检测的”)。在一些实施方案中，测定包括SPR测定。在一些实施方案中，参考IL-12包括以下中的一个或多个：野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0547] 在一些实施方案中，异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域的效力与参考IL-12的效力相比降低至少约0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、0.9倍、1.0倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍、11.0倍、12.0倍、13.0倍、14.0倍、15.0倍、16.0倍、17.0倍、18.0倍、19.0倍、20.0倍、21.0倍、22.0倍、23.0倍、24.0倍、25.0倍、30.0倍、35.0倍、40.0倍、45.0倍、50.0倍、100.0倍、150.0倍、200.0倍、250.0倍、300.0倍、350.0倍、400.0倍、450.0倍、500.0倍、550.0倍、600.0倍、650.0倍、700.0倍、750.0倍、800.0倍、850.0倍、900.0倍、950.0倍、1000.0倍、2000.0倍、3000.0倍、4000.0倍、5000.0倍、6000.0倍、7000.0倍、8000.0倍、9000.0倍、10,000.0倍或更多，如通过测定所确定。在一些实施方案中，测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中，参

考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0548] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域的效力与参考IL-12的效力相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0549] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域与参考IL-12相比降低刺激STAT4信号传导的能力,如通过测定所确定。刺激STAT4信号传导的能力降低可指观察到的最大反应的降低和/或EC_{50}值的转变。在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白刺激STAT4信号传导的能力与参考IL-12相比降低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更多,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0550] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域刺激STAT4信号传导的能力与参考IL-12相比降低约10%至约100%、约10%至约50%、约20%至约70%、约30%至约80%、约40%至约90%、约50%至约100%、约20%至约50%、约40%至约70%、约30%至约60%、约40%至约100%、约20%至约80%或约10%至约90%,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括IL-12HEK报告基因测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12Fc融合蛋白。

[0551] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域与参考IL-12相比降低刺激IFNγ产生的能力,如通过测定所确定。刺激IFNγ产生的能力降低可指观察到的最大反应的降低和/或EC_{50}值的转变。在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12相比降低至少约0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、0.9倍、1.0倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、

6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍、11.0倍、12.0倍、13.0倍、14.0倍、15.0倍、16.0倍、17.0倍、18.0倍、19.0倍、20.0倍、21.0倍、22.0倍、23.0倍、24.0倍、25.0倍、30.0倍、35.0倍、40.0倍、45.0倍、50.0倍、100.0倍、150.0倍、200.0倍、250.0倍、300.0倍、350.0倍、400.0倍、450.0倍、500.0倍、550.0倍、600.0倍、650.0倍、700.0倍、750.0倍、800.0倍、850.0倍、900.0倍、950.0倍、1000.0倍、2000.0倍、3000.0倍、4000.0倍、5000.0倍、6000.0倍、7000.0倍、8000.0倍、9000.0倍、10,000.0倍或更多,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括胞内细胞因子染色测定、基于Luminex珠的细胞因子释放测定、ELISA或ELISpot测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0552] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域刺激IFNγ产生的能力与参考IL-12相比降低至少约0.5倍至约50.0倍、约0.5倍至约5.0倍、约5.0倍至约10.0倍、约10.0倍至约15.0倍、约15.0倍至约20.0倍、约20.0倍至约25.0倍、约25.0倍至约30.0倍、约30.0倍至约35.0倍、约35.0倍至约40.0倍、约40.0倍至约45.0倍、约45.0倍至约50.0倍、约50.0倍至约100.0倍、约100.0倍至约200.0倍、约200.0倍至约300.0倍、约300.0倍至约400.0倍、约400.0倍至约500.0倍、约500.0倍至约600.0倍、约600.0倍至约700.0倍、约700.0倍至约800.0倍、约800.0倍至约900.0倍、约900.0倍至约1000.0倍、约1000.0倍至约2000.0倍、约2000.0倍至约3000.0倍、约3000.0倍至约4000.0倍、约4000.0倍至约5000.0倍、约5000.0倍至约6000.0倍、约6000.0倍至约7000.0倍、约7000.0倍至约8000.0倍、约8000.0倍至约9000.0倍、约9000.0倍至约10,000.0倍、约10,000.0倍至约50,000.0倍、约50,000.0倍至约100,000.0倍、约100,000.0倍至约200,000.0倍、约200,000.0倍至约300,000.0倍、约300,000.0倍或更高,如通过测定所确定。在一些实施方案中,测定包括胞内细胞因子染色测定、基于Luminex珠的细胞因子释放测定、ELISA或ELISpot测定。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子或IL-12 Fc融合蛋白。

[0553] 在一些实施方案中,提供了异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的一个或多个氨基酸取代与参考IL-12的半衰期相比改善了半衰期。在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域和/或(变体)IL-12 p40亚基结构域的融合与参考的半衰期相比改善了半衰期。在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或变体IL-12 p35亚基结构域的半衰期与参考IL-12的半衰期相比降低或增加0.5倍、0.6倍、0.7倍、0.8倍、0.9倍、1.0倍、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍、5.0倍、5.1倍、5.2倍、5.3倍、5.4倍、5.5倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍或更多。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子、IL-12 Fc融合蛋白或其任何组合。

[0554] 本领域已知各种用于确定剂(诸如例如IL-12)半衰期的方法。相关领域的技术人员将能够容易地确定和采用任何数量的此类方法来确定半衰期的变化。在一些实施方案中,利用选自包括以下的组的至少一个样品来测量半衰期:(i)一个或多个血液样品、(ii)

一个或多个血浆样品、(iii)一个或多个血清样品、(iv)一个或多个组织样品和(v)其任何组合。为了测量半衰期,可利用一、二、三、四、五、六、七、八、九、10或更多个样品(如上文所述)来测量半衰期。

[0555] 2.p40亚基结构域:

[0556] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域共价附接至第一Fc结构域的N末端或C末端,和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域共价附接至第二Fc结构域的N末端或C末端。

[0557] 在一些实施方案中,IL-12 p40亚基结构域包括变体IL-12 p40亚基结构域。

[0558] 在一些实施方案中,IL-12 p40亚基结构域包括变体IL-12 p40亚基结构域,并且在进一步的实施方案中,变体IL-12 p40亚基结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:C177S、C252S和C177S/C252S。

[0559] 在一些实施方案中,(变体)IL-12 p40亚基结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90(如图1和10中所示)。

[0560] 在一些实施方案中,(变体)IL-12 p40亚基结构域包含与选自包括以下的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90(如图1和10中所示)。

[0561] 除了上述新型、异二聚体Fc融合蛋白之外,本领域还已知对IL-12 p40亚基结构域的各种修饰,并且可进一步包括在本文所述的异二聚体Fc融合蛋白中。可被修饰的残基的非限制性实例包括:E3、D7、E12、D14、W15、P17、D18、A19、P20、G21、E22、M23、D29、E32、E33、D34、L40、D41、Q42、S43、E45、L47、S49、T54、Q56、I55、Q56、K58、E59、F60、G61、D62、Y66、E73、H77、K84、E86、D87、G88、I89、W90、D93、K99、E100、K102、N103、K104、T105、F106、R108、E110、N113、Y114、D129、D142、Q144、E156、R159、D161、N162、K163、E164、Y165、E166、S168、D170、Q172、D174、A176、C177、P178、A179、A180、E181、S183、P185、E187、M189、H194、K195、L196、K197、N200、S204、F206、R208、D209、D214、N218、Q220、N226、Q229、E231、E235、T242、P243、S245、Y246、F247、S248、C252、Q256、K258、S259、K260、R261、E262、K264、D265、V267、D270、N281、S283、S285、R287、Q289、D290、R291、Y292、Y293和E299。在一些实施方案中,上文、下文或图1和10中的任一者中描述的(变体)IL-12 p40亚基结构域包含一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更多个额外氨基酸取代。在一些实施方案中,上文、下文或图1和10中的任一者中描述的(变体)IL-12 p40亚基结构域包含约1至约5、约6至约10、约11至约15、约16至约20、约21至约25、约26至约30、约31至约35、约36至约40、约41至约45、约46至约50、约51至约55、约56至约60、约1至约10、约11至约20、约21至约30、约31至约40、约41至约50、约51至约60、约1至约20、或约21至约40或约41至约60个额外氨基酸取代。

[0562] 3.Fc结构域:

[0563] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域共价附接至第一Fc结构域的N末端或C末端,和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:(变体)IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中(变体)IL-12 p40亚基结构域共价附接至第二Fc结构域的N末端或C末端。

[0564] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含人免疫球蛋白G1(IgG1)的CH2-CH3结构域和任选地人IgG1的铰链的全部或部分以及其片段。在EU编号中,人IgG1的CH2-CH3结构域包含氨基酸231至447,并且铰链包含氨基酸216至230。“Fc片段”可含有来自N末端或C末端或两者的一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更少的氨基酸,但仍保留与另一个Fc结构域或Fc片段形成二聚体的能力,这可使用标准方法(诸如例如非变性色谱法、尺寸排阻色谱法等)检测。

[0565] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13(如图3中所示)。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含SEQ ID NO:9,并且第二Fc结构域包含SEQ ID NO:9。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含SEQ ID NO:10,并且第二Fc结构域包含SEQ ID NO:11。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含SEQ ID NO 11,并且第二Fc结构域包含SEQ ID NO:10。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含SEQ ID NO:12,并且第二Fc结构域包含SEQ ID NO:13。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含SEQ ID NO:13,并且第二Fc结构域包含SEQ ID NO:12。

[0566] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含与选自包括以下的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13(如图3中所示)。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:9具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列,并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:9具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:10具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列,并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:11具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:11具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列,并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:10具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:12具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列,并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:13具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,第一Fc结构域包含与SEQ ID NO:13具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列,并且第二Fc结构域包含与SEQ ID NO:12具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

[0567] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一、二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个氨基酸取代。

[0568] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和第二Fc结构域包含促进第一Fc结构域和第二Fc结构域异二聚化的修饰。在进一步的实施方案中,第一Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12,并且第二Fc结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:13。在其他实施方案中,第一Fc结构域和第二Fc结构域不包含促进第一Fc结构域和第二Fc结构域异二聚化的修饰。

[0569] 在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一个或多个改变Fc结合的修饰。在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一个或多个改变Fc半衰期的修饰。在一些实施方案中,第一Fc结构域和/或第二Fc结构域包含一个或多个修饰,其改变第一Fc结构域和/或第二Fc结构域与新生儿Fc受体(FcRn)的结合。

[0570] 上文描述了各种人IgG1 Fc结构域,其中至少一些包含一个或多个修饰。为清楚起见,虽然为了简洁起见在人IgG1 Fc结构域的背景下讨论了修饰,但明确考虑可在对应于本文所述的人IgG1中的突变的残基位置处发生其他免疫球蛋白(诸如例如,IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM和IgE)的突变。相关领域的技术人员将能够容易地确定与本文所述的人IgG1修饰相对应的其他免疫球蛋白中的残基位置。

[0571] 4.结构域接头:

[0572] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端,和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:(变体)IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中(变体)IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端。

[0573] 在其中变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端的一些实施方案中,使用接头结构域将变体IL-12p35亚基结构域和第一Fc结构域连接在一起,其中变体IL-12 p35亚基结构域的C末端连接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端连接至第一Fc结构域的N末端。在进一步的实施方案中,接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23(如图4中所示)。

[0574] 在其中(变体)IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端的一些实施方案中,使用接头结构域将(变体)IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域连接在一起,其中(变体)IL-12 p40亚基结构域的C末端连接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端连接至第二Fc结构域的N末端。在进一步的实施方案中,接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23(如图4中所示)。

[0575] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域不经由接头结构域附接至第一Fc结构域。

[0576] 在一些实施方案中,(变体)IL-12 p40亚基结构域不经由接头结构域附接至第二Fc结构域。

[0577] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的N末端共价附接至第一Fc结构域的C末端,和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:(变体)IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中(变体)IL-12 p40亚基结构域的N末端共价附接至第二Fc结构域的C末端。

[0578] 在其中变体IL-12 p35亚基结构域的N末端共价附接至第一Fc结构域的C末端的一些实施方案中,使用接头结构域将变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域连接在一起,其中第一Fc结构域的C末端连接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端连接至变体IL-12 p35亚基结构域的N末端。在进一步的实施方案中,接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ IDNO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23(如图4中所示)。

[0579] 在其中(变体)IL-12 p40亚基结构域的N末端共价附接至第二Fc结构域的C末端的一些实施方案中,使用接头结构域将(变体)IL-12p40亚基结构域和第二Fc结构域连接在一起,其中第二Fc结构域的C末端连接至接头结构域的N末端,并且接头结构域的C末端连接至(变体)IL-12 p40亚基结构域的N末端。在进一步的实施方案中,接头结构域包含选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23(如图4中所示)。

[0580] 在一些实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域不经由接头结构域附接至第一Fc结构域。

[0581] 在一些实施方案中,(变体)IL-12 p40亚基结构域不经由接头结构域附接至第二Fc结构域。

[0582] 5.核酸和载体:

[0583] 根据本文所述的方面和实施方案中的任一者,本公开提供了编码以下的核酸组合物:(i)异二聚体Fc融合蛋白、(ii)融合构建体、(iii)变体IL-12 p35亚基结构域、(iv)(变体)IL-12 p40亚基结构域、(v)Fc结构域、(vi)结构域接头和(vii)一个或多个额外蛋白质,诸如例如白蛋白,如上文所述。

[0584] 在一些实施方案中,将一种或多种编码本发明组分的核酸掺入表达盒或表达载体中。本领域技术人员应理解,表达盒通常包括遗传物质的构建体,所述遗传物质含有编码序列和足够的调控信息以指导受体细胞(体内和/或离体)中编码序列的适当转录和/或翻译。通常,表达盒可插入载体中,以靶向期望的宿主细胞和/或个体。因此,在一些实施方案中,本公开的表达盒包括如本文所公开的多肽的编码序列,所述编码序列可操作地连接至表达控制元件,诸如启动子,以及任选地,影响编码序列转录或翻译的任何其他核酸序列或其组合(诸如例如,复制起点、可选择标志物、核糖体结合位点、诱导物等)。

[0585] 在一些实施方案中,将核苷酸序列掺入表达载体中。本领域技术人员应理解,术语“载体”通常是指设计用于在宿主细胞之间转移的重组多核苷酸构建体,并且其可用于转化

的目的(例如,将异源DNA引入宿主细胞中)。因此,在一些实施方案中,载体可以是复制子(诸如例如质粒、噬菌体或粘粒),可将另一个DNA区段插入其中以引起插入区段的复制。在一些实施方案中,表达载体可以是整合载体。

[0586] 在一些实施方案中,表达载体可以是病毒载体。本领域技术人员将了解,术语"病毒载体"被广泛用于指包括病毒衍生的核酸元件的核酸分子(例如,转移质粒),所述核酸元件通常促进核酸分子的转移或整合至细胞基因组中,或指介导核酸转移的病毒颗粒。除了感兴趣的核酸之外,病毒颗粒通常包含各种病毒组分,并且有时还包含宿主细胞组分。术语病毒载体可指能够将核酸转移至细胞中的病毒或病毒颗粒,或指被转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒含有主要衍生自病毒的结构和/或功能遗传元件。在一些实施方案中,病毒载体是杆状病毒载体、逆转录病毒载体或慢病毒载体。术语"逆转录病毒载体"是指含有主要衍生自逆转录病毒的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒。术语"慢病毒载体"是指含有主要衍生自慢病毒(逆转录病毒的一个属)的结构和功能遗传元件或其部分的病毒载体或质粒,包括LTR。

[0587] 因此,本文还提供了载体、质粒或病毒,其含有编码本文所公开的异二聚体Fc融合蛋白、融合构建体、变体IL-12 p35亚基结构域、(变体)IL-12 p40亚基结构域、Fc结构域、结构域接头和/或一个或多个额外蛋白质(诸如例如白蛋白)中的任一者的一种或多种核酸。核酸可包含在能够指导其在例如已用载体转化/转导的细胞系中表达的所述载体内。适用于原核和真核细胞的载体是本领域已知的,并且是市售的,或可由熟练的技术人员容易地制备。

[0588] 本领域技术人员将了解,核酸组成将取决于异二聚体Fc融合蛋白的构型。因此,例如,当构型需要三个氨基酸序列时,可将三个核酸序列掺入一个或多个表达载体中进行表达。类似地,对于其他构型,当仅需要两个核酸时,它们可掺入一个或两个表达载体中。

[0589] DNA载体可经由常规转化或转染技术引入宿主细胞(诸如例如真核细胞或原核细胞),所述技术包括但不限于以中的一个或多个:转染、磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、刮擦加载、弹道引入、核穿孔、流体动力轰击、感染等。

[0590] 本公开中可使用的病毒载体包括但不限于杆状病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体、疱疹病毒、猿猴病毒40(SV40)、牛乳头瘤病毒载体等。

[0591] 6.重组细胞和细胞培养物:

[0592] 在另一方面,本文提供了细胞培养物,其包括至少一种如本文所公开的重组细胞(本文中也称为"宿主细胞")和培养基。通常,培养基可以是任何适用于培养本文所述细胞的培养基。用于转化多种上述细胞和物种的技术是本领域已知的。因此,包括至少一种如本文所公开的重组细胞的细胞培养物也在本申请的范围内。适用于产生和维持细胞培养物的方法和系统是本领域中已知的。

[0593] 宿主细胞可用于制备目的,以繁殖一种或多种编码以下的核酸:(i)异二聚体Fc融合蛋白、(ii)融合构建体、(iii)变体IL-12 p35亚基结构域、(iv)(变体)IL-12 p40亚基结构域、(v)Fc结构域、(vi)结构域接头和(vii)一个或多个额外蛋白质(诸如例如白蛋白)以及其组合和/或组分。宿主细胞可包括原核细胞或真核细胞,其中特别意图产生异二聚体Fc

融合蛋白和/或其组分。宿主细胞的非限制性实例包括细菌细胞(诸如例如革兰氏阳性细菌(例如芽孢杆菌属、链霉菌属和葡萄球菌属的菌种)的细胞或革兰氏阴性细菌细胞(例如大肠杆菌属和假单胞菌属的细胞))、真菌细胞或酵母细胞(例如酵母属、毕赤酵母和汉逊酵母)、昆虫细胞(例如果蝇属细胞和Sf9细胞)、植物细胞(例如来自农作物、药用或观赏植物或球茎的细胞)、哺乳动物细胞(例如上皮细胞系、骨肉瘤细胞系、神经母细胞瘤细胞系、上皮癌、神经胶质细胞、肝细胞系、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、COS细胞、BHK细胞、HeLa细胞、鼠胚胎干细胞(mESC)系的D3细胞、人胚胎干细胞(例如HS293细胞和BG01V细胞)、NIH 3T3细胞、人胚胎肾(HEK)293T细胞、人间充质干细胞(hMSCS)等)等。

[0594] C.同二聚体IL-12 Fc融合蛋白

[0595] 在一个方面中,本公开提供了一种同二聚体IL-12 Fc融合蛋白,其包含融合构建体的两个实例,其中融合构建体的个别实例包含Fc结构域和sc-IL-12复合物,其中Fc结构域的C末端共价附接至sc-IL-12复合物的N末端,任选地通过结构域接头。sc-IL-12复合物可包括本文所公开的任何合适的sc-IL-12复合物,并且Fc结构域可包括本文所述的任何合适的Fc结构域。在其中使用结构域接头将Fc结构域连接至sc-IL-12复合物的此类实施方案中,可使用本文所公开的任何合适的结构域接头。

[0596] 在另一方面,本公开提供了一种同二聚体IL-12 Fc融合蛋白,其包含融合构建体的两个实例,其中融合构建体的个别实例包含Fc结构域和sc-IL-12复合物,其中sc-IL-12复合物的C末端共价附接至Fc结构域的N末端,任选地通过结构域接头或通过Fc结构域的铰链区(的全部或部分)。在其中使用结构域接头将Fc结构域连接至sc-IL-12复合物的此类实施方案中,可使用本文所公开的任何合适的结构域接头。

[0597] D.本发明的有用实施方案

[0598] 如本领域技术人员将了解的并且如上文更充分讨论的,本发明的非天然存在的IL-12变体、同二聚体Fc融合蛋白和异二聚体Fc融合蛋白可采用多种构型。在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体与IL-12Rβ2和IL-12Rβ1结合和/或对其具有结合亲和力。在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白与IL-12Rβ2和IL-12Rβ1结合和/或对其具有结合亲和力。

[0599] 如上文所述,本文提供了非天然存在的IL-12变体,其包含:a)变体IL-12 p35亚基,其中IL-12 p35亚基包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸取代:Y40A、T43A、D126A、P127A、R129A、K168A和K170A,和b)IL-12 p40亚基。在示例性实施方案中,变体IL-12p35亚基包含SEQ ID NO:24。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:24具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:30。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:30具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:31。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:31具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:32。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:32具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:49。

在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:49具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含SEQ ID NO:65。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。

[0600] 如上文所述,本文提供了同二聚体Fc融合蛋白,其包含:融合构建体的两个实例,其中融合构建体的个别实例包含:Fc结构域和sc-IL-12复合物,其中Fc结构域的C末端共价附接至sc-IL-12复合物的N末端,任选地通过结构域接头。sc-IL-12复合物可包括本文所公开的任何合适的sc-IL-12复合物,并且Fc结构域可包括本文所述的任何合适的Fc结构域。在其中使用结构域接头将Fc结构域连接至sc-IL-12复合物的此类实施方案中,可使用本文所公开的任何合适的结构域接头。

[0601] 如上文所述,本文提供了同二聚体Fc融合蛋白,其包含:融合构建体的两个实例,其中融合构建体的个别实例包含:Fc结构域和sc-IL-12复合物,其中sc-IL-12复合物的C末端共价附接至Fc结构域的N末端,任选地通过结构域接头或通过Fc结构域的铰链区(的全部或部分)。在其中使用结构域接头将Fc结构域连接至sc-IL-12复合物的此类实施方案中,可使用本文所公开的任何合适的结构域接头。

[0602] 如上文所述,本文提供了异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:变体IL-12 p35亚基结构域和第一Fc结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端或其中第一Fc结构域的C末端共价附接至变体IL-12 p35亚基结构域的N末端,和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:IL-12 p40亚基结构域和第二Fc结构域,其中IL-12 p40亚基结构域的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端或第二Fc结构域的C末端共价附接至IL-12 p40亚基结构域的N末端,并且任选地其中第一Fc结构域和第二Fc结构域包含修饰,所述修饰(i)促进第一Fc结构域和第二Fc结构域的异二聚化和/或(ii)沉默或抑制效应子功能。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:24。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:24具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:30。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:30具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:31。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:31具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:32。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:32具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:49。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:49具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含SEQ ID NO:65。在示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域包含与SEQ ID NO:65具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列。

[0603] 此外,本文提供了异二聚体Fc融合蛋白,其包含:a)第一融合构建体和b)第二融合构建体。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:91,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:93,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:94,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:95,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:96,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:97,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:98,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:99,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:100,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:101,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:102,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:92(如图11中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:91。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:93。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:94。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:95。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:96。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:97。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:98。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:99。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:100。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:101。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:92,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:102。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:169(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170(如图79中所示)。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:171(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:172(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:173(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:174(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:175(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:176(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:167(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含

SEQ ID NO:168(如图79中所示),并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:170。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:169。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:171。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:172。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:173。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:174。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:175。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:176。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:167。在示例性实施方案中,第一融合构建体包含SEQ ID NO:170,并且第二融合构建体包含SEQ ID NO:168。

[0604] 在示例性实施方案中,提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其中异二聚体Fc融合蛋白包含:a)第一融合构建体,所述第一融合构建体包含:(i)变体IL-12 p35亚基结构域,其中变体IL-12 p35亚基结构域选自包括SEQ ID NO:24、30-34、49、52、53、65、103、104、112、177-247的组,(ii)第一Fc结构域,其中第一Fc结构域选自包括SEQ ID NO:12和13的组以及(iii)接头,其中接头包含SEQ ID NO:15,变体IL-12 p35亚基结构域的C末端共价附接至接头的N末端,并且接头的C末端共价附接至第一Fc结构域的N末端;和b)第二融合构建体,所述第二融合构建体包含:(i)(变体)IL-12 p40亚基结构域,其中(变体)IL-12 p40亚基结构域选自包括SEQ ID NO:4、89和90的组,(ii)第二Fc结构域,其中第二Fc结构域选自包括SEQ ID NO:13和12的组以及(iii)接头,其中接头包含SEQ ID NO:15,(变体)IL-12p40亚基结构域的C末端共价附接至接头的N末端,并且接头的C末端共价附接至第二Fc结构域的N末端。在一些进一步的示例性实施方案中,变体IL-12 p35亚基结构域可进一步包含C74S取代突变,并且(变体)IL-12 p40亚基结构域可进一步包含C177S取代突变,使得变体IL-12 p35亚基结构域和(变体)IL-12 p40亚基结构域之间的链间二硫键被去除。

[0605] IV.制备方法

[0606] 本领域技术人员将了解,本文所述的制备非天然存在的IL-12变体、同二聚体Fc融合蛋白和异二聚体Fc融合蛋白的方法的任何方面和实施方案均可利用本文所述的组合物的方面和/或实施方案中的任一者,并且可进一步用于本文另外所述的任何使用方法中。

[0607] A.白介素12(IL-12)变体

[0608] 在另一方面,本公开提供了一种产生本公开的非天然存在的IL-12变体的方法,所述方法包括:在产生非天然存在的IL-12变体(和/或其片段或组分)的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中核酸或载体包括编码上文组合物部分中描述的一种或多种氨基酸序列的一种或多种核酸。

[0609] 可通过用于转化或转染细胞的标准技术将编码期望的蛋白质(诸如例如非天然存在的IL-12变体(和/或其片段或组分))的核酸引入宿主细胞中。或者或另外,可将编码期望的蛋白质(诸如例如非天然存在的IL-12变体(和/或其片段或组分))的核酸掺入载体或“表达盒”中,如上文进一步详细描述的。载体(或表达盒)可经由常规转化或转染技术引入宿主细胞中。用于使用核酸或载体转化或转染宿主细胞的合适方法包括但不限于磷酸钙转染、

DEAE-葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、脂质转染、电穿孔、转导、刮擦加载、弹道引入、核穿孔、流体动力轰击、感染等。

[0610] 在一些实施方案中,方法进一步包括分离和/或纯化非天然存在的IL-12变体。在过程中,已引入可操作地连接至调控序列的编码感兴趣的蛋白质的核酸的宿主细胞(如上文所述)在培养基中以生产规模生长,以刺激编码感兴趣的蛋白质的核苷酸序列的转录。随后,从收获的宿主细胞或从培养基中分离蛋白质。可使用标准蛋白质纯化技术从培养基或从收获的细胞中分离感兴趣的蛋白质。具体而言,纯化技术可用于大规模(即至少毫克(1.00mg)量)或小规模(即至少纳克(1.00ng)量至毫克(<1.00mg)量)表达和纯化期望的蛋白质(诸如例如非天然存在的IL-12变体),其来自各种实施方式,包括但不限于滚瓶、旋转瓶、组织培养板、一个或多个生物反应器、一个或多个发酵罐和/或其任何组合。

[0611] 表达的蛋白质(诸如例如非天然存在的IL-12变体)可通过已知方法分离和纯化。通常,将培养基离心和/或过滤,然后通过亲和或免疫亲和色谱法纯化上清液。本发明的蛋白质可通过已知技术的适当组合来分离和/或纯化。这些方法包括但不限于利用溶解度的方法(例如,盐沉淀或溶剂沉淀)、利用分子量差异的方法(例如,透析、超滤、凝胶过滤、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE))、利用电荷差异的方法(例如,离子交换柱色谱法)、利用特异性亲和力的方法(例如,亲和色谱法)、利用疏水性差异的方法(例如,反相高效液相色谱法)、利用等电点差异的方法(例如,等电聚焦电泳或金属亲和柱,诸如例如,Ni-NTA)等。

[0612] 在一些实施方案中,用于产生非天然存在的IL-12变体的方法包括对所产生的多肽进行结构修饰以增加半衰期。在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体进一步包含与变体IL-12 p35亚基和/或(变体)IL-12 p40亚基融合的以下中的一个或多个:(i)Fc结构域,其中Fc结构域包含一个或多个选自包括以下的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13,(ii)白蛋白,(iii)一个或多个非结构化可生物降解多肽(“XTEN”)或(iv)聚乙二醇(PEG)。

[0613] B.异二聚体IL-12 Fc融合蛋白

[0614] 在另一方面,本公开提供了一种产生本公开的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:在产生异二聚体IL-12 Fc融合蛋白(和/或其片段或组分)的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中一种或多种核酸或载体包括编码上文组合物部分中描述的一种或多种氨基酸序列的一种或多种核酸,其中异二聚体IL-12 Fc融合蛋白与参考IL-12的半衰期相比增加了半衰期。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子、IL-12 Fc融合蛋白或其任何组合。

[0615] 可通过用于转化或转染细胞的标准技术将编码期望的融合蛋白(诸如例如异二聚体IL-12 Fc融合蛋白(和/或其片段或组分))的核酸引入宿主细胞中。或者或另外,可将编码期望的蛋白质(诸如例如异二聚体IL-12 Fc融合蛋白(和/或其片段或组分))的核酸掺入载体或“表达盒”中,如上文进一步详细描述的。载体(或表达盒)可经由常规转化或转染技术引入宿主细胞中。用于使用核酸或载体转化或转染宿主细胞的合适方法包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、脂质转染、电穿孔、转导、刮擦加载、弹道引入、核穿孔、流体动力轰击、感染等。

[0616] 在一些实施方案中,方法进一步包括分离和/或纯化异二聚体IL-12 Fc融合蛋白。在过程中,已引入可操作地连接至调控序列的编码感兴趣的融合蛋白的核酸的宿主细胞

(如上文所述)在培养基中以生产规模生长,以刺激编码感兴趣的融合蛋白的核苷酸序列的转录。随后,从收获的宿主细胞或从培养基中分离融合蛋白。可使用标准蛋白质纯化技术从培养基或从收获的细胞中分离感兴趣的融合蛋白。具体而言,纯化技术可用于大规模(即至少毫克(1.00mg)量)或小规模(即至少纳克(1.00ng)量至毫克(<1.00mg)量)表达和纯化期望的融合蛋白(诸如例如异二聚体Fc融合蛋白),其来自各种实施方式,包括但不限于滚瓶、旋转瓶、组织培养板、一个或多个生物反应器、一个或多个发酵罐和/或其任何组合。

[0617] 表达的融合蛋白(诸如例如异二聚体IL-12 Fc融合蛋白)可通过已知方法分离和纯化。通常,将培养基离心和/或过滤,然后通过亲和或免疫亲和色谱法纯化上清液。本发明的融合蛋白可通过已知技术的适当组合来分离和/或纯化。这些方法包括但不限于利用溶解度的方法(例如,盐沉淀或溶剂沉淀)、利用分子量差异的方法(例如,透析、超滤、凝胶过滤、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE))、利用电荷差异的方法(例如,离子交换柱色谱法)、利用特异性亲和力的方法(例如,亲和色谱法)、利用疏水性差异的方法(例如,反相高效液相色谱法)、利用等电点差异的方法(例如,等电聚焦电泳或金属亲和柱,诸如例如,Ni-NTA)等。

[0618] C.同二聚体IL-12 Fc融合蛋白

[0619] 在另一方面,本公开提供了一种产生本公开的同二聚体IL-12 Fc融合蛋白的方法,所述方法包括:在产生同二聚体IL-12 Fc融合蛋白(和/或其片段或组分)的条件下,用一种或多种核酸或载体培养宿主细胞,其中一种或多种核酸或载体包括编码上文组合物部分中描述的一种或多种氨基酸序列的一种或多种核酸。在一些实施方案中,产生的同二聚体IL-12 Fc融合蛋白与参考IL-12的半衰期相比增加了半衰期。在一些实施方案中,参考IL-12包括以下中的一个或多个:野生型IL-12、人野生型IL-12、市售IL-12分子、IL-12 Fc融合蛋白或其任何组合。

[0620] 可通过用于转化或转染细胞的标准技术将编码期望的融合蛋白(诸如例如同二聚体IL-12 Fc融合蛋白(和/或其片段或组分))的核酸引入宿主细胞中。或者或另外,可将编码期望的蛋白质(诸如例如同二聚体IL-12 Fc融合蛋白(和/或其片段或组分))的核酸掺入载体或“表达盒”中,如上文进一步详细描述的。载体(或表达盒)可经由常规转化或转染技术引入宿主细胞中。用于使用核酸或载体转化或转染宿主细胞的合适方法包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、脂质转染、电穿孔、转导、刮擦加载、弹道引入、核穿孔、流体动力轰击、感染等。

[0621] 在一些实施方案中,方法进一步包括分离和/或纯化同二聚体IL-12 Fc融合蛋白。在过程中,已引入可操作地连接至调控序列的编码感兴趣的融合蛋白的核酸的宿主细胞(如上文所述)在培养基中以生产规模生长,以刺激编码感兴趣的融合蛋白的核苷酸序列的转录。随后,从收获的宿主细胞或从培养基中分离融合蛋白。可使用标准蛋白质纯化技术从培养基或从收获的细胞中分离感兴趣的融合蛋白。具体而言,纯化技术可用于大规模(即至少毫克(1.00mg)量)或小规模(即至少纳克(1.00ng)量至毫克(<1.00mg)量)表达和纯化期望的融合蛋白(诸如例如同二聚体IL-12 Fc融合蛋白),其来自各种实施方式,包括但不限于滚瓶、旋转瓶、组织培养板、一个或多个生物反应器、一个或多个发酵罐和/或其任何组合。

[0622] 表达的融合蛋白(诸如例如同二聚体IL-12 Fc融合蛋白)可通过已知方法分离和

纯化。通常,将培养基离心和/或过滤,然后通过亲和或免疫亲和色谱法纯化上清液。本发明的融合蛋白可通过已知技术的适当组合来分离和/或纯化。这些方法包括但不限于利用溶解度的方法(例如,盐沉淀或溶剂沉淀)、利用分子量差异的方法(例如,透析、超滤、凝胶过滤、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE))、利用电荷差异的方法(例如,离子交换柱色谱法)、利用特异性亲和力的方法(例如,亲和色谱法)、利用疏水性差异的方法(例如,反相高效液相色谱法)、利用等电点差异的方法(例如,等电聚焦电泳或金属亲和柱,诸如例如,Ni-NTA)等。

[0623] V.使用方法

[0624] 本领域技术人员将了解,本文所述的使用方法的任何方面和实施方案均可利用上文所述的组合物的方面和/或实施方案中的任一者,并且可进一步利用上文另外所述的制备非天然存在的IL-12变体、同二聚体Fc融合蛋白和异二聚体Fc融合蛋白的方法中的任一者。

[0625] A.白介素12(IL-12)变体

[0626] 在另一方面,本公开提供了使用本公开的一种或多种非天然存在的IL-12变体的方法。

[0627] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的非天然存在的IL-12变体,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。如本文所用,术语“治疗有效量”通常是指相对于不存在组合物足以使组合物实现所述目的的量(例如,实现施用的效果、治疗疾病/病症/疾患、减少信号传导通路或减少疾病/病症/疾患的一种或多种症状)。“治疗有效量”的实例是足以有助于治疗、预防或减少疾病/病症/疾患的一种或多种症状的量。症状的“减少”意指降低症状的严重程度和/或频率和/或消除症状。包括“治疗有效量”的组合物的确切量将取决于治疗的目的,并且可由相关领域的技术人员确定。

[0628] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的非天然存在的IL-12变体,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用非天然存在的IL-12变体以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。

[0629] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的非天然存在的IL-12变体,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用非天然存在的IL-12变体以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。在甚至进一步的实施方案中,癌症包括良性肿瘤、转移性肿瘤或混合型肿瘤。

[0630] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的非天然存在的IL-12变体,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用非天然存在的IL-12变体以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。在甚至进一步的实施方案中,癌症包括复发性癌症和/或难治性癌症。在一些实施方案中,难治性癌症是原发性难治性癌症(即,在基线时对给定疗法具有抗性或免疫性的癌症)。在其他实施方案中,难治性癌症是继发性难治性癌症(即,在第一个时间点之前对给定疗法敏感或部分敏感但随后在第二个时间点(诸如例如,在复发时或复发后)对给定疗法具有抗性或免疫性的癌症)。

[0631] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体作为一线、二线、三线、四线、五线或更高线疗法施用。

[0632] 在一些实施方案中,非天然存在的IL-12变体单独施用。在其他实施方案中,非天然存在的IL-12变体作为组合疗法的一部分施用,包括与本领域已知和本文所公开的用于治疗癌症的治疗的组合,诸如在一些非限制性实例中,手术、化学疗法、放射疗法、光疗、靶向疗法和免疫疗法。

[0633] B.异二聚体IL-12 Fc融合蛋白

[0634] 在另一方面,本公开提供了使用本公开的一种或多种异二聚体Fc融合蛋白的方法。

[0635] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的异二聚体Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。如本文所用,术语“治疗有效量”通常是指相对于不存在组合物足以使组合物实现所述目的的量(例如,实现施用的效果、治疗疾病/病症/疾患、减少信号传导通路或减少疾病/病症/疾患的一种或多种症状)。“治疗有效量”的实例是足以有助于治疗、预防或减少疾病/病症/疾患的一种或多种症状的量。症状的“减少”意指降低症状的严重程度和/或频率和/或消除症状。包括“治疗有效量”的组合物的确切量将取决于治疗的目的,并且可由相关领域的技术人员确定。

[0636] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的异二聚体Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用异二聚体Fc融合蛋白以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。

[0637] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的异二聚体Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用异二聚体Fc融合蛋白以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。在甚至进一步的实施方案中,癌症包括良性肿瘤、转移性肿瘤或混合型肿瘤。

[0638] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的异二聚体Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用异二聚体Fc融合蛋白以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。在甚至进一步的实施方案中,癌症包括复发性癌症和/或难治性癌症。在一些实施方案中,难治性癌症是原发性难治性癌症(即,在基线时对给定疗法具有抗性或免疫性的癌症)。在其他实施方案中,难治性癌症是继发性难治性癌症(即,在第一个时间点之前对给定疗法敏感或部分敏感但随后在第二个时间点(诸如例如,在复发时或复发后)对给定疗法具有抗性或免疫性的癌症)。

[0639] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白作为一线、二线、三线、四线、五线或更高线疗法施用。

[0640] 在一些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白单独施用。在其他实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白作为组合疗法的一部分施用。

[0641] C.同二聚体IL-12 Fc融合蛋白

[0642] 在另一方面,本公开提供了使用本公开的一种或多种同二聚体IL-12 Fc融合蛋白的方法。

[0643] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的同二聚体IL-12 Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。如本文所用,术语“治疗有效量”通常是指相对于不存在组合物足以使组合物实现所述目的的量(例如,实现施用的效果、治疗疾病/病症/疾患、减少信号传导通路或减少疾病/病症/疾患的一种或多种症状)。“治疗有效量”的实例是足以有助于治疗、预防或减少疾病/病症/疾患的一种或多种症状的量。症状的“减少”意指降低症状的严重程度和/或频率和/或消除症状。包括“治疗有效量”的组合物的确切量将取决于治疗的目的,并且可由相关领域的技术人员确定。

[0644] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的同二聚体IL-12 Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用同二聚体IL-12 Fc融合蛋白以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。

[0645] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的同二聚体IL-12 Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用同二聚体IL-12 Fc融合蛋白以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。在甚至进一步的实施方案中,癌症包括良性肿瘤、转移性肿瘤或混合型肿瘤。

