(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118369331 A
(43)申请公布日 2024.07.19

(21)申请号 202280076070.8
(22)申请日 2022.09.16
(30)优先权数据
63/245,523 2021.09.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/043762 2022.09.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/043978 EN 2023.03.23
(71)申请人 比卡拉治疗股份有限公司
地址 美国马塞诸塞州
(72)发明人 佳亚·巴特纳格尔
阿尔温德·维塔尔·戈斯瓦米
哈里什·库玛·特利普拉那
普拉迪普·奈尔
拉马克里希南·梅拉科德·萨巴拉曼
希夫·拉姆·奎师那
斯里尼瓦·雷迪·博瑞迪
瑞希米·奈尔
艾瓦尼斯·K·瓦什尼 谭申来
(74)专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658
专利代理师 王怡瑾 黄幸兒
(51)Int.Cl.
C07K 14/54(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)
C07K 14/715(2006.01)
C12N 15/10(2006.01)

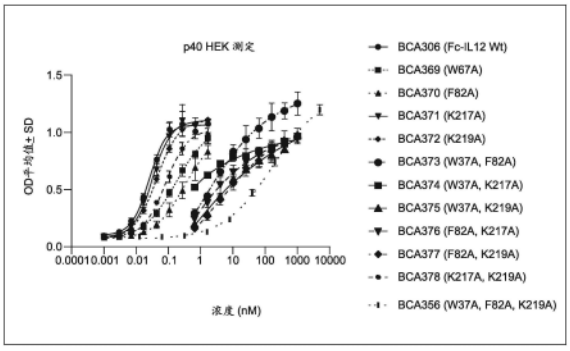
权利要求书17页 说明书246页 附图34页

(54)发明名称

CAIX靶向型IL-12融合蛋白及其使用方法

(57)摘要

本文提供了IL-12p40和IL-12p35多肽以及包含其的组合物(例如药物组合物);以及制备所述IL-12p40和IL-12p35多肽和组合物的方法。本文进一步提供了融合蛋白(例如,抗体融合蛋白),其包含IL-12p40多肽(例如,本文所述的IL-12p40多肽)和/或IL-12p35多肽(例如,本文所述的IL-12p35多肽)。本文提供的IL-12p40多肽、IL-12p35多肽和融合蛋白可用于治疗疾病(例如癌症)的药物组合物和方法中。



CN 118369331 A

1.一种人白介素12p40(hIL-12p40)多肽,其包含氨基酸序列,所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;以及(b)在以下氨基酸位置的每个处包含氨基酸取代或由所述氨基酸取代组成:(i)W37、F82和K219;(ii)W37、F82、和K217;(iii)K106、K217、和K219;(iv)W37和F82;(v)W37和K217;(vi)W37和K219;(vii)W37和K106;(viii)F82和K106;(xiv)F82和K217;(xv)F82和K219;(xvi)K217和K219;(xvii)K106和K217;或(xviii)K106和K219,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

2.如权利要求1所述的hIL-12p40多肽,其包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代中的每一个:(i)W37A、F82A和K219A;(ii)W37A、F82A、和K217A;(iii)K106A、K217A、和K219A;(iv)W37A和F82A;(v)W37A和K217A;(vi)W37A和K219A;(vii)W37A和K106A;(viii)F82A和K106A;(xiv)F82A和K217A;(xv)F82A和K219A;(xvi)K217A和K219A;(xvii)K106A和K217A;或(xviii)K106A和K219A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

3.如权利要求1或2所述的hIL-12p40多肽,其包含以下或由以下组成:在氨基酸位置W37、F82和K219中的每一个处的氨基酸取代,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

4.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代W37A、F82A和K219A中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

5.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表5中所示任一多肽的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表5中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

6.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:38-65的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-65中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

7.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:38-51的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-51中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

8.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:52-65的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:52-65中任一个所示的氨基酸序列至少85%、

86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

9.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38或52中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38或52中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

10.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

11.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38的氨基酸序列100％相同。

12.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中所述hIL-12p40多肽特异性结合所述hIL-12受体(hIL-12R)。

13.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中当与hIL-12p35蛋白组合时,所述hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达所述hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加更低。

14.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中当与hIL-12p35蛋白组合时,所述hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达所述hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

15.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中当与hIL-12p35蛋白组合时,所述hIL-12p40蛋白介导的通过在表面上表达所述hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。

16.如前述权利要求中任一项所述的hIL-12p40多肽,其中当与hIL-12p35蛋白组合时,所述hIL-12p40蛋白介导的由在表面上表达所述hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

17.一种人白介素12p35(hIL-12p35)多肽,其包含氨基酸序列,所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同;以及(b)包含以下或由以下组成:一个或多个以下氨基酸位置E60、F61、P63、K150、F188、Y189A处的氨基酸修饰(例如,取代、添加、缺失(例如,取代)),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

18.如权利要求17所述的hIL-12p35多肽,其包含以下或由以下组成:在以下氨基酸位置的每个处的氨基酸修饰(例如,取代、添加、缺失(例如,取代)):(i)F188;(ii)Y189;(iii)F188和Y189;或(iv)E60、F61、P63、K150和F188,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

19.如权利要求17或18所述的hIL-12p35多肽,其包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代中的一个或多个:E60K、F61H、P63S、K150H、F188P、F188A和/或Y189A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

20.如权利要求17-19中任一项所述的hIL-12p35多肽,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:111-114的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:111-114中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

21.如权利要求17-20中任一项所述的hIL-12p35多肽,其包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代中的每一个:(i)F188A;(ii)Y189A;(iii)F188A和Y189A;或(iv)E60K、F61H、P63S、K150H和F188P,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

22.一种hIL-12p35多肽,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸A55-K92、N50-K92、M51-K92、L52-K92、Q53-K92、K54-K92、N50-N93、M51-N93、L52-N93、Q53-N93、K54-N93、N50-E94、M51-E94、L52-E94、Q53-E94、K54-E94、N50-S95、M51-S95、L52-S95、Q53-S95、K54-S95、N50-C96、M51-C96、L52-C96、Q53-C96、K54-C96、N50-L97、M51-L97、L52-L97、Q53-L97、K54-L97、N50-P87、M51-P87、L52-P87、Q53-P87、K54-P87、N50-L88、M51-L88、L52-L88、Q53-L88、K54-L88、N50-E89、M51-E89、L52-E89、Q53-E89、K54-E89、N50-L90、M51-L90、L52-L90、Q53-L90、K54-L90、N50-T91、M51-T91、L52-T91、Q53-T91、K54-T91、R56-K92、Q57-K92、T58-K92、L59-K92、E60-K92、A55-N93、R56-N93、Q57-N93、T58-N93、L59-N93、E60-N93、A55-E94、R56-E94、Q57-E94、T58-E94、L59-E94、E60-E94、A55-S95、R56-S95、Q57-S95、T58-S95、L59-S95、E60-S95、A55-C96、R56-C96、Q57-C96、T58-C96、L59-C96、E60-C96、A55-L97、R56-L97、Q57-L97、T58-L97、L59-L97、E60-L97、A55-P87、R56-P87、Q57-P87、T58-P87、L59-P87、E60-P87、A55-L88、R56-L88、Q57-L88、T58-L88、L59-L88、E60-L88、A55-E89、R56-E89、Q57-E89、T58-E89、L59-E89、E60-E89、A55-L90、R56-L90、Q57-L90、T58-L90、L59-L90、E60-L90、A55-T91、R56-T91、Q57-T91、T58-T91、L59-T91或E60-T91(氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列)的缺失,并且除了氨基酸A55-K92、N50-K92、M51-K92、L52-K92、Q53-K92、K54-K92、N50-N93、M51-N93、L52-N93、Q53-N93、K54-N93、N50-E94、M51-E94、L52-E94、Q53-E94、K54-E94、N50-S95、M51-S95、L52-S95、Q53-S95、K54-S95、N50-C96、M51-C96、L52-C96、Q53-C96、K54-C96、N50-L97、M51-L97、L52-L97、Q53-L97、K54-L97、N50-P87、M51-P87、L52-P87、Q53-P87、K54-P87、N50-L88、M51-L88、L52-L88、Q53-L88、K54-L88、N50-E89、M51-E89、L52-E89、Q53-E89、K54-E89、N50-L90、M51-L90、L52-L90、Q53-L90、K54-L90、N50-T91、M51-T91、L52-T91、Q53-T91、K54-T91、R56-K92、Q57-K92、T58-K92、L59-K92、E60-K92、A55-N93、R56-N93、Q57-N93、T58-N93、L59-N93、E60-N93、A55-E94、R56-E94、Q57-E94、T58-E94、L59-E94、E60-E94、A55-S95、R56-S95、Q57-S95、T58-S95、L59-S95、E60-S95、

A55-C96、R56-C96、Q57-C96、T58-C96、L59-C96、E60-C96、A55-L97、R56-L97、Q57-L97、T58-L97、L59-L97、E60-L97、A55-P87、R56-P87、Q57-P87、T58-P87、L59-P87、E60-P87、A55-L88、R56-L88、Q57-L88、T58-L88、L59-L88、E60-L88、A55-E89、R56-E89、Q57-E89、T58-E89、L59-E89、E60-E89、A55-L90、R56-L90、Q57-L90、T58-L90、L59-L90、E60-L90、A55-T91、R56-T91、Q57-T91、T58-T91、L59-T91或E60-T91的缺失,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同。

23.如权利要求22所述的hIL-12p35多肽,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸A55-K92(氨基酸编号相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列)的缺失,并且除了氨基酸A55-K92的缺失,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％相同。

24.如权利要求21-23中任一项所述的hIL-12p35多肽,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:110的氨基酸序列中所示的氨基酸缺失组(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述氨基酸缺失组之外,所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:110中任一个所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

25.一种单链hIL-12(schIL-12)多肽,其包含与hIL-12p35多肽可操作地连接的如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽。

26.如权利要求25所述的schIL-12,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与表6中所示多肽的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

27.如权利要求25-26中任一项所述的sch-IL12多肽,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

28.如权利要求25-27中任一项所述的schIL-12多肽,其中所述hIL-12p35多肽是如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽。

29.一种schIL-12多肽,其包含与hIL-12p40多肽可操作地连接的如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽。

30.如权利要求29所述的schIL-12,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表10中所示多肽的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

31.如权利要求29-30中任一项所述的sch-IL12多肽,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-51或90-109中任一个的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

32.如权利要求29-31中任一项所述的schIL-12多肽,其中所述hIL-12p40多肽是如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽。

33.如权利要求17-32中任一项所述的schIL-12多肽,其中所述hIL-12p40多肽经由肽接头可操作地连接至所述hIL-12p35多肽。

34.如权利要求17-33中任一项所述的schIL-12多肽,其中所述多肽从N末端到C末端包含:所述hIL-12p40多肽、肽接头和所述hIL-12p35多肽。

35.如权利要求17-33中任一项所述的schIL-12多肽,其中所述多肽从N末端到C末端包含:所述hIL-12p35多肽、肽接头和所述hIL-12p40多肽。

36.一种融合蛋白,其包含

a.如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽,

b.hIL-12p35多肽;以及

c.异源部分。

37.一种融合蛋白,其包含

a.hIL-12p40多肽;

b.如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽;以及

c.异源部分。

38.如权利要求36-37中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与表6中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

39.如权利要求36-38中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

40.如权利要求36-39中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

41.如权利要求36-40中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表10中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

42.如权利要求36-41中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:33或38-51或90-109中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

43.如权利要求36-42中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:33或38的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

44.如权利要求36-43中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽和所述hIL-12p35多肽可操作地连接为schIL-12多肽。

45.如权利要求44所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽经由肽接头可操作地连接至所述hIL-12p35多肽。