[0646] 在一些实施方案中,向有需要的受试者施用治疗有效量的同二聚体IL-12 Fc融合蛋白,如上文组合物和/或制备方法部分中所述。在进一步的实施方案中,向有需要的受试者施用同二聚体IL-12 Fc融合蛋白以治疗疾病、病症或疾患。在进一步的实施方案中,疾病、病症或疾患包括癌症。在甚至进一步的实施方案中,癌症包括复发性癌症和/或难治性癌症。在一些实施方案中,难治性癌症是原发性难治性癌症(即,在基线时对给定疗法具有抗性或免疫性的癌症)。在其他实施方案中,难治性癌症是继发性难治性癌症(即,在第一个时间点之前对给定疗法敏感或部分敏感但随后在第二个时间点(诸如例如,在复发时或复发后)对给定疗法具有抗性或免疫性的癌症)。

[0647] 在一些实施方案中,同二聚体IL-12 Fc融合蛋白作为一线、二线、三线、四线、五线或更高线疗法施用。

[0648] 在一些实施方案中,同二聚体IL-12 Fc融合蛋白单独施用。在其他实施方案中,同二聚体IL-12 Fc融合蛋白作为组合疗法的一部分施用。

[0649] 实施例

[0650] 为了更全面地说明本发明的一些实施方案,提供以下的实施例。然而,它们绝不应被解释为限制本发明的广泛范围。本领域技术人员可容易地设计出本文所公开的原理的许多变型和修改,而不背离本发明的范围。

[0651] A.实施例1-异二聚体Fc型式的IL-12的表达和纯化

[0652] 为了在哺乳动物细胞中表达,IL-12经由柔性接头(GGGGSGGGGSGGGGSTR)与人IgG1-Fc的羧基末端重组融合。IL-12与Fc结构域的融合可由于若干原因而有优势,包括但不限于:i)稳定性增加,ii)易于经由蛋白质A色谱法纯化,iii)由于经由新生儿Fc受体循环而增加血清半衰期和iv)Fc表达为异二聚体的能力,从而允许以模拟其天然生理状态的异二聚体形式呈现IL-12。在初始实验中,利用杵臼结构突变和人工二硫键来促进Fc-异二聚体形成,并且在每个Fc链内包括N297G取代,以防止N连接的糖基化,并且从而降低Fc效应子

功能。所用的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的构型显示于图12中。异二聚体IL-12 Fc融合蛋白通过将两条链(编码“IgG1Fc(杵)-IL12 p35”和“IgG1Fc(臼)-IL12 p40”)慢病毒转导至CHO细胞中来表达,并且使用3步程序进行纯化,所述程序包括:蛋白质A、尺寸排阻色谱法和阳离子交换色谱法。图13显示了示例性野生型IL-12异二聚体Fc融合蛋白的代表性色谱图。合并用于进一步纯化/分析的对应于异二聚体IL-12 Fc融合蛋白的级分以矩形指示。在整个纯化过程中,“Fc(杵)-IL12 p35”和“Fc(臼)-IL12 p40”链共洗脱,并且在最终纯化的样品中,在非还原性SDS-PAGE条件下明显为单一物质,指示二硫键连接的异二聚体的适当形成(图14)。

[0653] B.实施例2-鉴定和产生效力降低的IL-12 Fc单一突变体

[0654] 为了能够合理选择非天然存在的IL-12 p35突变体,通过将IL-12的晶体结构(PDB ID 3HMX)和IL-12Rβ2的AlphaFold模型拟合至IL-12/IL-12R四元复合物(EMD-21645)的低分辨率低温EM图谱中,产生了IL-12/IL-12R复合物模型(图15)。选择了六个表面暴露的IL-12p35残基,所述残基基于其空间接近性可能影响与IL-12Rβ2的结合。这些包括衍生自A-B(Y40和T43)和B-C(D126、P127和R128)环以及D螺旋内的K168的残基。将在这些位置中的每一者处的丙氨酸突变体(Y40A、T43A、D126A、P127A、R128A、K168A)个别地引入IL-12 Fc构建体中,并且在CHO细胞中表达,如上文实施例1中所述。图16显示了每个个别的非天然存在的IL-12突变体(包含p35亚基结构域中六个上述取代突变中的一者(也称为“IL-12 Fc单一突变体”或“单一突变体”)的最终纯度。

[0655] C.实施例3-IL-12 Fc单一突变体对IL-12Rβ2的结合亲和力

[0656] 使用表面等离子体共振(SPR)测定评估了各种IL-12 Fc单一突变体对IL-12Rβ2的亲和力。在包含20mM磷酸钠pH 7.4、150mM NaCl和0.05%Tween20的缓冲液中,在20℃下在Biacore T100上记录SPR测量值。将大约200-300个响应单位(RU)的IL-12 Fc w.t.或其突变体(IL-12 Fc单一突变体)固定至蛋白质A系列S芯片上,并且以30μl/min的流速测量截短形式的IL-12Rβ2胞外区(结构域1-3)的结合。在300秒解离阶段之后,使用50mM甘氨酸pH 2.5,随后50mM NaOH(各自注射30秒)将剩余结合的IL-12Rβ2从芯片上洗掉。使用BIAevaluation软件使用1:1Langmuir模型计算动力学参数,随后减去与含有同种型对照抗体的参考流动池的结合。图17和18分别显示了原始传感图和SPR测量值总结。虽然IL-12Rβ2与IL-12 Fc w.t.结合具有相对较高的亲和力(K_D=13.1nM),但在若干IL-12 Fc单一突变体中结合有所减弱。具体而言,Y40A变体表现出明显降低的结合,使得无法确定可靠的亲和力(不可检测或“弱”结合),而对于包含K168A、D126A或P127A取代突变的IL-12 Fc单一突变体,亲和力明显更适度降低。

[0657] D.实施例4-使用IL-12HEK报告基因得到的IL-12 Fc单一突变体的效力

[0658] 如上文所述,IL-12与IL-12受体的结合触发胞内信号传导级联,其尤其导致TyK2(酪氨酸激酶2)、JAK2(Janus激酶2)和STAT4(信号转导子和转录活化子4)活化,这导致IFNγ的产生和分泌。因此,为了测量IL-12 Fc单一突变体的效力,利用市售报告基因系统(HEK-Blue IL-12细胞,InvivoGen),其中IL-12诱导的STAT4通路触发导致分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)的产生,这可使用QUANTI-Blue试剂容易地检测到。

[0659] 为了确定IL-12 Fc单一突变体的效力,将不同浓度的个别IL-12Fc突变体、IL-12 Fc w.t.和未与Fc融合的市售IL-12(Miltenyi)与12,500个HEK-Blue IL-12细胞在384臼板

中在37℃下孵育过夜,并且用含有4.5g/L葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺、10％热灭活FBS和100U/ml青霉素/链霉素的DMEM重新悬浮。第二天,使用QUANTI-Blue检测试剂通过使用PHERAstar平板读数器测量620nm处的光密度(OD)对SEAP进行量化,并且在Prism软件中绘制结果。

[0660] HEK-Blue IL-12测定的结果显示于图19中,并且总结于图20中。野生型IL-12 Fc表现出与商业来源的IL-12(Miltenyi)类似的效力,指示所使用的单价Fc融合型式不改变IL-12活性。一些评估的突变导致IL-12Rβ2亲和力无显著变化或适度降低。出乎意料的是,在p35亚基结构域中含有Y40A取代突变的IL-12 Fc单一突变体表现出效力和活性明显降低(HEK-Blue EC_{50}值降低了大约17倍)。

[0661] E.实施例5-IL-12 Fc单一突变体触发原代T细胞中IFNγ释放的能力

[0662] IL-12的抗肿瘤活性至少部分由于其诱导免疫细胞分泌IFNγ的能力,IFNγ具有细胞抑制性/细胞毒性、抗血管生成性,并且可上调肿瘤细胞上的MHC I和II表达以实现免疫识别。因此,进一步研究了IL-12 Fc单一突变体诱导原代T细胞分泌IFNγ的能力。将来自健康供体的外周血单核细胞(PBMC)在含有10％FCS、1×GlutaMAX、1％青霉素/链霉素、0.1％β-巯基乙醇、25mM HEPES、1％非必需氨基酸、1％丙酮酸钠、600U/ml IL-2和32ng/ml OKT3的RPMI 1640培养基中扩增/活化2天,然后在具有上文特征的类似培养基中维持3天,不同之处在于所述培养基缺乏OKT3并且含有50U/ml IL-2。为了进行测定,将100,000个细胞分配至96孔板中,并且与所指示浓度的IL-12 Fc单一突变体、IL-12 Fc w.t.或市售IL-12(Miltenyi)一起孵育45小时。收集上清液并且使用Bio-Plex PIX多路复用读取器对IFNγ水平进行量化。

[0663] IFNγ测定的结果显示于图21中,并且总结于图22中。IL-12 Fc w.t.诱导的IFNγ与市售IL-12具有类似程度。相对于IL-12 Fc w.t.,在p35亚基结构域中含有Y40A取代突变的IL-12 Fc单一突变体表现出降低了大约14倍的EC_{50}。相对于IL-12 Fc w.t.,在p35亚基结构域中含有P127A取代突变的IL-12 Fc单一突变体表现出降低了大约3倍的EC_{50}。其余的IL-12 Fc单一突变体表现出略有降低的刺激IFNγ分泌的能力。

[0664] F.实施例6-IL-12-Fc组合突变体

[0665] 为了鉴定赋予IL-12效力进一步降低的额外突变体,探索了在IL-12 p35亚基结构域内多于一个位置处组合突变的影响。变体IL-12突变体以单价、异二聚体IL-12 Fc型式表达,如上文实施例1(图23)中所述,其中p35亚基结构域包含两个(“IL-12 Fc双重突变体”或“双重突变体”)、三个(“IL-12 Fc三重突变体”或“三重突变体”)或四个(“IL-12Fc四重突变体”或“四重突变体”)取代突变,统称为“IL-12 Fc组合突变体”。由于Y40A与IL-12活性的最大损失相关,因此此突变体位置与T43A、D126A、P127A或其组合相组合。然后,如上文实施例4中所述,在HEK-Blue IL-12报告基因测定中评估IL-12 Fc组合突变体的效力,同时评估个别IL-12 Fc单一突变体、IL-12 Fc w.t.和未连接至Fc结构域的市售IL-12(Miltenyi),以在相同实验中提供直接比较。HEK-Blue IL-12报告基因测定的结果显示于图24中,并且总结于图25中。与先前的HEK-Blue IL-12测定一致,Y40A显示单个突变体效力的最大降低(大约降低29倍),而P127A与效力适中损失(大约降低2倍)相关。出乎意料的是,一些双重突变体表现出协同效应。包含Y40A/D126A或Y40A/P127A的双重突变体进一步降低IL-12效力,使其低于个别Y40A突变的效力(分别降低了(大约)38倍和40倍)。这种协同效应对于所有突变体组合并不明显,如Y40A/T43A所证明的,它表现出的EC_{50}值与单独的Y40A类似。明显地,与

Y40A/D126A或Y40A/P127A相比,Y40A/D126A/P127A三重突变体显示出效力进一步降低(大约降低404倍)。此外,Y40A/T43A/D126A/P127A四重突变体表现出效力降低了(大约)451倍。

[0666] 还在原代T细胞IFNγ释放测定中研究了双重、三重和四重IL-12 Fc突变体的活性,并且将其与IL-12 Fc w.t.的活性进行了比较,如上文实施例5中所述。结果显示于图26中,并且总结于图27中。总体而言,突变体刺激IFNγ释放的能力与其在HEK-Blue IL-12报告基因测定中的效力相关,其中Y40A/D126A(大约降低21倍)和Y40A/P127A(大约降低27倍)导致效力与Y40A单一突变体(大约降低14倍,如图22中所示)相比适度降低,而观察到Y40A/D126A/P127A三重突变体的效力急剧降低(大约降低907倍)。

[0667] G.实施例7-额外IL-12-Fc丙氨酸突变体

[0668] 基于IL-12/IL-12Rβ2复合物的结构模型,鉴定了可在IL-12Rβ2结合中发挥作用的额外IL-12 p35残基K170。因此,将IL-12 p35K170A突变引入实施例1中所述的异二聚体IL-12 Fc融合蛋白中,并且使用SPR测定评估其与IL-12Rβ2的结合,如实施例3中所述。明显地,将K170A突变引入IL-12 p35亚基结构域中急剧降低了IL-12Rβ2结合,使得无法准确确定亲和力(即,K170A突变体具有"弱"结合亲和力,如上文所述;参见例如图28)。

[0669] 除了K170A单一突变体之外,还产生了额外双重突变体和三重突变体组合,其中双重突变体和三重突变体的子集包括K170A取代突变。如实施例4中所述,最初在HEK-Blue IL-12报告基因测定中评估这些额外IL-12 Fc突变体的效力。作为参考框架,还包括Y40A单一突变体和Y40A/P127A双重突变体,以使在同一个实验中能够进行直接比较。HEK-Blue IL-12测定的结果显示于图29中,并且总结于图30中。与通过SPR观察到的对IL-12Rβ2亲和力的损失一致,K170A单一突变体导致效力明显降低(HEK-Blue EC_{50}值降低大约16倍)。令人惊讶的是,R129A、K168A和K170A中的每一者在与Y40A(在双重突变体中)组合时或与Y40A/P127A(在三重突变体中)组合时都赋予效力进一步降低。K170A的效力损失幅度最大(与野生型相比,Y40A/K170A的HEK-Blue EC_{50}值降低大约6537倍),K168A的效力损失幅度中等(与野生型相比,Y40A/K168A的HEK-Blue EC_{50}值降低大约67倍),并且R129A的效力损失幅度最小(与野生型相比,Y40A/R129A的HEK-Blue EC_{50}值降低大约44倍)。值得注意的是,D126A/P127A双重突变体不影响IL-12-Fc效力,突出了选择具有协同效应而产生IL-12效力降低的突变体所涉及的不可预测性。

[0670] 如实施例5中所述,还在原代T细胞IFNγ释放测定中研究了额外单一突变体、双重突变体和三重突变体的活性,同时还研究了野生型IL-12 Fc和IL-12 Fc Y40A突变体的活性以进行比较。T细胞IFNγ释放测定的结果显示于图31中,并且总结于图32中。突变体刺激IFNγ释放的能力与其在HEK-Blue IL-12报告基因测定中的效力相关,其中K170A导致与Y40A类似的效力降低(与Y40A大约降低23倍相比,K170A大约降低24倍),并且R129A、K168A和K170A中的每一者在与Y40A(在双重突变体中)组合时或与Y40A/P127A(在三重突变体中)组合时都赋予效力进一步降低,其层次与HEK-Blue报告基因测定中观察到的类似。

[0671] H.实施例8-替代Fc融合型式的所选的IL-12丙氨酸突变体

[0672] 选择了八种具有一系列效力的IL-12丙氨酸突变体进行进一步分析。这些包括:Y40A、K170A、Y40A/D126A、Y40A/R129A、Y40A/K168A、Y40A/D126A/P127A、Y40A/P127A/K168A和Y40A/K170A,并且统称为"丙氨酸效力系列"。除野生型IL-12外,还使用替代的Fc融合形式表达所选的IL-12丙氨酸突变体,其中IL-12亚基经由(G4S)2接头附接至Fc区的N末端(参

见例如图33)。除了促进Fc异二聚化的杵臼结构突变之外,对序列的其他修饰包括:(i)Fc结构域内的L234F、L235E和P331S,(ii)Fc铰链内的C220S和(iii)IL-12 p40亚基内的C252S取代以防止二硫键连接聚集。通过瞬时转染expi-CHO细胞表达野生型IL-12-Fc和"丙氨酸效力系列",并且通过蛋白质A和阳离子交换色谱法纯化。将来自阳离子交换柱的洗脱级分合并起来,并且使用Superdex 200 10/300柱进行分析型尺寸排阻色谱法,以确认样品不含高分子量聚集体。图34显示了示例性野生型IL-12异二聚体Fc融合蛋白的代表性色谱图,而图35显示了野生型IL-12-Fc和"丙氨酸效力系列"的最终纯度。

[0673] 使用IL-12HEK报告基因测定(如实施例4中所述)和原代T细胞IFNγ测定(如实施例5中所述)来评估"丙氨酸效力系列"的活性,不同之处在于使用Luminex系统(而不是Bio-Plex系统)来量化IFNγ水平。HEK-Blue IL-12测定的结果显示于图36中,并且总结于图37中。T细胞IFNγ测定的结果显示于图38中,并且总结于图39中。在两种测定中,野生型IL-12 Fc表现出与商业来源的IL-12(Miltenyi)类似的效力,指示IL-12活性不受细胞因子与Fc亚基的N末端融合、引入不同突变以沉默Fc效应子功能或IL-12 p40内的C252S取代的影响。虽然突变体相对于野生型IL-12 Fc的绝对倍数变化EC_{50}值与早期实验的幅度不同,但突变体效力的等级顺序遵循类似的趋势,其中(i)Y40A、K170A和Y40A/D126A导致效力降低相对较小,(ii)Y40A/R129A和Y40A/K168A与效力降低相对适中相关,以及(iii)Y40A/D126A/P127A、Y40A/P127A/K168A和Y40A/K170A导致效力降低相对较大。

[0674] I.实施例9-IL-12 Fc丙氨酸突变体体外调节T细胞表型

[0675] 随后研究了表现出一系列效力降低的IL-12 Fc变体对体外T细胞表型的影响。为了扩增/活化人T细胞,将来自三个独立健康供体的外周血单核细胞(PBMC)在含有10%FCS、2mM L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽、50U/mL青霉素、50ug/mL链霉素、55μMβ-巯基乙醇、10mM HEPES、0.1mM非必需氨基酸、1mM丙酮酸钠、600U/ml IL-2和30ng/ml OKT3的RPMI 1640培养基中培养2天,然后洗涤并且重新悬浮于具有上文特征的相同培养基中,不同之处在于所述培养基缺乏OKT3,并且含有50U/ml IL-2和1、5或10ng/ml野生型IL-12 Fc或10ng/ml"丙氨酸效力系列"的个别成员中的每一者。两天后,用表面标志物组对T细胞进行染色,所述表面标志物组包括:(i)抗CD4(BUV805)、(ii)抗CD8(BUV737)、(iii)抗CD39(PerCPCy5.5)、(iv)抗CD45RO(BV650)、(v)抗CD45RA(BUV395)、(vi)抗CD62L(APC-Cy7)、(vii)抗PD-1(BV785)、(viii)抗CD27(BV711)、(ix)抗Tim3(BV421)、(x)抗CD95(PE-Cy7)和(xi)抗LAG-3(AF647)。随后,使用FoxP3转录因子试剂盒(ThermoFisher Scientific)固定和透化T细胞,然后用胞内标志物组染色,所述胞内标志物组包括:(a)抗TCF1(PE)、(b)抗Ki-67(BV605)、(c)抗FoxP3(AF700)和(d)抗颗粒酶B(APC),然后使用Cytek Aurora进行分析。

[0676] 图40-43描绘了来源于两个供体的CD8+和CD4+T细胞上所选的T细胞标志物的表达。野生型IL-12 Fc诱导了若干T细胞活化和耗竭标志物的表达,包括:CD4+和CD8+细胞中的颗粒酶B、LAG-3、CD39以及较小程度的PD-1,并且与从幼稚至活化/记忆表型的转变相关,以CD45RA+CD45RO-细胞比例的降低为代表。这些标志物的诱导程度在"丙氨酸效力系列"的个别成员之间有所不同,并且与效力直接相关,其中"较高效力"变体诱导较高的标志物表达,而"较低效力"变体诱导的标志物表达程度较低。为了更系统地分析T细胞表型与IL-12效力之间的关系,进行了主成分分析(PCA),其中考虑了3个不同PBMC供体("B245"、"B246"和"B247";参见例如图44和45)中CD8+和CD4+T细胞中的整个表型标志物组(上述)。在CD8+T

细胞中,PC1评分与IL-12效力显示出很强的相关性,其中与“低效力”变体和在不存在IL-12 Fc的情况下培养的样品相比,野生型IL-12和“高效力”变体诱导的评分相对较高。在CD4+T细胞中,PC2与IL-12效力的相关性最强,尽管不如在CD8+T细胞中那样一致。

[0677] J.实施例10-IL-12 Fc丙氨酸突变体表现出有利的体内特征

[0678] 随后在NOD SCIDγ(NSG)小鼠中研究了效力降低的IL-12 Fc突变体的体内特性,所述小鼠被静脉内注射了$10x10^6$个新鲜分离的人PBMC。小鼠(每组n=6)未经治疗,或在第0天(即与PBMC异种移植同一天)和第7天用0.1或0.01mg/kg野生型IL-12 Fc或以下IL-12 Fc效力降低突变体进行腹膜内治疗:(i)Y40A/D126A、(ii)Y40A/R129A、(iii)Y40A/K168A或(iv)Y40A/P127A/K168A。定期(时间=24、96、120、144、192、240、288和576小时)对血液进行取样,以确定血浆中的IFNγ和IL-12 Fc水平,以及通过流式细胞术进行免疫细胞计数和表型分析。

[0679] 图46显示了描绘第12天血液中CD4+和CD8+T细胞计数的数据。在接受0.1mg/kg剂量IL-12(WT或IL-12 Fc效力降低突变体)的动物中,注射野生型IL-12 Fc的动物中观察到最高的CD4+和CD8+细胞绝对数量,而注射每种效力降低IL-12 Fc变体的小鼠中CD4+和CD8+细胞数量明显减少(但比未治疗的动物多)。虽然野生型IL-12 Fc在0.01mg/kg下确实导致T细胞明显扩增,但在这种较低剂量下,未处理和效力降低的IL-12 Fc变体之间的CD4+和CD8+细胞数量差异不太明显。除了绝对数字外,还评估了IL-12 Fc效力对CD4:CD8比率的影响。虽然没有观察到显著差异,但数据指示了一种趋势,其中对于“较低效力”IL-12 Fc变体(诸如例如Y40A/K168A和Y40A/P127A/K168A),观察到与未治疗小鼠类似的CD4:CD8比率,而野生型IL-12 Fc和“较高效力”变体(诸如例如Y40A/D126A)表现出增加的CD4:CD8比率。

[0680] 图47和48显示了描绘第12天小鼠血浆中CD4+和CD8+细胞表型的数据。与T细胞活化(颗粒酶B)和耗竭(PD-1、Lag-3和Tim-3)相关的标志物的表达均显示出与IL-12效力直接相关,其中“较高效力”的IL-12 Fc变体(诸如例如Y40A/D126A和Y40A/R129A)与这些标志物的相对较高表达(如通过MFI或阳性细胞百分比确定)相关,而“较低效力”的IL-12 Fc变体(诸如例如Y40A/K168A和Y40A/P127A/K168A)与这些标志物的相对较低表达相关。与体外培养实验中观察到的结果类似(参见例如实施例9),“较高效力”的IL-12 Fc变体也与从幼稚至活化/记忆表型的转变相关,如通过CD45RA+CD45RO-细胞比例的降低所确定,这在0.01mg/kg剂量下特别明显。总体而言,这些数据指示“较低效力”的IL-12变体与血液中T细胞活化和增殖降低相关,并且因此可用于降低与全身性IL-12递送相关的毒性。

[0681] 图49显示了描绘血浆IFNγ浓度(如通过Luminex测定确定)的数据。在0.1mg/kg剂量下,血浆中的IFNγ水平在288小时时达到峰值,然后在下一个测量时间点(576小时)显著下降。相反,注射了效力降低的IL-12 Fc变体的小鼠表现出不同的药效学概况,其中在288小时时的IFNγ水平低于野生型IL-12 Fc观察到的水平并且与IL-12效力相关(Y40A/D126A大约为野生型的79%;Y40A/R129A大约为野生型的69%;Y40A/K168A大约为野生型的43%;Y40A/P127A/K168A大约为野生型的44%)。此外,在用效力降低的IL-12 Fc变体治疗的小鼠的血浆中,在576小时时IFNγ水平没有下降,而是维持不变,或在一些情况下略有升高,指示作用持续时间延长。

[0682] 图50显示了描绘血浆IL-12 Fc浓度(如通过检测IL-12 p40的Luminex测定确定)的数据。野生型IL-12 Fc水平在第7天(168小时)施用第二个剂量后立即急剧上升,在192-

240小时之间达到峰值,但然后急剧下降,这可能是由于与同种反应性T细胞快速扩增相关的靶标介导的药物处置所致。相反,效力降低的IL-12 Fc变体在192-240小时时表现出更高的峰值,并且随后IL-12 Fc血浆浓度表现出更渐进的降低。这种影响的程度与效力相关,其中表现出效力降低较大的变体(Y40A/K168A和Y40A/P127A/K168A)显示出最大的IL-12 Fc血浆水平升高,而表现出更适度效力降低的变体(Y40A/D126A和Y40A/R129A)显示出中等IL-12 Fc血浆水平。总体而言,这些数据证明,效力降低的IL-12 Fc变体在体内表现出若干期望特性,包括但不限于降低与全身性T细胞活化相关的毒性、延长血浆半衰期以及增加作用持续时间。这些特性最终可增强对人疾病(诸如例如癌症)的治疗用途。

[0683] K.实施例11-效力降低的IL-12 Fc突变体的体内抗肿瘤活性

[0684] 随后使用人T细胞过继转移模型在体内研究了示例性效力降低IL-12 Fc突变体(Y40A/P127A/K168A)的抗肿瘤活性。给雌性NSG小鼠(每个治疗组n=5-6)皮下注射2x10^5个HCT116人结肠直肠癌细胞,所述细胞经过工程化以表达HLA-A2、β2-微球蛋白和变体(A4)NY-ESO-1肽的单链三聚体(SEQ ID NO:291,如图81中所示)。十四天后(第0天),对小鼠进行1Gy全身照射,并且静脉内注射2.5x10^6个PBMC衍生的原代T细胞,所述细胞已用600U/ml IL-2和30ng/ml抗CD3(克隆OKT3)活化,并且用HLA-A2/NY-ESO-1的高亲和力变体限制性1G4 T细胞受体(TCR)转导(SEQ ID NO:292,如图81中所示)。为了预防移植物抗宿主病,在通过电穿孔介导递送靶向TRAC基因的重组Cas9/sgRNA核糖核蛋白进行转导之前,T细胞内的内源性TCRα的表达被消除。除了过继性T细胞疗法外,一些小鼠还在第0、7、14和21天接受野生型IL-12 Fc(0.01或0.3mg/kg)或IL-12 Fc Y40A/P127A/K168A突变体(0.1、0.3或1mg/kg)的腹膜内注射。在第1天以及随后每次施用IL-12 Fc之前立即对小鼠的血液进行取样,以允许经由Luminex测定分析免疫细胞表型和血浆IL-12和IFNγ水平,其结果描绘于图51-54中。图55描绘了肿瘤生长曲线,并且图56提供了第18天记录的肿瘤大小总结。

[0685] 总体而言,数据证明,与仅有T细胞的对照相比,效力降低的IL-12 Fc Y40A/P127A/K168A突变体能够显著降低小鼠的肿瘤负担。此外,相对于WT IL-12 Fc,效力降低的IL-12 Fc突变体表现出有利的药代动力学和药效学特征。例如,尽管采用每周给药方案,但WT IL-12 Fc的血浆浓度在整个实验过程中都降低,这与Y40A/P127A/K168A突变体直接相反,Y40A/P127A/K168A突变体的循环水平一直维持至第21天。此外,在第7天,Y40A/P127A/K168A突变体导致较低的血浆中的IFNγ水平,并且降低了外周T细胞的扩增和活化,如通过$CD4^+$和$CD8^+$细胞数量以及相对于用WT IL-12 Fc治疗的小鼠,活化(T-bet)、细胞毒性(颗粒酶B)、增殖(Ki-67)以及$CD8^+$T细胞中的成熟和耗竭($CD45RA^+CD45RO^-$、Lag3、PD-1)标志物的表达变化所证明。尽管在用IL-12 Fc Y40A/P127A/K168A突变体治疗的小鼠中,血浆IFNγ水平和$CD8^+$T细胞活化状态在后期时间点确实有所增加,但总的来说,这些数据指示本发明的效力降低的IL-12 Fc变体具有改善的毒性概况,并且可以比WT IL-12 Fc更低的间隔频率给药。这些特征有利于在临床环境中治疗人疾病。

[0686] L.实施例12-额外(非丙氨酸)IL-12 Fc突变体

[0687] 虽然在IL-12(p35)的位置40、126、127、129、168和170处的丙氨酸突变可能经由损失与IL-12Rβ2的分子相互作用而降低其效力,但在这些相同位置处引入其他(非丙氨酸)氨基酸也可能或多或少地影响IL-12的效力。例如,将庞大(large/bulky)残基引入IL-12 p35中可在空间上阻碍与IL-12Rβ2的相互作用,而带电荷侧链可产生吸引力或排斥力。然而,在

不存在IL-12/IL-12Rβ2复合物的高分辨率结构的情况下,IL-12 p35取代的功能效应很难预测。因此,产生了一系列IL-12 Fc突变体,其中p35亚基结构域的位置40、126、127、129、168和170个别地突变为19种可能的氨基酸(统称为“非丙氨酸突变体”)中的每一者(除丙氨酸突变体外)。由于在D126、P127、R129和K168处的丙氨酸取代的影响相对适度,因此在这些位置处的突变掺入进一步包含Y40A取代的p35亚基结构域中。将IL-12 Fc“非丙氨酸突变体”引入如实施例8中所述的相同IL-12 Fc构型中,但不同之处在于将额外突变引入IL-12 p35亚基结构域(C74S)和IL-12 p40亚基结构域(C177S)以去除亚基之间的链间二硫键,因为观察到这些修饰改善了产量而不影响IL-12的活性或稳定性。

[0688] IL-12 Fc“非丙氨酸突变体”通过瞬时转染2.5mL expi-CHO细胞培养物来表达,使用蛋白质A琼脂糖树脂以批量模式纯化,并且通过AlphaLISA人IgG Fc检测试剂盒进行量化。还使用SDS-PAGE目视验证了每种非丙氨酸突变体的完整性(参见例如图57和58)。为了提供效力测量,将单一浓度(Y40X和K170X为20pM,并且Y40A/D126X、Y40A/R129X和Y40A/K168X为80pM,其中“X”指示任何氨基酸(K170Q除外))的每种纯化IL-12 Fc“非丙氨酸突变体”与活化的原代T细胞一起孵育,如实施例5中所述,并且使用AlphaLISA检测IFNγ分泌。纯化的野生型IL-12 Fc以及未受刺激的对照和“无DNA”样品(代表进行过与“非丙氨酸突变体”相同的纯化程序的条件expi-CHO培养基)被包括在内作为额外的对照。图59-64描绘了AlphaLISA计数图(作为IFNγ产生的读数)。总体而言,观察到不同的“非丙氨酸突变体”表现出一系列不同的明显活性。对于位置40,与Y40Y相比活性降低的氨基酸取代是:(i)Ala(A;丙氨酸)、(ii)Cys(C;半胱氨酸)、(iii)Asp(D;天冬氨酸)、(iv)Glu(E;谷氨酸)、(v)Gly(G;甘氨酸)、(vi)Lys(K;赖氨酸)、(vii)Asn(N;天冬酰胺)、(viii)Pro(P;脯氨酸)、(ix)Gln(Q;谷氨酰胺)、(x)Arg(R;精氨酸)、(xi)Ser(S;丝氨酸)和(xii)Thr(T;苏氨酸)。对于位置126,与Y40A/D126D相比活性降低的氨基酸是:(i)Ala、(ii)Cys、(iii)Glu、(iv)Phe(F;苯丙氨酸)、(v)Gly、(vi)Ile(I;异亮氨酸)、(vii)Lys、(viii)Leu(L;亮氨酸)、(ix)Met(M;蛋氨酸)、(x)Asn、(xi)Pro、(xii)Gln、(xiii)Arg、(xiv)Ser、(xv)Thr、(xvi)Val(V;缬氨酸)和(xvii)Trp(W;色氨酸)。对于位置127,与Y40A/P127P相比活性降低的氨基酸是:(i)Ala、(ii)Cys、(iii)Asp、(iv)Glu、(v)Phe、(vi)Gly、(vii)His(H;组氨酸)、(viii)Lys、(iv)Met、(x)Asn、(xi)Gln、(xii)Arg和(xiii)Ser。对于位置129,与Y40A/R129R相比活性降低的氨基酸是:(i)Ala、(ii)Cys、(iii)Asp、(iv)Glu、(v)Phe、(vi)Gly、(vii)His、(viii)Ile、(ix)Lys、(x)Leu、(xi)Met、(xii)Asn、(xiii)Pro、(xiv)Gln、(xv)Ser、(xvi)Thr、(xvii)Val、(xviii)Trp和(xix)Tyr(Y)。对于位置168,与Y40A/K168K相比活性降低的氨基酸是:(i)Ala、(ii)Cys、(iii)Asp、(iv)Glu、(v)Phe、(vi)Gly、(vii)His、(viii)Ile、(ix)Leu、(x)Met、(xi)Asn、(xii)Pro、(xiii)Gln、(xiv)Ser、(xv)Thr、(xvi)Trp和(xvii)Tyr。对于位置170,与K170K相比活性降低的氨基酸是:(i)Ala、(ii)Cys、(iii)Asp、(iv)Glu、(v)Phe、(vi)Gly、(vii)Ile、(viii)Leu、(ix)Met、(x)Asn、(xi)Pro、(xii)Ser、(xiii)Thr、(xiv)Val和(xv)Trp。

[0689] 为了进一步证实非丙氨酸突变体的效力,评估了暴露于若干浓度的所选IL-12 Fc非丙氨酸突变体(包括Y40X单一突变体和Y40A/K168X双重突变体(其中X指示可变氨基酸))的T细胞的IFNγ产生。经由人IFNγ AlphaLISA检测试剂盒测量IFNγ产生。图65描绘了AlphaLISA计数图,并且图66提供了计算的EC50值的总结。总体而言,每个测试的突变体都

表现出比WT IL-12 Fc更弱的效力,并且EC_{50}值的倍数变化与在单一浓度下测试突变体时观察到的效力降低的幅度直接相关(数据描绘于图59和63),从而验证了筛选非丙氨酸突变体效力的初始方法。

[0690] M.实施例13-IL-12 Fc突变体的热稳定性

[0691] 为了研究在位置40、126、127、129、168或170处的丙氨酸取代是否影响IL-12 p35亚基的稳定性,使用NanoTemper Prometheus nano DSF进行了差示扫描荧光法(DSF)来测量热诱导的蛋白质解折叠。将野生型IL-12 Fc和在位置40、126、127、129、168或170处含有个别丙氨酸突变的IL-12 Fc在包含20mM磷酸钠(pH 7.5)和150mM NaCl的缓冲液中以0.2-0.4mg/mL的浓度以1℃/min的速率加热至110℃。图67描绘了描绘F350:F330比率的一阶导数随温度变化的数据。观察到野生型IL-12 Fc经历两次不同的热解折叠事件,第一次(熔化温度(T_M)大约为60℃)可能对应于IL-12亚基,而第二次(T_M大约为80℃)可能对应于Fc亚基。虽然若干丙氨酸单一突变体(包括Y40A、R129A、K168A和K170A)表现出与野生型IL-12 Fc类似的热解折叠概况,但引入D126A或P127A改变了IL-12异二聚体的稳定性,现在观察到它经历两次不同的热解折叠事件,熔化温度大约为55℃(IL-12 p35亚基)和64℃(IL-12 p40亚基)。因此,在位置D126或P127处的丙氨酸取代降低IL-12 p35亚基的热稳定性,而在IL-12 p35的位置Y40、R129、K168和K170处的丙氨酸取代不会对IL-12的稳定性产生不利影响。

[0692] 随后使用功能读数评估实施例12中产生的所选非丙氨酸IL-12突变体的热稳定性。此处,每个测试制品在46、52、58、64、70或76℃下热处理15分钟,并且测量每个处理过的样品刺激活化的原代T细胞产生IFNγ的能力。使用PBS对照样品减去基线后,将每个测试制品/处理条件的AlphaLISA计数(作为IFNγ的读数)绘制为相对于其在46℃下或未处理样品中的值的百分比。图68显示了所选温度步骤的数据。通过增加温度进行预处理导致所有样品的T细胞IFNγ产生降低。然而,在所检测的各种突变体中,IFNγ水平随温度增加而下降的速率变化显著。在测试的样品中,被视为具有热稳定性的样品是:Y40A、Y40E、Y40G、Y40P、Y40Q、Y40R、Y40S、Y40T、D126G、D126L、D126P、D126S、D126T、D126V、P127C、P127D、P127E、R129A、R129D、R129E、R129F、R129I、R129K、R129L、R129P、R129Q、R129T、R129W、R129Y、K168A、K168D、K168E、K168I、K168M、K168Q、K168T、K170A、K170L、K170M、K170P、K170S、K170T和K170W。

[0693] N.实施例14-热稳定性IL-12 Fc变体

[0694] 在实施例13中描述的实验之后,选择了二十五种不同的IL-12单一突变体或双重突变体进行进一步深入表征,所述突变体(1)被假设涵盖一系列效力并且(2)预计具有热稳定性。这些统称为“热稳定性突变体系列”。如实施例8中所述表达并且纯化“热稳定性突变体系列”,并且进行DSF分析,其结果总结于图69中。“热稳定性突变体系列”的每个成员都表现出与野生型IL-12 Fc基本同一的热解折叠概况,由发生在大约63℃的第一次解折叠事件(TM_1)和发生在大约80℃的第二次解折叠事件(TM_2)组成。这些数据证实了实施例13中关于热稳定性所证明的发现,并且指示将两个个别的热稳定性突变体组合以产生双重突变体不会对IL-12的热稳定性产生不利影响。

[0695] 接下来,使用原代T细胞IFNγ测定评估“热稳定性突变体系列”中个别成员的效力。图70显示了来自单一供体的结果的代表性实例,并且图71总结了来自四个独立供体的数据。“热稳定性突变体系列”的所有成员均表现出相对于野生型IL-12 Fc的降低的效力,

范围为从比野生型IL-12 Fc低大约3倍(对于Y40S)至比野生型IL-12 Fc低大约4,100倍(对于Y40S/K170A)。

[0696] O.实施例15-IL-12 Fc突变体在体外增强T细胞对癌细胞的杀伤

[0697] 为了进一步研究所选IL-12 Fc突变体的功能特征,进行了体外T细胞杀伤测定。此处,1G4转导的、T细胞受体α链恒定区(TRAC)敲除的原代T细胞用50U/mL IL-2和0.01-10ng/mL野生型IL-12 Fc或每个"热稳定性突变体系列"预处理过夜,单一确定的浓度是根据其预期效力选择的。第二天,将T细胞重新悬浮于含有50U/mL IL-2的培养基中,并且添加至含有12,500个HCT-116细胞的孔中,所述细胞表达HLA-A2 NY-ESO-1A4变体单链三聚体和绿色荧光蛋白(GFP)(以2.5:1的效应子:靶标(E:T)比率粘附过夜)。将细胞混合物放入Incucyte中,并且通过量化16h时段内的GFP强度来监测活HCT-116细胞的汇合度。图72显示了野生型IL-12 Fc滴定的杀伤曲线,并且图73代表了在8h时间点所有测试样品的GFP汇合度的量化。总体而言,与野生型IL-12 Fc预孵育导致T细胞杀伤呈剂量依赖性增加,所述增加在共培养后2h就很明显了,并且在实验的整个16h时间框架内持续存在。为了量化IL-12 Fc突变体的活性,将8h时间点的已知野生型IL-12 Fc浓度的数据拟合至GraphPad Prism中的4参数逻辑曲线。利用此标准曲线,可计算出每种IL-12 Fc变体的插值浓度(使用它们在8h时间点观察到的汇合度)。然后通过将已知的IL-12 Fc变体浓度除以从标准曲线得出的插值浓度来计算每种IL-12 Fc变体的效力的倍数降低(描绘于图74中)。

[0698] P.实施例16-额外热稳定性IL-12 Fc突变体

[0699] 随后设计了额外一组预计具有热稳定性的IL-12 Fc突变体(基于实施例13中概述的数据)。如实施例8中所述表达并且纯化额外IL-12 Fc突变体,并且进行DSF分析,其结果总结于图75中。所测试的IL-12 Fc突变体的每个成员都表现出与野生型IL-12 Fc基本同一的热解折叠概况,由发生在大约63℃的第一次解折叠事件(TM_1)和发生在大约80℃的第二次解折叠事件(TM_2)组成。因此,这些突变体被认为具有热稳定性。