46.如权利要求44或45所述的融合蛋白,其中所述多肽从N末端到C末端包含:所述hIL-12p40多肽、肽接头和所述hIL-12p35多肽。

47.如权利要求44或45所述的融合蛋白,其中所述多肽从N末端到C末端包含:所述hIL-12p35多肽、肽接头和所述hIL-12p40多肽。

48.如权利要求36-47中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白介导的在表面上表

达所述hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加更低。

49.如权利要求36-48中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白介导的在表面上表达所述hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

50.如权利要求36-49中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白介导的通过在表面上表达所述hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。

51.如权利要求36-50中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白介导的通过在表面上表达所述hIL-12R产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NOS:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

52.如权利要求36-51中任一项所述的融合蛋白,其中所述异源部分包含以下或由以下组成:抗体(或其抗原结合结构域)和/或一个或多个Fc区。

53.如权利要求36-52中任一项所述的融合蛋白,其中所述异源部分包含以下或由以下组成:抗体(或其抗原结合结构域)。

54.如权利要求36-53中任一项所述的融合蛋白,其中所述异源部分包含以下或由以下组成:全长抗体、scFv、$(scFv)_2$、scFv-Fc、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab-Fc、单结构域抗体(例如VHH)或单结构域抗体-Fc(例如VHH-Fc)。

55.如权利要求54所述的融合蛋白,其中所述抗体(或其抗原结合结构域)包含第一可变重链区(VH),所述VH包含三个VH互补决定区(VH CDR):VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;以及第一可变轻链区(VL),所述VL包含三个VL CDR:VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

56.如权利要求36-55中任一项所述的融合蛋白,其中所述异源部分包含以下或由以下组成:全长抗体。

57.如权利要求36-56中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合人肿瘤相关抗原(hTAA)。

58.如权利要求36-57中任一项所述的融合蛋白,其中所述抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合人碳酸酐酶IX(hCAIX)。

59.如权利要求36-58中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列各自包含以下或由以下组成:表17中所示的抗体的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列。

60.如权利要求55-59中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序

列;所述VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及所述VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列,或SEQ ID NO:243的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

61.如权利要求55-60中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列与表17中所示的任何VH多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与表17中所示的任何VL多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

62.如权利要求55-61中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7、246、256、264、274或284中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12、247、257、265、275或285中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

63.如权利要求55-62中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

64.如权利要求55-63中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

65.如权利要求36-64中任一项所述的融合蛋白,其包含包含CH2区和CH3区的第一Fc区;以及包含CH2区和CH3区的第二Fc区。

66.如权利要求65所述的融合蛋白,其中(a)所述第一Fc区包含CH2区和CH3区;并且所述第二Fc区包含CH2区和CH3区;或(b)所述第一Fc区包含铰链区、CH2区和CH3区;并且所述第二Fc区包含铰链区、CH2区和CH3区。

67.如权利要求65或66所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区和所述第二Fc区各自是hIgGl或hIgG4 Fc区或其功能性变体。

68.如权利要求65-67中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区和所述第二Fc区是全长抗体的一部分。

69.如权利要求65-68中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区的CH3区和所述第二Fc区的CH3区各自包含促进所述第一Fc区和所述第二Fc区异二聚化的至少一个氨基酸修饰。

70.如权利要求65-69中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368和Y407处的氨基酸取代。

71.如权利要求65-70中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。

72.如权利要求65-71中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置Y349处的氨基酸取代。

73.如权利要求65-72中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代Y349C。

74.如权利要求65-73中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368、Y407和Y349处的氨基酸取代。

75.如权利要求65-74中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C。

76.如权利要求65-75中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366处的氨基酸取代。

77.如权利要求65-76中任一项所述的融合蛋白,所述第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W。

78.如权利要求65-77中任一项所述的融合蛋白,所述第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置S354处的氨基酸取代。

79.如权利要求65-78中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代S354C。

80.如权利要求65-79中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366和S354处的氨基酸取代。

81.如权利要求65-80中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W和S354C。

82.如权利要求65-81中任一项所述的融合蛋白,其中根据Kabat的EU索引编号,所述第一Fc区包含以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C,并且其中所述第二Fc区包含以下氨基酸取代T366W和S354C。

83.如权利要求65-69中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368和Y407处的氨基酸取代。

84.如权利要求65-69或83中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。

85.如权利要求65-69或83-84中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置Y349处的氨基酸取代。

86.如权利要求65-69或83-85中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代Y349C。

87.如权利要求65-69或83-86中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含在根

据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368、Y407和Y349处的氨基酸取代。

88.如权利要求65-69或83-87中任一项所述的融合蛋白,其中所述第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C。

89.如权利要求65-69或83-88中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366处的氨基酸取代。

90.如权利要求65-69或83-89中任一项所述的融合蛋白,所述第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W。

91.如权利要求65-69或83-90中任一项所述的融合蛋白,所述第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置S354处的氨基酸取代。

92.如权利要求65-69或83-91中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代S354C。

93.如权利要求65-69或83-92中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366和S354处的氨基酸取代。

94.如权利要求65-69或83-93中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W和S354C。

95.如权利要求65-69或83-94中任一项所述的融合蛋白,其中根据Kabat的EU索引编号,所述第二Fc区包含以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C,并且其中所述第一Fc区包含以下氨基酸取代T366W和S354C。

96.如权利要求65-95中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区和所述第二Fc区各自包含与参考Fc区相比减少或消除Fc区效应子功能的至少一个氨基酸修饰(例如取代、缺失、添加),所述参考Fc区不包含所述至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。

97.如权利要求65-96中任一项所述的融合物,其中所述至少一种效应子功能包括所述Fc区诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或补体依赖性细胞毒性(CDC)、结合Fc受体(例如,Fcγ受体)或其任何组合的能力。

98.如权利要求65-97中任一项所述的融合蛋白,其中根据Kabat的EU索引编号,所述第一Fc区和所述第二Fc区各自在氨基酸位置L234、L235和/或P329的一个、两个或三个处包含氨基酸取代。

99.如权利要求65-98中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一Fc区和所述第二Fc区各自包含以下氨基酸取代中的一个、两个或三个:L234A、L235A和/或P329G或P329A,根据Kabat的EU索引编号。

100.如权利要求65-99中任一项所述的融合蛋白,其中根据Kabat的EU索引编号,所述第一Fc区和所述第二Fc区各自包含L234A和L235A氨基酸取代。

101.如权利要求65-100中任一项所述的融合蛋白,其中根据Kabat的EU索引编号,所述第一Fc区和所述第二Fc区各自包含L234A、L235A和P329A氨基酸取代。

102.如权利要求65-101中任一项所述的融合蛋白,其中根据Kabat的EU索引编号,所述第一Fc区和所述第二Fc区各自包含L234A、L235A和P329G氨基酸取代。

103.如权利要求65-102中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接至所述第一Fc区的C末端;并且其中所述hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接至所述第二Fc区的C末端。

104.如权利要求65-103中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽通过第一肽接头可操作地连接至所述第一Fc区;并且所述hIL-12p40多肽通过第二肽接头可操作地连接至所述第二Fc区。

105.如权利要求104所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列;并且其中所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。

106.如权利要求104或105所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、88-303或369中任一个的氨基酸序列;并且其中所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。

107.如权利要求104-106中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且其中所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

108.如权利要求65-107中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接至所述第一Fc区的C末端;并且其中所述hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接至所述第二Fc区的C末端。

109.如权利要求108所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽通过第一肽接头可操作地连接至所述第二Fc区;并且所述hIL-12p40多肽通过第二肽接头可操作地连接至所述第一Fc区。

110.如权利要求109所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列;并且其中所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。

111.如权利要求108-110中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列;并且其中所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。

112.如权利要求108-111中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且其中所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

113.如权利要求108-112中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽和所述hIL-12p35多肽可操作地连接为schIL-12多肽,并且其中所述schIL-12多肽的N末端可操作地连接至所述第一Fc区的C末端或所述第二Fc区的C末端。

114.如权利要求113所述的融合蛋白,其中所述schIL-12多肽经由第一肽接头可操作地连接至所述第一Fc区或所述第二Fc区。

115.如权利要求114所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。

116.如权利要求114或115所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。

117.如权利要求114-116中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽的氨基酸序列包

含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

118.一种融合蛋白,其包含

a.特异性结合hTAA的全长抗体,所述全长抗体包含:

i.第一轻链,其从N末端到C末端包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL);

ii.第一重链,其从N末端到C末端包含重链可变区(VH)、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;

iii.第二重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;

iv.第二轻链,其从N末端到C末端包含VL区和VH区;

其中所述第一轻链和所述第一重链相关联形成第一抗原结合结构域;

其中所述第二轻链和所述第二重链相关联形成第二抗原结合结构域;并且

其中所述第一重链和所述第二重链相关联形成二聚体;

b.如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽,

c.hIL-12p35多肽;

其中所述全长抗体的第一重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);

其中所述全长抗体的第二重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);

其中所述全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰不同于所述全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰;

其中所述全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰和所述全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰促进所述全长抗体的第一和第二重链的异二聚化;

其中所述hIL-12p40多肽的N末端通过第一肽接头可操作地连接至所述第一重链的CH3区的C末端;以及

其中所述hIL-12p35多肽的N末端经由第二肽接头可操作地连接至所述第二重链的CH3区的C末端。

119.如权利要求118所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:在氨基酸位置W37、F82和K219中的每一个处的氨基酸取代,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

120.如权利要求118或119所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代W37A、F82A和K219A中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

121.如权利要求118-120中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

122.如权利要求118-121中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

123.如权利要求118-122中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

124.如权利要求118-123中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

125.如权利要求118-124中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一抗原结合结构域特异性结合hCAIX,并且所述第二抗原结合结构域特异性结合hCAIX。

126.如权利要求118-125中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及所述VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列,或SEQ ID NO:243的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

127.如权利要求118-126中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

128.如权利要求118-127中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

129.如权利要求118-128中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一重链和所述第二重链各自包含与参考Fc区相比减少或消除Fc区效应子功能的至少一个氨基酸修饰(例如取代、缺失、添加),所述参考Fc区不包含所述至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。

130.如权利要求129所述的融合物,其中所述至少一种效应子功能包括诱导ADCC、ADCP或CDC、结合Fc受体或任何组合的能力。

131.一种融合蛋白,其包含:

a.包含第一轻链的第一多肽,所述第一轻链从N末端到C末端包含VL区和CL区;

b.第二多肽,其从N末端到C末端包含:(i)第一重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;(ii)第一肽接头,和(iii)如权利要求1-14中任一项所述的hIL-12p40多肽;

c.第三多肽,其从N末端到C末端包含:(i)第二重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区,(ii)第二肽接头;以及(iii)hIL-12p35多肽;以及

d.包含第二轻链的第四多肽,所述第二轻链从N末端到C末端包含VL区和CL区;

其中所述第一轻链的VL和所述第一重链的VH相关联以形成特异性结合第一hTAA的第一抗原结合结构域;

其中所述第一重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);

其中所述第二重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);

其中所述全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰不同于所述全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰;

其中所述全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰和所述全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰促进所述全长抗体的第一和第二重链的异二聚化。

132.如权利要求131所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:在氨基酸位置W37、F82和K219中的每一个处的氨基酸取代,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

133.如权利要求131或132所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代W37A、F82A和K219A中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

134.如权利要求131-133中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

135.如权利要求131-134中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

136.如权利要求131-135中任一项所述的融合蛋白,其中所述hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

137.如权利要求131-136中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且所述第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

138.如权利要求131-137中任一项所述的融合蛋白,其中所述全长抗体特异性结合hCAIX。

139.如权利要求131-138中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;所述VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及所述VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列,或SEQ ID NO:243的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

140.如权利要求131-139中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

141.如权利要求131-140中任一项所述的融合蛋白,其中所述VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且所述VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

142.如权利要求131-141中任一项所述的融合蛋白,其中所述第一重链和所述第二重链各自包含与参考Fc区相比减少或消除Fc区效应子功能的至少一个氨基酸修饰(例如取代、缺失、添加),所述参考Fc区不包含所述至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。

143.如权利要求142所述的融合物,其中所述至少一种效应子功能包括诱导ADCC、ADCP或CDC、结合Fc受体或任何组合的能力。

144.一种抗体(或其抗原结合结构域),其特异性结合hCAIX并包含VH和VL,其中所述VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3-9中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10-17中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

145.如权利要求144所述的抗体,其中所述VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7所示的氨基

酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且所述VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

146.一种多核苷酸,其编码如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)或如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)。

147.如权利要求146所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸是RNA(例如mRNA)或DNA。

148.如权利要求146或147所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸经密码子优化。

149.一种表达载体,其包含如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸。

150.如权利要求149所述的表达载体,其中所述表达载体是病毒载体或质粒。

151.一种宿主细胞,其包含如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸或如权利要求149-150中任一项所述的表达载体。

152.一种载剂,其包含如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸或如权利要求149-150中任一项所述的表达载体。

153.如权利要求152所述的载剂,其中所述载剂是脂质纳米颗粒、脂质体、脂质复合物或纳米脂质体。

154.一种药物组合物,其包含如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸、如权利要求149-150中任一项所述的表达载体、如权利要求151所述的宿主细胞或如权利要求152-153中任一项所述的载剂,以及药学上可接受的赋形剂。

155.一种试剂盒,其包含如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸、如权利要求149-150中任一项所述的表达载体、如权利要求151所述的宿主细胞、如权利要求152-153中任一项所述的载剂或如权利要求154所述的药物组合物。

156.一种制备以下的方法:如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)或如权利要求131-132

中任一项所述的抗体(或其多肽),所述方法包括:

a.将如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸或如权利要求149-150中任一项所述的表达载体引入体外或离体细胞群体中,

b.在足以使所述细胞群体表达所述多特异性蛋白的条件下培养所述细胞群体;以及

c.任选地分离和/或纯化所述hIL-12p40多肽、hIL-12p35多肽、schIL-12多肽或融合蛋白(或其一个或多个多肽)。

157.一种将多肽、融合蛋白、抗体、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、载剂或药物组合物递送至受试者的方法,所述方法包括以一定量和一定时间向所述受试者施用如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸、如权利要求149-150中任一项所述的表达载体、如权利要求151所述的宿主细胞、如权利要求152-153中任一项所述的载剂或如权利要求154所述的药物组合物,所述量和时间足以向所述受试者递送所述hIL-12p40多肽、所述hIL-12p35多肽、schIL-12多肽、融合蛋白、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、载剂或药物组合物。

158.一种刺激受试者中T细胞或NK细胞效应子功能的方法,所述方法包括以一定量和一定时间向所述受试者施用如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸、如权利要求149-150中任一项所述的表达载体、如权利要求151所述的宿主细胞、如权利要求152-153中任一项所述的载剂或如权利要求154所述的药物组合物,所述量和时间足以刺激所述受试者的T细胞或NK细胞效应子功能。

159.一种预防或治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括以一定量和时间向有需要的受试者施用如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸、如权利要求149-150中任一项所述的表达载体、如权利要求151所述的宿主细胞、如权利要求152-153中任一项所述的载剂或如权利要求154所述的药物组合物,所述量和时间足以预防或治疗所述受试者的癌症。

160.如权利要求159所述的方法,其中所述癌症是实体瘤。

161.如权利要求159或160所述的方法,其中所述癌症是肺癌、中枢神经系统癌(例如脑癌或脊髓癌,例如星形细胞瘤、胶质母细胞瘤)、乳腺癌、结直肠癌、结肠癌、直肠癌、食管癌、肾癌(kidney cancer)、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、皮肤癌、膀胱癌、子宫癌、脑癌、子宫内膜癌、唇癌、口腔癌、间皮瘤、肉瘤、甲状腺癌、胸腺癌、肾癌(renal cancer)、肛门癌、头癌、颈癌或头颈癌。

162.如权利要求159-161中任一项所述的方法,其中所述癌症是肾癌(例如,肾细胞

癌)、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/食管胃交界处(GEJ)癌、中枢神经系统癌(例如,脑癌或脊髓癌,例如胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、肺癌(例如小细胞肺癌)或胃肠道癌。

163.一种确定受试者的癌症(例如实体癌)细胞中CAIX的表达的方法,所述方法包括:

a.从所述受试者获得样品,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞),以及

b.确定所述样品中是否存在可溶性CAIX(或其片段或变体)。

164.一种诊断患有包含表达CAIX的癌细胞的癌症(例如实体癌)的受试者的方法,所述方法包括:

a.从所述受试者获得样品,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞),

b.确定所述样品中是否存在可溶性CAIX(或其片段或变体);以及

c.如果确定所述样品中存在可溶性CAIX,则诊断所述受试者患有包含表达CAIX的癌细胞的癌症(例如实体癌)。

165.一种治疗受试者的癌症(例如实体癌)的方法,所述方法包括:

a.接收确定来自受试者的样品中存在可溶性CAIX的测试结果,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞);

b.诊断所述受试者患有包含表达CAIX的癌细胞的癌症(例如实体癌);以及

c.向有需要的所述受试者以一定量和时间施用如权利要求1-16中任一项所述的hIL-12p40多肽、如权利要求17-24中任一项所述的hIL-12p35多肽、如权利要求25-35中任一项所述的schIL-12多肽、如权利要求36-143中任一项所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、如权利要求144-145中任一项所述的抗体(或其一个或多个多肽)、如权利要求146-148中任一项所述的多核苷酸、如权利要求149-150中任一项所述的表达载体、如权利要求151所述的宿主细胞、如权利要求152-153中任一项所述的载剂或如权利要求154所述的药物组合物,所述量和时间足以治疗所述受试者的癌症(例如实体癌)。

166.如权利要求163-165中任一项所述的方法,其中所述样品是血液、血清或血浆。

167.如权利要求163-166中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

168.如权利要求163-167中任一项所述的方法,其中所述癌症是(例如,实体癌)。

169.如权利要求163-168中任一项所述的方法,其中所述实体癌是肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/食管胃交界处(GEJ)癌、中枢神经系统癌(例如,脑癌或脊髓癌,例如胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、肺癌(例如小细胞肺癌)或胃肠道癌。

CAIX靶向型IL-12融合蛋白及其使用方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2021年9月17日提交的美国临时申请号63/245,523的优先权和权益,其全部内容通过引用并入本文。

1.技术领域

[0002] 本披露涉及IL-12p40变体、IL-12p35变体、IL-12融合蛋白及其使用方法。本披露进一步涉及将IL-12靶向至细胞表面上表达靶蛋白(例如hCAIX)的细胞的多特异性IL-12融合蛋白及其使用方法。

2.背景技术

[0003] 人IL-12(hIL-12)是一种多效性分泌细胞因子,由α亚基人IL-12p35(hIL-12p35)和β亚基人IL-12p40(hIL-12p40)构成。天然存在的hIL-12p35和hIL-12p40亚基通过二硫键连接形成具有生物活性的hIL12-p70细胞因子。hIL-12尤其是促炎性的,并且通过与hIL-12受体(hIL-12R)结合来介导其功能。高亲和力hIL-12R是包含hIL-12Rβ1亚基和hIL-12Rβ2亚基的异二聚体。hIL-12R在多种免疫细胞(包括自然杀伤(NK)细胞、T细胞和B细胞)中以组成型或诱导型方式表达。hIL-12与例如激活的T细胞、NK细胞和树突状细胞上表达的hIL-12R的结合激活了TYK2、JAK2和STAT信号传导通路。hIL-12的主要作用之一是激活T细胞和NK细胞,从而增加INF-γ的生产、增殖和细胞毒性潜力。

3.发明内容

[0004] 本文尤其提供了IL-12p40变体和IL-12p35多肽以及编码其的多核苷酸;IL-12融合蛋白和缀合物;制造方法;药物组合物;以及使用方法,包括例如治疗疾病(例如癌症)的方法。

[0005] 一方面,本文提供了人白介素12p40(hIL-12p40)多肽,其包含氨基酸序列,该氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;以及(b)在以下氨基酸位置的每个处包含氨基酸取代或由氨基酸取代组成:(i)W37、F82和K219;(ii)W37、F82、和K217;(iii)K106、K217、和K219;(iv)W37和F82;(v)W37和K217;(vi)W37和K219;(vii)W37和K106;(viii)F82和K106;(xiv)F82和K217;(xv)F82和K219;(xvi)K217和K219;(xvii)K106和K217;或(xviii)K106和K219,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0006] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下氨基酸取代中的每一个或由以下氨基酸取代中的每一个组成:(i)W37A、F82A和K219A;(ii)W37A、F82A、和K217A;(iii)K106A、K217A、和K219A;(iv)W37A和F82A;(v)W37A和K217A;(vi)W37A和K219A;(vii)W37A和K106A;(viii)F82A和K106A;(xiv)F82A和K217A;(xv)F82A和K219A;(xvi)K217A和K219A;(xvii)K106A和K217A;或(xviii)K106A和K219A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下或由以下组成:在氨基酸位置W37、F82和K219中的每一个处的氨基酸取代,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0008] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代W37A、F82A和K219A中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表5中所示任一多肽的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表5中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0010] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:38-65的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-65中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0011] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:38-51的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-51中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0012] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:52-65的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:52-65中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0013] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38或52中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38或52中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0014] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0015] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38的氨基酸序列100%相同。

[0016] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽特异性结合hIL-12受体(hIL-12R)。

[0017] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考

hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加更低。

[0018] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0019] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。

[0020] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的由在表面上表达hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0021] 一方面,本文提供人白介素12p35(hIL-12p35)多肽,其包含氨基酸序列,该氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;以及(b)包含以下或由以下组成:一个或多个以下氨基酸位置E60、F61、P63、K150、F188、Y189A处的氨基酸修饰(例如,取代、添加、缺失(例如,取代)),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽包含以下或由以下组成:在以下氨基酸位置的每个处的氨基酸修饰(例如,取代、添加、缺失(例如,取代)):(i)F188;(ii)Y189;(iii)F188和Y189;或(iv)E60、F61、P63、K150和F188,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代中的一个或多个:E60K、F61H、P63S、K150H、F188P、F188A和/或Y189A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:111-114的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:111-114中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0025] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代中的每一个:(i)F188A;(ii)Y189A;(iii)F188A和Y189A;或(iv)E60K、F61H、P63S、K150H和F188P,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸A55-K92、N50-K92、M51-K92、L52-K92、Q53-K92、K54-K92、N50-N93、M51-N93、L52-N93、Q53-N93、K54-N93、N50-E94、M51-E94、L52-E94、Q53-E94、K54-E94、N50-S95、M51-S95、L52-S95、Q53-S95、K54-S95、N50-C96、M51-C96、L52-C96、Q53-C96、K54-C96、N50-L97、M51-L97、L52-L97、Q53-L97、K54-L97、N50-P87、M51-P87、L52-P87、Q53-P87、K54-P87、N50-L88、M51-L88、L52-L88、Q53-L88、K54-L88、N50-E89、M51-E89、L52-E89、Q53-E89、K54-E89、N50-L90、M51-