[0700] 我们还使用原代T细胞IFNγ测定评估了额外IL-12 Fc热稳定性突变体的效力,其数据总结于图76中。额外IL-12 Fc热稳定性突变体中的每一者均表现出相对于野生型IL-12 Fc的降低的效力,范围为从比野生型IL-12 Fc低大约2.5倍(对于K170T)至比野生型IL-12 Fc低大约35,953倍(对于K170P/R129E)。

[0701] Q.实施例17-p40-Fc(杵)/p35-Fc(臼)构型的低效力IL-12 Fc突变体

[0702] 随后,产生了额外一组替代构型的IL-12 p35突变体(Y40G/K170A、Y40P/K170A、Y40E/K170A),其中p40亚基附接至含有杵突变的Fc链,而p35亚基附接至含有臼突变的Fc链(图77)。作为对照,产生了相同p40-Fc(杵)/p35-Fc(臼)构型的野生型IL-12 Fc,并且比较了此分子与p40-Fc(臼)/p35-Fc(杵)构型的野生型IL-12 Fc的效力。在T细胞IFNγ测定中,观察到测试的两种野生型IL-12 Fc构型(p40-Fc(杵)/p35-Fc(臼)和p40-Fc(臼)/p35-Fc(杵))具有同一活性(EC_{50}为4.3pM)(图82和83)。另外,每个IL-12 p35双重突变体(Y40G/K170A、Y40P/K170A和Y40E/K170A)都会在p40-Fc(杵)/p35-Fc(臼)构型的背景中降低IL-12 Fc的效力(图82和83)。因此,发现了三种额外低效力IL-12 Fc突变体(与野生型IL-12 Fc相比,活性弱大约7,128倍至237,937倍的范围内),并且证明改变IL-12 Fc构型(p40-Fc(杵)/p35-Fc(臼)与p40-Fc(臼)/p35-Fc(杵))不会影响本发明的功能属性。

人IL-12亚基α (IL-12 p35)前体序列 (SEQ ID NO: 1)

MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKD
KTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF
LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 2)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

人IL-12亚基β (IL-12 p40)前体序列 (SEQ ID NO: 3)

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTI
QVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF
SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRD
IIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISV
RAQDRYYSSSWSEWASVPCS

人IL-12亚基β (IL-12 p40)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 4)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

图1

人IL-12受体β1序列 (SEQ ID NO: 5)

MEPLVTWVVPLLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFL
RCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQ
LRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCV
PPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRRLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPY
LSGAAYNVAVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSL
TAPQDPDPAGMATYSWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSV
SVDWAPSLLSTCPGVLKEYVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSI
EVQVSDWLIFFASLGSFLSILLVGVLGYLGLNRAARHLCPPLPTPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEASLQEA
LVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCKAKM

人IL-12受体β1胞外结构域 (SEQ ID NO: 6)

CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFS
DQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTP
SSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRR
RLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFGPGLNQT
WHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATYSWSRESGAM
GQEKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPGVLKEYVVRC
RDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSD

人IL-12受体β2序列 (SEQ ID NO: 7)

MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRI
NFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLY
TEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIR
IKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDW
SESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHIDYSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQNITGHTSWTT
VIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELH
PGGDTQVPLNWLRSRPYNVSALISENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITEEKGSILI
SWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQLCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFC
LQGKANWMAFVAPSICIAIIMVGIFSTHYFQQKVFVLLAALRPQWCSREIPDPANSTCAKKYPIAEEKTQLPLDRLL
IDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLYKVL
ESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDK
LTLDQLKMRCDSLML

人IL-12受体β2胞外结构域 (SEQ ID NO: 8)

KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFV
CKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIY
CDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLL
NRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMK
RHIDYSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQNITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLP
TRINIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYNVSALI
SENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITEEKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKE
RDSNSQPQLCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCLQGKAN

图2

人IgG1 Fc - G1m同种异型序列(SEQ ID NO: 9)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

人IgG1 Fc -具有N297G突变体序列的杵(SEQ ID NO: 10)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYG
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

人IgG1 Fc -具有N297G突变体序列的臼(SEQ ID NO: 11)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYG
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

人IgG1 Fc -具有C220S和LFLEPS突变体序列的杵(SEQ ID NO: 12)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

人IgG1 Fc -具有C220S和LFLEPS突变体序列的臼(SEQ ID NO: 13)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图3

结构域接头

名称	SEQ ID NO:	序列
(G4S)	14	GGGGS
(G4S)2	15	GGGGSGGGGS
(G4S)3	16	GGGGSGGGGSGGGGS
TR(G4S)3	17	TRGGGGSGGGGSGGGGS
(G4S)4	18	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
(G4S)5	19	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
(G4S)6	20	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
(G4S)7	21	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
(G4S)8	22	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
Whitlow	23	GSTSGSGKPGSGEGSTKG

图4

具有Y40A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 24**)

具有T43A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 25**)

具有D126A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 26**)

具有P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 27**)

具有R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 28**)

具有K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 29**)

图5

具有Y40A/T43A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 30**)

具有Y40A/D126A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 31**)

具有Y40A/P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 32**)

具有Y40A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 33**)

具有Y40A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 34**)

具有T43A/D126A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 35**)

具有T43A/P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 36**)

具有T43A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 37**)

具有T43A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 38**)

具有D126A/P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 39**)

具有D126A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 40**)

图6A

具有D126A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 41**)

具有P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 42**)

具有P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 43**)

具有R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 44**)

图6B

具有Y40A/T43A/D126A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 45**)

具有Y40A/T43A/P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 46**)

具有Y40A/T43A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 47**)

具有Y40A/T43A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 48**)

具有Y40A/D126A/P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 49**)

具有Y40A/D126A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 50**)

具有Y40A/D126A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 51**)

具有Y40A/P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 52**)

具有Y40A/P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 53**)

具有Y40A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 54**)

具有T43A/D126A/P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 55**)

图7A

具有T43A/D126A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 56**)

具有T43A/D126A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 57**)

具有T43A/P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 58**)

具有T43A/P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 59**)

具有T43A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 60**)

具有D126A/P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 61**)

具有D126A/P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 62**)

具有D126A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 63**)

具有P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 64**)

图7B

具有Y40A/T43A/D126A/P127A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 65**)

具有Y40A/T43A/D126A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 66**)

具有Y40A/T43A/D126A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 67**)

具有Y40A/T43A/P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 68**)

具有Y40A/T43A/P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 69**)

具有Y40A/T43A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 70**)

具有Y40A/D126A/P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 71**)

具有Y40A/D126A/P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 72**)

具有Y40A/D126A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 73**)

具有Y40A/P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 74**)

具有T43A/D126A/P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 75**)

图8A

具有T43A/D126A/P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 76**)

具有T43A/D126A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 77**)

具有T43A/P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 78**)

具有D126A/P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 79**)

图8B

具有Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 80**)

具有Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 81**)

具有Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 82**)

具有Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 83**)

具有Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 84**)

具有T43A/D126A/P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 85**)

具有Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 86**)

具有C74S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESSLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 87**)

图9

具有C177S突变的人IL-12亚基β (IL-12 p40)成熟形式序列（SEQ ID NO: 88）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

具有C252S突变的人IL-12亚基β (IL-12 p40)成熟形式序列（SEQ ID NO: 89）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

具有C177S/C252S突变的人IL-12亚基β (IL-12 p40)成熟形式序列（SEQ ID NO: 90）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSASPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

图10

IL12(Y40A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A（SEQ ID NO: 91）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc 臼 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(T43A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 T43A（SEQ ID NO: 93）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(D126A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 D126A（SEQ ID NO: 94）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图11A

IL12(D126A)-Fc（续）

hIgG1 Fc白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(P127A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 P127A（SEQ ID NO: 95）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc白C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(R129A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 R129A（SEQ ID NO: 96）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc白C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

图11B

IL12(K168A)-Fc

hIgG1 Fc 杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 K168A（SEQ ID NO: 97）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc 臼C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(Y40A/D126A)-Fc

hIgG1 Fc 杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/D126A（SEQ ID NO: 98）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc 臼C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(Y40A/P127A)-Fc

hIgG1 Fc 杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/P127A（SEQ ID NO: 99）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图11C

IL12(Y40A/P127A)-Fc (续)

hIgG1 Fc 白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 (SEQ ID NO: 92)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(Y40A/D126A/P127A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/D126A/P127A (SEQ ID NO: 100)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc 白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 (SEQ ID NO: 92)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

IL12(Y40A/T43A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/T43A (SEQ ID NO: 101)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 (SEQ ID NO: 92)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

图11D

IL12(Y40A/T43A/D126A/P127A)-Fc

hIgG1 Fc 白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/T43A/P126A/D127A（SEQ ID NO: 102）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS/GGGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc 杵C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40（SEQ ID NO: 92）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS/G
GGGSGGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT
KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG

图11E

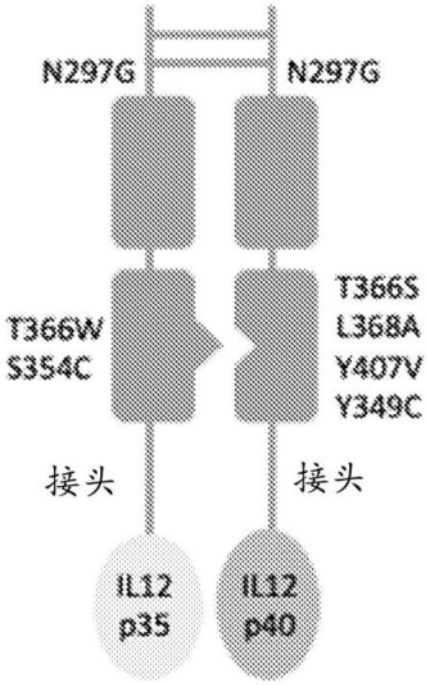


图12

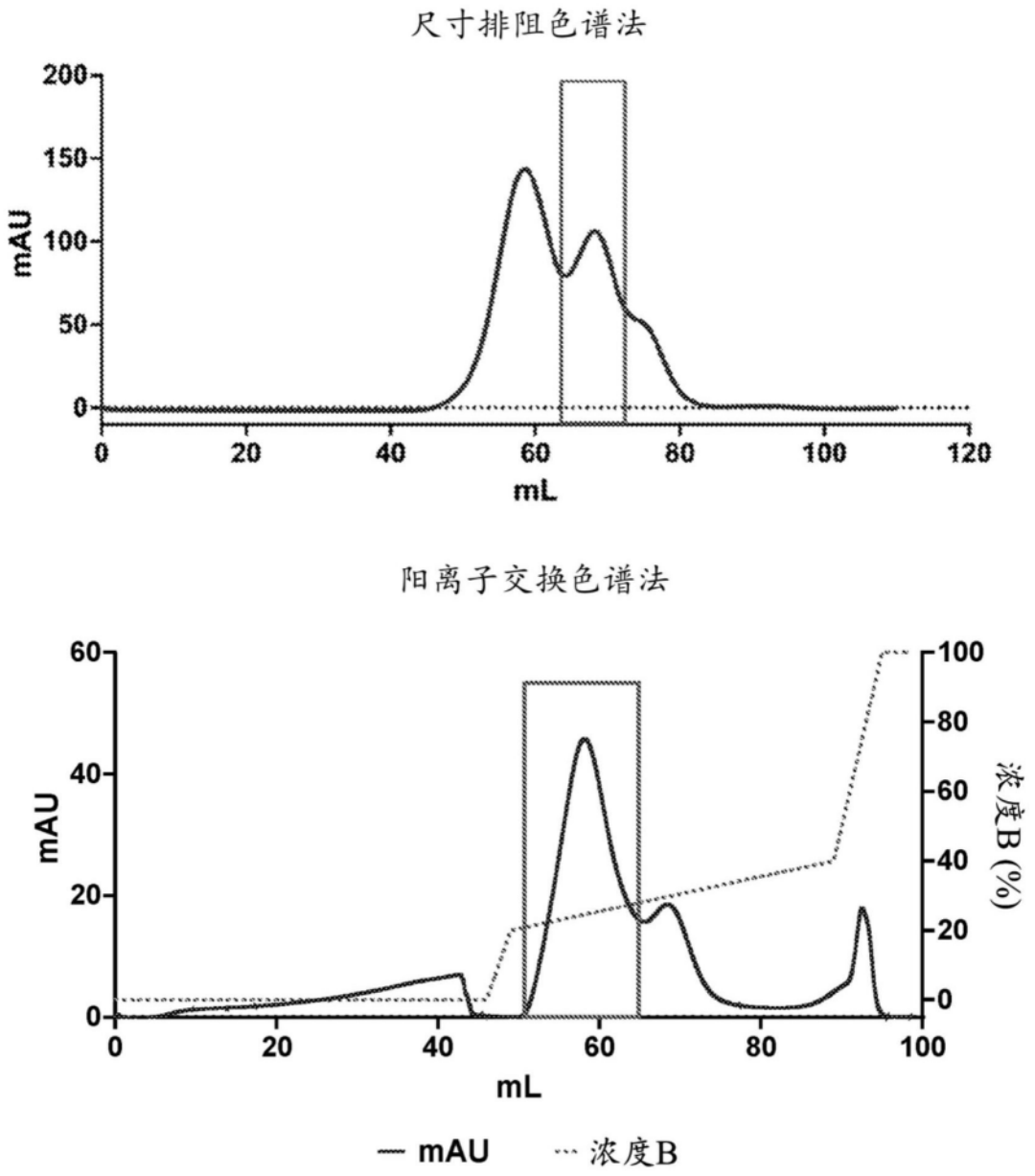


图13

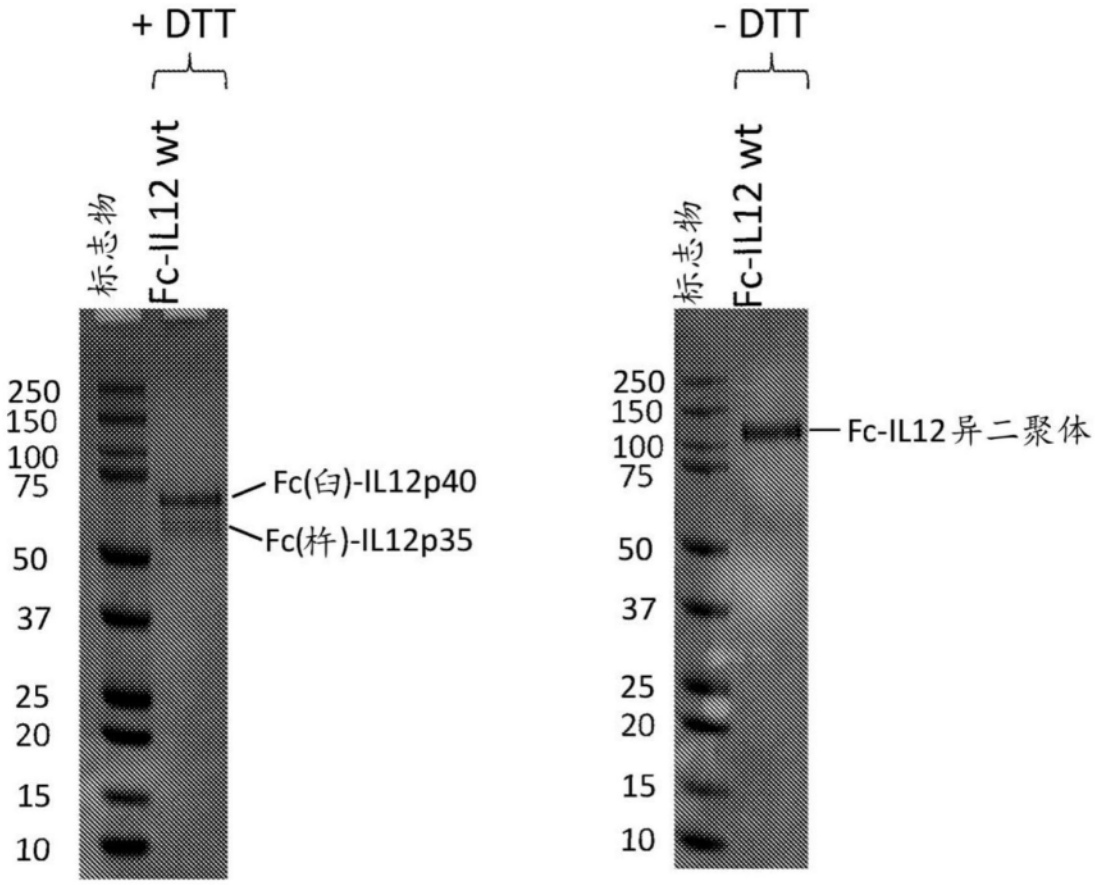

+ DTT
- DTT
标志物
Fc-IL12 wt
标志物
Fc-IL12 wt
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Fc(白)-IL12p40
Fc(杵)-IL12p35
Fc-IL12异二聚体

图14

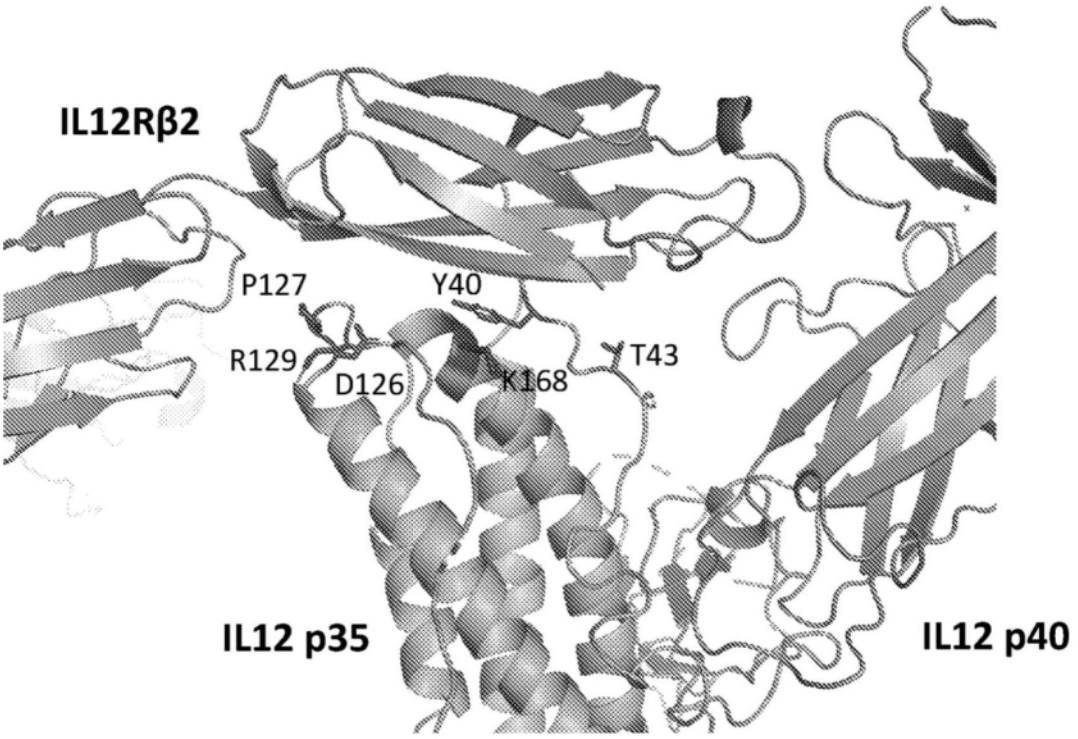


图15

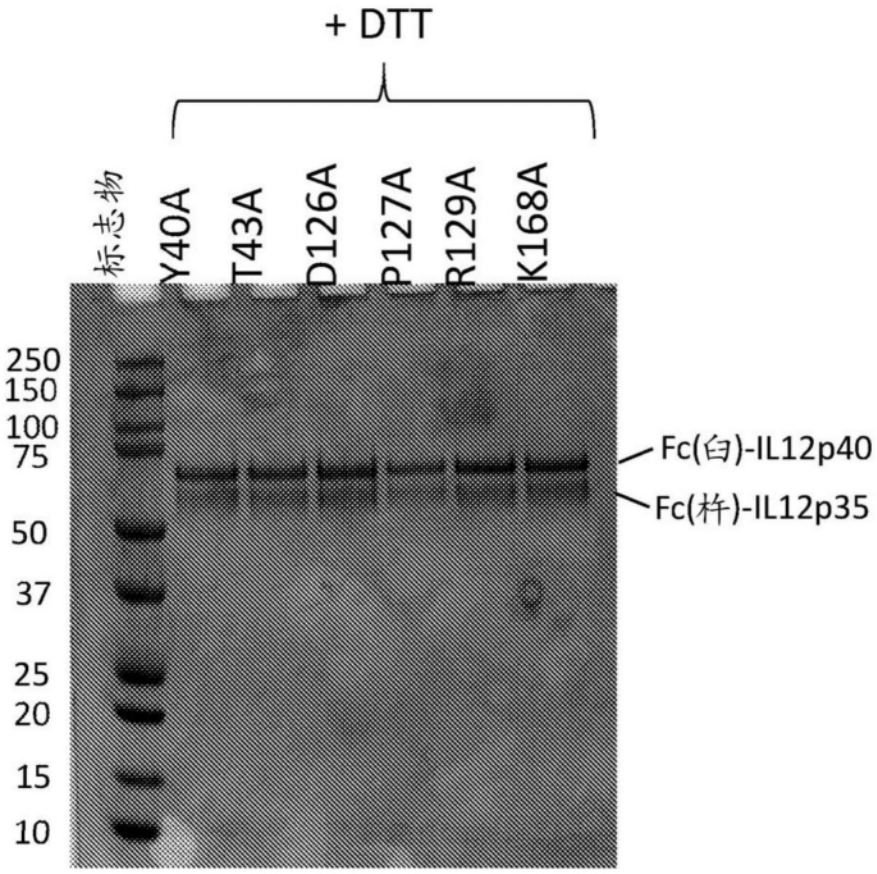

+ DTT
标志物
Y40A
T43A
D126A
P127A
R129A
K168A
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Fc(白)-IL12p40
Fc(杵)-IL12p35

图16A

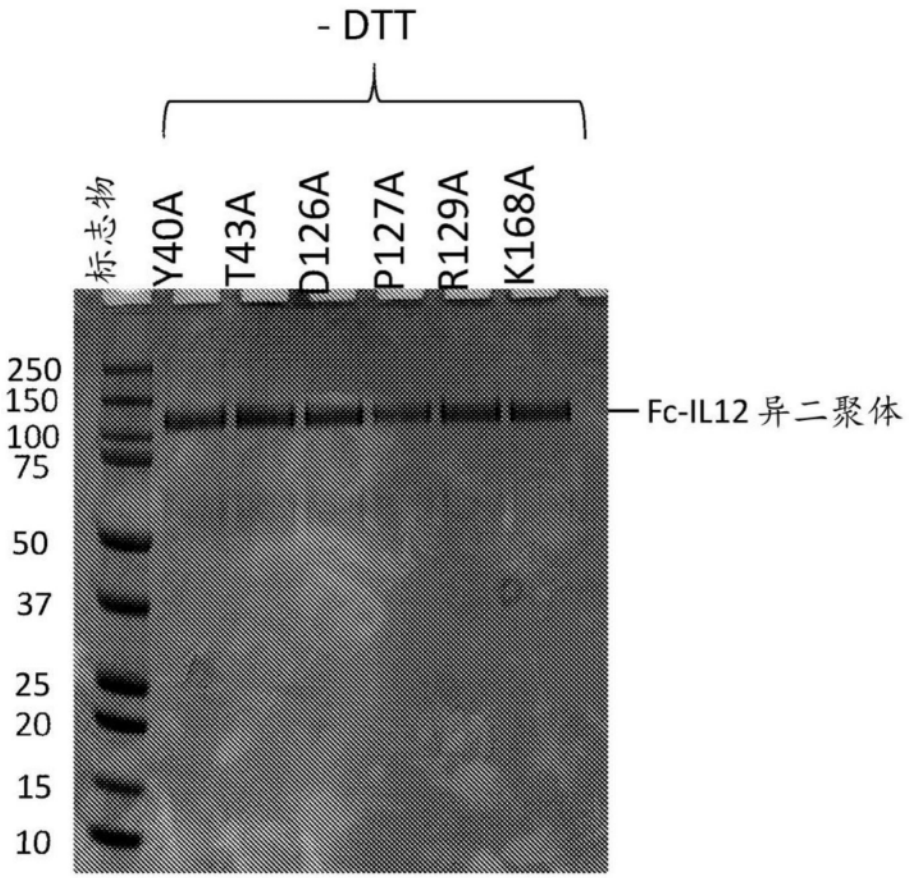

- DTT
标志物
Y40A
T43A
D126A
P127A
R129A
K168A
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Fc-IL12 异二聚体

图16B

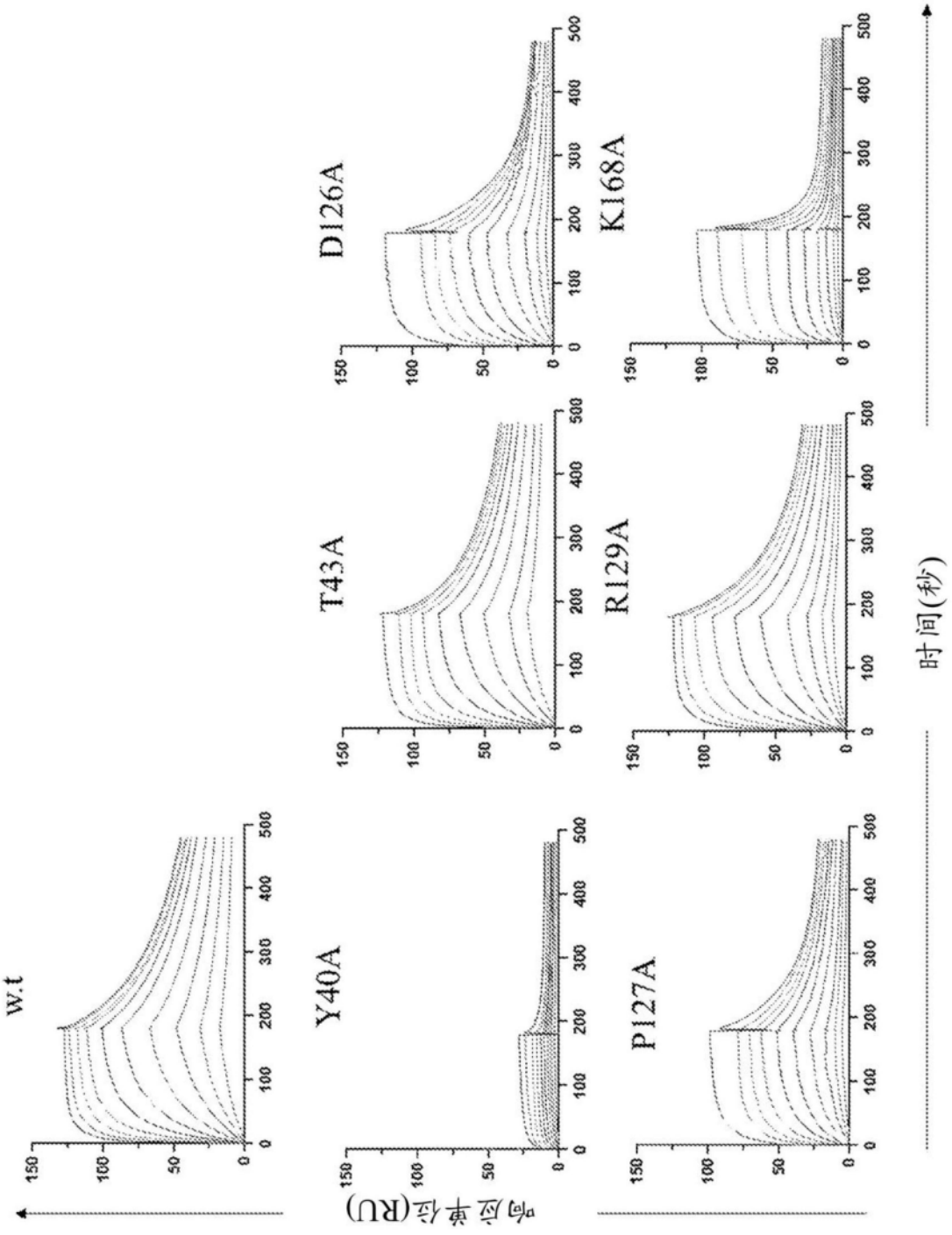


图17

样品	捕获(RU)	K_D (nM)
w.t.	295	13.1
Y40A	275	弱
T43A	245	20.6
D126A	220	42.9
P127A	190	44.3
R129A	275	38.5
K168A	230	130

图18

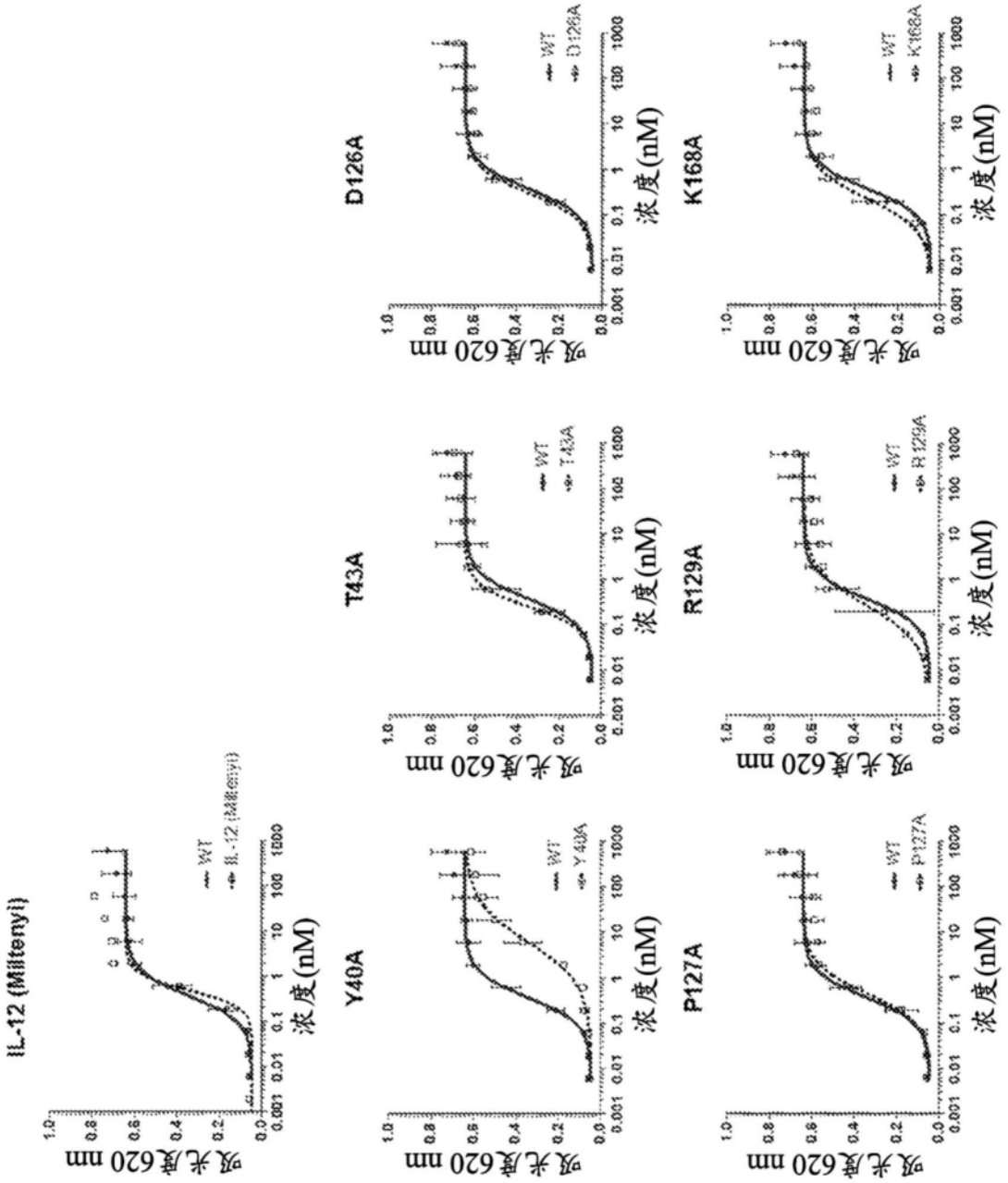

IL-12 (Miltenyi)
WT
IL-12 (Miltenyi)
Y40A
WT
Y40A
T43A
WT
T43A
D126A
WT
D126A
R129A
WT
R129A
K168A
WT
K168A
P127A
WT
P127A
双光层620 nm
浓度(nM)

图19

样品	HEK-Blue EC50 (nM)	倍数变化 (相对于w.t.)
IL-12 (Miltenyi)	0.49	1.3
w.t.	0.37	1.0
Y40A	6.2	16.8
T43A	0.25	0.67
D126A	0.29	0.78
P127A	0.45	1.2
R129A	0.26	0.7
K168A	0.22	0.6

图20

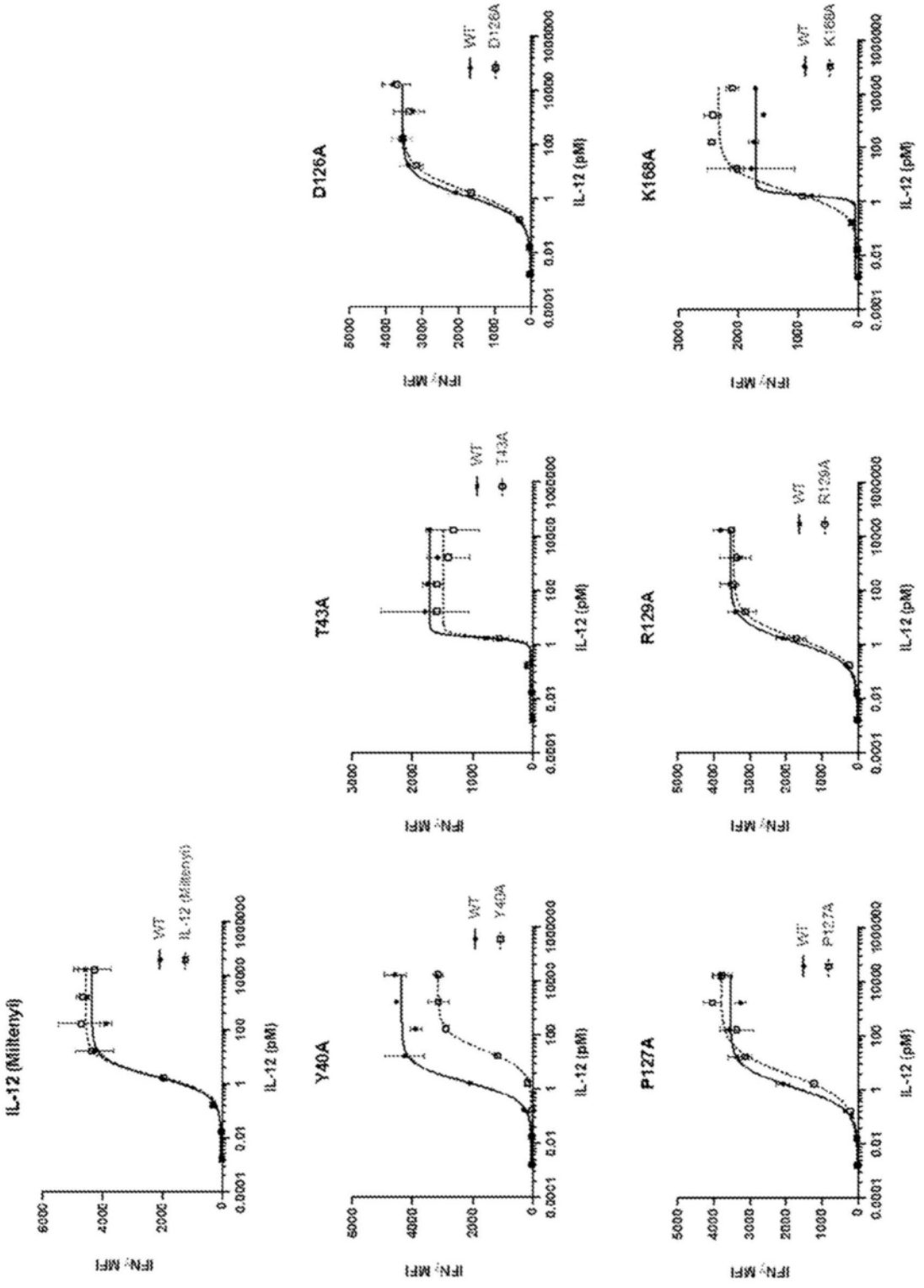

IL-12 (Millenyi)
WT
IL-12 (Millenyi)
IFNγ MFI
IL-12 (pM)
D126A
WT
D126A
K168A
WT
K168A
T43A
WT
T43A
R129A
WT
R129A
Y40A
WT
Y40A
P127A
WT
P127A

图21

样品	w.t. EC50 (pM)	样品EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t)
IL-12 (Miltenyi)	1.79	2.05	1.15
Y40A	1.79	25.84	14.44
T43A	1.74	1.83	1.05
D126A	1.24	1.94	1.56
P127A	1.24	3.64	2.93
R129A	1.24	1.76	1.42
K168A	1.74	2.47	1.42