L90、L52-L90、Q53-L90、K54-L90、N50-T91、M51-T91、L52-T91、Q53-T91、K54-T91、R56-K92、Q57-K92、T58-K92、L59-K92、E60-K92 A55-N93、R56-N93、Q57-N93、T58-N93、L59-N93、E60-N93、A55-E94、R56-E94、Q57-E94、T58-E94、L59-E94、E60-E94、A55-S95、R56-S95、Q57-S95、T58-S95、L59-S95、E60-S95、A55-C96、R56-C96、Q57-C96、T58-C96、L59-C96、E60-C96、A55-L97、R56-L97、Q57-L97、T58-L97、L59-L97、E60-L97、A55-P87、R56-P87、Q57-P87、T58-P87、L59-P87、E60-P87、A55-L88、R56-L88、Q57-L88、T58-L88、L59-L88、E60-L88、A55-E89、R56-E89、Q57-E89、T58-E89、L59-E89、E60-E89、A55-L90、R56-L90、Q57-L90、T58-L90、L59-L90、E60-L90、A55-T91、R56-T91、Q57-T91、T58-T91、L59-T91或E60-T91(氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列)的缺失,并且除了氨基酸A55-K92、N50-K92、M51-K92、L52-K92、Q53-K92、K54-K92、N50-N93、M51-N93、L52-N93、Q53-N93、K54-N93、N50-E94、M51-E94、L52-E94、Q53-E94、K54-E94、N50-S95、M51-S95、L52-S95、Q53-S95、K54-S95、N50-C96、M51-C96、L52-C96、Q53-C96、K54-C96、N50-L97、M51-L97、L52-L97、Q53-L97、K54-L97、N50-P87、M51-P87、L52-P87、Q53-P87、K54-P87、N50-L88、M51-L88、L52-L88、Q53-L88、K54-L88、N50-E89、M51-E89、L52-E89、Q53-E89、K54-E89、N50-L90、M51-L90、L52-L90、Q53-L90、K54-L90、N50-T91、M51-T91、L52-T91、Q53-T91、K54-T91、R56-K92、Q57-K92、T58-K92、L59-K92、E60-K92 A55-N93、R56-N93、Q57-N93、T58-N93、L59-N93、E60-N93、A55-E94、R56-E94、Q57-E94、T58-E94、L59-E94、E60-E94、A55-S95、R56-S95、Q57-S95、T58-S95、L59-S95、E60-S95、A55-C96、R56-C96、Q57-C96、T58-C96、L59-C96、E60-C96、A55-L97、R56-L97、Q57-L97、T58-L97、L59-L97、E60-L97、A55-P87、R56-P87、Q57-P87、T58-P87、L59-P87、E60-P87、A55-L88、R56-L88、Q57-L88、T58-L88、L59-L88、E60-L88、A55-E89、R56-E89、Q57-E89、T58-E89、L59-E89、E60-E89、A55-L90、R56-L90、Q57-L90、T58-L90、L59-L90、E60-L90、A55-T91、R56-T91、Q57-T91、T58-T91、L59-T91或E60-T91的缺失,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0027] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸A55-K92(氨基酸编号相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列)的缺失,并且除了氨基酸A55-K92的缺失,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0028] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:110的氨基酸序列中所示的氨基酸缺失组(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述氨基酸缺失组之外,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:110中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0029] 一方面,本文提供单链hIL-12(schIL-12)多肽,其包含可操作地连接至hIL-12p35多肽的本文所述的hIL-12p40多肽。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与表6中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-

12p35多肽是本文所述的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽经由肽接头可操作地连接至hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p40多肽、肽接头和hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p35多肽、肽接头和hIL-12p40多肽。

[0030] 一方面,本文提供了schIL-12多肽,其包含可操作地连接至hIL-12p40多肽的本文所述的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表10中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-51或90-109中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p40多肽是本文所述的hIL-12p40多肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽经由肽接头可操作地连接至hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p40多肽、肽接头和hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p35多肽、肽接头和hIL-12p40多肽。

[0031] 一方面,本文提供了融合蛋白,其包含本文所述的hIL-12p40多肽(例如变体hIL-12p40多肽)、hIL-12p35多肽;和异源部分。

[0032] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与表6中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0033] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表10中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:33或38-51或90-109中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:33或38的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0034] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽和hIL-12p35多肽可操作地连接为schIL-12多肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽经由肽接头可操作地连接至hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p40多肽、肽接头和hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p35多肽、肽接头和hIL-12p40多肽。

[0035] 在一些实施例中,融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加更低。在一些实施例中,融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-

100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。在一些实施例中,融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。在一些实施例中,融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0036] 在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:抗体(或其抗原结合结构域)和/或一个或多个Fc区。在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:抗体(或其抗原结合结构域)。在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:全长抗体、scFv、$(scFv)_2$、scFv-Fc、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab-Fc、单结构域抗体(例如VHH)或单结构域抗体-Fc(例如VHH-Fc。在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)包含第一可变重链区(VH),所述VH包含三个VH互补决定区(VH CDR):VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;以及第一可变轻链区(VL),所述VL包含三个VL CDR:VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:全长抗体。

[0037] 在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合人肿瘤相关抗原(hTAA)。

[0038] 在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合人碳酸酐酶IX(hCAIX)。

[0039] 在一些实施例中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列各自包含以下或由以下组成:表17中所示的抗体的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列。

[0040] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列,或SEQ ID NO:243的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0041] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与表17中所示的任何VH多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与表17中所示的任何VL多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0042] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7、246、

256、264、274或284中任一个的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12、247、257、265、275或285中任一个的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0043] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0044] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0045] 在一些实施例中,融合蛋白包含:包含CH2区和CH3区的第一Fc区;以及包含CH2区和CH3区的第二Fc区。在一些实施例中,(a)第一Fc区包含CH2区和CH3区;并且第二Fc区包含CH2区和CH3区;或(b)第一Fc区包含铰链区、CH2区和CH3区;并且第二Fc区包含铰链区、CH2区和CH3区。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自是hIgG1或hIgG4 Fc区或其功能性变体。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区是全长抗体的一部分。

[0046] 在一些实施例中,第一Fc区的CH3区和第二Fc区的CH3区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的至少一个氨基酸修饰。

[0047] 在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368和Y407处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代Y349C。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368、Y407和Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代S354C。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366和S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W和S354C。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区包含以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C,并且其中第二Fc区包含以下氨基酸取代T366W和S354C。

[0048] 在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368和Y407处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以

下氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代Y349C。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368、Y407和Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代S354C。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366和S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W和S354C。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区包含以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C,并且其中第一Fc区包含以下氨基酸取代T366W和S354C。

[0049] 在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含与参考Fc区相比减少或消除Fc区效应子功能的至少一个氨基酸修饰(例如取代、缺失、添加),所述参考Fc区不包含所述至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。在一些实施例中,至少一种效应子功能包括Fc区诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或补体依赖性细胞毒性(CDC)、结合Fc受体(例如,Fcγ受体)或其任何组合的能力。

[0050] 在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自在氨基酸位置L234、L235和/或P329的一个、两个或三个处包含氨基酸取代。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含以下氨基酸取代中的一个、两个或三个:L234A、L235A和/或P329G或P329A,。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含L234A和L235A氨基酸取代。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含L234A、L235A和P329A氨基酸取代。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含L234A、L235A和P329G氨基酸取代。

[0051] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且其中hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接至第二Fc区的C末端。在一些实施例中,hIL-12p40多肽通过第一肽接头可操作地连接至第一Fc区;并且hIL-12p40多肽通过第二肽接头可操作地连接至第二Fc区。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、88-303或369中任一个的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0052] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且其中hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接至第二Fc区的C末端。在一些实施例中,hIL-12p40多肽通过第一肽接头可操作地连接至第二Fc区;并且hIL-12p40多肽通过第二肽接头

可操作地连接至第一Fc区。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0053] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽和hIL-12p35多肽可操作地连接为schIL-12多肽,并且其中schIL-12多肽的N末端可操作地连接至第一Fc区的C末端或第二Fc区的C末端。在一些实施例中,schIL-12多肽经由第一肽接头可操作地连接至第一Fc区或第二Fc区。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0054] 一方面,本文提供了融合蛋白,其包含hIL-12p40多肽;本文所述的hIL-12p35多肽(例如,变体hIL-12p35多肽);和异源部分。

[0055] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与表6中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0056] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表10中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:33或38-51或90-109中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:33或38的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0057] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽和hIL-12p35多肽可操作地连接为schIL-12多肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽经由肽接头可操作地连接至hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p40多肽、肽接头和hIL-12p35多肽。在一些实施例中,多肽从N末端到C末端包含:hIL-12p35多肽、肽接头和hIL-12p40多肽。

[0058] 在一些实施例中,融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加更低。在一些实施例中,融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-

12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。在一些实施例中,融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。在一些实施例中,融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0059] 在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:抗体(或其抗原结合结构域)和/或一个或多个Fc区。在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:抗体(或其抗原结合结构域)。在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:全长抗体、scFv、$(scFv)_2$、scFv-Fc、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab-Fc、单结构域抗体(例如VHH)或单结构域抗体-Fc(例如VHH-Fc。在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)包含第一可变重链区(VH),所述VH包含三个VH互补决定区(VH CDR):VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;以及第一可变轻链区(VL),所述VL包含三个VL CDR:VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些实施例中,异源部分包含以下或由以下组成:全长抗体。

[0060] 在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合人肿瘤相关抗原(hTAA)。

[0061] 在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合人碳酸酐酶IX(hCAIX)。

[0062] 在一些实施例中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列各自包含以下或由以下组成:表17中所示的抗体的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列。

[0063] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列,或SEQ ID NO:243的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与表17中所示的任何VH多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与表17中所示的任何VL多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0065] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7、246、256、264、274或284中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12、247、257、265、275或285中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0066] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0067] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0068] 在一些实施例中,融合蛋白包含:包含CH2区和CH3区的第一Fc区;以及包含CH2区和CH3区的第二Fc区。在一些实施例中,(a)第一Fc区包含CH2区和CH3区;并且第二Fc区包含CH2区和CH3区;或(b)第一Fc区包含铰链区、CH2区和CH3区;并且第二Fc区包含铰链区、CH2区和CH3区。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自是hIgG1或hIgG4 Fc区或其功能性变体。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区是全长抗体的一部分。

[0069] 在一些实施例中,第一Fc区的CH3区和第二Fc区的CH3区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的至少一个氨基酸修饰。

[0070] 在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368和Y407处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代Y349C。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368、Y407和Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代S354C。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366和S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W和S354C。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区包含以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C,并且其中第二Fc区包含以下氨基酸取代T366W和S354C。

[0071] 在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、

L368和Y407处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A和Y407V。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代Y349C。在一些实施例中,第二Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366、L368、Y407和Y349处的氨基酸取代。在一些实施例中,第二Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代S354C。在一些实施例中,第一Fc区包含在根据Kabat的EU索引编号的氨基酸位置T366和S354处的氨基酸取代。在一些实施例中,第一Fc区包含根据Kabat的EU索引编号的以下氨基酸取代T366W和S354C。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区包含以下氨基酸取代T366S、L368A、Y407V和Y349C,并且其中第一Fc区包含以下氨基酸取代T366W和S354C。

[0072] 在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含与参考Fc区相比减少或消除Fc区效应子功能的至少一个氨基酸修饰(例如取代、缺失、添加),所述参考Fc区不包含所述至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。在一些实施例中,至少一种效应子功能包括Fc区诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或补体依赖性细胞毒性(CDC)、结合Fc受体(例如,Fcγ受体)或其任何组合的能力。

[0073] 在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自在氨基酸位置L234、L235和/或P329的一个、两个或三个处包含氨基酸取代。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含以下氨基酸取代中的一个、两个或三个:L234A、L235A和/或P329G或P329A,。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含L234A和L235A氨基酸取代。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含L234A、L235A和P329A氨基酸取代。在一些实施例中,根据Kabat的EU索引编号,第一Fc区和第二Fc区各自包含L234A、L235A和P329G氨基酸取代。

[0074] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且其中hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接至第二Fc区的C末端。在一些实施例中,hIL-12p40多肽通过第一肽接头可操作地连接至第一Fc区;并且hIL-12p40多肽通过第二肽接头可操作地连接至第二Fc区。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、88-303或369中任一个的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0075] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且其中hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接至第二Fc区的C末端。在一些实施例中,hIL-

12p40多肽通过第一肽接头可操作地连接至第二Fc区;并且hIL-12p40多肽通过第二肽接头可操作地连接至第一Fc区。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且其中第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0076] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽和hIL-12p35多肽可操作地连接为schIL-12多肽,并且其中schIL-12多肽的N末端可操作地连接至第一Fc区的C末端或第二Fc区的C末端。在一些实施例中,schIL-12多肽经由第一肽接头可操作地连接至第一Fc区或第二Fc区。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的肽接头的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,第一肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0077] 一方面,本文提供包含特异性结合hTAA的全长抗体的融合蛋白,所述融合蛋白包含:第一轻链,其从N末端到C末端包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL);第一重链,其从N末端到C末端包含重链可变区(VH)、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;第二重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;第二轻链,其从N末端到C末端包含VL区和VH区;其中第一轻链和第一重链相关联形成第一抗原结合结构域;其中第二轻链和第二重链相关联形成第二抗原结合结构域;并且其中第一重链和第二重链相关联形成二聚体;本文所述的hIL-12p40多肽(例如,变体hIL-12p40)、hIL-12p35多肽;其中全长抗体的第一重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);其中全长抗体的第二重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);其中全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰不同于全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰;其中全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰和全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰促进全长抗体的第一和第二重链的异二聚化;其中hIL-12p40多肽的N末端通过第一肽接头可操作地连接至第一重链的CH3区的C末端;并且其中hIL-12p35多肽的N末端经由第二肽接头可操作地连接至第二重链的CH3区的C末端。

[0078] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:在氨基酸位置W37、F82和K219中的每一个处的氨基酸取代,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0079] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代W37A、F82A和K219A中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0080] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0081] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

[0082] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0083] 在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0084] 在一些实施例中,第一抗原结合结构域特异性结合hCAIX,并且第二抗原结合结构域特异性结合hCAIX。

[0085] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列,或SEQ ID NO:243的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0086] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0087] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0088] 在一些实施例中,第一重链和第二重链各自包含与参考Fc区相比减少或消除Fc区效应子功能的至少一个氨基酸修饰(例如取代、缺失、添加),所述参考Fc区不包含所述至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。在一些实施例中,至少一种效应子功能包括诱导

ADCC、ADCP或CDC、结合Fc受体或任何组合的能力。

[0089] 一方面,本文提供融合蛋白,其包含:包含第一轻链的第一多肽,所述第一轻链从N末端到C末端包含VL区和CL区;第二多肽,其从N末端到C末端包含:(i)第一重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;(ii)第一肽接头,和(iii)本文所述的hIL-12p40多肽(例如变体hIL-12p40);第三多肽,其从N末端到C末端包含:(i)第二重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区,(ii)第二肽接头;以及(iii)hIL-12p35多肽;以及包含第二轻链的第四多肽,所述第二轻链从N末端到C末端包含VL区和CL区;其中第一轻链的VL和第一重链的VH相关联以形成特异性结合第一hTAA的第一抗原结合结构域;其中第一重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);其中第二重链的CH3区相对于不包含一个或多个氨基酸修饰的参考CH3区(例如,野生型CH3区,例如SEQ ID NO:122)的氨基酸序列包含所述一个或多个氨基酸修饰(例如取代);其中全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰不同于全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰;其中全长抗体的第一重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰和全长抗体的第二重链的CH3区中的一个或多个氨基酸修饰促进全长抗体的第一和第二重链的异二聚化。

[0090] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含氨基酸序列,所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:在氨基酸位置W37、F82和K219中的每一个处的氨基酸取代,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0091] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代W37A、F82A和K219A中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0092] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸序列SEQ ID NO:38中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列的氨基酸取代);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0093] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0095] 在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列;并且第二肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。

[0096] 在一些实施例中,全长抗体特异性结合hCAIX。

[0097] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸

修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:243的氨基酸序列,或SEQ ID NO:243的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0098] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0099] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:15的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0100] 在一些实施例中,第一重链和第二重链各自包含与参考Fc区相比减少或消除Fc区效应子功能的至少一个氨基酸修饰(例如取代、缺失、添加),所述参考Fc区不包含所述至少一个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。在一些实施例中,至少一种效应子功能包括诱导ADCC、ADCP或CDC、结合Fc受体或任何组合的能力。

[0101] 一方面,本文提供特异性结合hCAIX并且包含VH和VL的抗体(或其抗原结合结构域),其中VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3-9中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10-17中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0102] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0103] 一方面,本文提供编码本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、或本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)的多核苷酸。在一些实施例中,多核苷酸是RNA(例如mRNA)或DNA。在一些实施例中,多核苷酸是密码子优化的。

[0104] 一方面,本文提供包含本文所述的多核苷酸的表达载体。在一些实施例中,表达载体是病毒载体或质粒。

[0105] 一方面,本文提供的是宿主细胞,其包含本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、

本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)、本文所述的多核苷酸、或本文所述的表达载体。

[0106] 一方面,本文提供了载剂,其包含本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)的多核苷酸、或本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体。在一些实施例中,载剂是脂质纳米颗粒、脂质体、脂质复合物(lipoplex)或纳米脂质体。

[0107] 一方面,本文提供了药物组合物,本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)、本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体、本文所述的宿主细胞或本文所述的载剂以及药学上可接受的赋形剂。

[0108] 一方面,本文提供的是试剂盒,其包含本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)、本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物。

[0109] 一方面,本文提供了制备本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、或本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)的多核苷酸的方法,所述方法包括将本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体引入体外或离体细胞群体中,在足以使细胞群体表达多特异性蛋白质的条件下培养细胞群体;并且任选地,分离和/或纯化hIL-12p40多肽、hIL-12p35多肽、schIL-12多肽或融合蛋白(或其一个或多个多肽)。

[0110] 一方面,本文提供将多肽、融合蛋白、抗体、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、载剂或药物组合物递送至受试者的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)、本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物,其量和时间足以向受试者递送hIL-12p40多肽、hIL-12p35多肽、schIL-12多肽、融合蛋白、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、载剂或药物组合物。

[0111] 一种刺激受试者中的T细胞或NK细胞效应子功能的方法,所述方法包括向受试者施用本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)、本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物,其量和时间足以刺激受试者的T细胞或NK细胞效应子功能。

[0112] 一种预防或治疗受试者中的癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)、本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物,其量和时间足以预防或治疗受试者中的癌症。

[0113] 在一些实施例中,癌症是实体瘤。在一些实施例中,癌症为肺癌、中枢神经系统癌(例如脑癌或脊髓癌,例如星形细胞瘤、胶质母细胞瘤)、乳腺癌、结直肠癌、结肠癌、直肠癌、

食管癌、肾癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、皮肤癌、膀胱癌、子宫癌、脑癌、子宫内膜癌、唇癌、口腔癌、间皮瘤、肉瘤、甲状腺癌、胸腺癌、肾癌、肛门癌、头癌、颈癌或头颈癌。

[0114] 在一些实施例中,癌症是肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/食管胃交界处(GEJ)癌、中枢神经系统癌(例如,脑癌或脊髓癌,例如胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、肺癌(例如小细胞肺癌)或胃肠道癌。

[0115] 一方面,本文提供了确定受试者的癌症(例如实体癌)细胞中CAIX的表达的方法,所述方法包括:从受试者获得样品,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞),并且确定样品中是否存在可溶性CAIX(或其片段或变体)。

[0116] 在一些实施例中,样品是血液、血清或血浆。在一些实施例中,受试者是人。

[0117] 在一些实施例中,癌症是(例如实体癌)。在一些实施例中,实体癌是肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/食管胃交界处(GEJ)癌、中枢神经系统癌(例如,脑癌或脊髓癌,例如胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、肺癌(例如小细胞肺癌)或胃肠道癌。

[0118] 一方面,本文提供诊断患有包含表达CAIX的癌细胞的癌症(例如实体癌)的受试者的方法,所述方法包括:从受试者获得样品,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞),确定样品中是否存在可溶性CAIX(或其片段或变体;并且如果确定样品中存在可溶性CAIX,则诊断受试者患有包含表达CAIX的癌细胞的癌症(例如实体癌)。

[0119] 在一些实施例中,样品是血液、血清或血浆。在一些实施例中,受试者是人。

[0120] 在一些实施例中,癌症是(例如实体癌)。在一些实施例中,实体癌是肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/食管胃交界处(GEJ)癌、中枢神经系统癌(例如,脑癌或脊髓癌,例如胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、肺癌(例如小细胞肺癌)或胃肠道癌。

[0121] 一方面,本文提供治疗受试者的癌症(例如实体癌)的方法,所述方法包括:接收确定来自受试者的样品中存在可溶性CAIX的测试结果,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞);诊断受试者患有包含表达CAIX的癌细胞的癌症(例如实体癌);以及向有需要的受试者施用本文所述的hIL-12p40多肽、本文所述的hIL-12p35多肽、本文所述的schIL-12多肽、本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)、本文所述的抗体(或其一个或多个多肽)、本文所述的多核苷酸或本文所述的表达载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物,其量和时间足以治疗受试者的癌症(例如实体癌)。

[0122] 在一些实施例中,样品是血液、血清或血浆。在一些实施例中,受试者是人。

[0123] 在一些实施例中,癌症是(例如实体癌)。在一些实施例中,实体癌是肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/食管胃交界处(GEJ)癌、中枢神经系统癌(例如,脑癌或脊髓癌,例如胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、肺癌(例如小细胞肺癌)或胃肠道癌。

4.附图说明

[0124] 图1是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,融合蛋白包含全长抗体、可操作地连接至全长抗体的第一Fc区的C末端的IL-12p35(例如,本文所述的IL-12p35多肽)和可操作地连接至全长抗体的第二Fc区的C末端的IL-12p40(例如,本文所述的IL-12p40多肽)。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例

如,取代),其消除或降低一种或多种Fc效应子功能(例如,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合)。

[0125] 图2是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,该融合蛋白包含全长抗体和可操作地连接到全长抗体第一Fc区的C末端的scIL-12(例如本文所述的scIL-12多肽)。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代),其消除或降低一个或多个Fc效应子功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、Fc受体结合)。

[0126] 图3是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,融合蛋白包含两个scFv,其中一个scFv可操作地连接至第一Fc区的N末端,第二scFv可操作地连接至第二Fc区的N末端;IL-12p35(例如本文所述的IL-12p35多肽)可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且IL-12p40(例如,本文所述的IL-12p40多肽)可操作地连接至第二Fc区的C末端。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代),其消除或降低一个或多个Fc效应子功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、Fc受体结合)。

[0127] 图4是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,融合蛋白包含两个scFv,其中一个scFv可操作地连接至第一Fc的N末端,第二scFv可操作地连接至第二Fc区的N末端;和可操作地连接至第一或第二Fc区的C末端的scIL-12(例如本文所述的sc-IL-12多肽)。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代),其消除或降低一个或多个Fc效应子功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、Fc受体结合)。

[0128] 图5是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,融合蛋白包含全长抗体和可操作地连接至全长抗体的第一或第二Fc区之一的C末端的IL-12p35(例如,本文所述的IL-12p35多肽)。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代),其消除或降低一个或多个Fc效应子功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、Fc受体结合)。

[0129] 图6是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,融合蛋白包含通过卷曲结构域(例如本文所述的卷曲结构域)可操作地连接到第一Fc区的第一DART和可操作地连接到第二Fc区(例如本文所述的卷曲结构域)的第二DART;IL-12p35(例如本文所述的IL-12p35多肽)可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且IL-12p40(例如,本文所述的IL-12p40多肽)可操作地连接至第二Fc区的C末端。在一些实施例中,将非天然二硫键引入第一和第二DART的重链中。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代),其消除或降低一个或多个Fc效应子功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、Fc受体结

合)。

[0130] 图7是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,融合蛋白包含可操作地串联连接至第一Fc区的N末端的两个scFv;和可操作地连接至第二Fc区的N末端的scIL-12(例如,本文所述的scIL-12多肽)。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代),其消除或降低一个或多个Fc效应子功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、Fc受体结合)。