图22

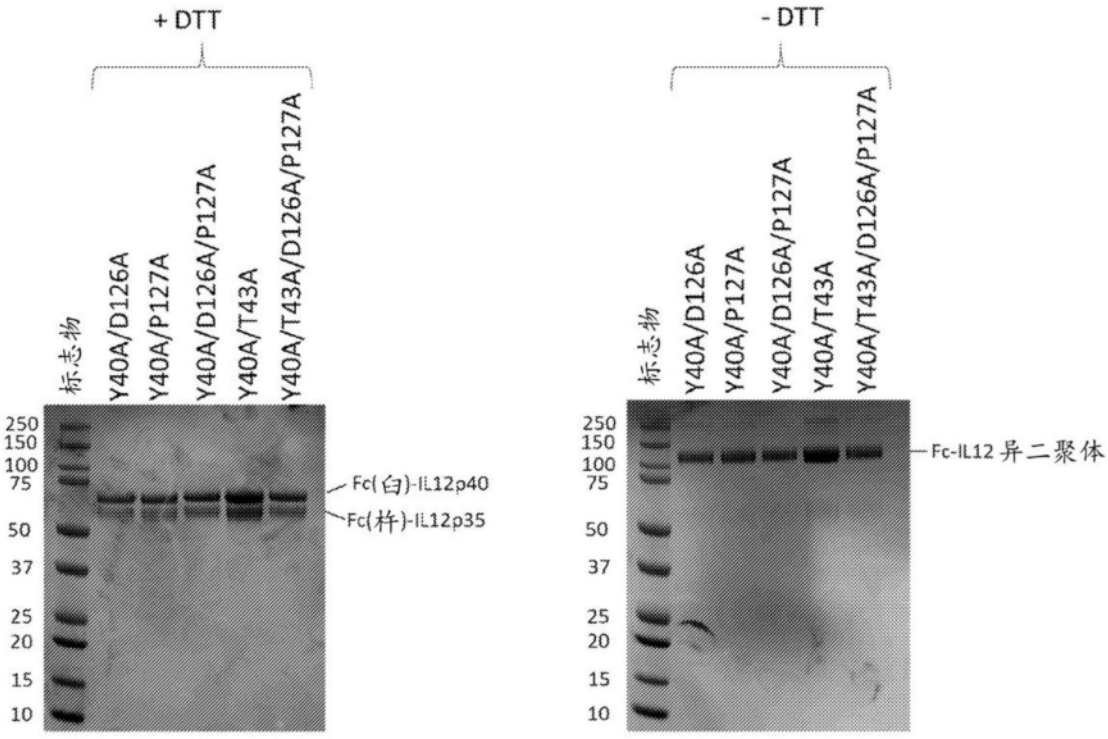


图23

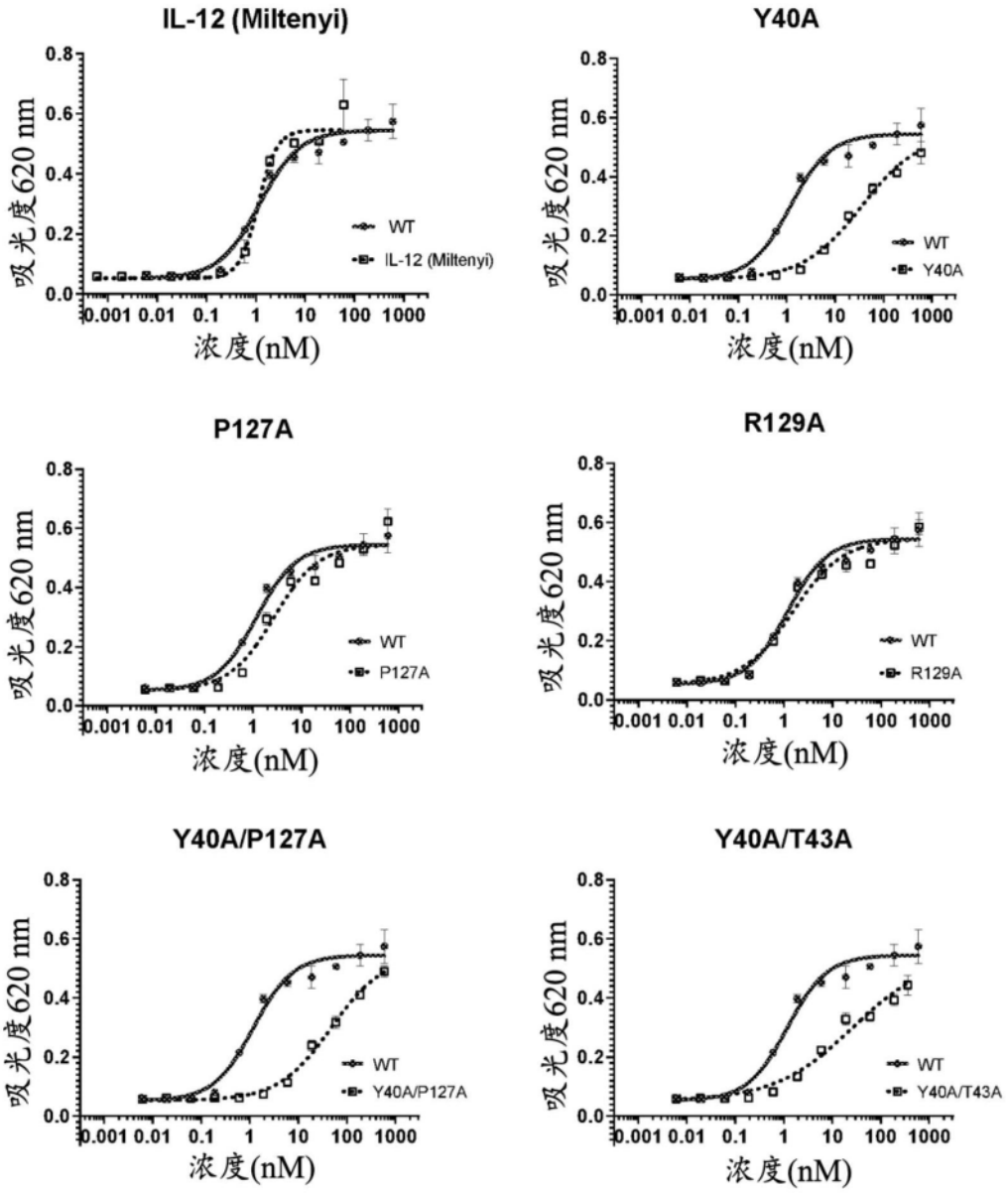

IL-12 (Miltenyi)
Y40A
P127A
R129A
Y40A/P127A
Y40A/T43A
吸光度620 nm
浓度(nM)
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8
WT
IL-12 (Miltenyi)
Y40A
P127A
R129A
Y40A/P127A
Y40A/T43A

图24A

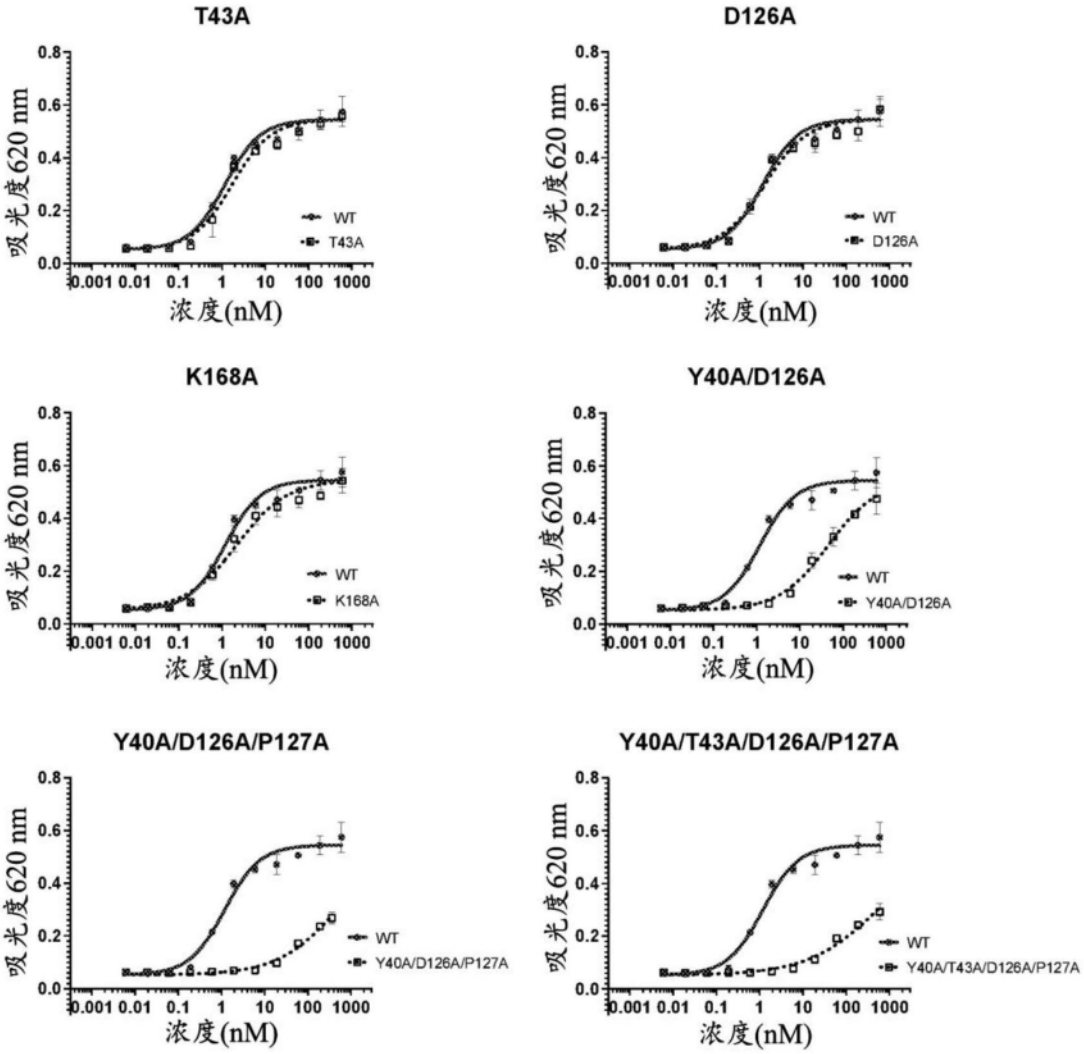

T43A
D126A
K168A
Y40A/D126A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/T43A/D126A/P127A
吸光度620 nm
浓度(nM)
WT
T43A
D126A
K168A
Y40A/D126A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/T43A/D126A/P127A

图24B

样品	HEK-Blue EC50 (nM)	倍数变化 (相对于w.t.)
IL-12 (Miltenyi)	1.1	0.94
w.t.	1.2	1.0
Y40A	34.9	29.3
T43A	1.7	1.5
D126A	1.3	1.1
P127A	2.7	2.3
R129A	1.5	1.3
K168A	2.2	1.9
Y40A/D126A	45.6	38.4
Y40A/P127A	47.9	40.3
Y40A/T43A	26.3	22.1
Y40A/D126A/P127A	480.8	404.4
Y40A/T43A/D126A/P127A	536.9	451.6

图25

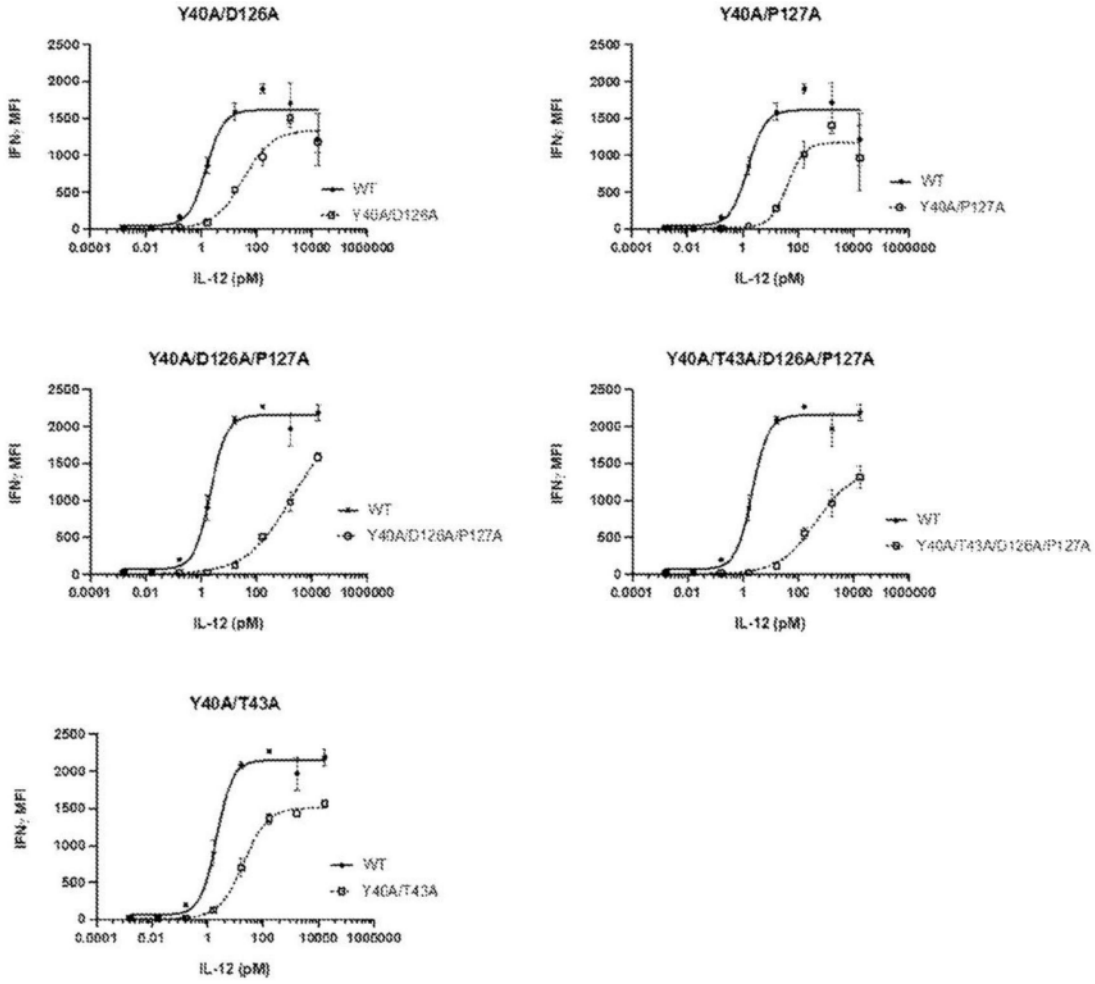


图26

样品	w.t. EC50 (pM)	样品EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t.)
Y40A/D126A	1.55	33.1	21.4
Y40A/P127A	1.55	41.0	26.5
Y40A/T43A	2.16	19.9	9.2
Y40A/D126A/P127A	2.16	1958.0	906.5
Y40A/T43A/D126A/P127A	2.16	436.1	201.9

图27

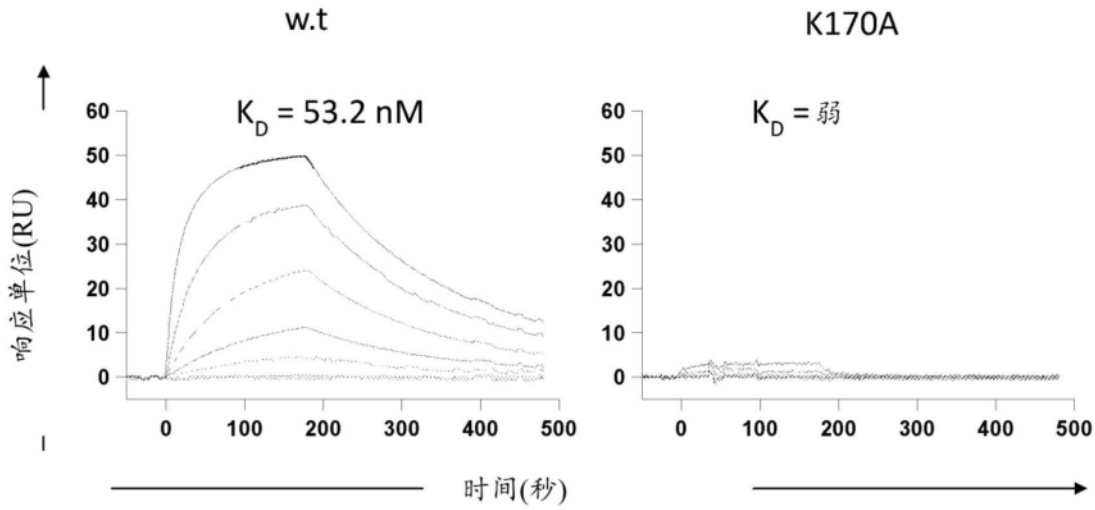

w.t
K170A
K_D = 53.2 nM
K_D = 弱
响应单位(RU)
60
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
时间(秒)

图28

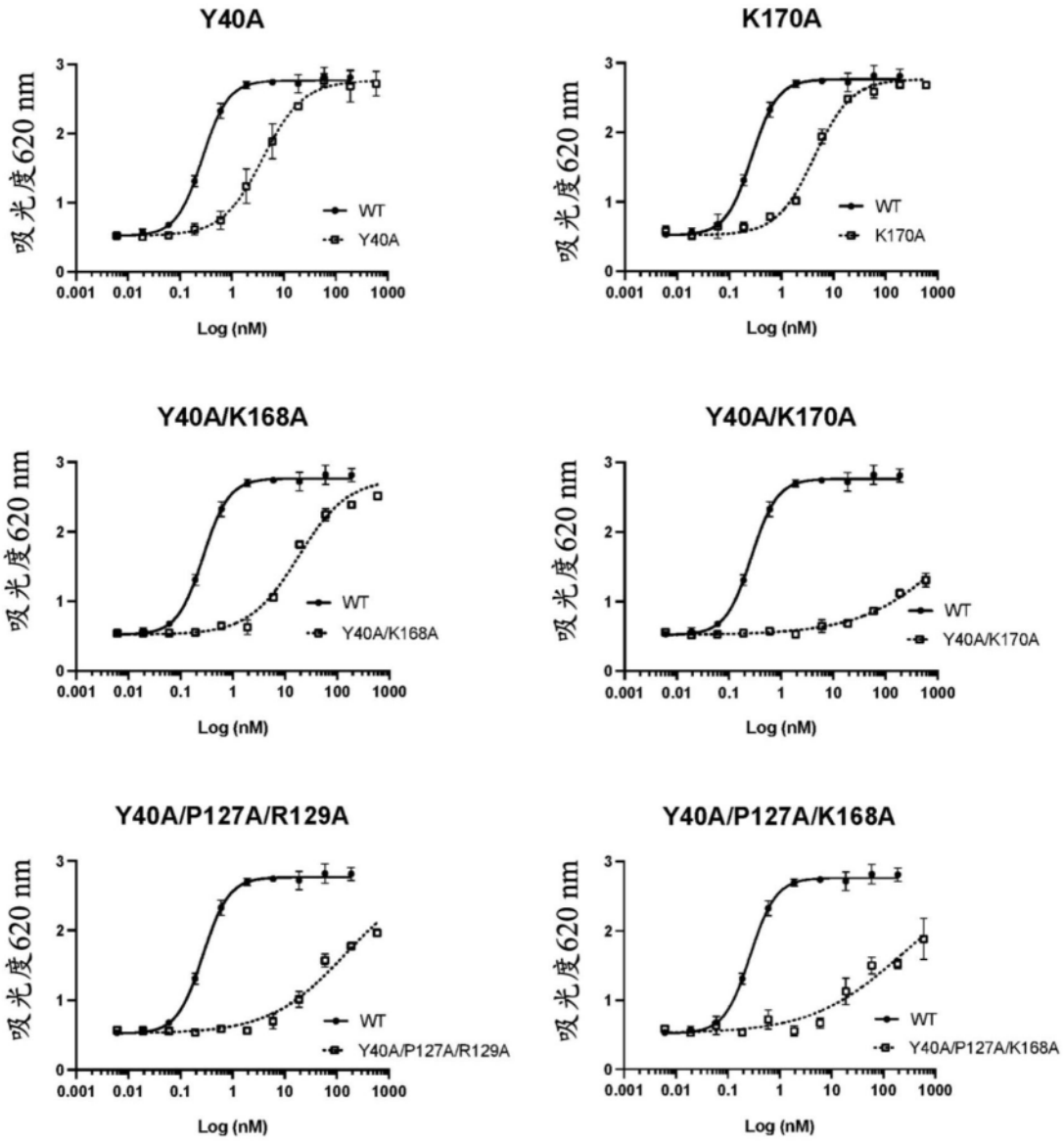

Y40A
K170A
Y40A/K168A
Y40A/K170A
Y40A/P127A/R129A
Y40A/P127A/K168A
吸光度620 nm
Log (nM)
WT
Y40A
K170A
Y40A/K168A
Y40A/K170A
Y40A/P127A/R129A
Y40A/P127A/K168A

图29A

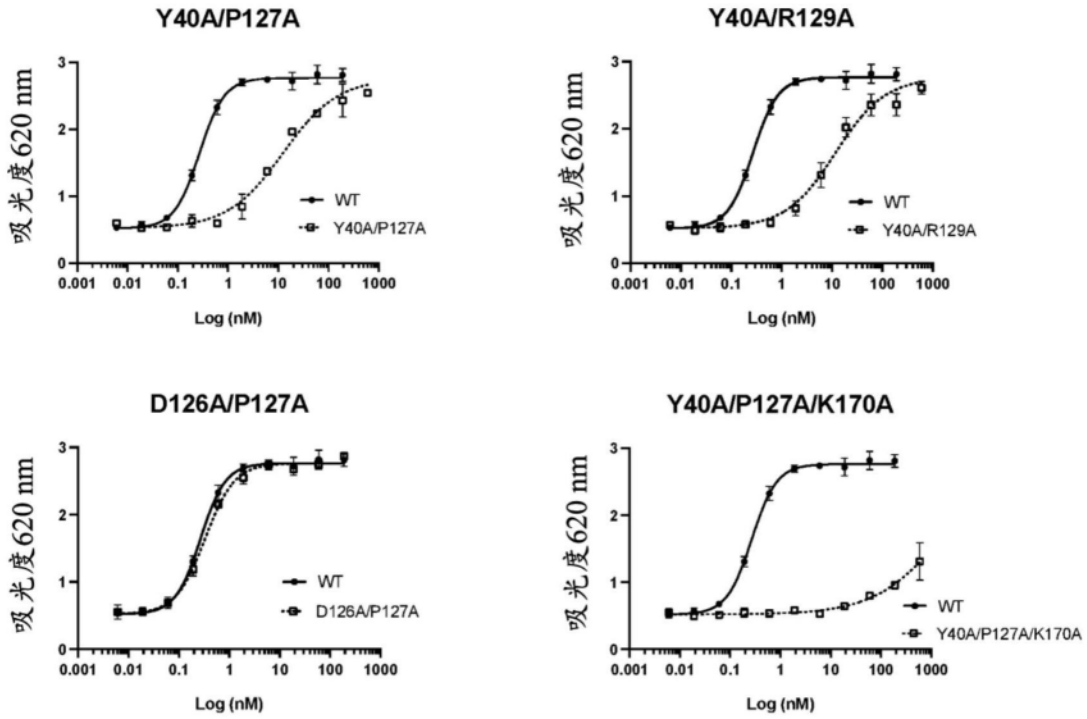

Y40A/P127A
吸光度620 nm
Log (nM)
WT
Y40A/P127A
Y40A/R129A
WT
Y40A/R129A
D126A/P127A
WT
D126A/P127A
Y40A/P127A/K170A
WT
Y40A/P127A/K170A

图29B

样品	HEK-Blue EC50 (nM)	倍数变化 (相对于w.t.)
IL-12 (Miltenyi)	0.22	-
w.t.	0.27	1.0
Y40A	3.96	14.6
K170A	4.27	15.8
Y40A/P127A	12.4	45.9
Y40A/R129A	11.8	43.7
Y40A/K168A	18.1	67.0
Y40A/K170A	1765.0	6537.0
Y40A/P127A/R129A	138.6	513.3
Y40A/P127A/K168A	212.8	788.1
Y40A/P127A/K170A	1567.0	5803.7
D126A/P127A	0.33	1.2

图30

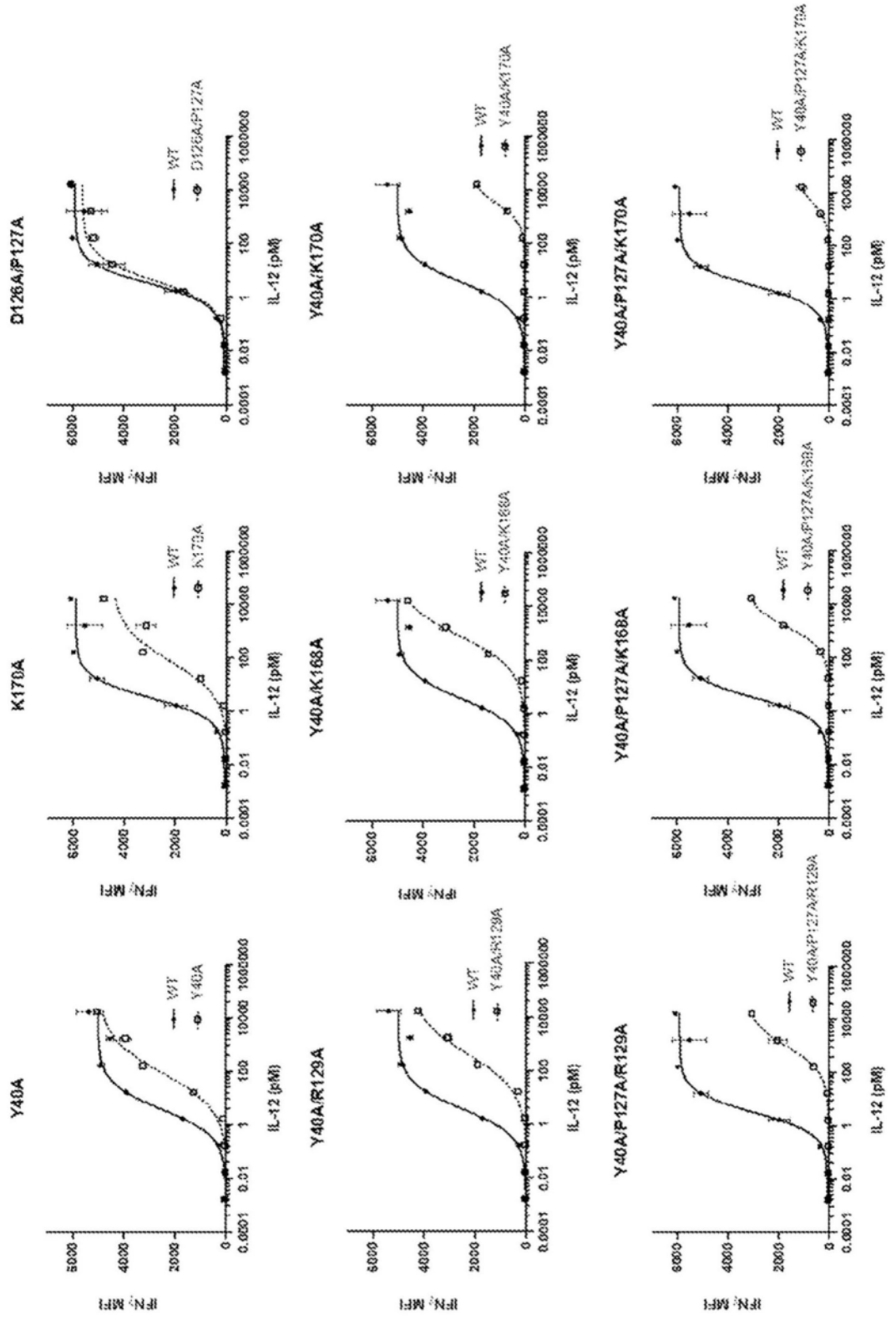

Y40A
K170A
D126A/P127A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/K170A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/P127A/K170A
Y40A/P127A/R129A
WT
IFN-γ MFI
IL-12 (pM)

图31

样品	w.t. EC50 (pM)	样品 EC50 (pM)	倍数变化 (相对于 w.t.)
Y40A	3.7	83.9	22.5
K170A	3.2	76.4	23.7
Y40A/R129A	3.7	401.1	107.8
Y40A/K168A	3.7	790.1	212.4
Y40A/K170A	3.7	3027.0	813.9
Y40A/P127A/R129A	3.2	959.4	297.8
Y40A/P127A/K168A	3.2	1397.0	433.6
Y40A/P127A/K170A	3.2	3945	1224.4
D126A/P127A	3.2	4.2	1.3

图32

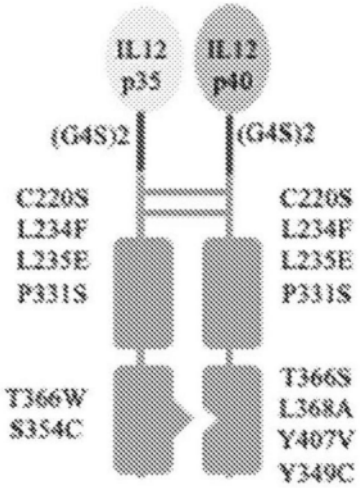
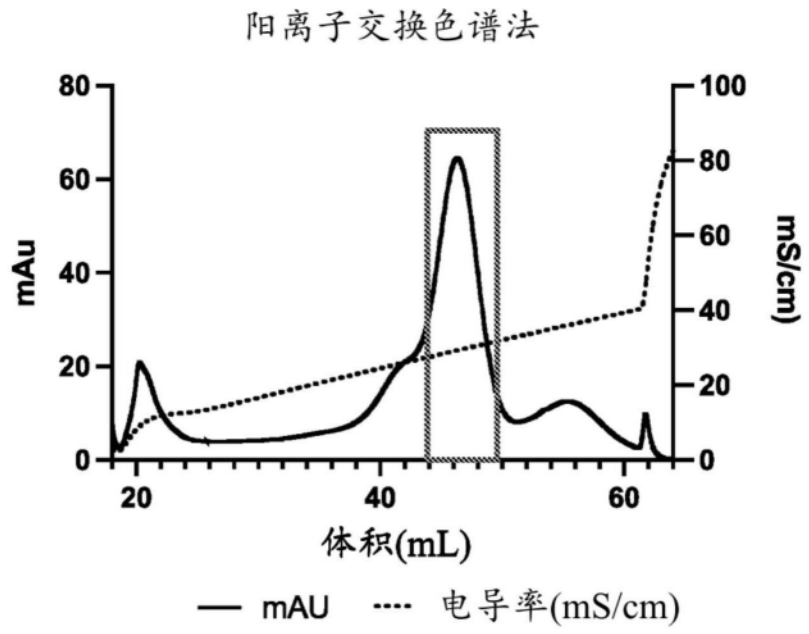


图33


阳离子交换色谱法
80
60
40
20
0
mAu
100
80
60
40
20
0
mS/cm)
20
40
60
体积(mL)
mAU
电导率(mS/cm)

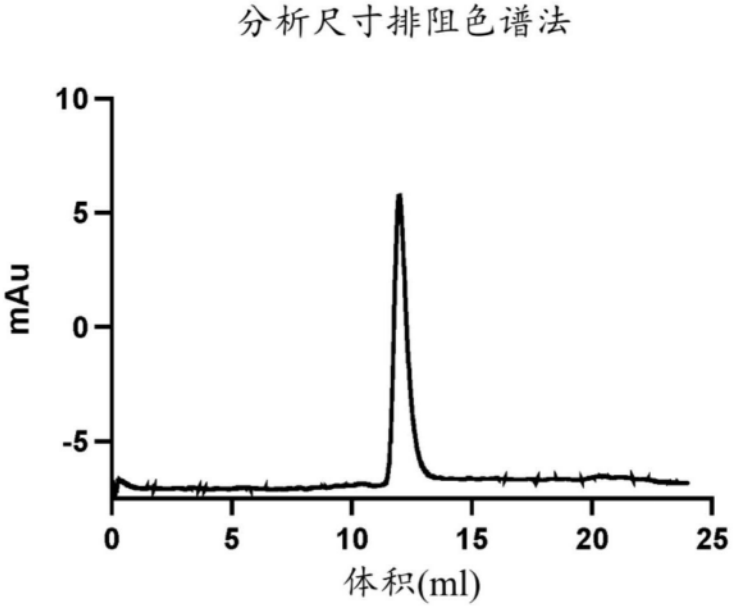

分析尺寸排阻色谱法
10
5
0
-5
mAu
0
5
10
15
20
25
体积(ml)

图34

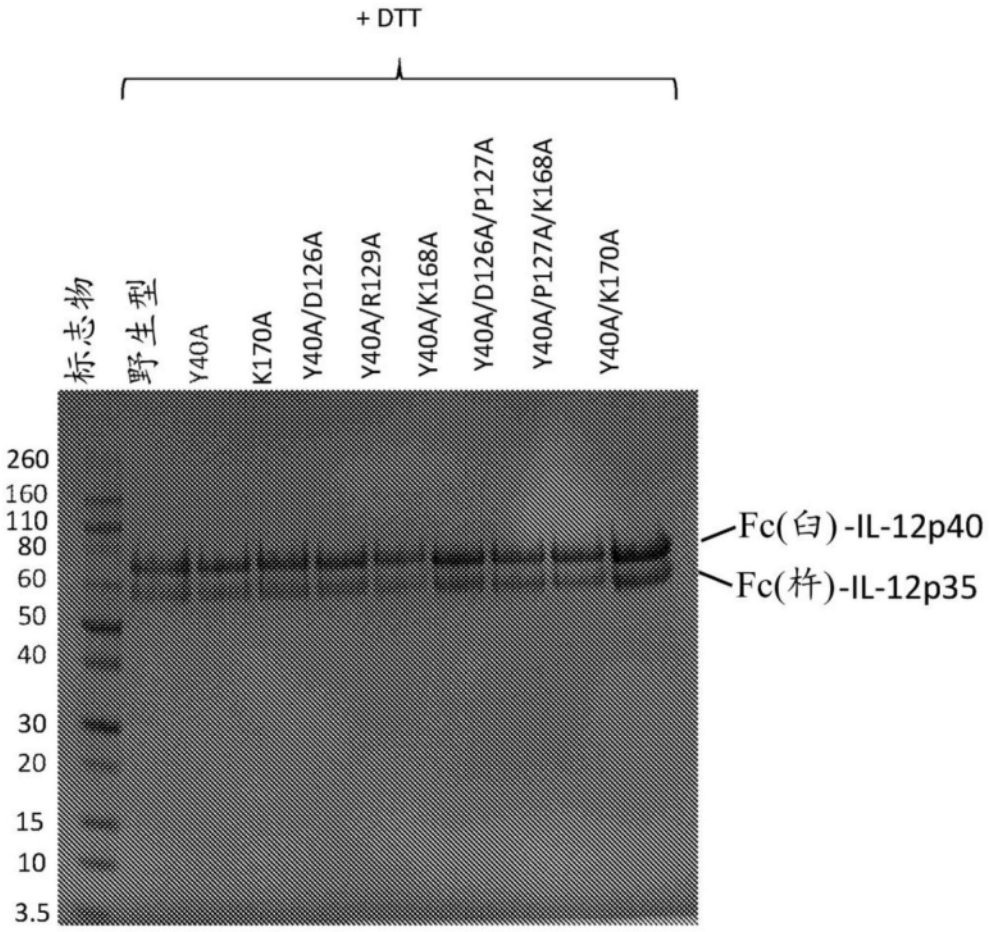

+ DTT
标志物
野生型
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
3.5
Fc(白)-IL-12p40
Fc(杵)-IL-12p35

图35A

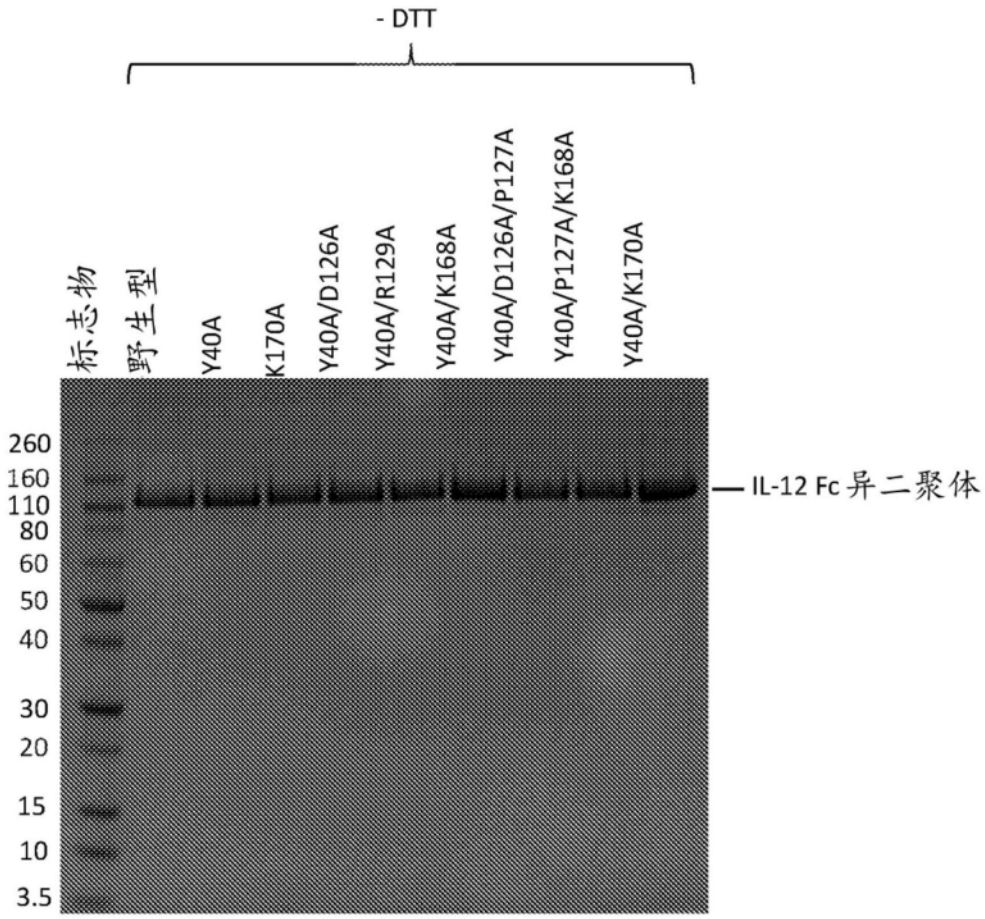

- DTT
标志物
野生型
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
3.5
IL-12 Fc 异二聚体

图35B

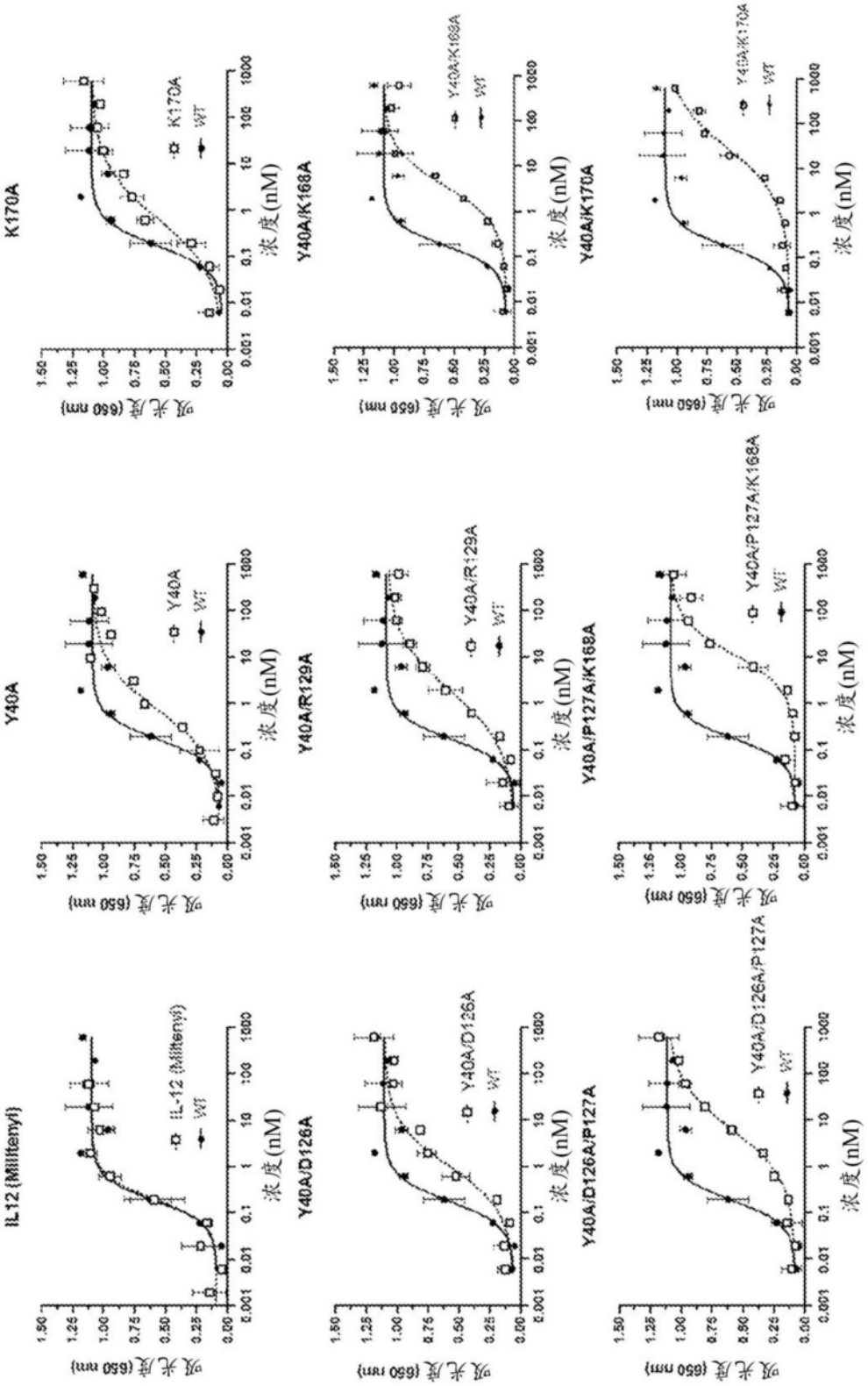

IL12 (Miltenyi)
IL-12 (Miltenyi)
WT
浓度(nM)
Y40A
Y40A
WT
浓度(nM)
K170A
K170A
WT
浓度(nM)
Y40A/D126A
Y40A/D126A
WT
浓度(nM)
Y40A/R129A
Y40A/R129A
WT
浓度(nM)
Y40A/K168A
Y40A/K168A
WT
浓度(nM)
Y40A/D126A/P127A
Y40A/D126A/P127A
WT
浓度(nM)
Y40A/P127A/K168A
Y40A/P127A/K168A
WT
浓度(nM)
Y40A/K170A
Y40A/K170A
WT
浓度(nM)

图36

样品	HEK-Blue EC50 (nM)	倍数变化 (相对于w.t.)
IL-12 (Miltenyi)	0.34	1.4
w.t.	0.25	1.0
Y40A	2.15	8.5
K170A	1.66	6.6
Y40A/D126A	2.43	9.6
Y40A/R129A	9.13	36.2
Y40A/K168A	7.48	29.7
Y40A/D126A/P127A	17.43	69.1
Y40A/P127A/K168A	27.65	109.6
Y40A/K170A	73.1	289.9

图37

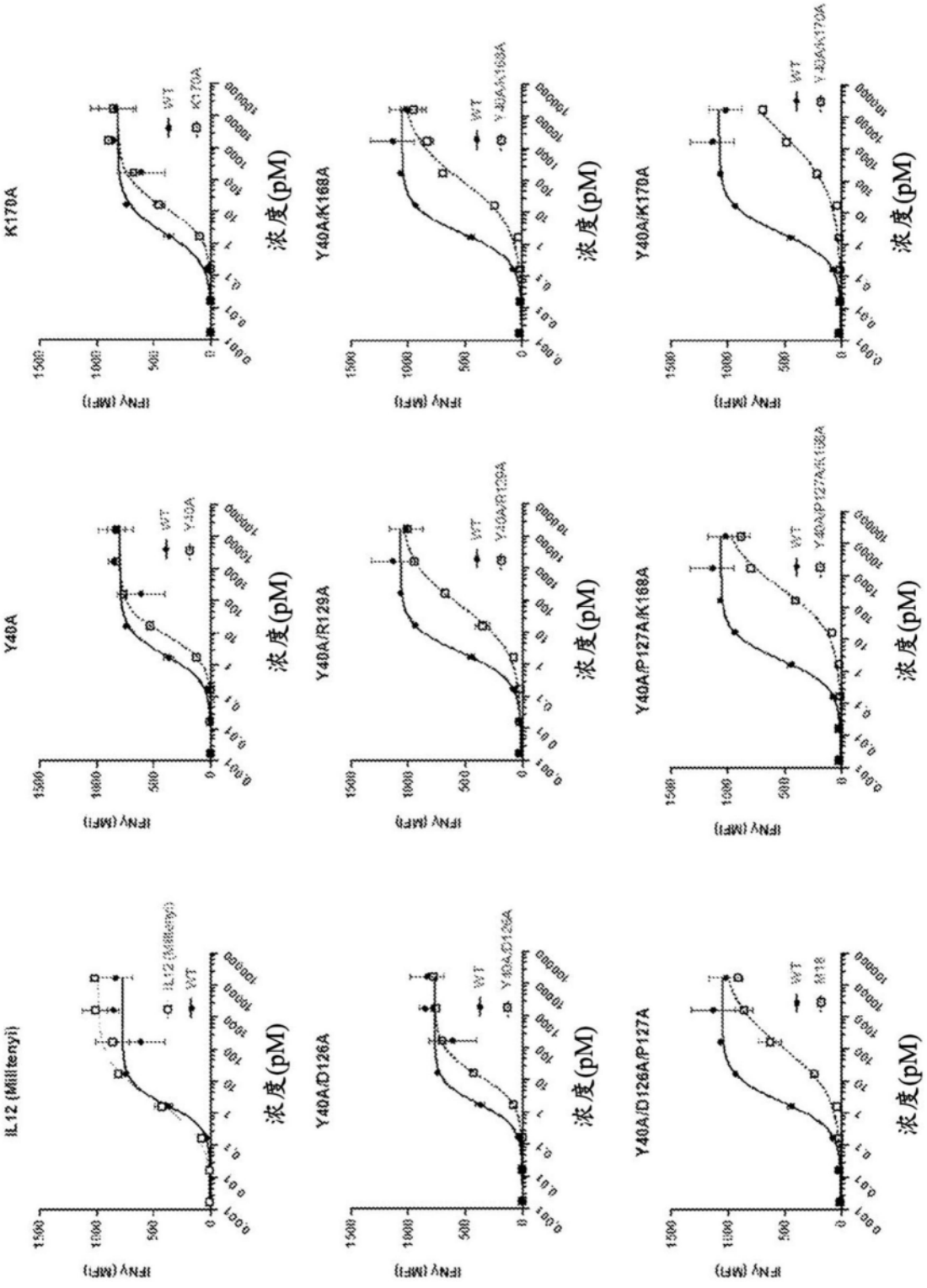

IL12 (Millitenyi)
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/D126A/P127A
WT
IFNγ (MFI)
浓度(pM)

图38

样品	w.t. EC50 (pM)	样品EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t.)
IL-12 (Miltenyi)	2.87	1.6	0.6
Y40A	2.87	10.4	3.6
K170A	2.87	15.8	5.5
Y40A/D126A	2.87	21.6	7.5
Y40A/R129A	2.06	52.8	25.7
Y40A/K168A	2.06	82.0	39.9
Y40A/D126A/P127A	2.06	98.6	48.0
Y40A/P127A/K168A	2.06	329.2	160.1
Y40A/K170A	2.06	2694.0	1310.3

图39

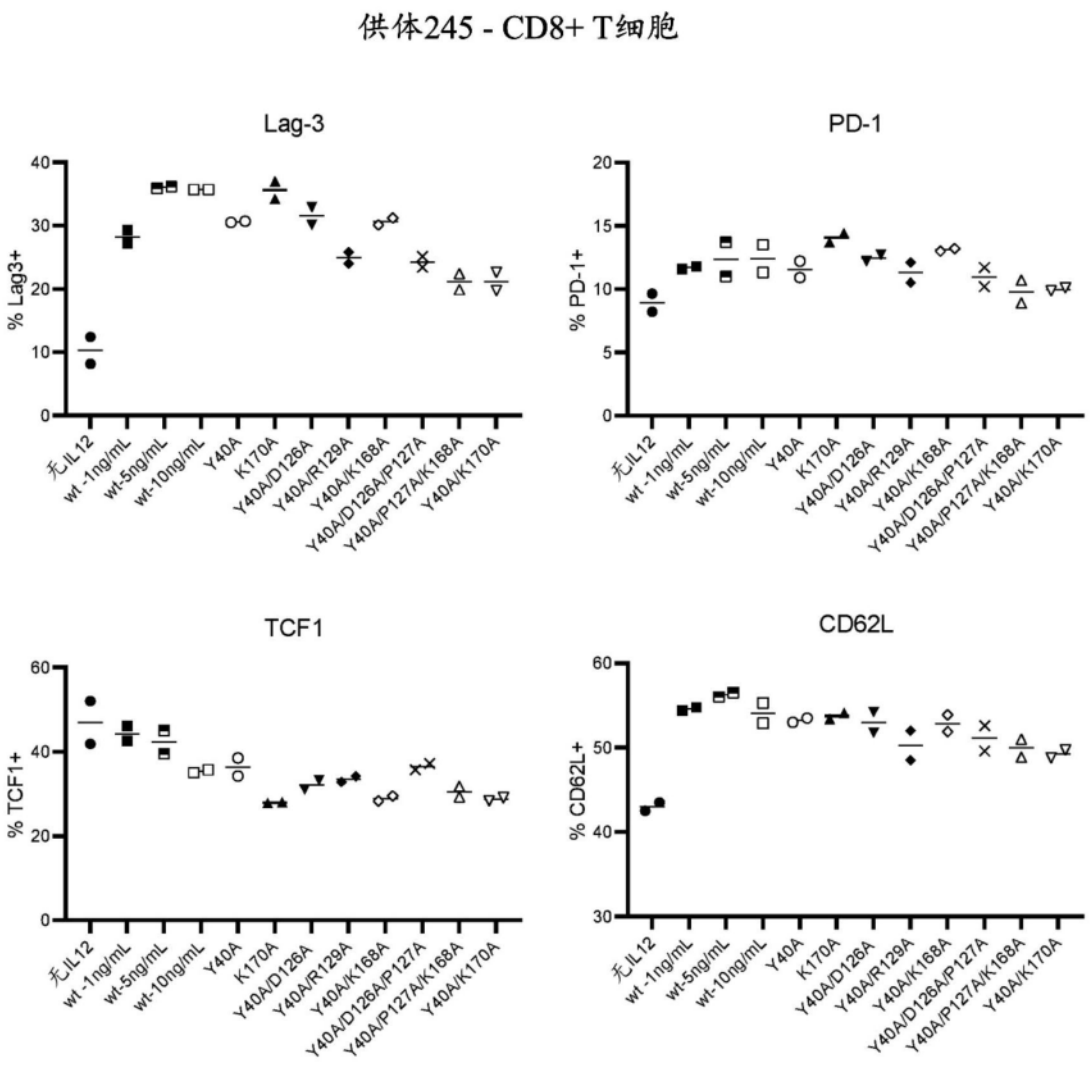

供体245 - CD8+ T细胞
Lag-3
% Lag3+
PD-1
% PD-1+
TCF1
% TCF1+
CD62L
% CD62L+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图40A

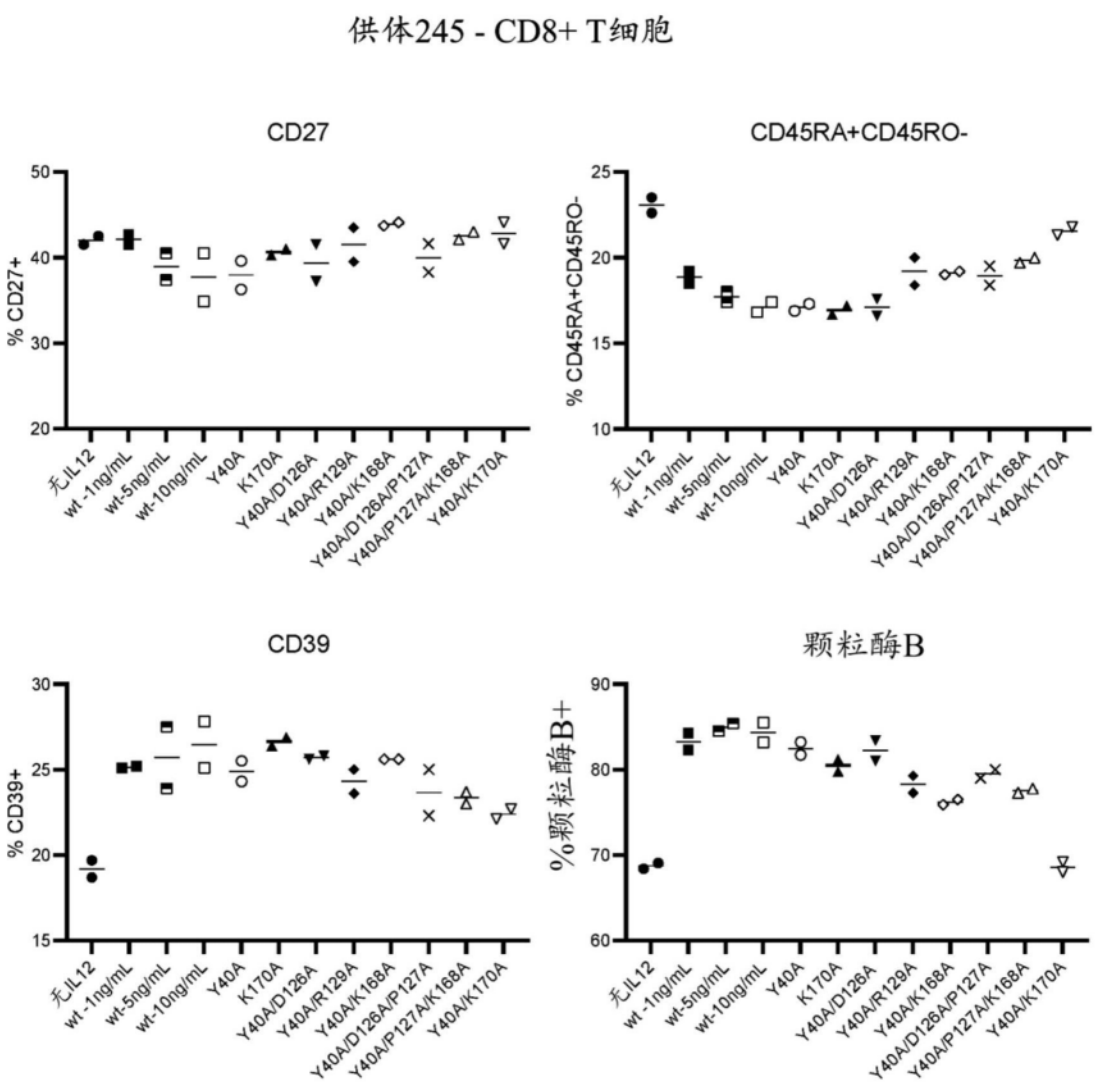

供体245 - CD8+ T细胞
CD27
% CD27+
CD45RA+CD45RO-
% CD45RA+CD45RO-
CD39
% CD39+
颗粒酶B
%颗粒酶B+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图40B

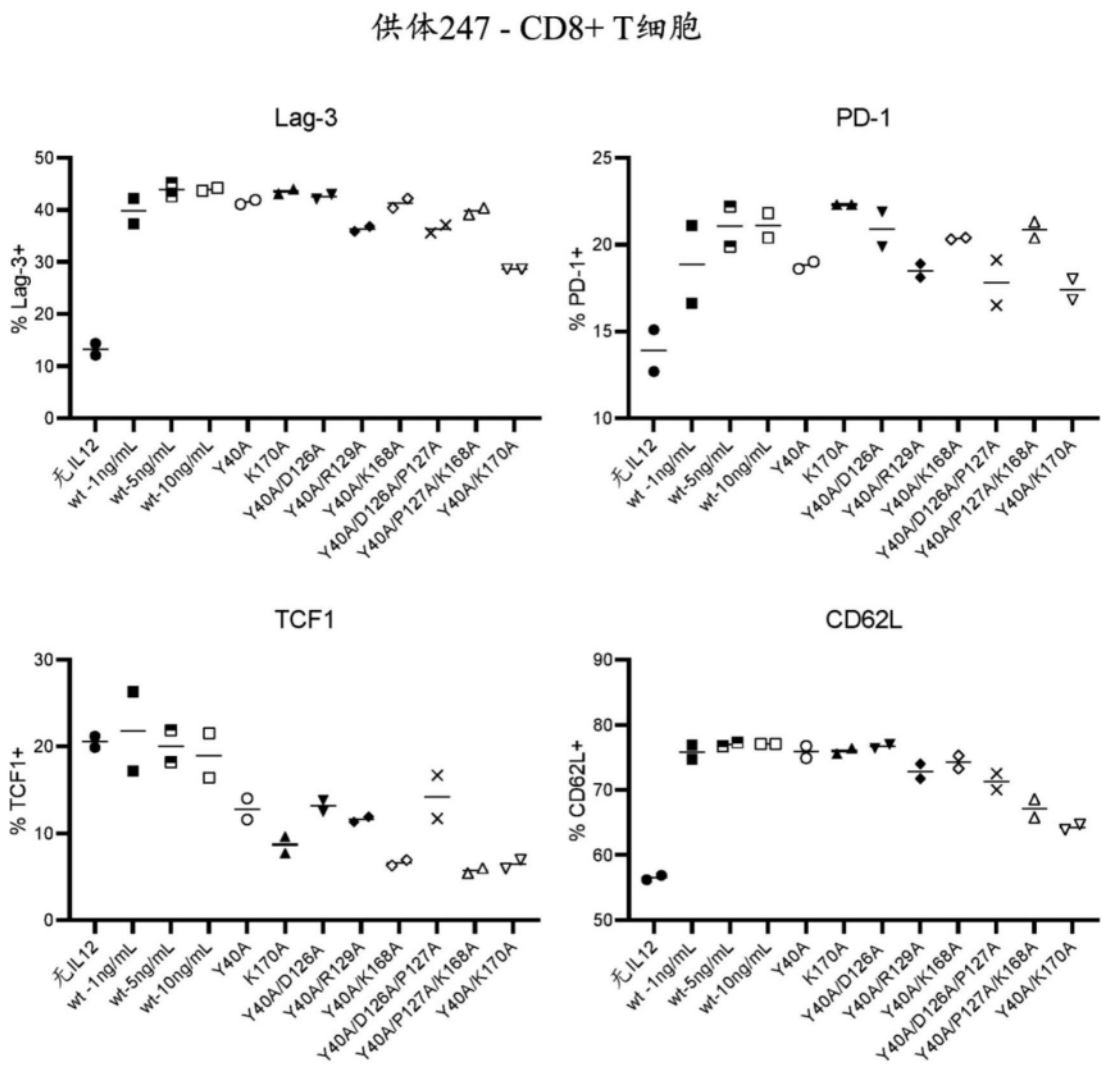

供体247 - CD8+ T细胞
Lag-3
% Lag-3+
PD-1
% PD-1+
TCF1
% TCF1+
CD62L
% CD62L+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图41A

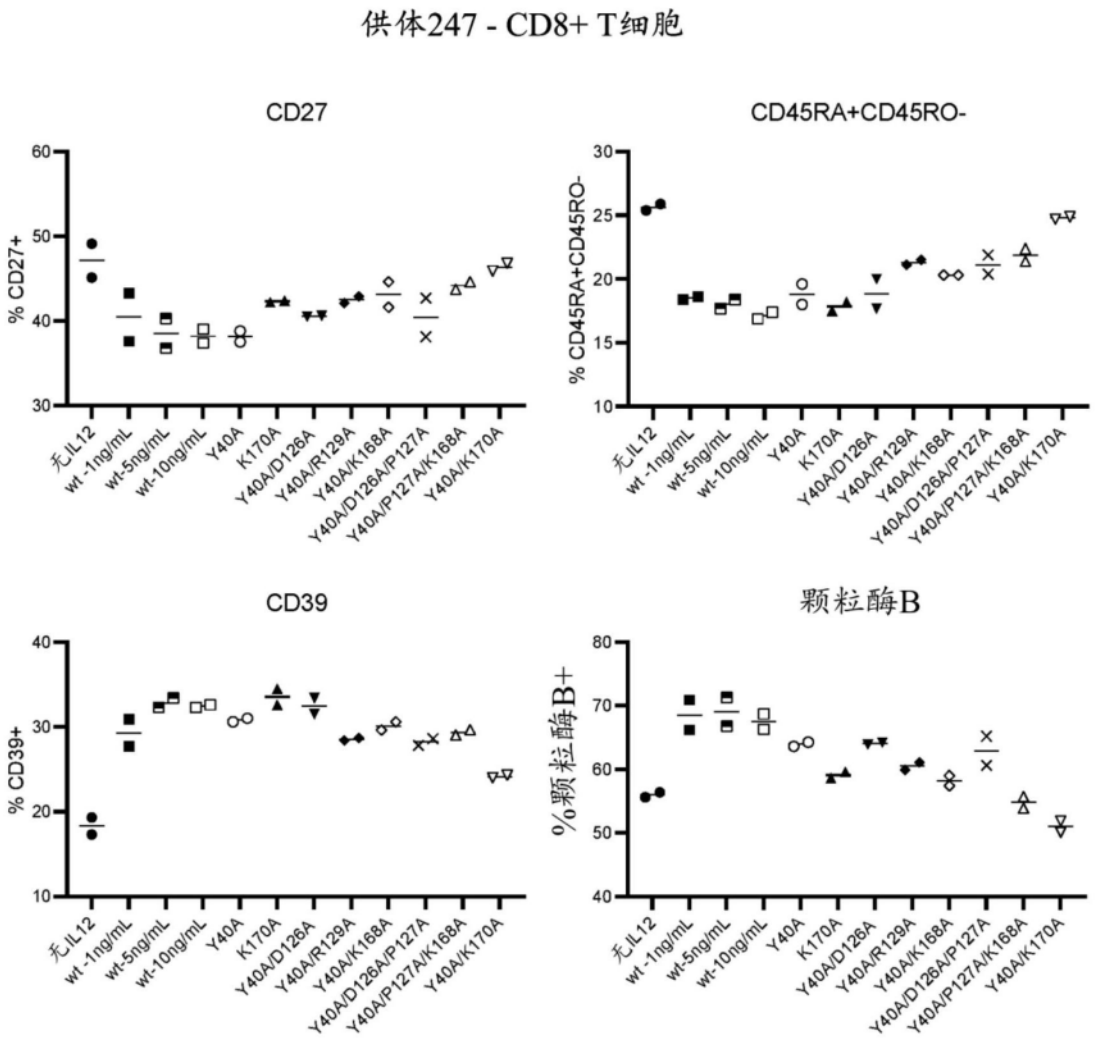

供体247 - CD8+ T细胞
CD27
% CD27+
CD45RA+CD45RO-
% CD45RA+CD45RO-
CD39
% CD39+
颗粒酶B
%颗粒酶B+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图41B

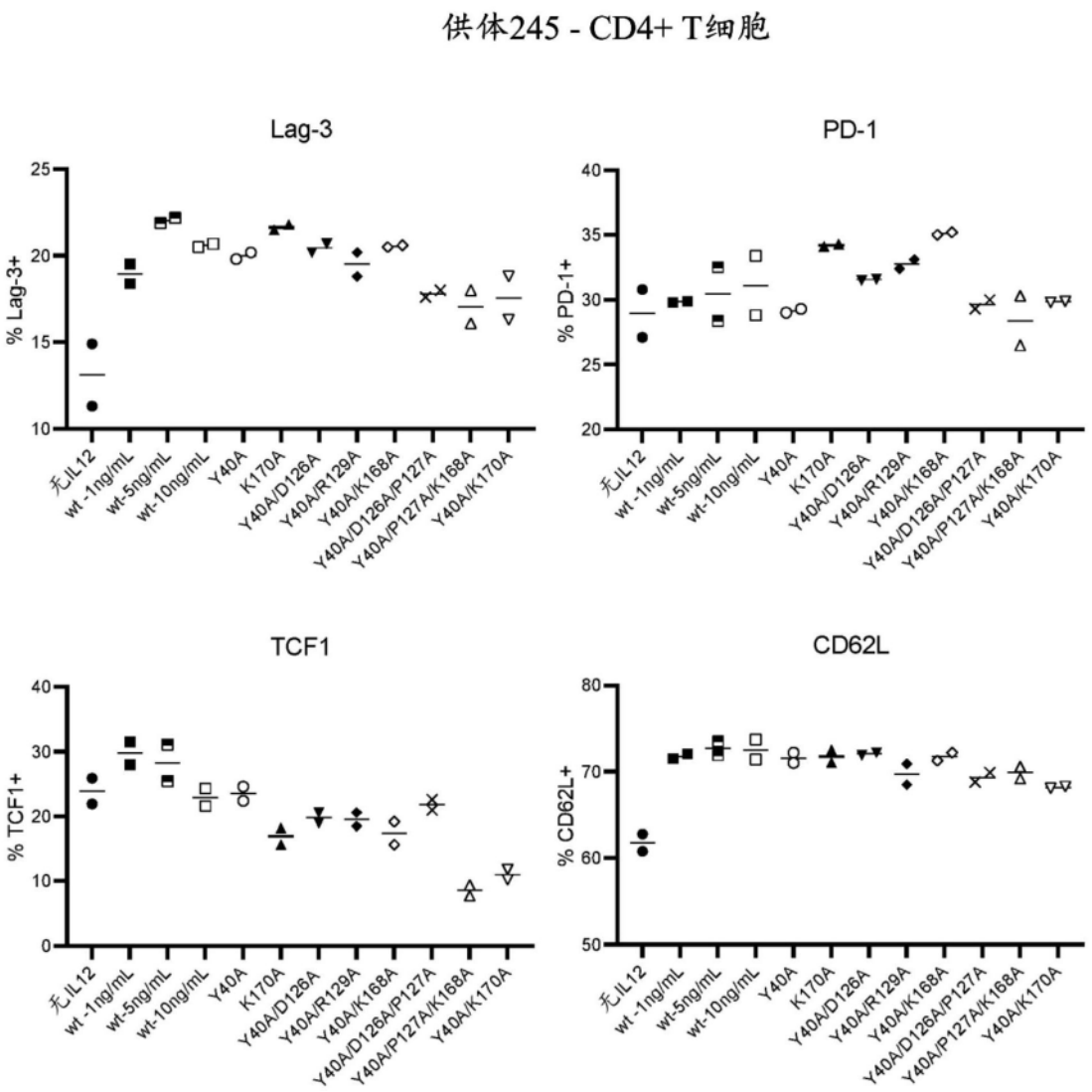

供体245 - CD4+ T细胞
Lag-3
% Lag-3+
PD-1
% PD-1+
TCF1
% TCF1+
CD62L
% CD62L+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图42A

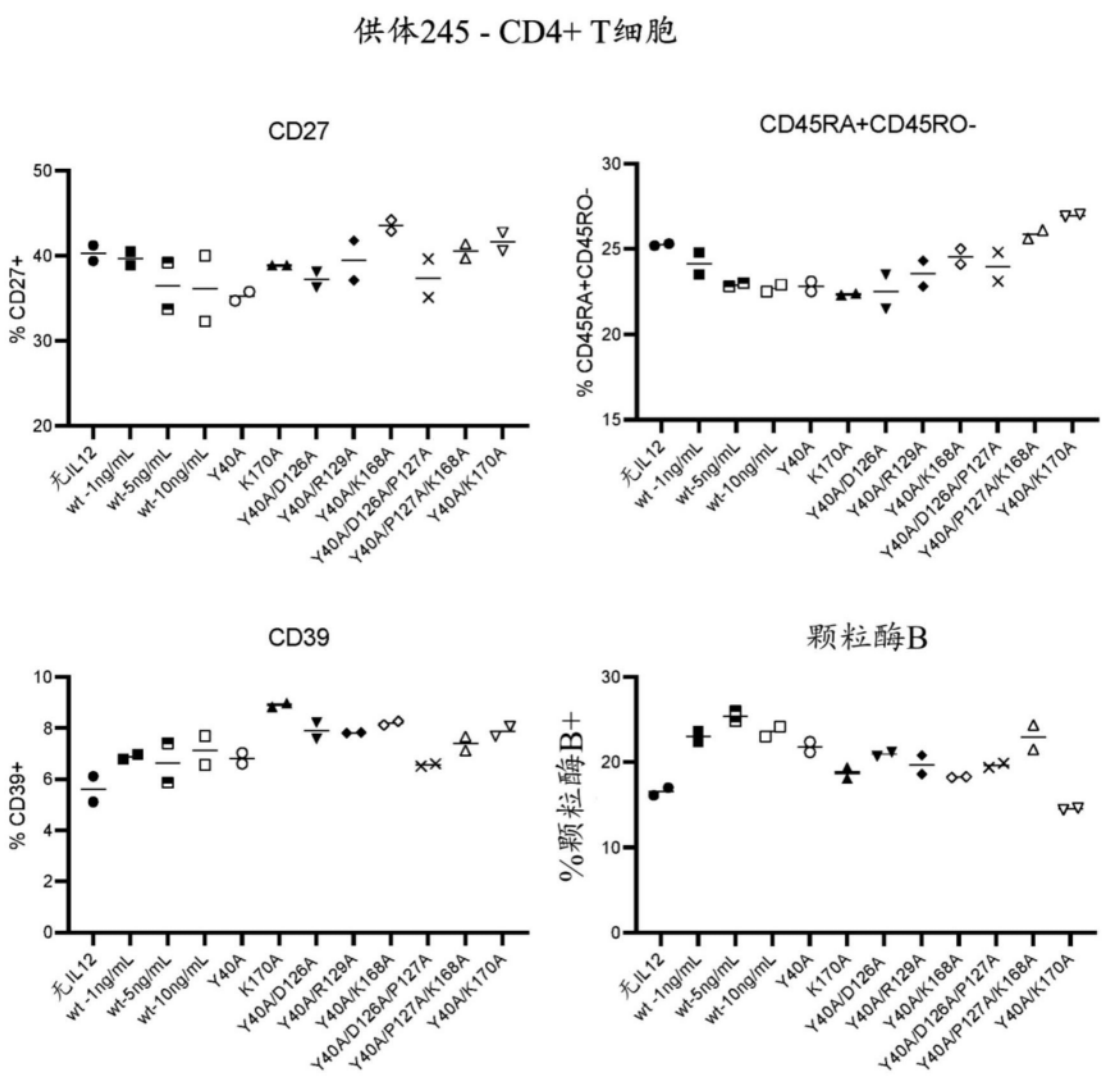

供体245 - CD4+ T细胞
CD27
% CD27+
CD45RA+CD45RO-
% CD45RA+CD45RO-
CD39
% CD39+
颗粒酶B
%颗粒酶B+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图42B

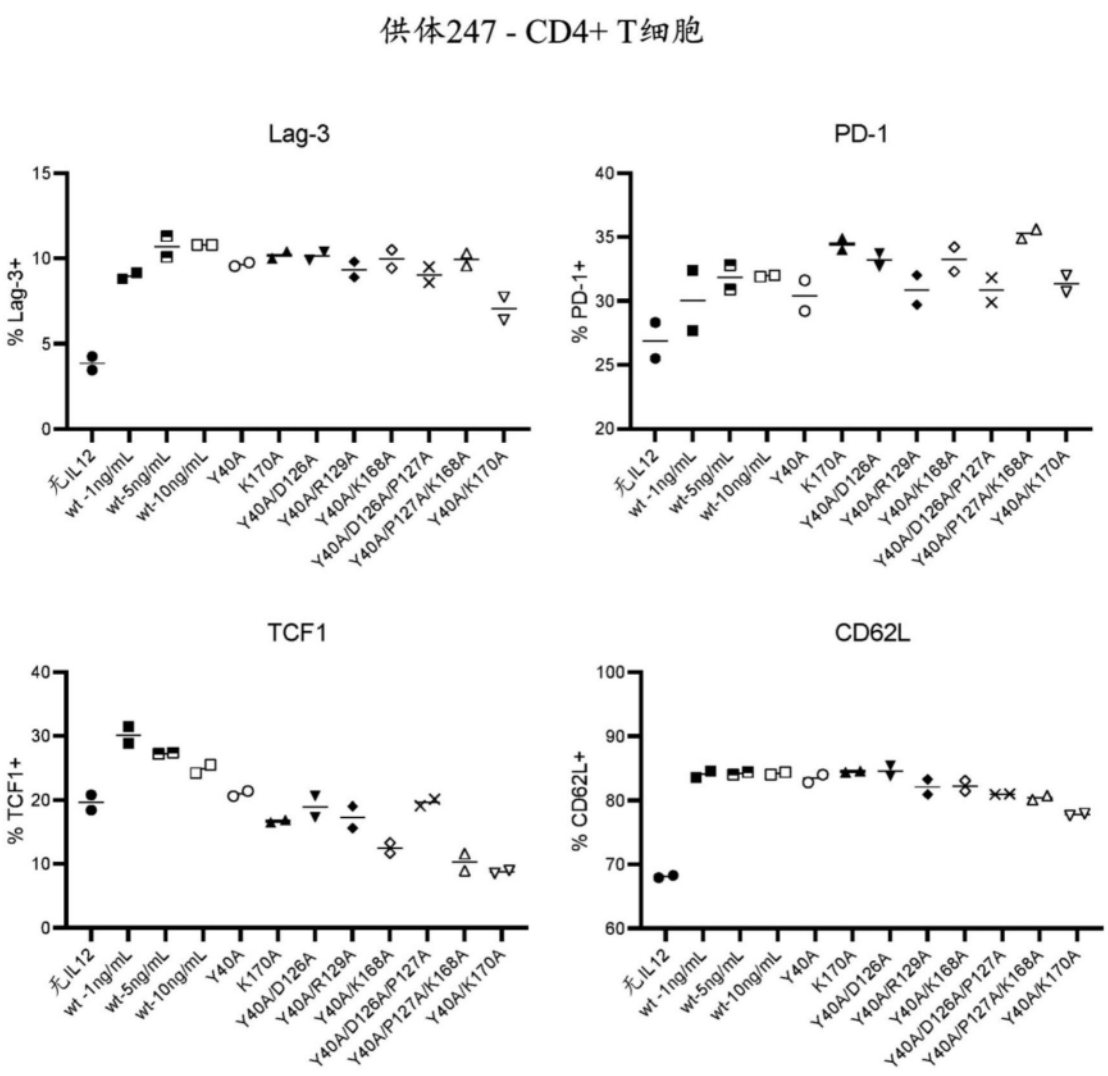

供体247 - CD4+ T细胞
Lag-3
% Lag-3+
PD-1
% PD-1+
TCF1
% TCF1+
CD62L
% CD62L+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图43A

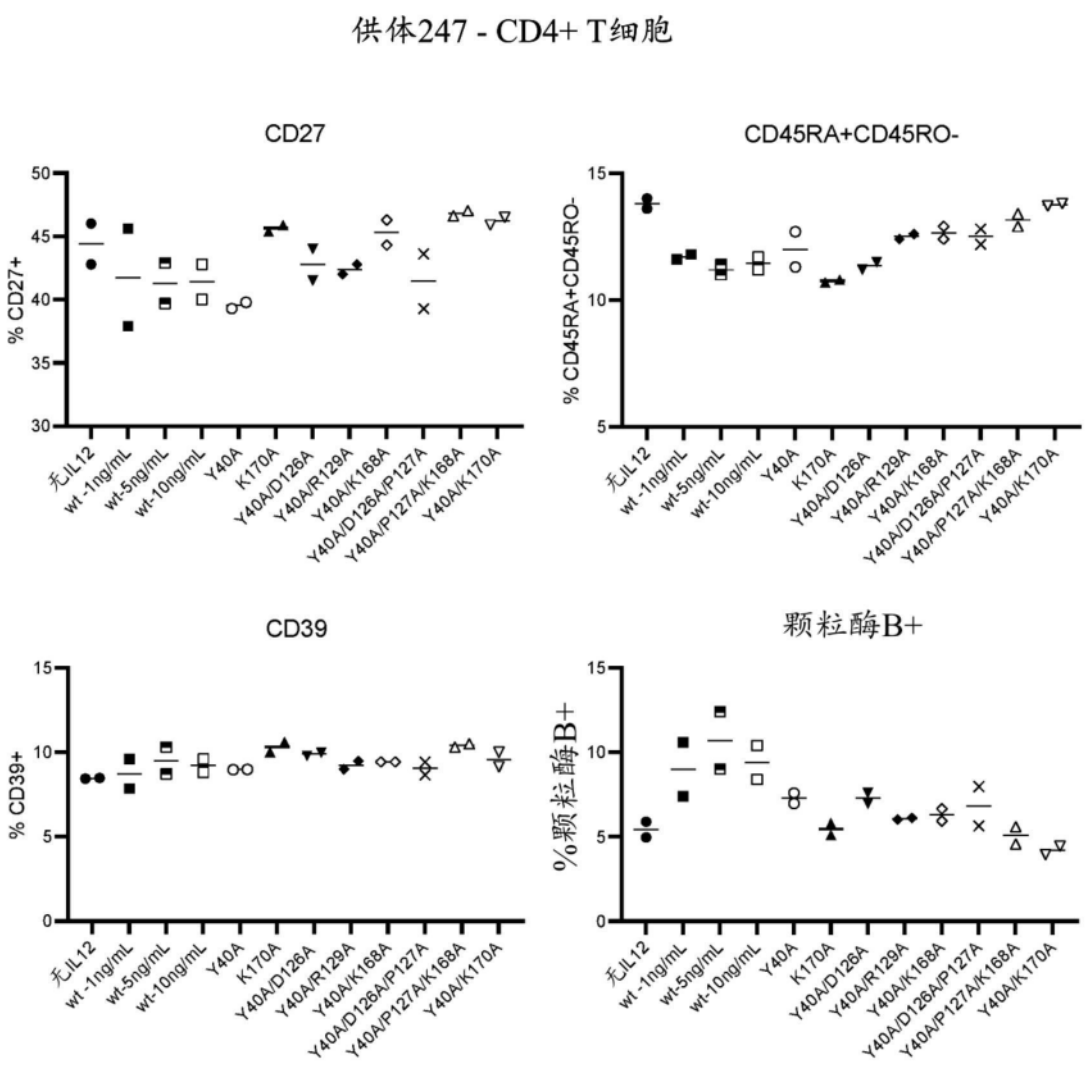

供体247 - CD4+ T细胞
CD27
% CD27+
CD45RA+CD45RO-
% CD45RA+CD45RO-
CD39
% CD39+
颗粒酶B+
%颗粒酶B+
无IL12
wt -1ng/mL
wt-5ng/mL
wt-10ng/mL
Y40A
K170A
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/D126A/P127A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/K170A

图43B

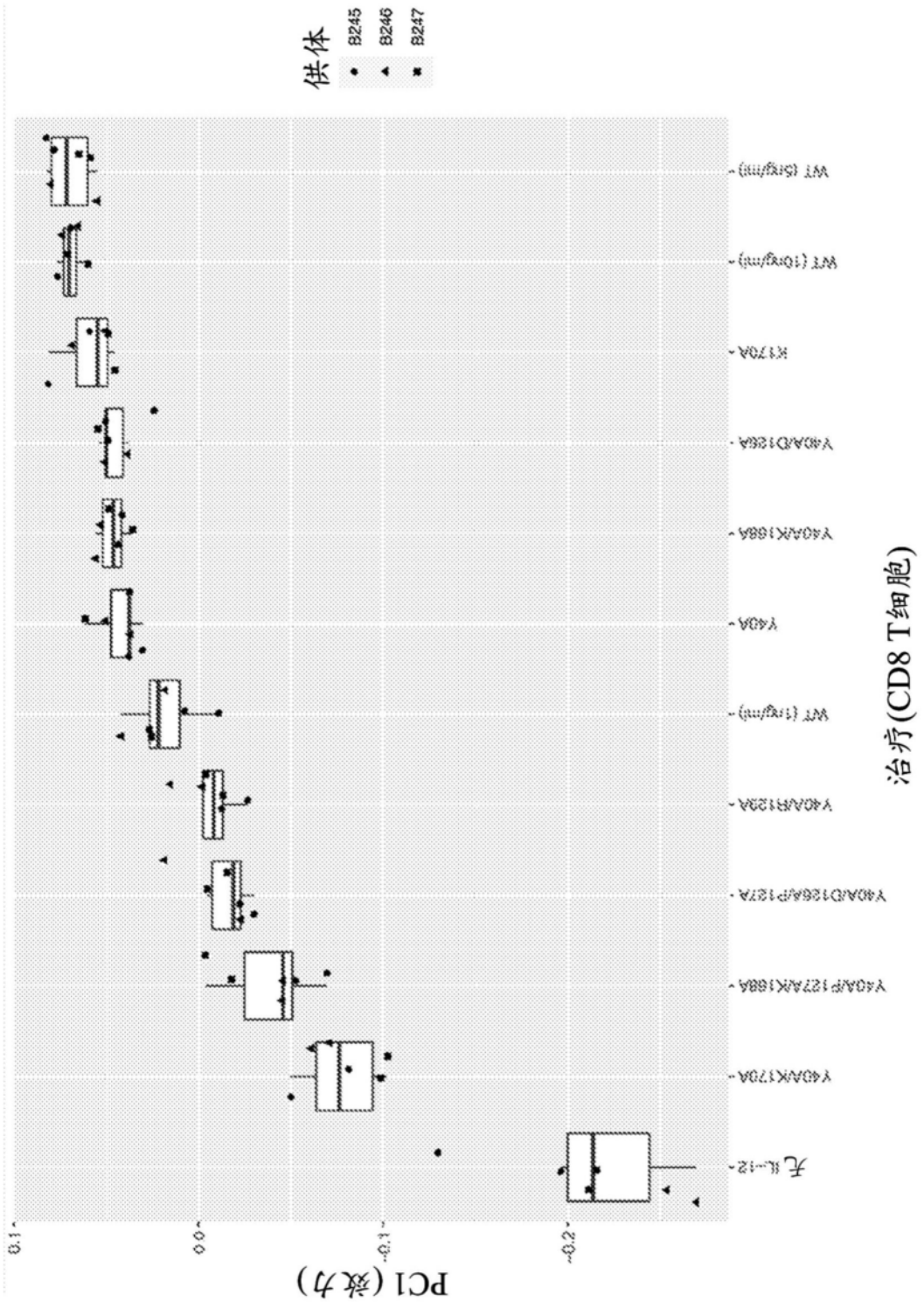

供体
B245
B246
B247
PC1 (效力)
0.1
0.0
-0.1
-0.2
治疗(CD8 T细胞)
无 IL-12
Y40A/K170A
Y40A/P127A/K168A
Y40A/D128A/P127A
Y40A/R129A
WT (1ng/ml)
Y40A
Y40A/K168A
Y40A/D128A
K170A
WT (10ng/ml)
WT (5ng/ml)