[0131] 图8是本文所述的示例性抗体(例如抗CAIX抗体)IL-12融合蛋白的图解描述。在所述的特定实施例中,融合蛋白包含可操作地串联连接至第一Fc区的N末端的两个scFv;和可操作地连接至单结构域抗体的scIL-12(例如本文所述的scIL-12多肽),所述单结构域抗体可操作地连接至第二Fc区的N末端。在所述的特定实施例中,第一和第二Fc区是异二聚体,其中每个Fc区包含至少一个促进第一Fc区与第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰(例如取代)。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰(例如,取代),其消除或降低一个或多个Fc效应子功能(例如,ADCC、ADCP、CDC、Fc受体结合)。

[0132] 图9是显示来自用指定构建体以指定浓度处理的HEK-Blue细胞的pSTAT4信号传导(通过SEAP产生测量)的线图。数据通过4-PL模型进行分析,并以光密度的平均值±SD表示。

[0133] 图10A是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图10B是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图10C是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图10D是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图10E是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图10F是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。

[0134] 图11A是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图11B是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图11C是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图11D是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复

值的平均值(平均值±SD)。图11E是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图11F是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。

[0135] 图12是显示来自用指定构建体以指定浓度培养的HEK-Blue细胞的体外(通过SEAP生产测量)的hIL-12R信号传导水平的线图。报告值(平均值±SD)是三个独立重复的平均值。

[0136] 图13是显示用指定构建体以指定浓度培养的经PHA刺激的人PBMC(hPBMC)在体外产生的IFN-γ水平的线图。每个数据点是一式三次重复值的平均值(平均值±SD),线图是来自三个独立实验的代表性数据。

[0137] 图14是显示用指定构建体以指定浓度培养的IL-2引发的NK细胞在体外产生的IFN-γ水平的线图。每个数据点是一式三次重复值的平均值(平均值±SD),线图是来自三个独立实验的代表性数据。

[0138] 图15是显示使用指定构建体以指定浓度培养的经抗CD3和抗CD28刺激的hPBMC通过门控CD8+T细胞在体外表达的pSTAT4水平的线图。每个点都是来自单个孔的数据,线图是来自三个独立实验的代表性数据。

[0139] 图16是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC对表达CAIX的SNU16肿瘤细胞的杀伤百分比的线图。每个数据点都是来自单个孔的值,线图是来自两个独立实验的代表性数据。

[0140] 图17A是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的颗粒酶B释放的柱状图。图17B是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的IFN-γ释放的柱状图。图17C是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的TNF-α释放的柱状图。图17D是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的IL-10释放的柱状图。图17E是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的MIP-3α释放的柱状图。图17F是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的CD40-L释放的柱状图。图17G是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的Flt3-L释放的柱状图。图17H是显示用每种指定构建体以指定浓度处理的经SEB刺激的hPBMC的GMCSF释放的柱状图。对于图17A-17H中,每个柱是来自单个孔的值并且线图是来自在24、72和120小时评估的实验的代表性数据。

[0141] 图18是显示每个所示构建体对NK细胞对表达HCT116 CAIX的球体的细胞毒性的箱图。细胞毒性数据是来自四个独立实验的三个供体的汇总数据。使用单因素ANOVA、Kruskal wallis检验进行统计分析,并将所有组相互比较(*p值<0.05,**<0.01被认为是显著的)。

[0142] 图19是显示转染的A549细胞的eGFP-CAIX表达的点图(左)和峰状图(右)。

[0143] 图20显示表达CAIX-eGFP融合蛋白的A459球体的明场和荧光图像,从Cytation 5捕获的图像。

[0144] 图21A是显示用所示构建体处理的表达单个CAIX-eGFP融合蛋白的A459球体的强度密度的柱状图。每个柱是来自单个球体的值,柱状图是来自两个独立实验的代表性数据。图21B是显示在表达CAIX-eGFP融合蛋白的A549模型中由各指定构建体诱导的细胞毒性的

柱状图。考虑IgG处理的球体作为100％活力计算细胞毒性。每个柱是来自单个球体的值,柱状图是来自两个独立实验的代表性数据。

[0145] 图22是显示用所示构建体处理的小鼠(n＝6)中HCT116-CAIX肿瘤的肿瘤生长谱的线图。x轴上的箭头表示给药天数。

[0146] 图23是显示在用所示构建体处理的hIL-12和hIL-12受体基因敲入转基因小鼠中表达人CAIX的B16F10同种异体移植物(n＝6)的肿瘤生长谱的线图。x轴上的箭头表示给药天数。

[0147] 图24A展示了显示所示正常或癌组织中CAIX表达的免疫组织化学图像。上分图:CAIX在正常膀胱(a)、结肠(b)、子宫颈(c)、肾脏(d)和脑(e)中表达(10倍放大)。下分图:不同癌症类型中异质CAIX表达的代表性图像:低表达(f、j、n、r、v)、中等表达(g、k、o、s、w)、高表达(h、l、p、t、x)(10倍放大)。透明细胞癌(f、g、h、i)、膀胱癌(j、k、l、m)、小肠癌(n、o、p、q)、结直肠癌(r、s、t、u)和胃癌(v、w、x、y)中异质CAIX表达的代表性图像。相应肿瘤类型的肿瘤细胞(i、m、q、u、y;30倍放大)中CAIX的膜染色分别显示在图h、l、p、t、x中。图24B是显示对于每种癌症类型(Y轴),对应于CAIX-高(201-300)、CAIX-中等(101-200)、CAIX-低(1-100)以及CAIX不存在(0)H得分类别的案例百分比(X轴)的柱状图。BC(ER+):乳腺癌(ER+);BLC:膀胱癌;BC(Her2+):乳腺癌(Her2+);CC:宫颈癌;CRC:结直肠癌;DLBLC:弥漫性大B细胞淋巴瘤;EnC:子宫内膜癌;EsC:食管癌/GEJ癌;GBM:胶质母细胞瘤;GC:胃癌;GIST:胃肠道间质瘤;HCC:肝细胞癌;HNC:头颈癌;MEL:黑色素瘤;NHL:非霍奇金淋巴瘤;NSCLC:非小细胞肺癌;OC:卵巢癌;PC:胰腺癌;PrC:前列腺癌;RCC:肾细胞癌;SARC:肉瘤;SBC:小肠癌;SCLC:小细胞肺癌;TC:甲状腺癌;TNBC:三阴性乳腺癌。

[0148] 图25A显示代表性显微图像,其显示苏木精和伊红染色的肿瘤组织核心中淋巴细胞的低(1-199;左分图)、中(200-499,中分图)和高(≥500,右分图)浸润。红色箭头:肿瘤细胞;绿色箭头:淋巴细胞。图25B是显示对于每种肿瘤类型(Y轴),对应于高、中、低和不存在淋巴细胞浸润的案例百分比(X轴)的柱状图。BC(ER+):乳腺癌(ER+);BLC:膀胱癌;BC(Her2+):乳腺癌(Her2+);CC:宫颈癌;CRC:结直肠癌;DLBLC:弥漫性大B细胞淋巴瘤;EnC:子宫内膜癌;EsC:食管癌/GEJ癌;GBM:胶质母细胞瘤;GC:胃癌;GIST:胃肠道间质瘤;HCC:肝细胞癌;HNC:头颈癌;MEL:黑色素瘤;NSCLC:非小细胞肺癌;OC:卵巢癌;PC:胰腺癌;PrC:前列腺癌;RCC:肾细胞癌;SARC:肉瘤;SBC:小肠癌;SCLC:小细胞肺癌;TC:甲状腺癌;TNBC:三阴性乳腺癌。图25C是显示表达CAIX的肿瘤中淋巴细胞(平均H得分,Y轴)浸润密度[平均得分(0-3),X轴]的图。BC(ER+):乳腺癌(ER+);BC(Her2+):乳腺癌(Her2+);BLC:膀胱癌;CC:宫颈癌;CRC:结直肠癌;DLBLC:弥漫性大B细胞淋巴瘤;EnC:子宫内膜癌;EsC:食管癌/GEJ癌;GBM:胶质母细胞瘤;GC:胃癌;GIST:胃肠道间质瘤;HCC:肝细胞癌;HNC:头颈癌;MEL:黑色素瘤;NSCLC:非小细胞肺癌;OC:卵巢癌;PC:胰腺癌;PrC:前列腺癌;RCC:肾细胞癌;SARC:肉瘤;SBC:小肠癌;SCLC:小细胞肺癌;TC:甲状腺癌;TNBC:三阴性乳腺癌。

[0149] 图26A是显示结直肠腺癌组织上通过单细胞RNA测序鉴定的不同细胞类型(总共10468个细胞)的百分比的饼图。图26B是t分布随机邻域嵌入(t-SNE)图,其显示结直肠腺癌中不同细胞类型的聚类以及这些细胞簇中CA9、IL12RB1和IL12RB2的表达。图26C是显示通过对结直肠腺癌组织的单细胞RNA测序分析鉴定的细胞类型(X轴)中的CA9、IL12RB1和IL12RB2基因表达(Y轴)的柱状图。图26D是显示不同基因组合(X轴)中表达CA9、IL12RB1和

IL12RB2的细胞类型(Y轴)的百分比的柱状图。

[0150] 图27是显示来自用指定构建体以指定浓度处理的HEK-Blue细胞的pSTAT4信号传导(通过SEAP产生测量)的线图。数据通过4-PL模型进行分析,并以光密度的平均值±SD表示。由于储备物浓度的限制,BCA307.16无法在100nM浓度下进行测试。

[0151] 图28A是显示在指定浓度的指定hIL-12构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图28B是显示在指定浓度的指定hIL-12构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图28C是显示在指定浓度的指定hIL-12构建体存在的情况下激活的T细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。

[0152] 图29A是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图29B是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。图29C是显示在指定浓度的指定构建体存在的情况下由富集的hIL-2引发的NK细胞释放的IFN-γ水平的线图。数据通过4-PL模型绘制,每个数据点是来自单个实验的一式三次重复值的平均值(平均值±SD)。

[0153] 图30是显示癌症患者(n=86)中肿瘤组织中定量为免疫组织化学H得分(X轴)的细胞CAIX和通过ELISA定量的肿瘤匹配血浆(Y轴)中的可溶性CAIX(pg/mL)之间的皮尔逊相关系数分析的点图。

5.具体实施方式

[0154] 虽然hIL-12已被评估为治疗癌症的药物,但其临床成功率有限。为了达到治疗效果,hIL-12的剂量必须相对较高且效力较高,这导致了严重且难以承受的副作用。特别是当全身施用时,hIL-12可能引起血流中表达hIL-12R的免疫细胞(例如T细胞,例如CD8+T细胞)的激活,产生的全身炎症反应可能导致与基于hIL-12的疗法相关的严重副作用。尤其是,发明人制备了经修饰的hIL-12(例如,hIL-12p40、hIL-12p35)蛋白,其表现出降低的效力,同时保持了通过激活免疫细胞(例如,T细胞和NK细胞)介导肿瘤细胞杀伤的能力。因此,本文所述的新颖hIL-12蛋白和包含其的融合蛋白(例如抗CAIX融合蛋白)是治疗疾病(例如癌症)的良好候选物。因此,本披露尤其提供了用于治疗疾病(例如癌症)的药物组合物中的hIL-12蛋白和包含其的融合蛋白(例如抗CAIX融合蛋白)。

5.1定义

[0155] 在此使用的小节标题仅是为了编排的目的并且不应该被解释为对所述主题进行限制。

[0156] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与所要求保护的主题所属领域的技术人员通常理解的相同含义。应当理解,前面的一般描述和下面的详细描述仅是示例性和解释性的,并且不限制所要求保护的任何主题。

[0157] 在本申请中,单数的使用包括复数,除非另外明确说明。例如,如说明书和所附权

利要求中所使用的,单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地规定。此外,术语“包括(including)”以及其他形式(例如包括(include)、“包括(includes)”和“包括(included)”)的使用不具限制性。

[0158] 应当理解,无论在本文中将多方面用语言“包含(comprising)”来描述的情况如何,还提供以“由……组成”和“本质上由……组成”的术语描述的另外相似方面。