图44

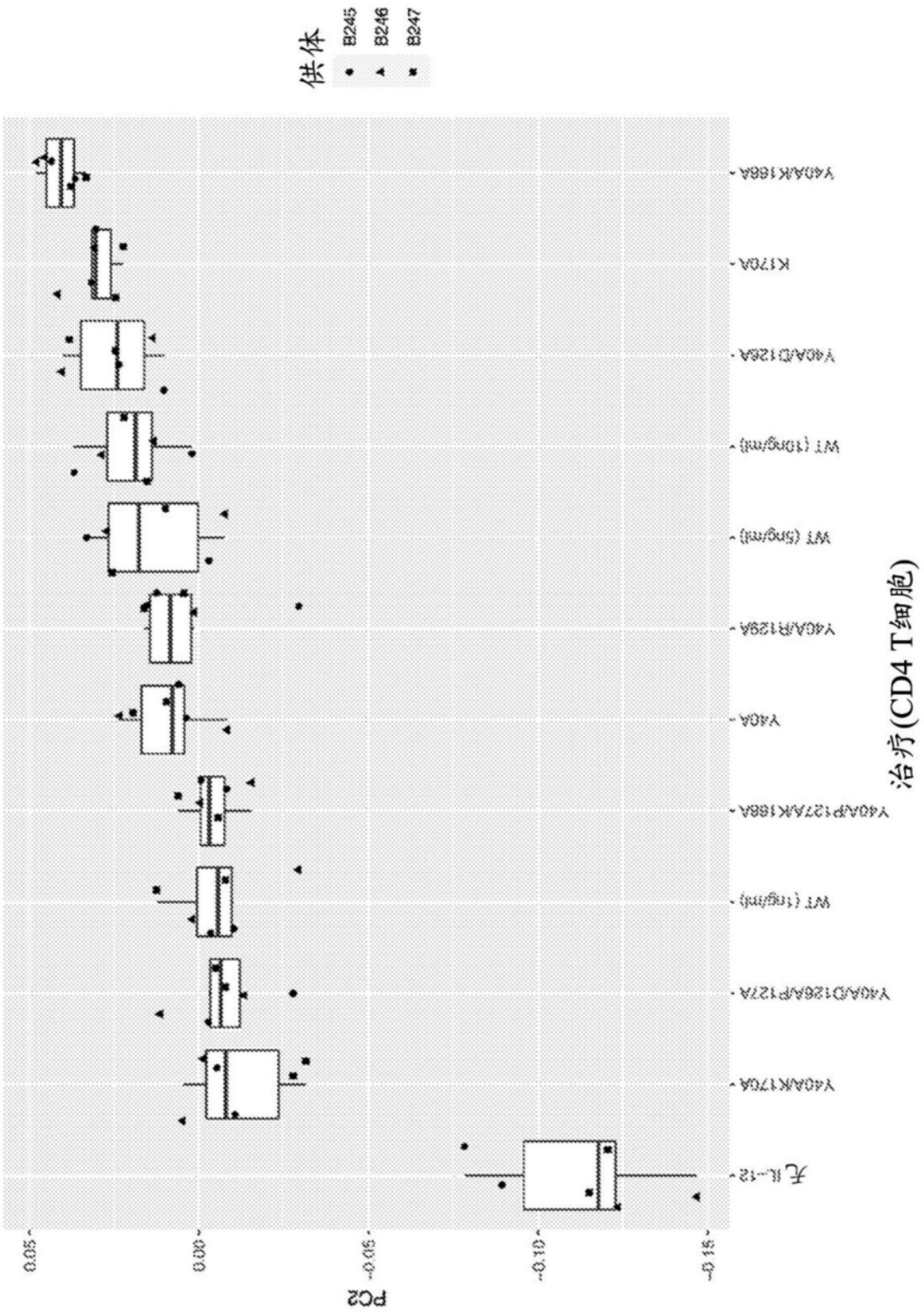

供体
B245
B246
B247
无IL-12
Y40A/K17QA
Y40A/D126A/P127A
WT (1ng/ml)
Y40A/P127A/K186A
Y40A
Y40A/R129A
WT (5ng/ml)
WT (10ng/ml)
Y40A/D126A
K17QA
Y40A/K186A
治疗(CD4 T细胞)
PC2
0.05
0.00
-0.05
-0.10
-0.15

图45

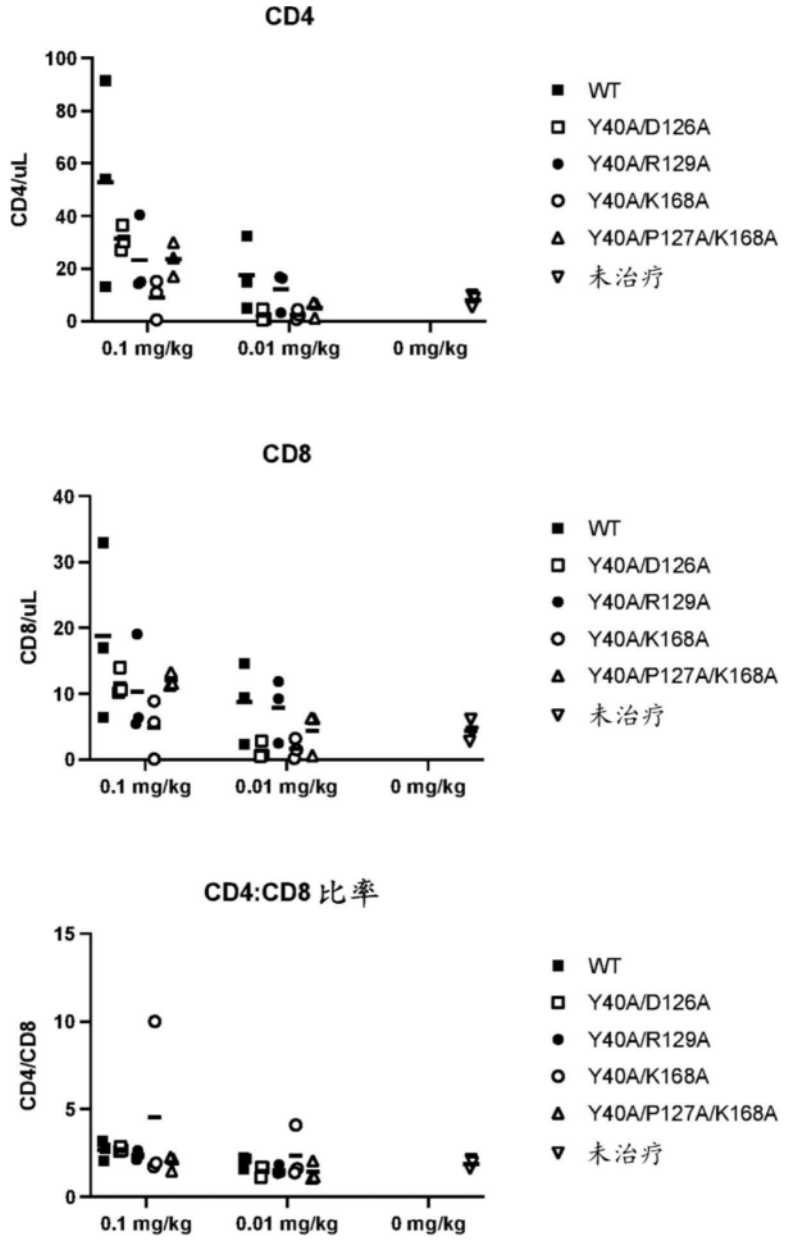

CD4
CD4/uL
100
80
60
40
20
0
0.1 mg/kg
0.01 mg/kg
0 mg/kg
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
未治疗
CD8
CD8/uL
40
30
20
10
0
0.1 mg/kg
0.01 mg/kg
0 mg/kg
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
未治疗
CD4:CD8 比率
CD4/CD8
15
10
5
0
0.1 mg/kg
0.01 mg/kg
0 mg/kg
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
未治疗

图46

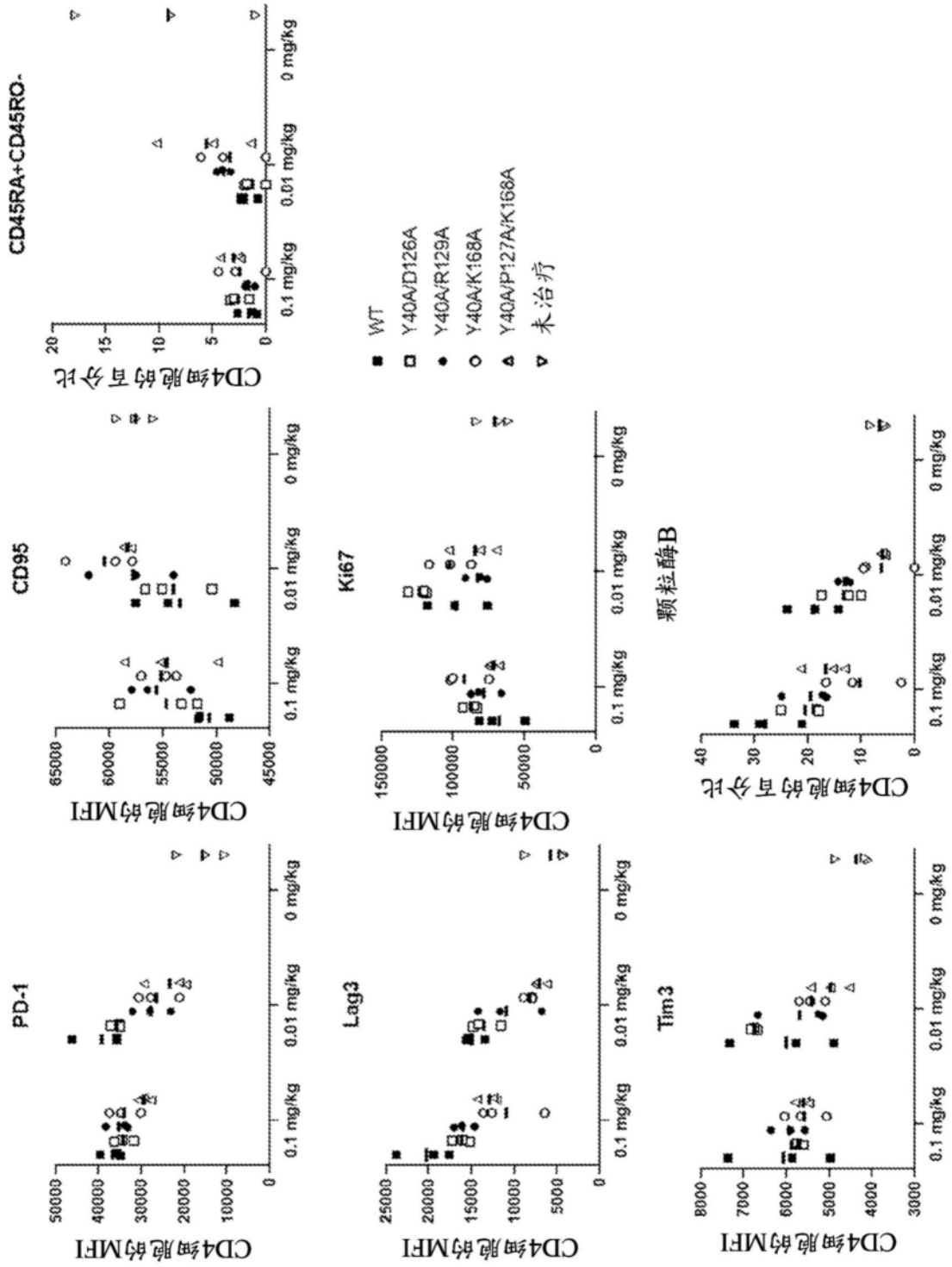

PD-1
CD95
Ki67
颗粒酶B
Lag3
Tim3
CD45RA+CD45RO-
CD4细胞的MFI
CD4细胞的百分比
0.1 mg/kg
0.01 mg/kg
0 mg/kg
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
未治疗

图47

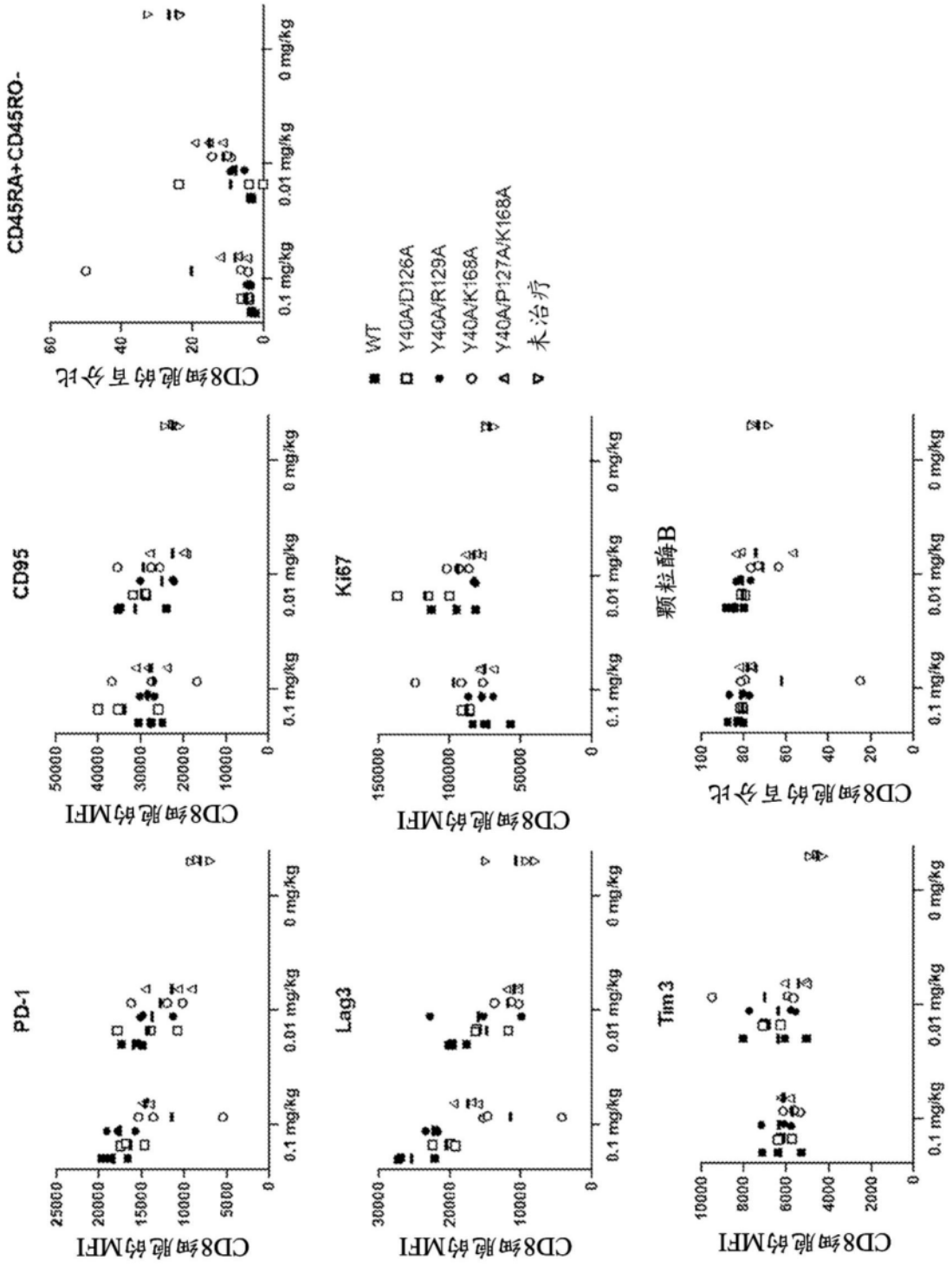

CD45RA+CD45RO-
CD8细胞的百分比
CD95
CD8细胞的MFI
Ki67
CD8细胞的MFI
颗粒酶B
CD8细胞的百分比
PD-1
CD8细胞的MFI
Lag3
CD8细胞的MFI
Tim3
CD8细胞的MFI
0.1 mg/kg
0.01 mg/kg
0 mg/kg
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
未治疗

图48

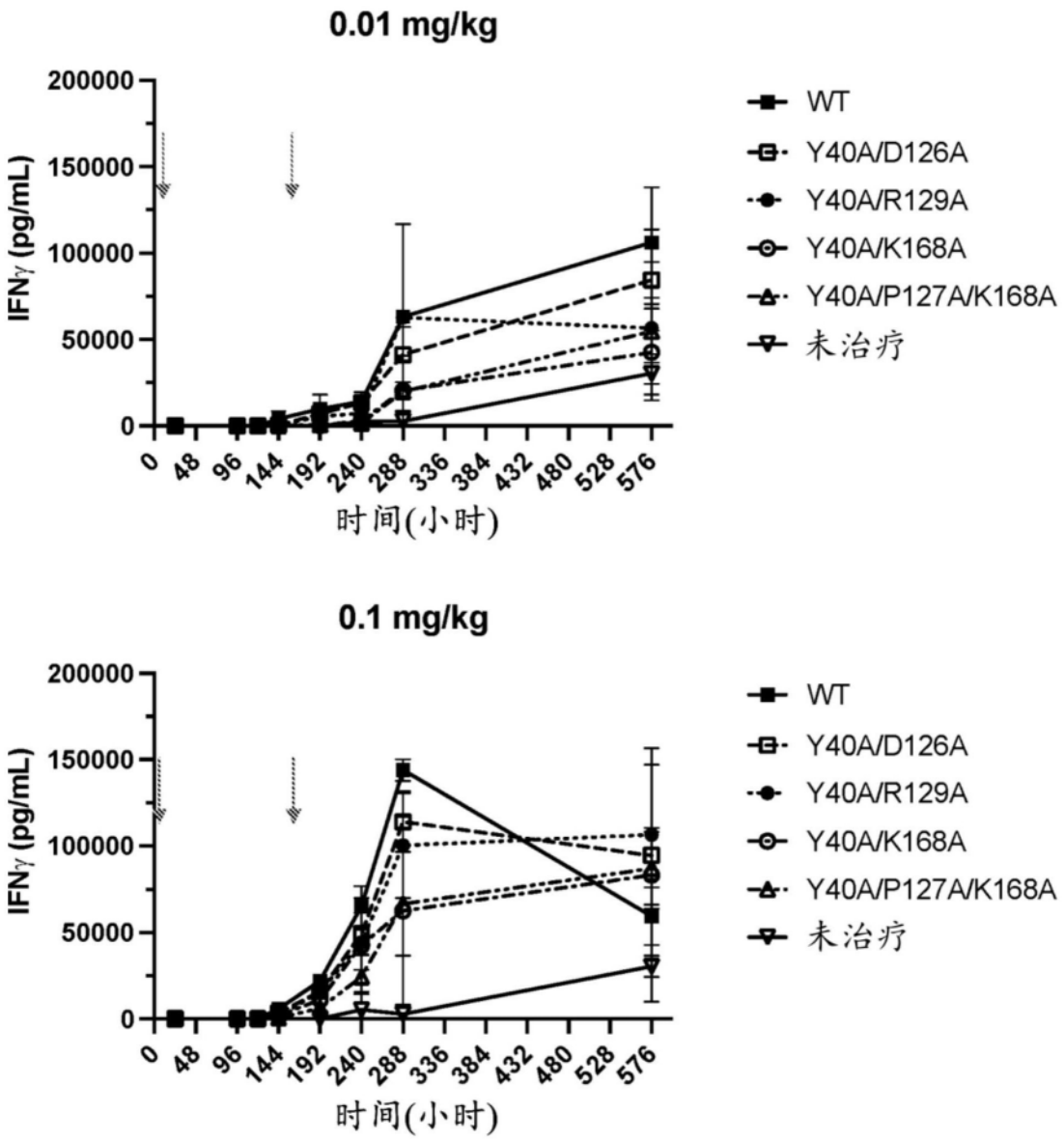

0.01 mg/kg
IFNγ (pg/mL)
200000
150000
100000
50000
0
0 48 96 144 192 240 288 336 384 432 480 528 576
时间(小时)
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
未治疗
0.1 mg/kg
IFNγ (pg/mL)
200000
150000
100000
50000
0
0 48 96 144 192 240 288 336 384 432 480 528 576
时间(小时)
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
未治疗

图49

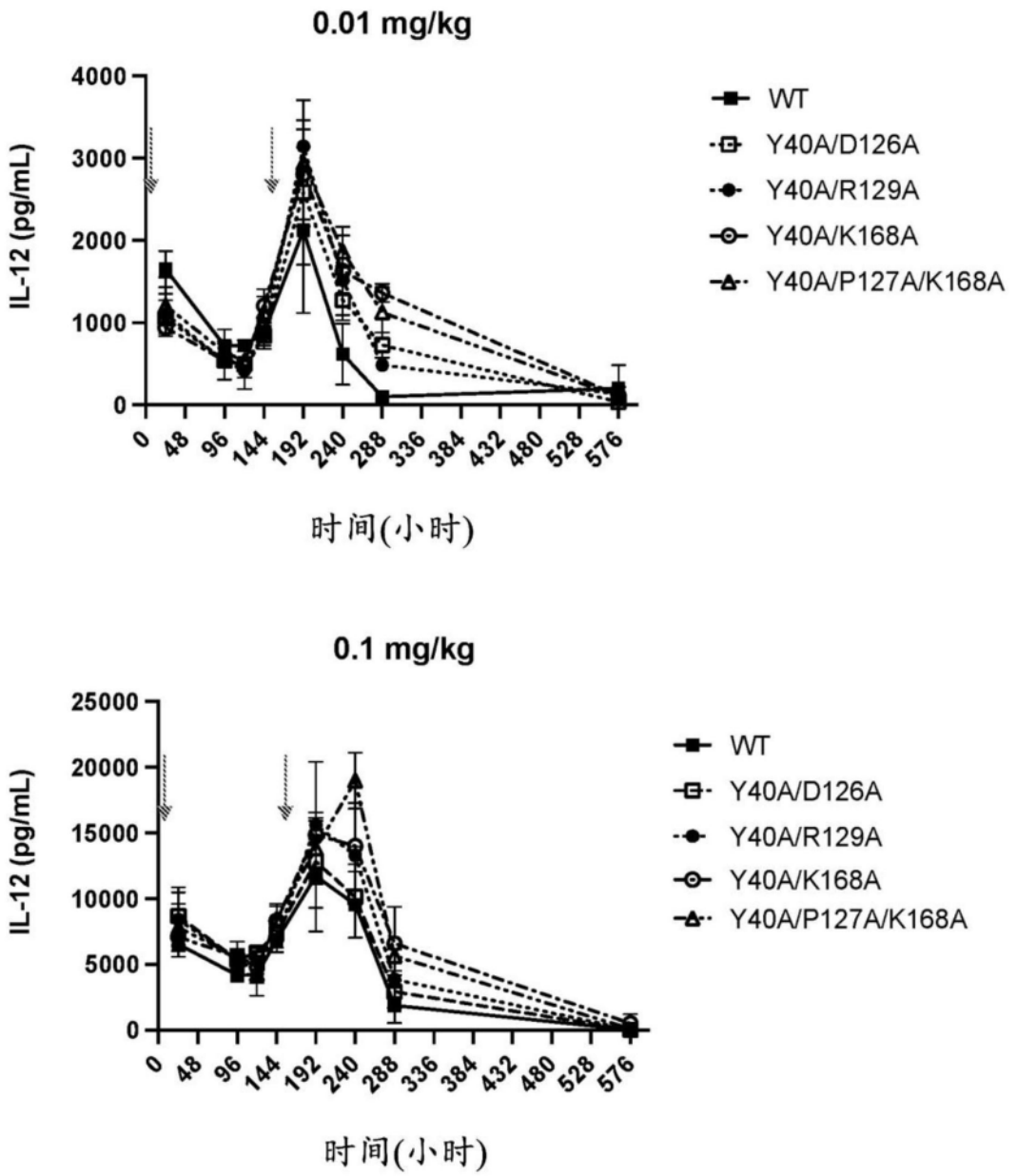

0.01 mg/kg
IL-12 (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
0
0 48 96 144 192 240 288 336 384 432 480 528 576
时间(小时)
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A
0.1 mg/kg
IL-12 (pg/mL)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0 48 96 144 192 240 288 336 384 432 480 528 576
时间(小时)
WT
Y40A/D126A
Y40A/R129A
Y40A/K168A
Y40A/P127A/K168A

图50

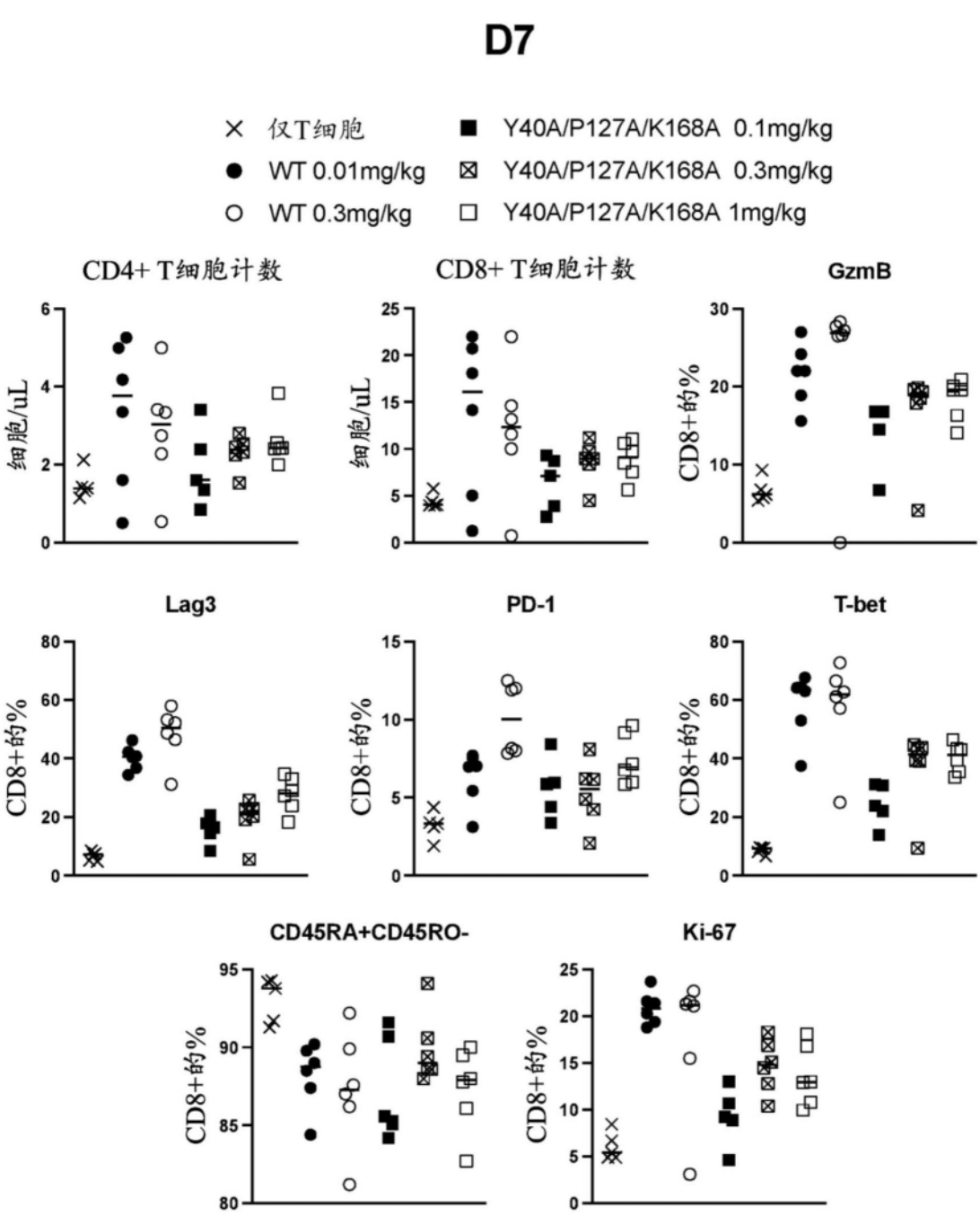

D7
仅T细胞
WT 0.01mg/kg
WT 0.3mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.1mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.3mg/kg
Y40A/P127A/K168A 1mg/kg
CD4+ T细胞计数
CD8+ T细胞计数
GzmB
Lag3
PD-1
T-bet
CD45RA+CD45RO-
Ki-67
细胞/uL
CD8+的%

图51

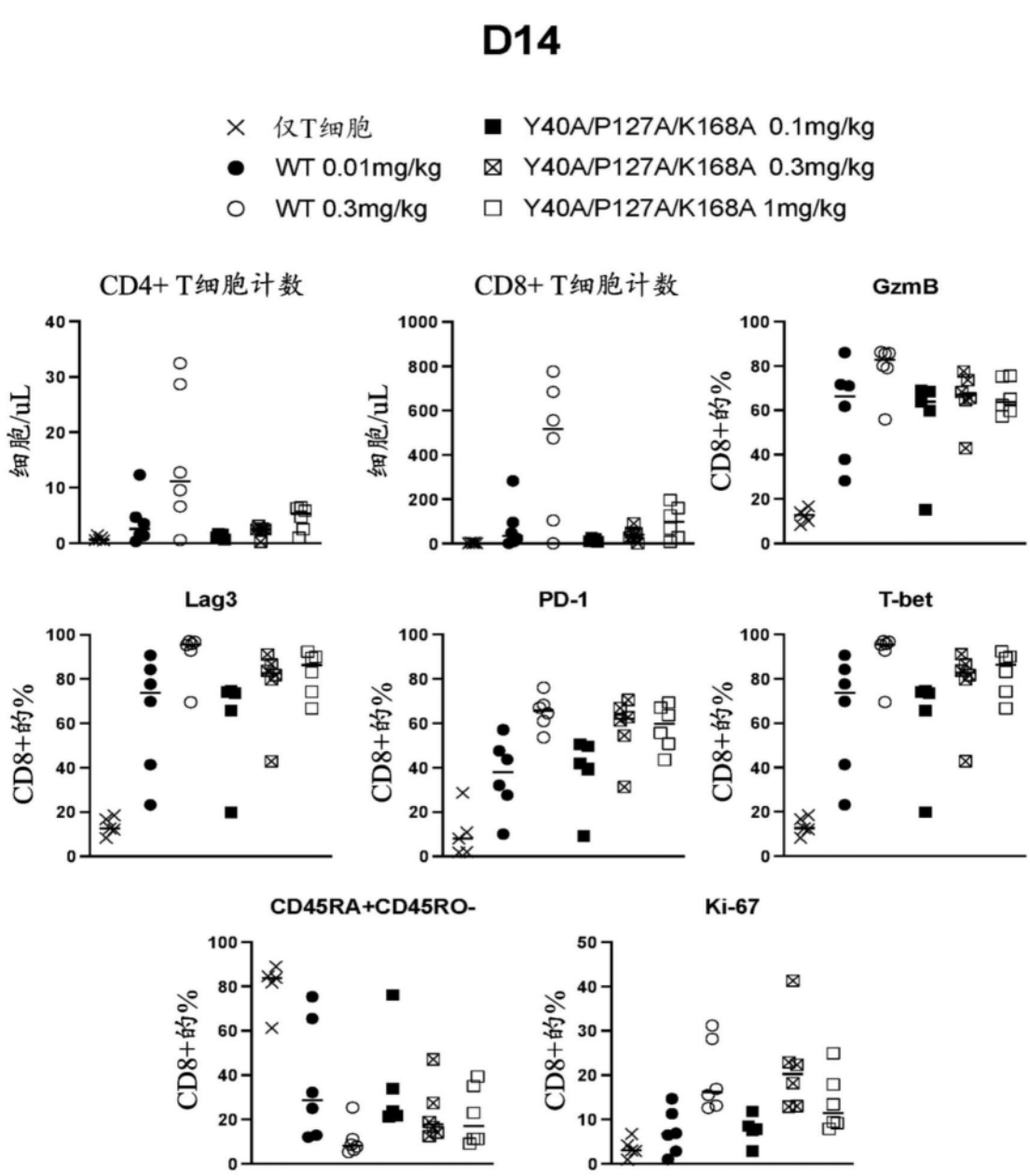

D14
仅T细胞
WT 0.01mg/kg
WT 0.3mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.1mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.3mg/kg
Y40A/P127A/K168A 1mg/kg
CD4+ T细胞计数
CD8+ T细胞计数
GzmB
Lag3
PD-1
T-bet
CD45RA+CD45RO-
Ki-67
细胞/uL
CD8+的%

图52

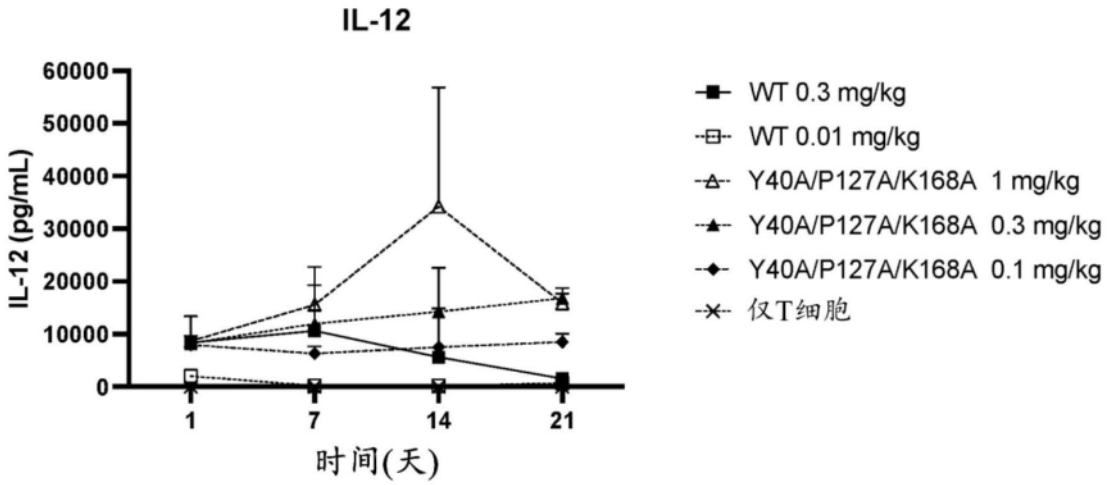

IL-12
IL-12 (pg/mL)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1
7
14
21
时间(天)
WT 0.3 mg/kg
WT 0.01 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 1 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.3 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.1 mg/kg
仅T细胞

图53

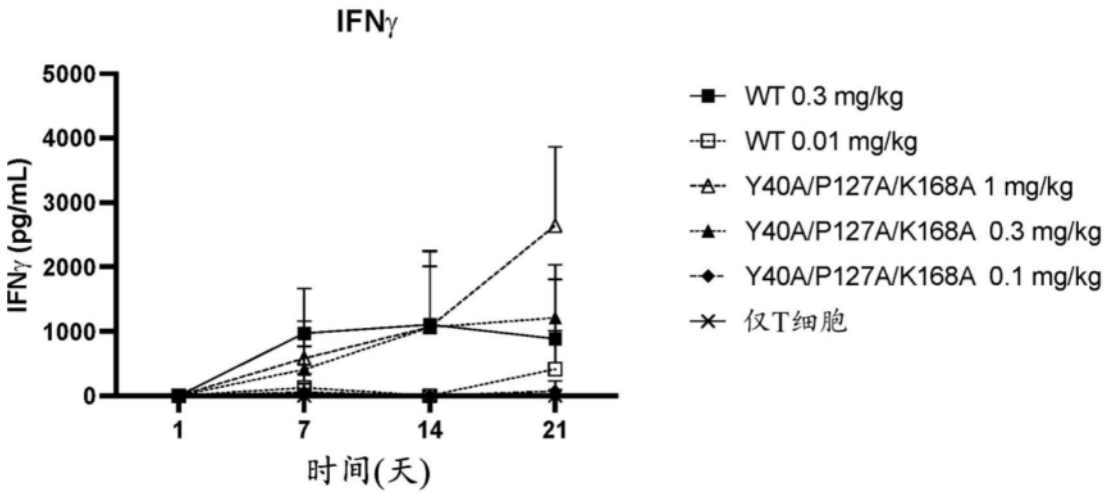

IFNγ
IFNγ (pg/mL)
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
7
14
21
时间(天)
WT 0.3 mg/kg
WT 0.01 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 1 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.3 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.1 mg/kg
仅T细胞