[0159] 此外,在本文使用的情况下,术语“和/或”应当被视为连同或不连同彼此的两个指定特征或组分中的每一个的特定披露。因此,在本文如在诸如“A和/或B”等短语中使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)以及“B”(单独)。同样,诸如“A、B和/或C”之类的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下各个方面:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0160] 如本文所述,除非另有指示,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值,并且在适当时包括其分数(如整数的十分之一和百分之一)。

[0161] 术语“约”或“基本上包括”是指在如由本领域普通技术人员所确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,这将部分取决于如何测量或确定该值或组成,即,测量系统的局限性。当在申请和权利要求中提供特定值或组合物时,除非另有说明,否则“约”或“基本上包含”的含义应当被假定在该特定值或组成的可接受的误差范围内。

[0162] 除非另有说明或从上下文中清楚地看出,本文中使用类似于“第一和第二”、或“(a)和(b)”或“(i)和(ii)”的术语并不表示顺序或方向但用于鉴别组合物或方法的多个组分。本领域普通技术人员根据上下文将清楚这些术语旨在表示顺序或方向。

[0163] 当本文描述蛋白质和/或多肽时,应当理解本文还提供编码蛋白质或多肽的多核苷酸(例如RNA(例如mRNA)或DNA多核苷酸)。

[0164] 当本文描述蛋白质、多肽、多核苷酸、细胞、表达载体等时,应理解本文还提供蛋白质、多肽、多核苷酸、细胞、表达载体等的分离形式。

[0165] 当本文描述蛋白质、多肽、多核苷酸等时,应当理解,本文还提供蛋白质、多肽、多核苷酸等的重组形式。

[0166] 当本文描述多肽或多肽组时,应当理解,本文还提供了包含折叠成其三维结构(即三级或四级结构)的多肽或多肽组的蛋白质,反之亦然。

[0167] 如本文所用,术语“施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何一种将药剂,例如治疗剂(或在受试者体内代谢或改变以体外产生治疗剂的治疗剂的前体)物理引入受试者。施用可以例如一次、多次和/或在一个或多个延长的时期内进行。

[0168] 如本文所用,术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指导致免疫效应细胞(例如NK细胞)裂解抗体(或含Fc区的多肽或蛋白质)(例如本文所述的含Ig Fc的融合蛋白或多肽)包被的靶细胞的免疫机制。如本文所用,术语“减少的ADCC”等是指在给定的时间内,在靶细胞周围培养基中给定浓度的抗体(或含有Ig Fc区的多肽或蛋白质)(例如本文所述的含有Fc区融合蛋白或多肽)下,通过上文定义ADCC机制裂解的靶细胞数量减少,和/或通过上文定义的ADCC机制,在给定时间内实现给定数量的靶细胞的裂解所需的靶细胞周围培养基中抗体(或含有Fc区的多肽或蛋白质)(例如,本文所述的含有Fc的融合蛋白或多肽)浓度的增加。ADCC的减少是相对于由相同抗体(或含Fc区的多肽或蛋白质)(例如,本文

所述的含Fc的融合蛋白或多肽)介导的ADCC而言的,所述抗体由相同类型的宿主细胞使用相同的标准生产、纯化、配制和储存方法(本领域技术人员已知),但未经工程改造(例如,不包含一个或多个介导ADCC减少的氨基酸修饰,例如氨基酸取代)产生。例如,由在其Fe区中包含减少ADCC的氨基酸取代的抗体(或含有Fe区的多肽或蛋白质)(例如,本文所述的含有Fe的融合蛋白或多肽)介导的ADCC的减少是相对于由Fc区没有所述氨基酸取代的相同抗体(或含有Fc区的多肽或蛋白质)(例如,本文所述的含有Fc的融合蛋白或多肽)介导的ADCC而言的。

[0169] 如本文所用,术语"亲和力"是指一种蛋白质(例如抗体)与另一种蛋白质(例如抗原)的结合强度。蛋白质的亲和力通过解离常数Kd来测量,定义为[抗体]x[抗原]/[抗体-抗原],其中[抗体-抗原]是抗体-抗原复合物的摩尔浓度,[抗体]是未结合抗体的摩尔浓度并且[配体]是未结合抗原的摩尔浓度。亲和常数Ka定义为1/Kd。测量亲和力的标准方法是本领域普通技术人员已知的。本文描述了测量亲和力的示例性方法,参见,例如,§5.2.25.2.3。

[0170] 如本文所用,术语"抗体"在最广泛的意义上使用,包括各种免疫球蛋白(Ig)(例如人Ig(hIg))结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性(例如双特异性、三特异性)抗体和抗体片段,只要它们表现出所期望的抗原结合活性(即抗原结合片段或变体)。因此,术语抗体包括例如全长抗体;全长抗体的抗原结合片段;包含抗体CDR、VH区和/或VL区的分子;和抗体样支架(例如,纤连蛋白)。抗体的实例包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、骆驼化抗体、胞内抗体、亲和体、双抗体、三抗体、异源缀合物抗体、抗体-药物缀合物、单结构域抗体(例如,VHH、$(VHH)_2$)、单链抗体、单链Fv(scFv;$(scFv)_2$)、Fab片段(例如Fab、单链Fab(scFab)、$F(ab')_2$片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、Fc融合物(例如,Fab-Fc、scFv-Fc、VHH-Fc、$(scFv)_2$-Fc、$(VHH)_2$-Fc),和任何上述的抗原结合片段,以及包含任何上述的缀合物或融合蛋白。抗体可以是Ig同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD或IgA)、任何类别(例如,IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1或IgA_2)或任何子类(例如,Ig的IgG_{2a}或IgG_{2b})。在某些实施例中,本文所述的抗体是IgG抗体或其类别(例如人IgG_1或IgG_4)或亚类。在一些实施例中,抗体是人、人源化或嵌合IgG_1或IgG_4单克隆抗体。在一些实施例中,术语抗体是指单克隆或多克隆抗体群体。本文所述的抗体可以通过本领域已知的任何标准方法产生,例如,在宿主细胞中重组产生,参见,例如,§5.4;或合成产生。

[0171] "抗体样支架"是本领域已知的,例如纤连蛋白和设计的锚蛋白重复蛋白(DARPins)已被用作抗原结合结构域的替代支架,参见例如Gebauer和Skerra,Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics.[作为下一代抗体疗法的工程蛋白质支架].Curr Opin Chem Biol[化学与生物学当前观点]13:245-255(2009)和Stumpp等人,Darpins:A new generation of protein therapeutics[Darpins:新一代蛋白质疗法].Drug Discovery Today[今日药物发现]13:695-701(2008),出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文。示例性的抗体样支架蛋白包括但不限于脂质运载蛋白(Anticalin)、蛋白A衍生的分子例如蛋白A的Z-结构域(Affibody)、A-结构域(Avimer/Maxibody)、血清转铁蛋白(跨体(trans-body));设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、VNAR片段、纤连蛋白(AdNectin)、C型凝集素结构域(Tetranectin);新抗原受体β-内酰胺酶的可变

结构域(VNAR片段)、人γ-晶状体蛋白或泛素(Affilin分子);人蛋白酶抑制剂、微体(例如来自knottin家族的蛋白质、肽适体和纤连蛋白(adnectin))的kunitz型结构域。

[0172] 术语“抗原结合结构域”是指能够特异性结合抗原的多肽或蛋白质、或者多肽或蛋白质的部分。示例性抗原结合结构域包括但不限于单结构域抗体(例如VHH、$(VHH)_2$)、单链Fv(例如scFv;$(scFv)_2$)、Fab片段(例如Fab、单链Fab(scFab)、$F(ab')_2$)和二硫键连接Fvs(sdFv)。抗原结合结构域可以是较大多肽或蛋白质的一部分,例如,全长抗体、Fc融合物。在一些实施例中,抗原结合结构域是全长抗体的一部分。在一些实施例中,抗原结合结构域可操作地连接至Fc区。当提及抗原结合结构域使用靶蛋白或多肽时,术语“抗原”可以替换为靶蛋白或抗原的名称。例如,特异性结合hCAIX的抗原结合结构域在本文中也可以称为“hCAIX结合结构域”。

[0173] 术语“癌症”和“肿瘤”在本文中可互换使用,并且指以体内异常细胞不受控制的生长为特征的一大类各种疾病。不受控制的细胞分裂和生长导致恶性肿瘤的形成,其可以侵入邻近组织,也可能通过例如淋巴系统或血流转移到身体的远处部位。

[0174] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区已经描述于:Kabat等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],252,6609-6616(1977);以及Kabat等人,Sequences of protein of immunological interest[免疫目的蛋白质序列].(1991),出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文。除非另有说明,术语“CDR”是由以下定义的CDR:Kabat等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],252,6609-6616(1977);以及Kabat等人,Sequences of protein of immunological interest[免疫目的蛋白质序列].(1991)。

[0175] 术语“CH1”和“CH1区”在本文中可互换使用并且是指免疫球蛋白重链的第一恒定区。示例性参考hIgG1 CH1区的氨基酸序列如SEQ ID NO:119所示;并且示例性参考hIgG4 CH1区的氨基酸序列如SEQ ID NO:132所示。

[0176] 术语“CH2”和“CH2区”在本文中可互换使用并且是指免疫球蛋白重链的第二恒定区。示例性参考hIgG1 CH2区的氨基酸序列如SEQ ID NO:121所示;并且示例性参考hIgG4 CH2区的氨基酸序列如SEQ ID NO:134所示。

[0177] 术语“CH3”和“CH3区”在本文中可互换使用并且是指免疫球蛋白重链的第三恒定区。示例性参考hIgG1 CH3区的氨基酸序列如SEQ ID NO:122所示;并且示例性参考hIgG4 CH3区的氨基酸序列如SEQ ID NO:135所示。

[0178] 术语“恒定区”和“恒定结构域”在本文中可互换使用,是指全长抗体的轻链和/或重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但可表现出各种效应子功能,例如与Ig Fc受体(例如Fcγ受体)的相互作用。Ig分子的恒定区通常具有相对于Ig可变结构域更保守的氨基酸序列。

[0179] 如本文所用,关于多核苷酸的术语“衍生自”是指与参考多核苷酸(例如天然存在的多核苷酸)或其片段具有至少70%(例如至少85%)序列同一性的多核苷酸。关于多肽或蛋白质的术语“衍生自”是指包含与参考多肽或蛋白质(例如天然存在的多肽或蛋白质)的氨基酸序列具有至少70%(例如至少85%)序列同一性的氨基酸序列的多肽或蛋白质。如本文所用,术语“衍生自”并不表示获得多核苷酸、多肽或蛋白质的任何特定过程或方法。例如,多核苷酸、多肽或蛋白质可以是重组产生的或化学合成的。

[0180] 如本文所用,术语“诊断”或“诊断”是指确定疾病的存在、不存在、严重程度或治疗过程(例如,癌症,例如包含表达CAIX的癌细胞的癌症)。术语“诊断”涵盖初始确定以及初始确定之后的后续确定(例如监测)。

[0181] 如本文所用,术语“疾病”是指损害生理功能的任何异常病症。该术语广泛用于涵盖其中生理功能受损的任何障碍、疾病、异常、病理、病况、病症或综合征,无论病因学的性质如何。

[0182] 术语“铰链”或“铰链区”在本文中可互换使用并且指免疫球蛋白重链的铰链区。示例性参考hIgG1铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:120所示;并且示例性参考hIgG4铰链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:133所示。

[0183] 术语“DNA”和“聚脱氧核糖核苷酸”在本文中可互换使用,并且是指包括通过磷酸二酯键聚合的多个脱氧核糖核苷酸的大分子。脱氧核糖核苷酸是其中糖是脱氧核糖的核苷酸。