图54

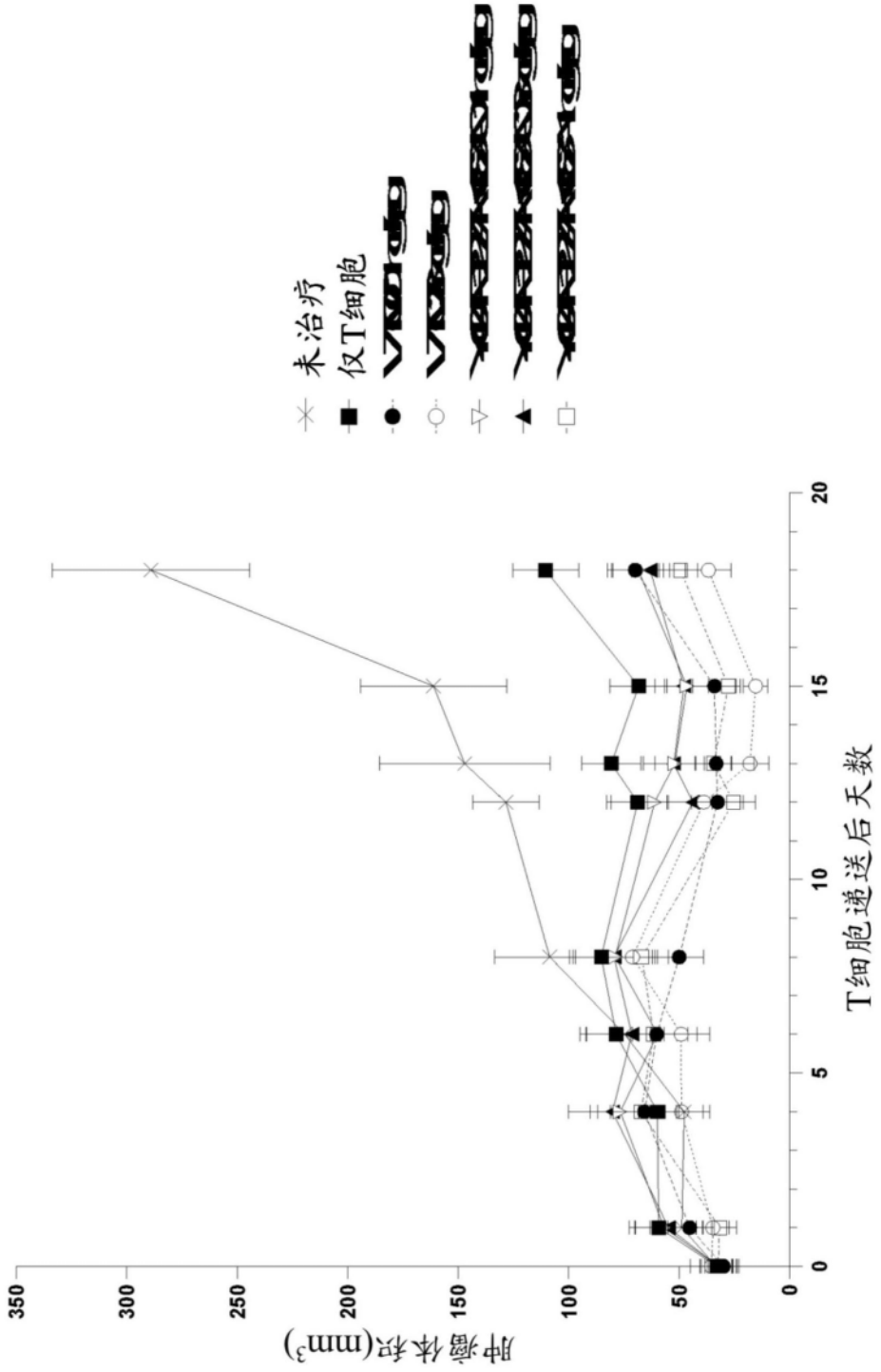

未治疗
仅T细胞
肿瘤体积(mm³)
T细胞递送后天数
0
50
100
150
200
250
300
350
0
5
10
15
20

图55

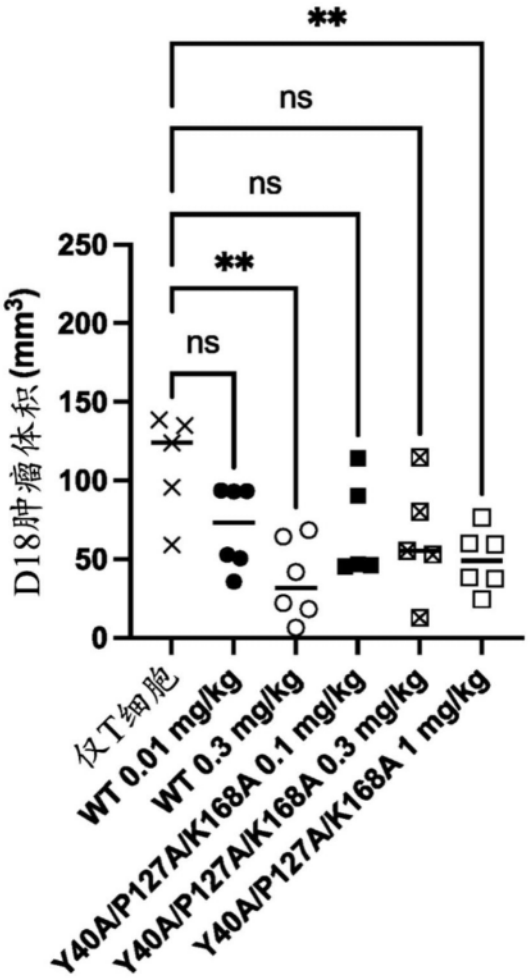

**
ns
ns
**
ns
250
200
150
100
50
0
D18肿瘤体积 (mm³)
仅T细胞
WT 0.01 mg/kg
WT 0.3 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.1 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 0.3 mg/kg
Y40A/P127A/K168A 1 mg/kg

图56

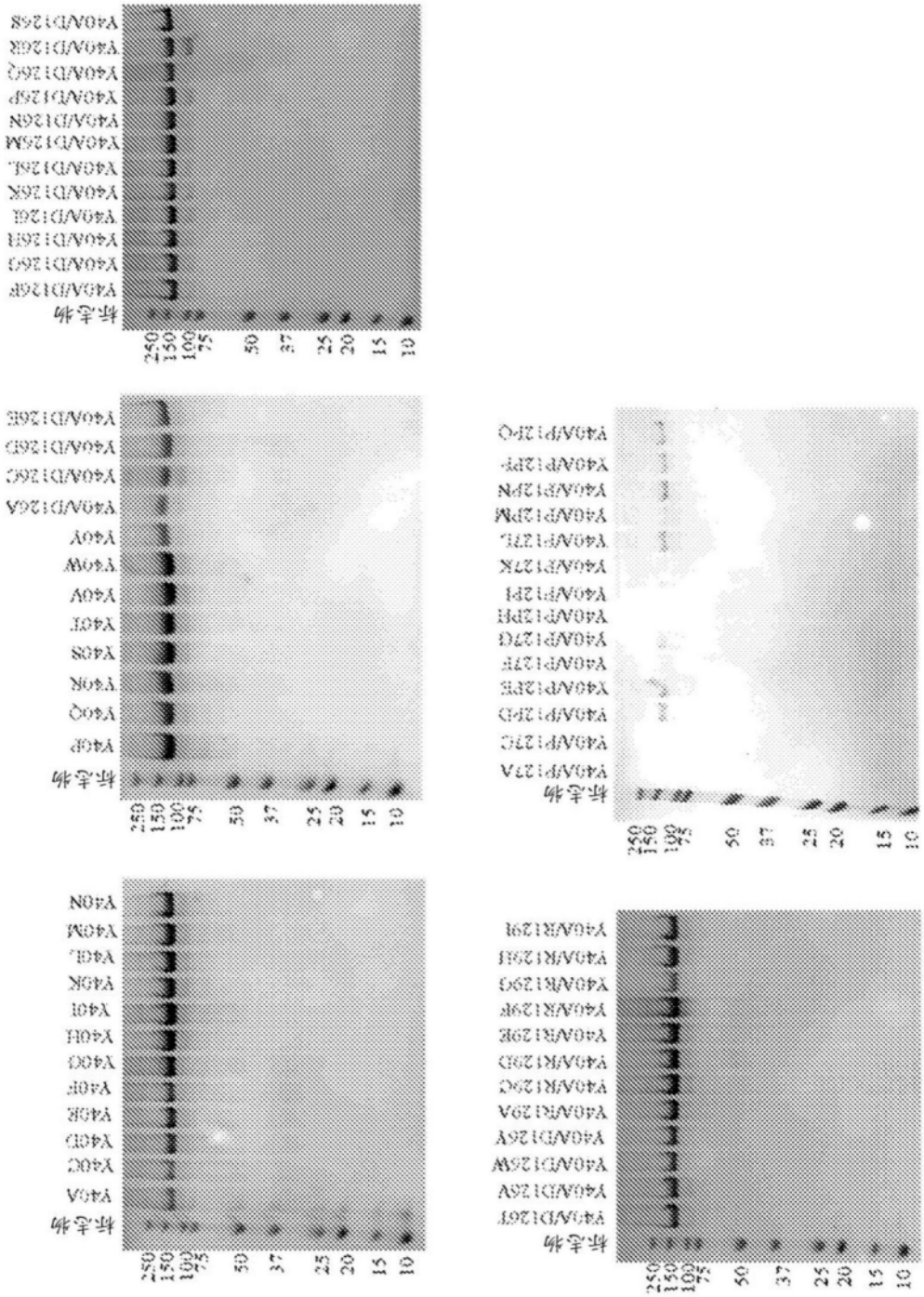

标志物
Y40A/D126P
Y40A/D126Q
Y40A/D126H
Y40A/D126G
Y40A/D126K
Y40A/D126L
Y40A/D126M
Y40A/D126N
Y40A/D126P
Y40A/D126Q
Y40A/D126R
Y40A/D126S
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
标志物
Y40A/D126E
Y40A/D126D
Y40A/D126C
Y40A/D126A
Y40Y
Y40W
Y40V
Y40T
Y40S
Y40N
Y40Q
Y40P
标志物
Y40A/P127A
Y40A/P127C
Y40A/P127D
Y40A/P127E
Y40A/P127F
Y40A/P127G
Y40A/P127H
Y40A/P127I
Y40A/P127K
Y40A/P127L
Y40A/P127M
Y40A/P127N
Y40A/P127P
Y40A/P127Q
标志物
Y40A/D126T
Y40A/D126V
Y40A/D126W
Y40A/D126Y
Y40A/R129A
Y40A/R129C
Y40A/R129D
Y40A/R129E
Y40A/R129F
Y40A/R129G
Y40A/R129H
Y40A/R129I
标志物
Y40A
Y40C
Y40D
Y40E
Y40F
Y40G
Y40H
Y40I
Y40K
Y40L
Y40M
Y40N

图57A

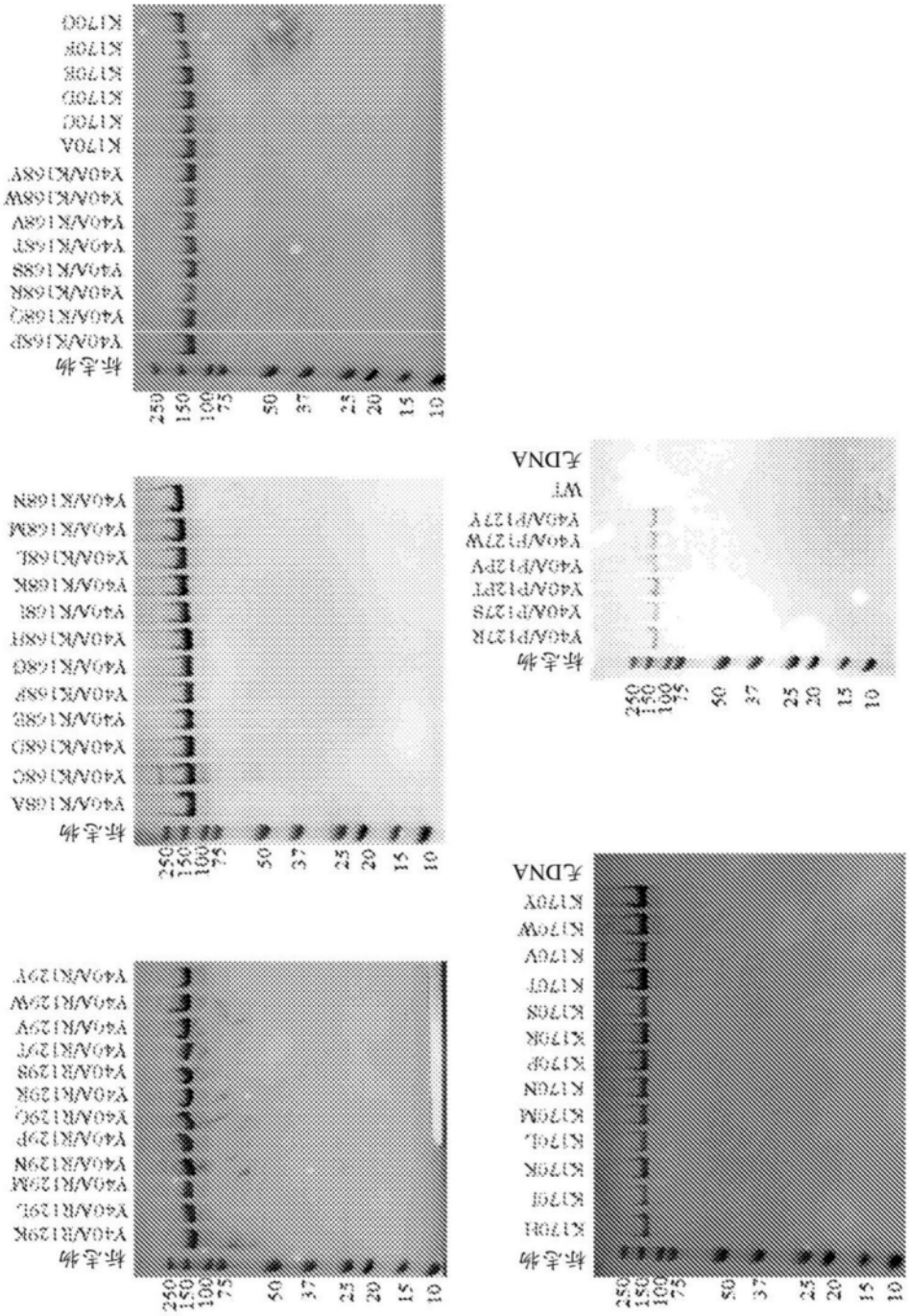

250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
标志物
Y40A/K168P
Y40A/K168Q
Y40A/K168R
Y40A/K168S
Y40A/K168T
Y40A/K168V
Y40A/K168W
Y40A/K168Y
K170A
K170C
K170D
K170E
K170F
K170G
Y40A/K168A
Y40A/K168C
Y40A/K168D
Y40A/K168E
Y40A/K168F
Y40A/K168G
Y40A/K168H
Y40A/K168I
Y40A/K168K
Y40A/K168L
Y40A/K168M
Y40A/K168N
Y40A/R129K
Y40A/R129L
Y40A/R129M
Y40A/R129N
Y40A/R129P
Y40A/R129Q
Y40A/R129R
Y40A/R129S
Y40A/R129T
Y40A/R129V
Y40A/R129W
Y40A/R129Y
λDNA
WT
Y40A/P127R
Y40A/P127S
Y40A/P127T
Y40A/P127V
Y40A/P127W
Y40A/P127Y
K170H
K170I
K170K
K170L
K170M
K170N
K170P
K170Q
K170S
K170T
K170V
K170W
K170Y

图57B

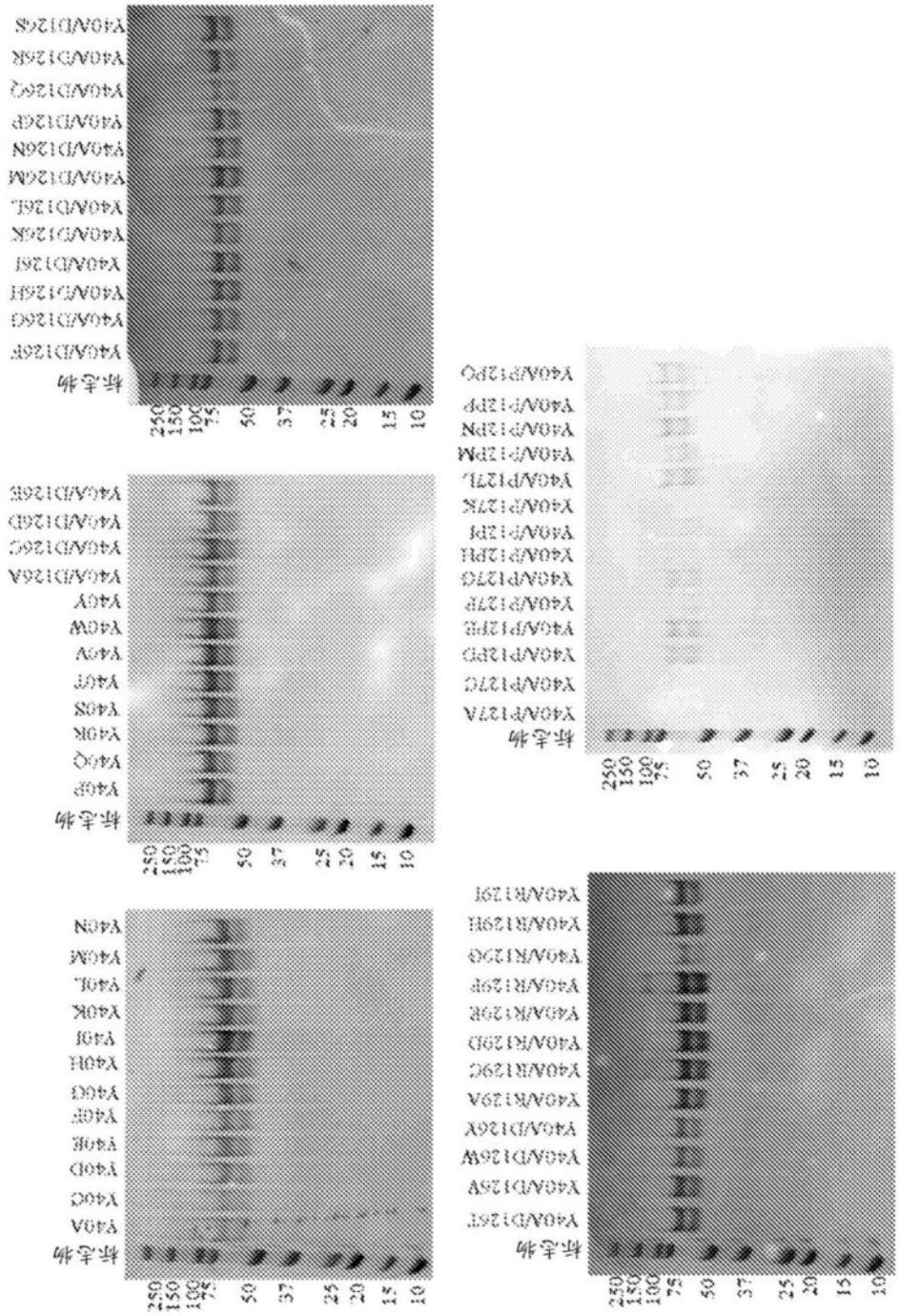

标志物
Y40A/D126F
Y40A/D126G
Y40A/D126H
Y40A/D126I
Y40A/D126K
Y40A/D126L
Y40A/D126M
Y40A/D126N
Y40A/D126P
Y40A/D126Q
Y40A/D126R
Y40A/D126S
Y40A/P127A
Y40A/P127C
Y40A/P127D
Y40A/P127E
Y40A/P127F
Y40A/P127G
Y40A/P127H
Y40A/P127I
Y40A/P127K
Y40A/P127L
Y40A/P127M
Y40A/P127N
Y40A/P127P
Y40A/P127Q
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
标志物
Y40P
Y40Q
Y40R
Y40S
Y40T
Y40V
Y40W
Y40Y
Y40A/D126A
Y40A/D126C
Y40A/D126D
Y40A/D126E
标志物
Y40A
Y40C
Y40D
Y40E
Y40F
Y40G
Y40H
Y40I
Y40K
Y40L
Y40M
Y40N
标志物
Y40A/R129T
Y40A/D126V
Y40A/D126W
Y40A/D126Y
Y40A/R129A
Y40A/R129C
Y40A/R129D
Y40A/R129E
Y40A/R129P
Y40A/R129G
Y40A/R129H
Y40A/R129I

图58A

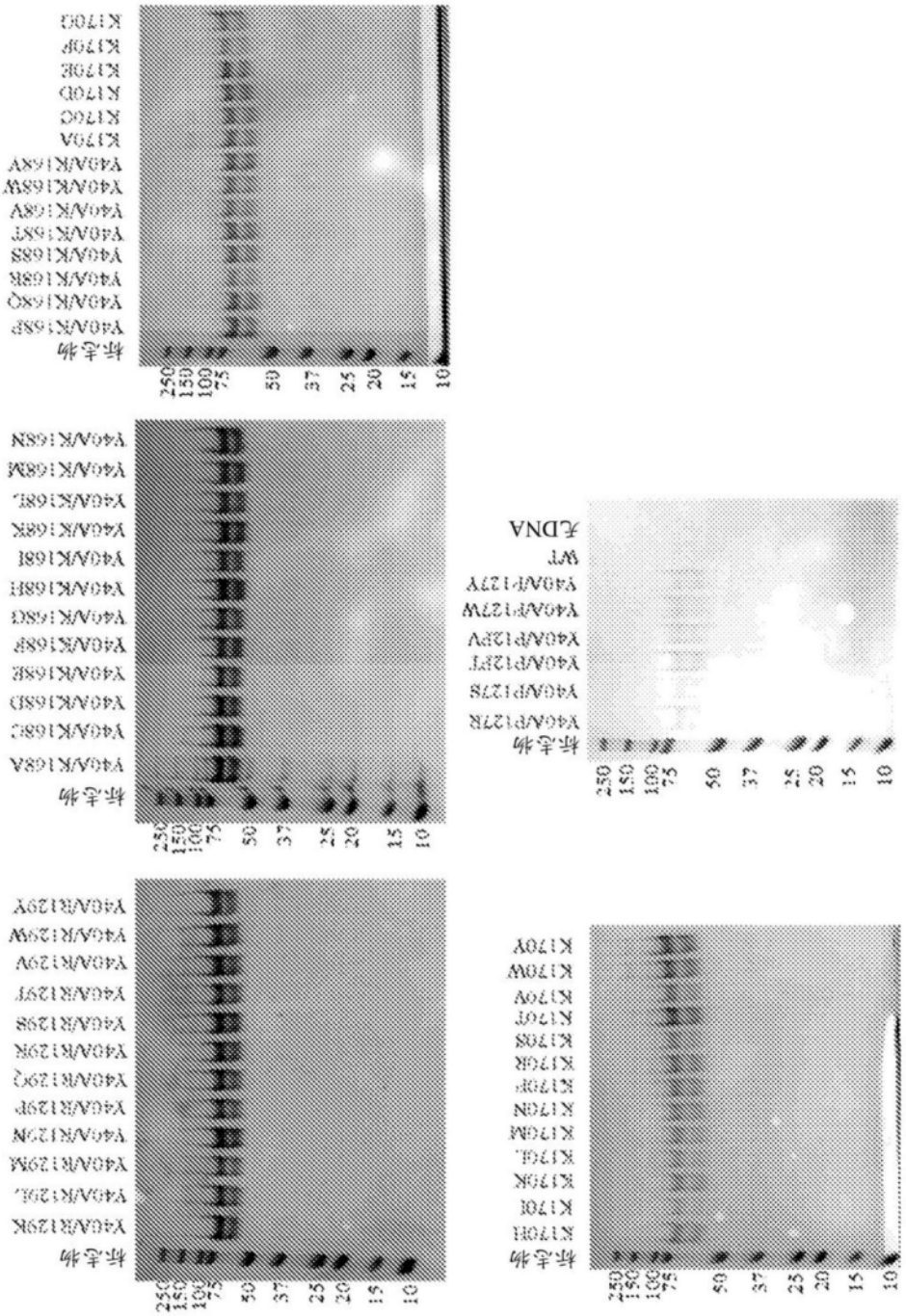

K170Q
K170P
K170E
K170D
K170C
K170A
Y40A/K168V
Y40A/K168W
Y40A/K168V
Y40A/K168T
Y40A/K168S
Y40A/K168R
Y40A/K168Q
Y40A/K168P
标志物
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Y40A/K168N
Y40A/K168M
Y40A/K168L
Y40A/K168K
Y40A/K168I
Y40A/K168H
Y40A/K168G
Y40A/K168F
Y40A/K168E
Y40A/K168D
Y40A/K168C
Y40A/K168A
Y40A/R129Y
Y40A/R129W
Y40A/R129V
Y40A/R129T
Y40A/R129S
Y40A/R129R
Y40A/R129Q
Y40A/R129P
Y40A/R129N
Y40A/R129M
Y40A/R129L
Y40A/R129K
λDNA
WT
Y40A/P127Y
Y40A/P127W
Y40A/P127V
Y40A/P127T
Y40A/P127S
Y40A/P127R
K170Y
K170W
K170V
K170T
K170S
K170R
K170P
K170N
K170M
K170L
K170K
K170I
K170H

图58B

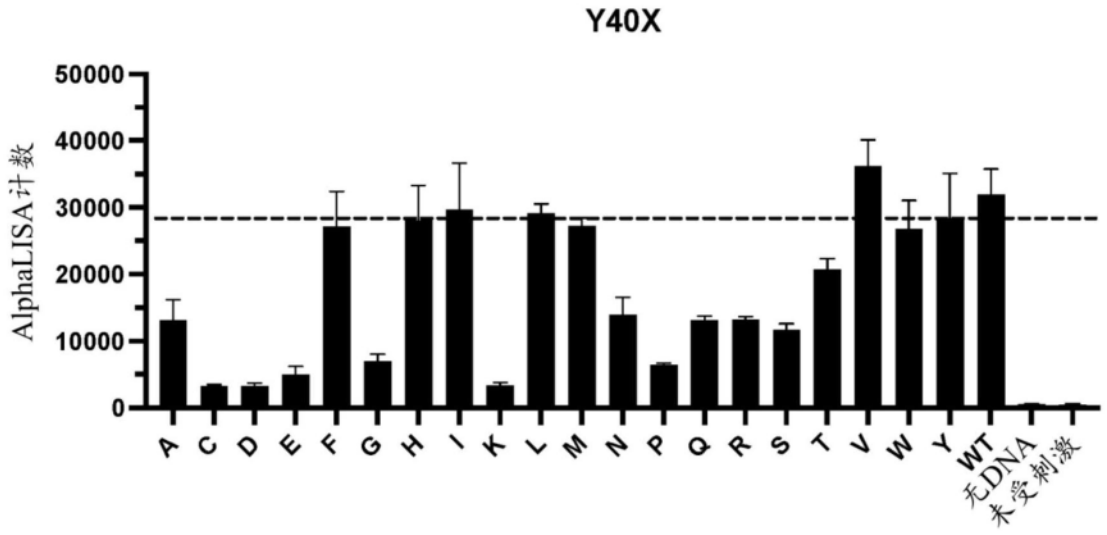

Y40X
AlphaLISA计数
50000
40000
30000
20000
10000
0
A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y WT 无DNA 未受刺激

图59

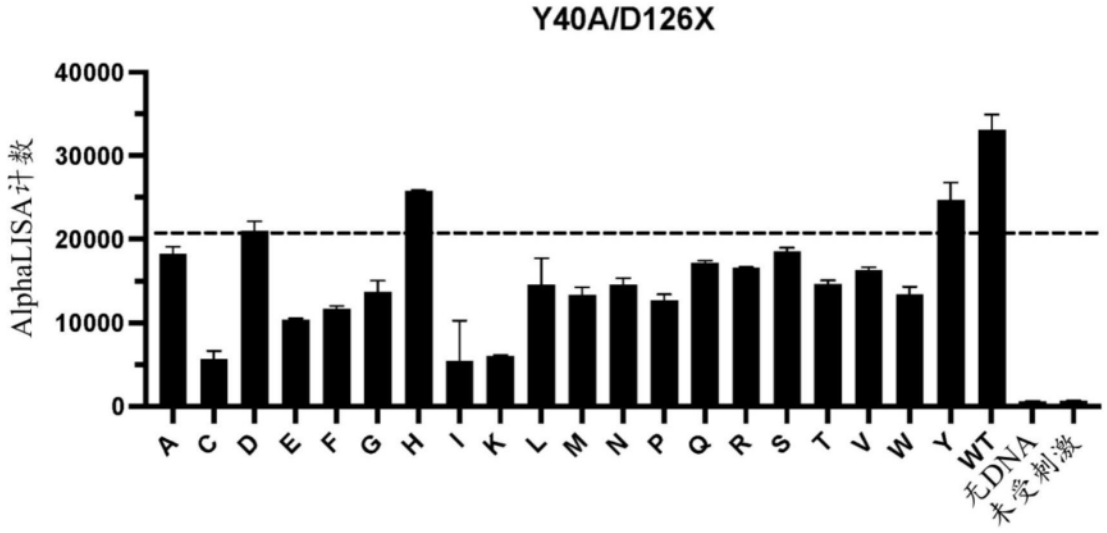

Y40A/D126X
AlphaLISA计数
40000
30000
20000
10000
0
A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y WT 无DNA 未受刺激

图60

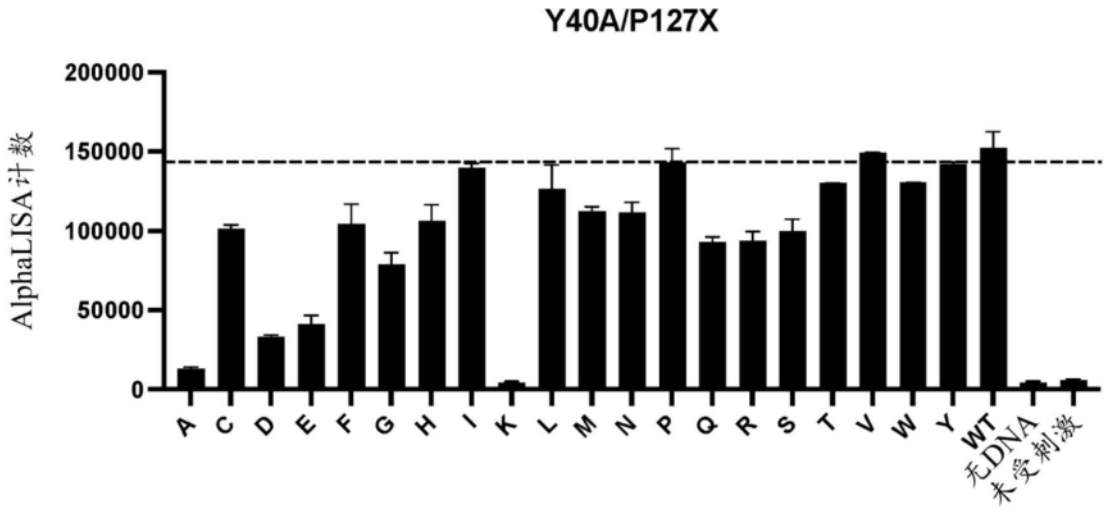

Y40A/P127X
AlphaLISA计数
200000
150000
100000
50000
0
A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y WT
无DNA
未受刺激

图61

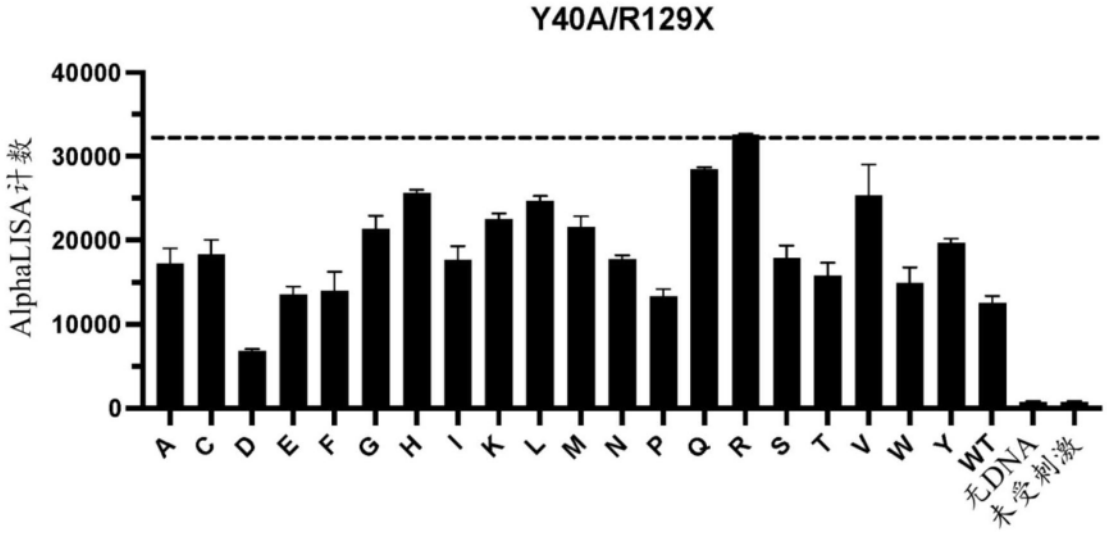

Y40A/R129X
AlphaLISA计数
40000
30000
20000
10000
0
A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y WT
无DNA
未受刺激

图62

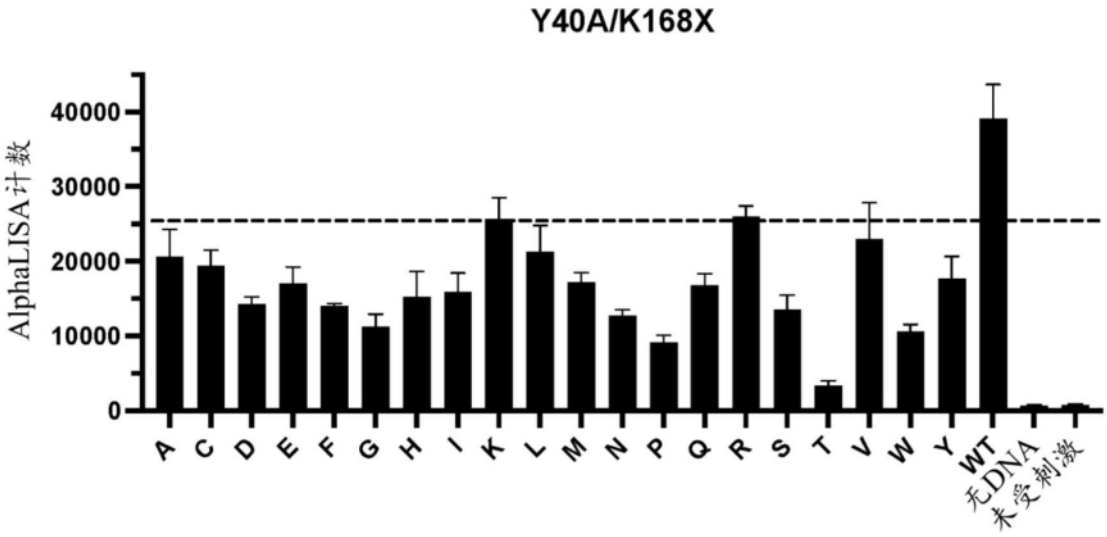

Y40A/K168X
AlphaLISA计数
40000
30000
20000
10000
0
A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y WT 无DNA 未受刺激

图63

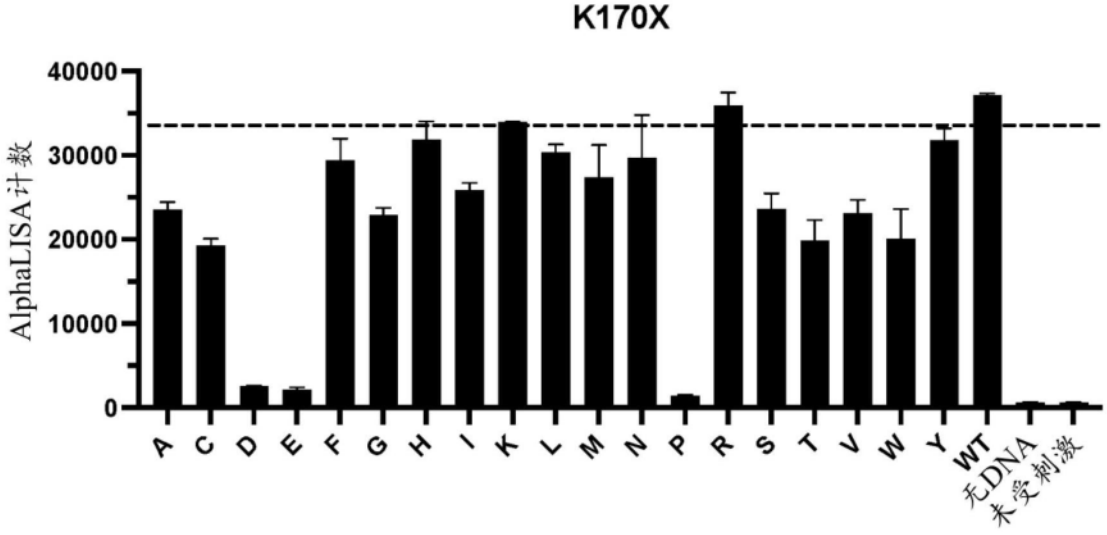

K170X
AlphaLISA计数
40000
30000
20000
10000
0
A C D E F G H I K L M N P R S T V W Y WT 无DNA 未受刺激

图64

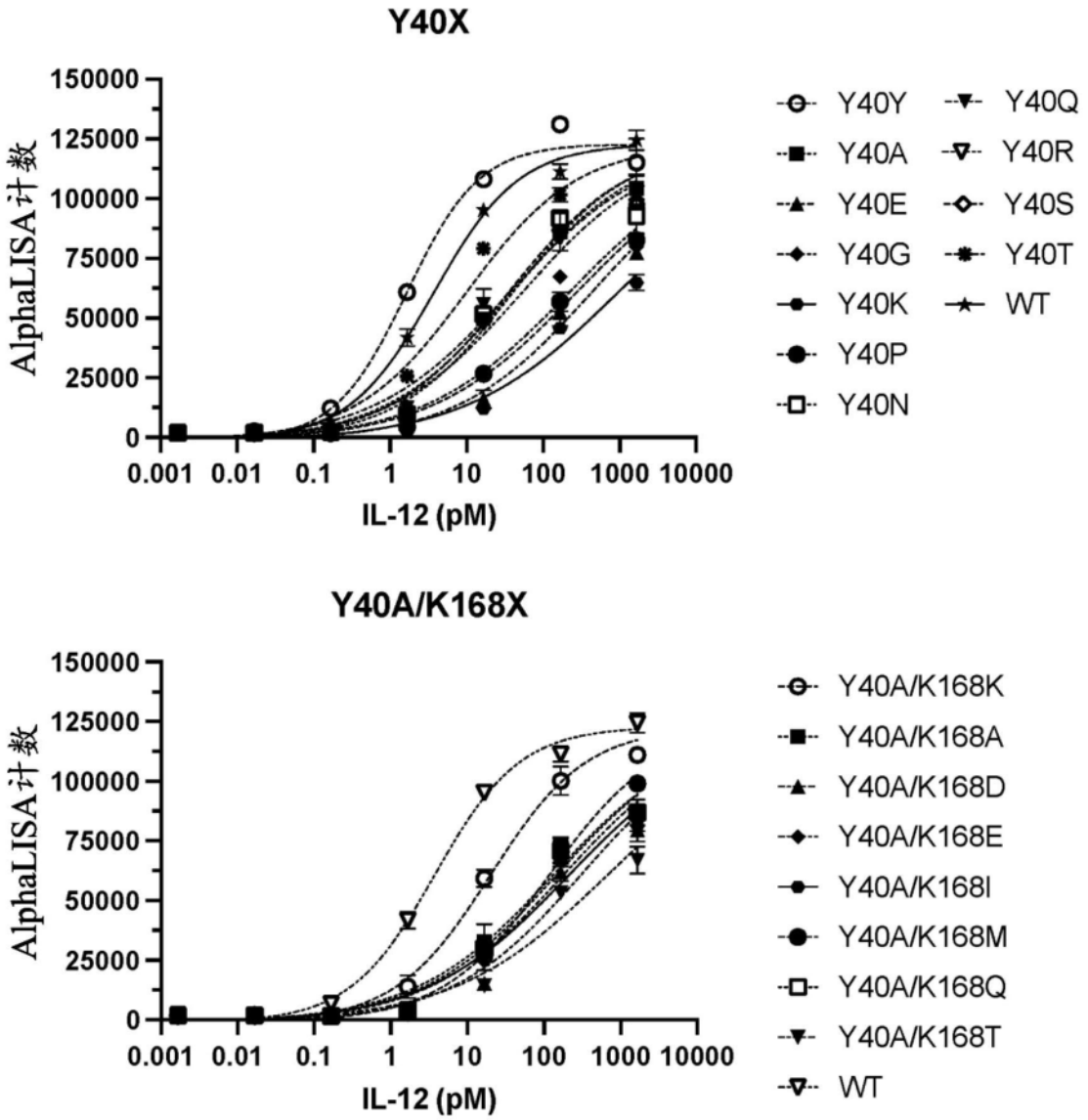

Y40X
AlphaLISA计数
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
IL-12 (pM)
Y40Y
Y40Q
Y40A
Y40R
Y40E
Y40S
Y40G
Y40T
Y40K
WT
Y40P
Y40N
Y40A/K168X
AlphaLISA计数
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
IL-12 (pM)
Y40A/K168K
Y40A/K168A
Y40A/K168D
Y40A/K168E
Y40A/K168I
Y40A/K168M
Y40A/K168Q
Y40A/K168T
WT

图65

样品	EC50 (pM)	倍数变化(相对于w.t.)
WT	3.8	1
Y40Y	1.65	0.44
Y40A	40.1	10.6
Y40E	429.6	114.0
Y40G	218.5	58.0
Y40K	949.5	252.0
Y40P	271.8	72.1
Y40N	39.1	10.4
Y40Q	36.3	9.6
Y40R	53.2	14.1
Y40S	35.3	9.4
Y40T	9.9	2.6
Y40A/K168K	20.2	5.36
Y40A/K168A	132.6	35.2
Y40A/K168D	305.6	81.1
Y40A/K168E	180.8	48.0
Y40A/K168I	214.0	56.8
Y40A/K168M	118.5	31.4
Y40A/K168Q	147.0	39.0
Y40A/K168T	681.4	180.8

图66

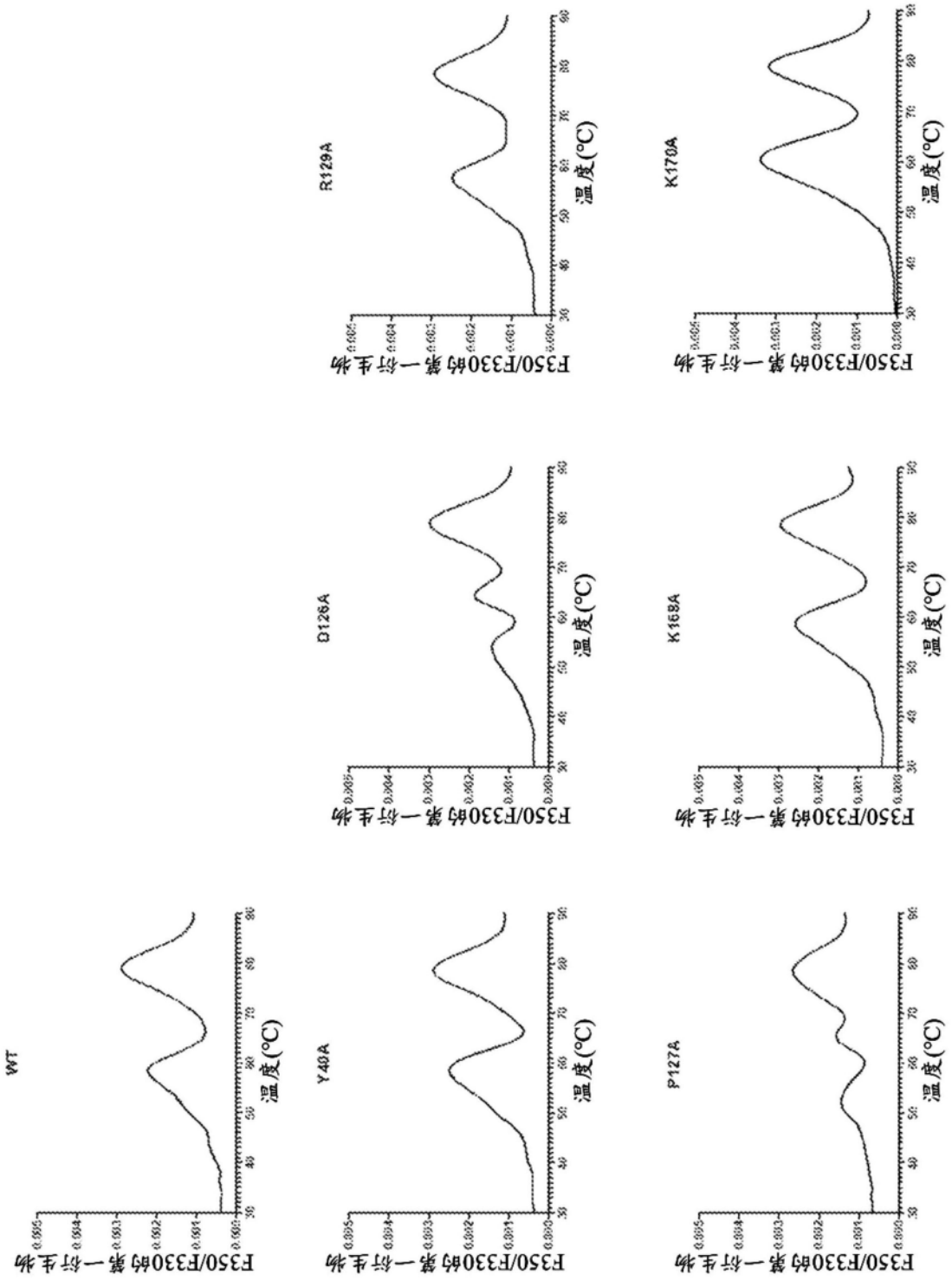


图67

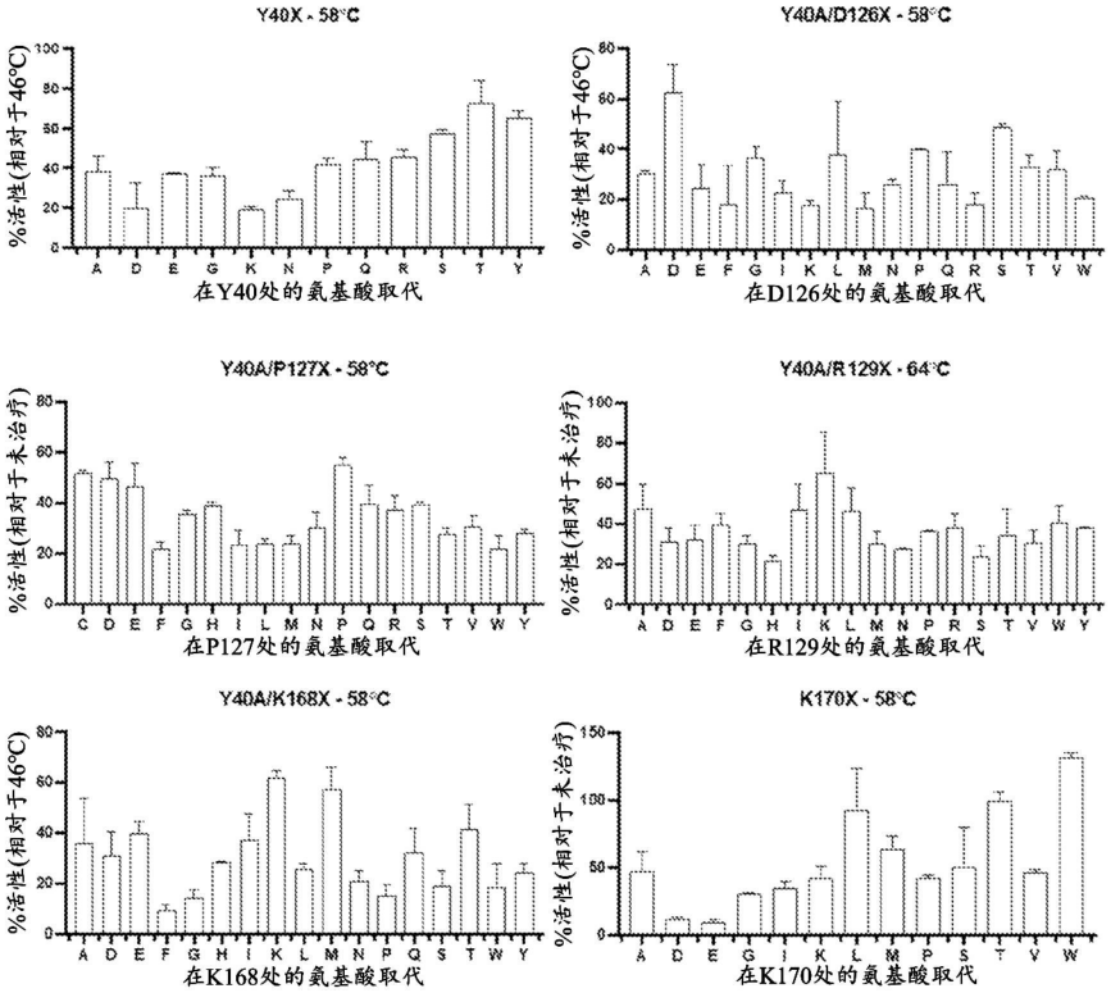

Y40X - 58°C
%活性(相对于46°C)
在Y40处的氨基酸取代
Y40A/D126X - 58°C
%活性(相对于46°C)
在D126处的氨基酸取代
Y40A/P127X - 58°C
%活性(相对于未治疗)
在P127处的氨基酸取代
Y40A/R129X - 64°C
%活性(相对于未治疗)
在R129处的氨基酸取代
Y40A/K168X - 58°C
%活性(相对于46°C)
在K168处的氨基酸取代
K170X - 58°C
%活性(相对于未治疗)
在K170处的氨基酸取代

图68

样品	TM_1 (°C)	TM_2 (°C)
WT	63.2	79.9
Y40S	63.0	80.4
Y40A	63.5	79.9
Y40R	63.2	79.7
Y40G	63.4	79.9
Y40P	63.0	80.0
Y40E	63.5	79.7
Y40S/K168I	62.8	80.0
Y40S/K168T	62.5	79.9
Y40P/K168A	64.0	80.0
Y40P/K168I	63.7	79.8
Y40P/K168T	63.9	79.8
Y40G/K168A	63.1	79.9
Y40G/K168I	63.0	80.0
Y40G/K168T	63.3	80.0
Y40E/K168A	63.2	79.8
Y40E/K168I	63.5	79.8
Y40P/K168D	63.5	79.5
Y40S/R129A	62.3	79.7
Y40G/R129A	63.0	79.9
Y40E/R129A	63.3	80.0
Y40S/K170L	63.4	79.9
Y40S/K170A	63.4	79.9
Y40S/K170T	63.0	79.7
Y40A/K170L	63.4	79.3
Y40A/K170A	63.3	79.4

图69

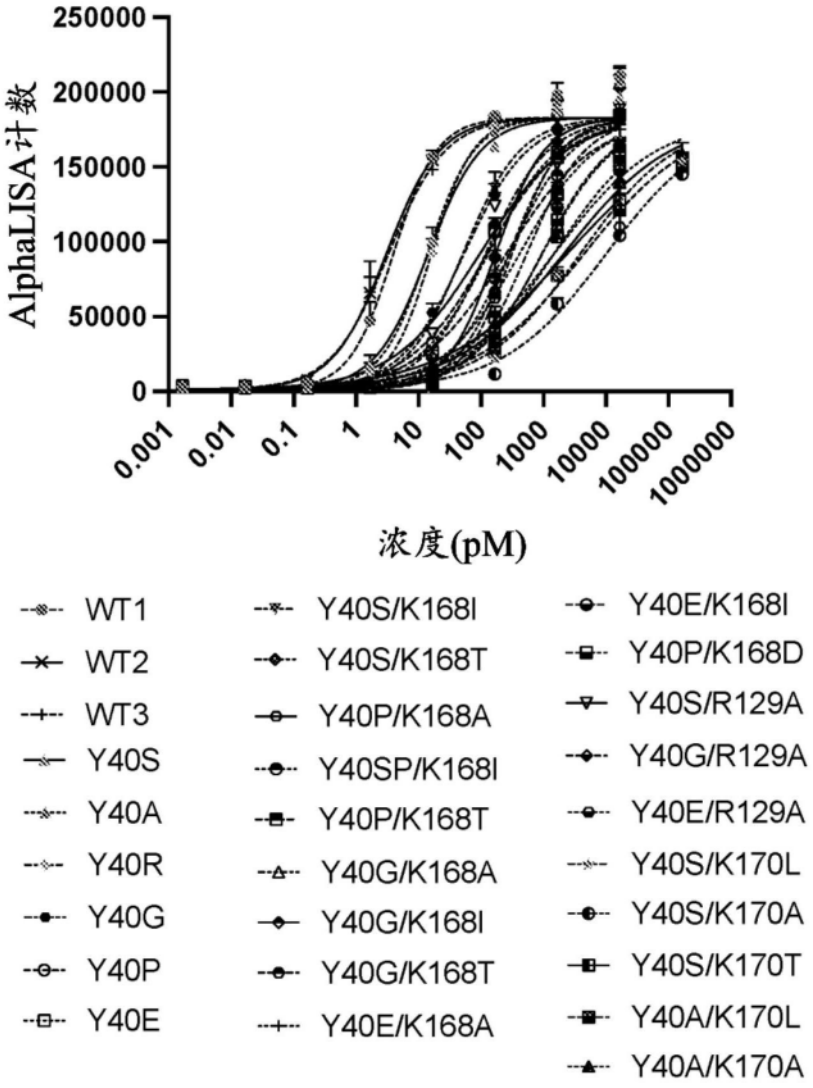

AlphaLISA计数
250000
200000
150000
100000
50000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
1000000
浓度(pM)
WT1
WT2
WT3
Y40S
Y40A
Y40R
Y40G
Y40P
Y40E
Y40S/K168I
Y40S/K168T
Y40P/K168A
Y40SP/K168I
Y40P/K168T
Y40G/K168A
Y40G/K168I
Y40G/K168T
Y40E/K168A
Y40E/K168I
Y40P/K168D
Y40S/R129A
Y40G/R129A
Y40E/R129A
Y40S/K170L
Y40S/K170A
Y40S/K170T
Y40A/K170L
Y40A/K170A

图70

样品	供体1		供体2		供体3		供体4	
	EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t.)	EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t.)	EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t.)	EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t.)
WT1	3.3	-	7.0	-	8.5	-	4.0	
WT2	2.9	-	5.5	-	10.0	-	3.1	
WT3	3.0	-	5.4	-	4.0	-	3.3	
Y40S	11.5	3.8	32.2	5.4	21.6	2.3	14.3	4.1
Y40A	18.2	5.9	25.2	4.2	35.0	3.7	13.9	4.0
Y40R	20.6	6.8	42.5	7.1	51.0	5.4	16.2	4.7
Y40Q	57.5	18.8	224.6	37.6	298.7	31.7	53.8	15.5
Y40P	91.6	30.0	515.8	86.4	746.2	79.2	125.2	36.2
Y40E	86.7	28.3	514.9	86.2	938.9	99.7	130.7	37.8
Y40S/K168I	35.9	11.7	121.9	20.4	74.9	8.0	51.6	14.9
Y40S/K168T	107.4	35.1	242.7	40.6	235.3	25.0	119.0	34.4
Y40P/K168A	708.8	231.9	2165.0	362.6	6540.0	726.1	2403.0	694.3
Y40P/K168I	204.1	66.8	860.3	144.1	749.7	79.6	283.8	82.0
Y40P/K168T	381.4	124.8	1373.0	229.9	828.0	87.9	542.3	156.7
Y40G/K168A	271.1	88.7	1029.0	172.3	560.9	59.5	285.7	82.5
Y40G/K168I	195.7	64.0	554.0	92.8	374.6	39.8	172.4	49.8
Y40G/K168T	244.3	79.9	1600.0	268.0	845.5	89.8	316.2	91.4
Y40E/K168A	1371.0	448.5	7776.0	1302.3	4925.0	522.8	1482.0	428.2
Y40E/K168I	989.2	323.6	3491.0	584.7	1518.0	161.1	952.0	275.1
Y40P/K168D	1638.0	535.8	3164.0	529.9	1387.0	147.2	968.4	279.8
Y40S/R129A	189.5	62.0	162.7	27.2	255.3	27.1	96.5	27.9
Y40G/R129A	196.2	64.2	1242.0	208.0	52354.0	5579.0	256.0	74.0
Y40E/R129A	286.2	93.6	1586.0	265.6	19684.0	2089.6	417.3	120.6
Y40S/K170L	2092.0	684.3	10225.0	1712.4	55873.0	5931.3	3911.0	1130.0
Y40S/K170A	3278.0	1072.3	42946.0	7192.4	49128.0	5215.3	10220.0	2952.9
Y40S/K170T	1021.0	334.0	12402.0	2077.0	5951.0	631.7	2133.0	616.3
Y40A/K170L	2699.0	882.9	13901.0	2328.1	8686.0	922.1	4488.0	1299.6
Y40A/K170A	824.4	269.7	3618.0	946.9	243893.0	25889.1	1494.0	431.7

图71

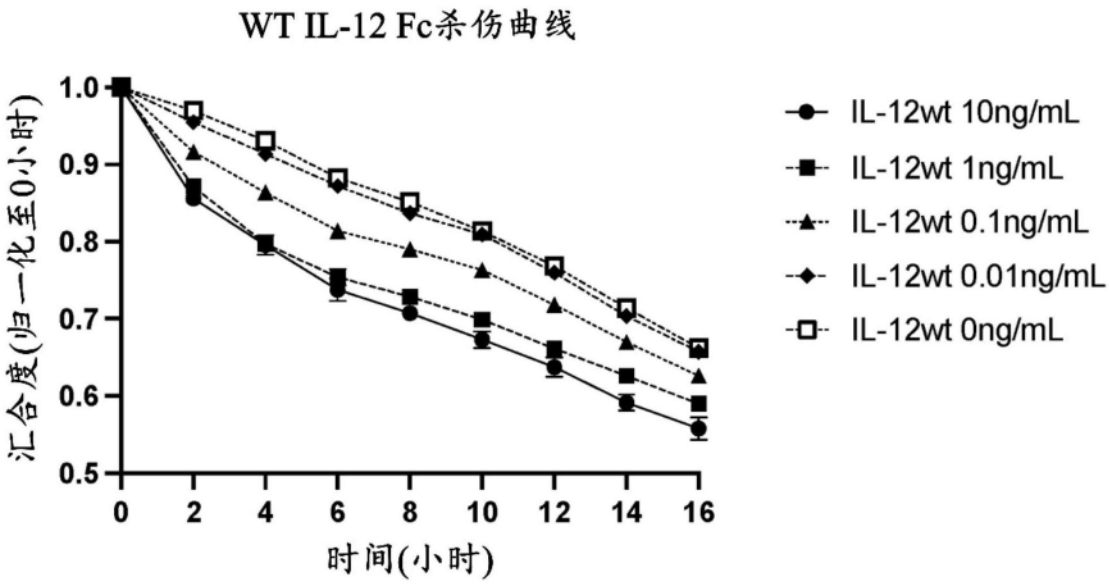

WT IL-12 Fc杀伤曲线
汇合度(归一化至0小时)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0
2
4
6
8
10
12
14
16
时间(小时)
IL-12wt 10ng/mL
IL-12wt 1ng/mL
IL-12wt 0.1ng/mL
IL-12wt 0.01ng/mL
IL-12wt 0ng/mL

图72

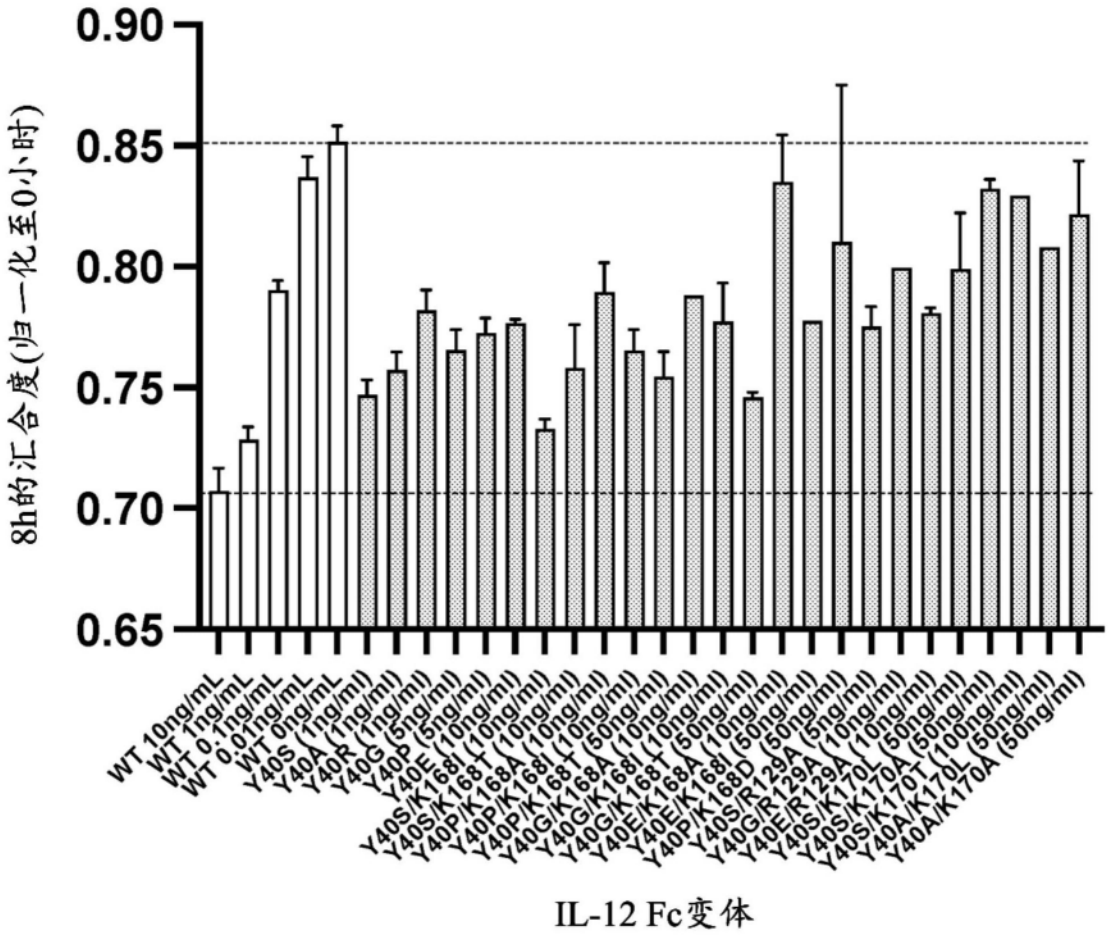

8h的汇合度(归一化至0小时)
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
0.65
WT 10ng/mL
WT 1ng/mL
WT 0.1ng/mL
WT 0.01ng/mL
WT 0ng/mL
Y40S (1ng/ml)
Y40A (1ng/ml)
Y40R (1ng/ml)
Y40G (5ng/ml)
Y40P (5ng/ml)
Y40E (10ng/ml)
Y40S/K168I (10ng/ml)
Y40S/K168T (10ng/ml)
Y40P/K168A (10ng/ml)
Y40P/K168I (10ng/ml)
Y40P/K168T (10ng/ml)
Y40G/K168A (10ng/ml)
Y40G/K168I (50ng/ml)
Y40G/K168T (10ng/ml)
Y40E/K168A (50ng/ml)
Y40E/K168I (10ng/ml)
Y40P/K168D (50ng/ml)
Y40S/R129A (50ng/ml)
Y40G/R129A (5ng/ml)
Y40E/R129A (10ng/ml)
Y40S/K170L (10ng/ml)
Y40S/K170A (50ng/ml)
Y40S/K170T (50ng/ml)
Y40A/K170L (100ng/ml)
Y40A/K170A (50ng/ml)
IL-12 Fc变体

图73

样品	相对于WT的 活性的插值倍数变化
Y40S	2.3
Y40A	3.4
Y40R	7.7
Y40G	22.4
Y40P	28.2
Y40E	64.9
Y40S/K168I	12.8
Y40S/K168T	34.8
Y40P/K168A	97.8
Y40P/K168I	44.5
Y40P/K168T	153.8
Y40G/K168A	93.1
Y40G/K168I	66.1
Y40G/K168T	112.0
Y40E/K168A	842.1
Y40E/K168I	331.8
Y40P/K168D	1045.5
Y40S/R129A	30.8
Y40G/R129A	138.4
Y40E/R129A	73.8
Y40S/K170L	682.7
Y40S/K170A	3318.7
Y40S/K170T	5384.8
Y40A/K170L	951.8
Y40A/K170A	1750.3

图74

样品	TM_1 (°C)	TM_2 (°C)
WT	63.1	79.8
Y40E/K168T	62.9	79.9
Y40A/K170T	63.0	79.8
K170A	63.0	79.7
K170T	62.7	79.7
K170A/K168A	62.9	79.6
K170A/K168I	62.6	79.6
K170A/K168T	62.8	79.6
K170T/K168A	62.4	79.7
K170T/K168I	62.8	80.0
K170T/K168T	63.0	79.7
K170P	62.0	78.7
K170P/K168A	63.1	79.6
K170P/K168I	63.1	79.7
K170P/K168T	63.1	79.7
K170A/R129E	62.7	79.7
K170T/R129E	62.5	79.7
K170P/R129E	62.5	79.4

图75

样品	WT EC50 (pM)	突变体 EC50 (pM)	倍数变化(相对于 w.t.)
Y40E/K168T	3.6	2134	587.1
Y40A/K170T	3.6	1748	480.9
K170A	3.6	13.7	3.8
K170T	3.6	9.1	2.5
K170A/K168A	3.6	31.5	8.7
K170A/K168I	3.6	27.3	7.5
K170A/K168T	3.6	34.6	9.5
K170T/K168A	3.6	32.1	8.8
K170T/K168I	4.5	53.2	12.0
K170T/K168T	3.6	42.7	11.8
K170P	3.6	2667	733.7
K170P/K168A	3.6	9128	2511.1
K170P/K168I	3.6	18734	5153.8
K170P/K168T	3.6	2622	721.3
K170A/R129E	3.6	402	110.8
K170T/R129E	3.6	190.1	52.3
K170P/R129E	4.5	159990	35952.8

图76

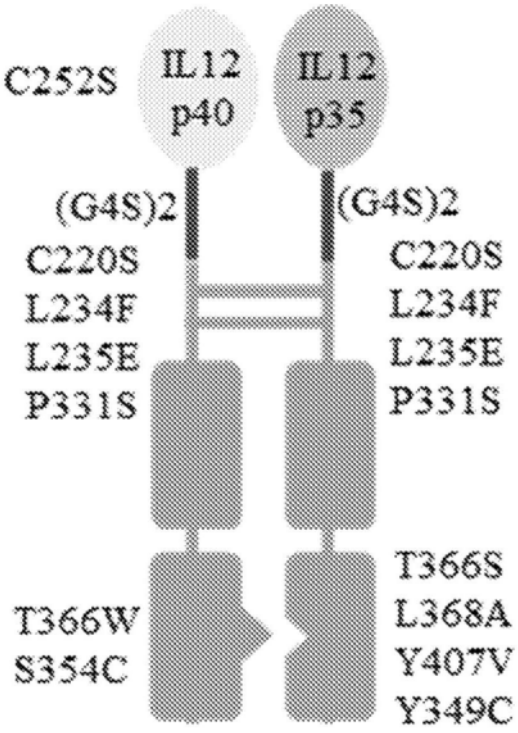

C252S
IL12
p40
IL12
p35
(G4S)2
(G4S)2
C220S
L234F
L235E
P331S
C220S
L234F
L235E
P331S
T366S
L368A
Y407V
Y349C
T366W
S354C

图77

具有K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 103**)

具有Y40A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 104**)

具有T43A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 105**)

具有D126A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 106**)

具有P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 107**)

具有R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 108**)

具有K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 109**)

具有Y40A/T43A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 110**)

具有Y40A/D126A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 111**)

具有Y40A/P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 112**)

具有Y40A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 113**)

图78A

具有Y40A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 114**)

具有T43A/D126A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 115**)

具有T43A/P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 116**)

具有T43A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 117**)

具有T43A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 118**)

具有D126A/P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 119**)

具有D126A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 120**)

具有D126A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 121**)

具有P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 122**)

具有P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 123**)

图78B

具有R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 124**)

具有Y40A/T43A/D126A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 125**)

具有Y40A/T43A/P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 126**)

具有Y40A/T43A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 127**)

具有Y40A/T43A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 128**)

具有Y40A/D126A/P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 129**)

具有Y40A/D126A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 130**)

具有Y40A/D126A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 131**)

具有Y40A/P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 132**)

具有Y40A/P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 133**)

具有Y40A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 134**)

图78C

具有T43A/D126A/P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 135**)

具有T43A/D126A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 136**)

具有T43A/D126A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 137**)

具有T43A/P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 138**)

具有T43A/P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 139**)

具有T43A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 140**)

具有D126A/P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 141**)

具有D126A/P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 142**)

具有D126A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 143**)

具有P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 144**)

具有Y40A/T43A/D126A/P127A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 145**)

图78D

具有Y40A/T43A/D126A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 146**)

具有Y40A/T43A/D126A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 147**)

具有Y40A/T43A/P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 148**)

具有Y40A/T43A/P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 149**)

具有Y40A/T43A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 150**)

具有Y40A/D126A/P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (**SEQ ID NO: 151**)
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/D126A/P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (**SEQ ID NO: 152**)
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/D126A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (**SEQ ID NO: 153**)
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (**SEQ ID NO: 154**)
RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

图78E

具有T43A/D126A/P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 155)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有T43A/D126A/P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 156)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有T43A/D126A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 157)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有T43A/P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 158)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有D126A/P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 159)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 160)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/T43A/D126A/P127A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 161)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 162)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/T43A/P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 163)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

图78F

具有Y40A/T43A/D126A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 164)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有T43A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 165)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

具有Y40A/T43A/D126A/P127A/R129A/K168A/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列 (SEQ ID NO: 166)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCASEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

图78G

IL12(K170A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 K170A（SEQ ID NO: 169）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc臼 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S（SEQ ID NO: 170）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IL12(Y40A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A（SEQ ID NO: 171）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc臼 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S（SEQ ID NO: 170）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IL12(Y40A/D126A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/D126A（SEQ ID NO: 172）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图79A

IL12(Y40A/D126A)-Fc（续）

hIgG1 Fc白C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S（SEQ ID NO: 170）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IL12(Y40A/P127A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/P127A（SEQ ID NO: 173）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc白C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S（SEQ ID NO: 170）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IL12(Y40A/R129A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/R129A（SEQ ID NO: 174）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc白C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S（SEQ ID NO: 170）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

图79B

IL12(Y40A/K168A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/K168A（SEQ ID NO: 175）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc臼 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S（SEQ ID NO: 170）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IL12(Y40A/K170A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/K170A（SEQ ID NO: 176）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc臼 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S（SEQ ID NO: 170）

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IL12(Y40A/D126A/P127A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/D126A/P127A（SEQ ID NO: 167）

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMAAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图79C

IL12(Y40A/D126A/P127A)-Fc (续)

hIgG1 Fc白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S (SEQ ID NO: 170)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

IL12(Y40A/P127A/K168A)-Fc

hIgG1 Fc杵 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p35 Y40A/P127A/K168A (SEQ ID NO: 168)

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDAKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

hIgG1 Fc白 C220S LFLEPS_(G4S)2_hIL12 p40 C252S (SEQ ID NO: 170)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSH
SLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLS
AERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE
VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFSVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGG
GGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN
QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

图79D

具有Y40C突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFCPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 177**)

具有Y40D突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFDPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 178**)

具有Y40E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFEPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 179**)

具有Y40G突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFGPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 180**)

具有Y40K突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFKPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 181**)

具有Y40N突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFNPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 182**)

具有Y40P突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFPPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 183**)

具有Y40Q突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFQPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 184**)

具有Y40R突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFRPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 185**)

具有Y40S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFSPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 186**)

具有Y40T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFTPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 187**)

图80A

具有K170C突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTCIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 188**)

具有K170D突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTDIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 189**)

具有K170E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTEIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 190**)

具有K170G突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTGIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 191**)

具有K170I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTIIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 192**)

具有K170M突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTMIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 193**)

具有K170P突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTPIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 194**)

具有K170S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTSIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 195**)

具有K170T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 196**)

具有K170V突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTVIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 197**)

具有K170W突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTWIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 198**)

图80B

具有Y40A/D126C突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMCPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 199**)

具有Y40A/D126E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMEPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 200**)

具有Y40A/D126F突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMFPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 201**)

具有Y40A/D126G突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMGPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 202**)

具有Y40A/D126I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMIPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 203**)

具有Y40A/D126K突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMKPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 204**)

具有Y40A/D126L突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMLPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 205**)

具有Y40A/D126M突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMMPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 206**)

具有Y40A/D126N突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMNPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 207**)

具有Y40A/D126P突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMPPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 208**)

具有Y40A/D126Q突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMQPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 209**)

图80C

具有Y40A/D126R突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMRPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 210**)

具有Y40A/D126S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMSPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 211**)

具有Y40A/D126T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMTPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 212**)

具有Y40A/D126V突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMVPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 213**)

具有Y40A/D126W突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMWPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 214**)

具有Y40A/R129C突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKCQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 215**)

具有Y40A/R129D突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKDQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 216**)

具有Y40A/R129E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKEQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 217**)

具有Y40A/R129F突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKFQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 218**)

具有Y40A/R129G突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKGQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 219**)

具有Y40A/R129H突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKHQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 220**)

图80D

具有Y40A/R129I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKIQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 221**)

具有Y40A/R129K突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKKQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 222**)

具有Y40A/R129L突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKLQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 223**)

具有Y40A/R129M突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKMQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 224**)

具有Y40A/R129N突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKNQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 225**)

具有Y40A/R129P突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKPQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 226**)

具有Y40A/R129S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKSQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 227**)

具有Y40A/R129T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKTQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 228**)

具有Y40A/R129V突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKVQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 229**)

具有Y40A/R129W突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKWQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 230**)

具有Y40A/R129Y突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKYQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 231**)

图80E

具有Y40A/K168C突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYCTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 232**)

具有Y40A/K168D突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYDTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 233**)

具有Y40A/K168E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYETKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 234**)

具有Y40A/K168F突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYFTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 235**)

具有Y40A/K168G突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYGTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 236**)

具有Y40A/K168H突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYHTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 237**)

具有Y40A/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 238**)

具有Y40A/K168L突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYLTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 239**)

具有Y40A/K168M突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYMTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 240**)

具有Y40A/K168N突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYNTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 241**)

具有Y40A/K168P突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYPTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 242**)

图80F

具有Y40A/K168Q突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYQTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 243**)

具有Y40A/K168S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYSTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 244**)

具有Y40A/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 245**)

具有Y40A/K168W突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYWTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 246**)

具有Y40A/K168Y突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYYTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 247**)

具有Y40A/K170L突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTLIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 248**)

具有Y40A/K170T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 249**)

具有Y40E/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFEPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 250**)

具有Y40E/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFEPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 251**)

具有Y40E/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFEPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 252**)

具有Y40E/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFEPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 253**)

图80G

具有Y40G/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFGPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 254**)

具有Y40G/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFGPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 255**)

具有Y40G/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFGPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 256**)

具有Y40G/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFGPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 257**)

具有Y40P/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFPPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 258**)

具有Y40P/K168D突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFPPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYDTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 259**)

具有Y40P/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFPPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 260**)

具有Y40P/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFPPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 261**)

具有Y40S/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFSPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 262**)

具有Y40S/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFSPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 263**)

具有Y40S/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFSPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 264**)

图80H

具有Y40S/K170L突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFSPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTLIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 265**)

具有Y40S/K170T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFSPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 266**)

具有Y40S/R129A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFSPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKAQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 267**)

具有K170A/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 268**)

具有K170A/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 269**)

具有K170A/R129E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKEQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 270**)

具有K170P/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATPIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 271**)

具有K170P/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITPIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 272**)

具有K170P/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTPIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 273**)

具有K170P/R129E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKEQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTPIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 274**)

具有K170T/K168A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYATTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 275**)

图80I

具有K170T/K168I突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYITTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 276**)

具有K170T/K168T突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYTTTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 277**)

具有K170T/R129E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKEQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTTIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 278**)

具有Y40A/P127C突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDCKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 279**)

具有Y40A/P127D突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDDKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 280**)

具有Y40A/P127E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDEKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 281**)

具有Y40A/P127F突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDFKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 282**)

具有Y40A/P127G突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDGKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 283**)

具有Y40A/P127H突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDHKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 284**)

具有Y40A/P127K突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDKKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 285**)

具有Y40A/P127M突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDMKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 286**)

图80J

具有Y40A/P127N突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDNKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 287**)

具有Y40A/P127Q突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDQKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 288**)

具有Y40A/P127R突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDRKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 289**)

具有Y40A/P127S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFAPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDSKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 290**)

具有P127C突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDCKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 293**)

具有P127D突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDDKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 294**)

具有P127E突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDEKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 295**)

具有P127F突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDFKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 296**)

具有P127G突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDGKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 297**)

具有P127H突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDHKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 298**)

图80K

具有P127K突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDKKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 299**)

具有P127M突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDMKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 300**)

具有P127N突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDNKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 301**)

具有P127Q突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDQKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 302**)

具有P127R突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDRKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 303**)

具有P127S突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDSKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 304**)

具有R129Q突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKQQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 305**)

具有K170F突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTFIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 306**)

具有K170L突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTLIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 307**)

图80L

具有K170N突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTNIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 308**)

具有Y40G/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFGPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 309**)

具有Y40P/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFPPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 310**)

具有Y40E/K170A突变的人IL-12亚基α (IL-12 p35)成熟形式序列

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFEPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNS
RETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSET
VPQKSSLEEPDFYKTAIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (**SEQ ID NO: 311**)

图80M

HLA-A2、β2-微球蛋白和NY-ESO-1A 4变体肽的单链三聚体

MGILPSPGMPALLSLVSLLSVLLMGCVAESLLAWITQVGCGGSGGGGSGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLN
CYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDMGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEY
WDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAA
DMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEI
TLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQPTIPIVGIIAG
LVLFGAVITGAVVAAVMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSDVSLTACKV (**SEQ ID NO: 291**)

1G4 T细胞受体β链-P2A-1G4 T细胞受体α链

MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQG
EVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS
HTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQ
FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKD
SRGRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDS
AIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPLYGGSYIPTFG
RGTSLIVHPYIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK
SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
(**SEQ ID NO: 292**)

图81

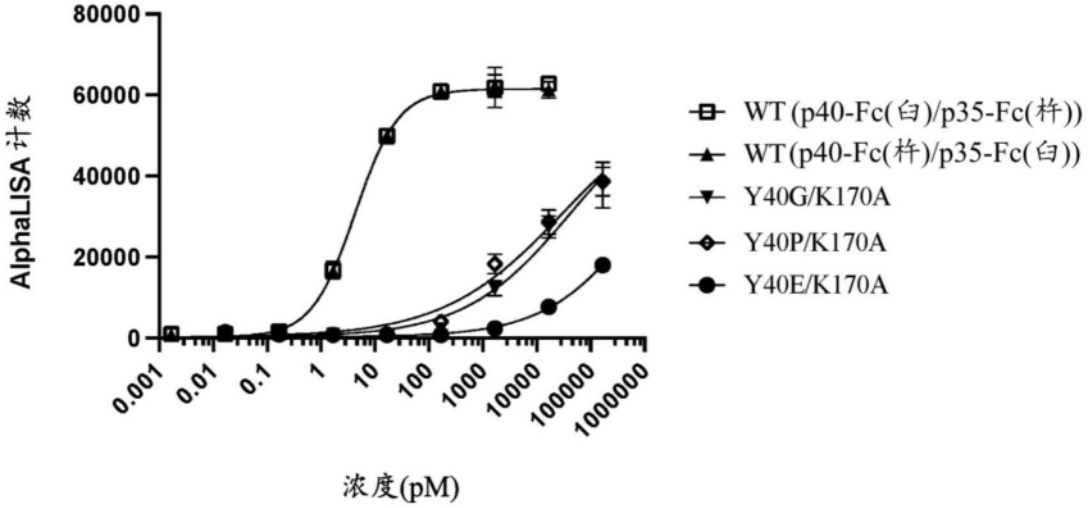


图82

样品	EC50 (pM)	倍数变化 (相对于w.t.)
WT (p40-Fc(白)/p35-Fc(杵))	4.3	1
WT (p40-Fc(杵)/p35-Fc(白))	4.3	1
Y40G/K170A	42446	9970.9
Y40P/K170A	30346	7128.5
Y40E/K170A	1012896	237936.6

图83