[0184] 当涉及抗体时,术语“效应子功能”是指归因于抗体Fc区的那些生物活性,因此其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能包括但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc受体结合(例如,Fcγ RI、Fcγ RIIa、Fcγ RIIc、Fcγ RIIIa和/或Fcγ RIIIb(例如,Fcγ RI、Fcγ IIa和/或Fcγ IIIa))和Clq结合。

[0185] 如本文所用,术语“EU编号系统”是指抗体恒定区的EU编号惯例,如以下所描述:Edelman,G.M.等人,Proc.Natl.Acad.USA[美国国家科学院院刊],63,78-85(1969)和Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫目的蛋白质序列],U.S.Dept.Health and Human Services[美国卫生与公众服务部],第5版,1991,出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文。

[0186] 如本文所用,术语“Fab”指抗原结合结构域,其包含Fab重链,所述Fab重链从N末端到C末端包含VH区和CH1区;以及轻链,所述轻链从N末端到C末端包含VL区和CL区;并且其中Fab重链和轻链相关联以形成抗原结合结构域。

[0187] 本文使用的术语“Fab-Fc”是指包含可操作地连接至Fc区的Fab的抗体。例如,全长抗体包含可操作地连接至第一Fc区的第一Fab和可操作地连接至第二Fc区的第二Fab。

[0188] 如本文所用,术语“Fc区”是指hIg重链的C末端区,其从N末端到C末端至少包含可操作地连接至CH3区的CH2区。在一些实施例中,Fc区包含可操作地连接至CH2区的N末端的Ig铰链区或Ig铰链区的至少一部分。在一些实施例中,Fc区相对于参考Fc区进行工程改造(例如,包含一个或多个氨基酸修饰),参见例如§5.3.2.1。具有工程改造的Fc区的蛋白质的其他实例可以在Saunders 2019(K.O.Saunders,“Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life[调节抗体效应子功能和循环半衰期的概念性方法],”2019,Frontiers in Immunology[],V.10,Art.1296,第1-20页,其全部内容出于所有目的通过引用并入本文)中找到。

[0189] 如本文所用,术语“Fc修饰的融合蛋白或多肽”是指包含Fc区的融合多肽或蛋白,其中Fc区被修饰(例如包含一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个氨基酸取代、缺失或添加)。

[0190] 如本文所用,关于Fc区等的术语“第一”和“第二”是为了方便区分每种类型的部分

存在多于一个时而使用的。除非明确说明,否则这些术语的使用并不旨在赋予融合蛋白特定的顺序或方向。

[0191] 如本文所用,术语“框架区”或“FR区”是指作为抗体可变区的一部分、但不是CDR(例如,使用CDR的Kabat定义)的一部分的氨基酸残基。

[0192] 如本文所用,术语“全长抗体”是指具有与天然抗体结构基本相似的结构的抗体(i)第一Ig轻链,其从N末端至C末端包含轻链可变区(VL)区和轻链恒定区(CL)区;(ii)第一Ig重链,其从N末端到C末端包含重链可变区(VH)、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;(iii)第二Ig重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;(iv)第二Ig轻链,其从N末端到C末端包含VL区和VH区;其中所述第一轻链和所述第一重链相关联形成第一抗原结合结构域;其中所述第二轻链和所述第二重链相关联形成第二抗原结合结构域;并且其中所述第一重链和所述第二重链相关联形成二聚体。在一些实施例中,两条重链包含基本上相同的氨基酸序列;并且这两条轻链包含基本上相同的氨基酸序列。两条重链的氨基酸序列可以不同,例如含有一个或多个促进两条重链异二聚化的氨基酸修饰。在一些实施例中,两条重链包含基本上相同的氨基酸序列,除了一个或多个促进正确重链异二聚化的氨基酸修饰(例如,如本文所述);并且这两条轻链包含基本上相同的氨基酸序列。如果抗体链由于翻译后修饰(如赖氨酸残基的C末端切割、可替代的糖基化模式等)而不同,则它们可以基本相同但不完全相同。相对于参考(例如野生型抗体序列),全长抗体的任何一条链的氨基酸序列可以包含一个或多个氨基酸修饰。

[0193] 如本文所用,关于多肽或蛋白质的术语“功能性变体”是指与参考多肽或蛋白质的氨基酸序列相比,包含至少一个但不超过15%、不超过12%、不超过10%、不超过8%的氨基酸变异(例如取代、缺失、添加)的多肽或蛋白质,其中所述多肽或蛋白质保留了参考多肽或蛋白质的至少一种特定功能。并非参考多肽或蛋白质(例如野生型)的所有功能都需要由蛋白质的功能性变体保留。在一些情况下,选择性地减少或消除一种或多种功能。在一些实施例中,参考多肽或蛋白质是野生型蛋白质。例如,hIL-12p40多肽或蛋白质的功能性变体可以指与参考hIL-12p40蛋白质(例如野生型)相比包含氨基酸取代的hIL-12p40蛋白质,其保留特异性结合hIL-12R的能力。

[0194] 如本文所用,关于多肽或蛋白质的术语“功能性片段”是指参考多肽或蛋白质的保留至少一种特定功能的片段。并非参考多肽或蛋白质的所有功能都需要由多肽或蛋白质的功能性片段保留。在一些情况下,选择性地减少或消除一种或多种功能。在一些实施例中,参考多肽或蛋白质是野生型蛋白质。例如,hIL-12p40的功能性片段可以指保留特异性结合IL-12R的能力的hIL-12p40片段。

[0195] 如本文所用,术语“融合物”及其语法等同物是指衍生自第一多肽的至少一个多肽与衍生自第二多肽的另一个多肽的可操作连接,其中第一和第二多肽不同。术语融合物涵盖至少两个多肽通过肽键的直接连接和通过接头(例如肽接头)的间接连接。

[0196] 如本文所用,术语“融合多肽”或“融合蛋白”及其语法等同物是指包含衍生自第一多肽的至少一个多肽和衍生自第二多肽的另一多肽可操作地连接的多肽或蛋白质,其中第一和第二多肽不同。融合多肽或蛋白中的至少两个多肽可以通过肽键直接可操作地连接;或者可以通过接头(例如,肽接头)间接可操作地连接。因此,例如,术语融合多肽涵盖其中多肽A通过肽键直接可操作地连接至多肽B的实施例(多肽A-多肽B),以及其中多肽A通过肽

接头可操作地连接至多肽B的实施例(多肽A-肽接头-多肽B)。

[0197] 如本文所用,术语“重链”是指免疫球蛋白的部分(例如,人Ig),其通常从N末端到C末端包含重链可变区(VH)、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。重链恒定区(即CH1区、铰链区、CH2区和CH3区)可以是任何不同的同种型,例如基于恒定结构域的氨基酸序列的人alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)和mu(μ),这分别产生hIgA、hIgD、IgE、hIgG和hIgM类人抗体,包括hIgG的亚类,例如,$hIgG_1$、$hIgG_2$、$hIgG_3$和$hIgG_4$。如本文所用,当用于指代人抗体时,基于恒定结构域的氨基酸序列,术语“重链”可以指任何不同的类型,例如,alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)和mu(μ),这分别产生人IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类抗体,包括人IgG的亚类,例如,IgG_1、IgG_2、IgG_3和IgG_4。

[0198] 如本文所用,术语“半衰期延长部分”是指当与多肽或蛋白质(主题多肽或蛋白质)缀合或以其他方式可操作地连接(例如融合)时,在体外给受试者(例如人类受试者)施用时增加主题多肽或蛋白质半衰期的部分(例如小分子、多肽、多核苷酸、碳水化合物、脂质、合成聚合物(例如PEG聚合物)等)。可以利用本领域已知的体外模型来评价多肽或蛋白质的药代动力学性质。

[0199] 如本文所用,术语“半衰期延长多肽”或“半衰期延长蛋白质”是指当与另一种多肽(主题多肽或蛋白质)可操作地连接时,在给受试者(例如人受试者)施用时,在体外增加主题多肽的半衰期的多肽。可以利用本领域已知的体外模型来评价多肽或蛋白质的药代动力学性质。

[0200] 如本文所用,当用于参考第二元件来描述第一元件时,术语“异源的”意思是第一元件和第二元件自然界中不以如所描述的布置存在。例如,包含“异源部分”的多肽是指与部分(例如小分子、多肽、多核苷酸、碳水化合物、脂质、合成聚合物(例如PEG聚合物)等)连接的多肽,所述部分天然不与所述多肽连接。例如,异源部分的非限制性实例是异源多肽(如本文所定义)。

[0201] 如本文所使用的,术语“异源信号肽”是指在自然界中不与主题多肽或蛋白质可操作地连接的信号肽。例如,关于包含可操作地连接至hIL-12p40的来自人IL-2(hIL-2)的信号肽的多肽,hIL-2信号肽将构成异源信号肽。

[0202] 如本文所用,术语“同源信号肽”是指在自然界中可操作地连接至主题多肽或蛋白质的信号肽。例如,关于包含与hIL-2可操作地连接的来自人IL-2的信号肽的多肽,hIL-2信号肽将构成同源信号肽。

[0203] 术语“人碳酸酐酶IX”或“CAIX”是指促进胃肠道中的酸分泌的人碳酸酐酶跨膜二聚体金属酶。CAIX在本领域中也称为“碳酸脱水酶IX”、“碳酸酐酶9”、“CA9”和“CA-IX”。示例性参考成熟hCAIX蛋白的氨基酸序列可以在Uniprot登录号Q16790下找到,并且在本文中如SEQ ID NO:1所示。

[0204] 如本文所用,术语“人肿瘤相关抗原”或“hTAA”是指在人癌细胞表面上表达的蛋白质,其允许将本文所述的多特异性蛋白质募集至人癌细胞。在一些实施例中,肿瘤相关抗原由正常细胞和癌细胞表达。在一些实施例中,与正常细胞相比,肿瘤相关抗原被癌细胞过表达,例如,与正常细胞相比过表达1倍、过表达2倍、过表达3倍或更多。在一些实施例中,肿瘤相关抗原由癌细胞不适当地合成,例如,与正常细胞表达的蛋白质相比,含有氨基酸修饰(例如,氨基酸缺失、添加和/或取代)的蛋白质。在一些实施例中,肿瘤相关抗原仅由癌细胞

表达,正常细胞不以可检测的水平表达。鉴定和验证肿瘤相关蛋白的方法是技术人员已知的并且描述于文献中(参见例如Bornstein,AAPS J.(2015),第17(3)卷,第525-534页;Hong等人,BMC Syst Biol.[BMC系统生物学](2018),第12卷(增刊2),第17页.

[0205] 术语“人白介素12”或“hIL-12”是指人IL-12蛋白或多肽。

[0206] 术语“白介素12”和“IL-12”在本文中可互换使用,并且意指并涵盖包含IL-12p35亚基和IL-12p40亚基的功能性IL-12蛋白复合物。在一些实施例中,IL-12p35亚基和IL-12p40亚基可操作地连接在单个多肽链中,例如单链IL-12(scIL-12)(例如本文所述的scIL-12)。在一些实施例中,IL-12p35亚基和IL-12p40亚基未可操作地连接在单个多肽链中,而是由两个单独的多肽编码。

[0207] 术语“单链IL-12”和“scIL-12”在本文中可互换使用,是指IL-12的形式,其已被工程改造以表达IL-12p40多肽,所述IL-12p40多肽通过肽接头直接或间接与IL-12p35多肽融合,使得IL-12p40/IL-12p35分子作为单个多肽链(即融合多肽)产生。scIL-12可以以任一顺序配置,使得以IL-12p40多肽开始产生单个多肽,因为氨基末端(“N末端”)部分通过肽接头直接或间接融合至作为scIL-12的羧基末端(“C末端”)部分的IL-12p35多肽。当利用肽接头时,该构型可以通过缩写名称“IL-12p40-接头-IL-12p35”来表示。相反,在scIL-12构建体中,IL-12p35多肽也可以是直接或通过肽接头与作为scIL-12的C末端部分的IL-12p40融合的N末端部分。当利用肽接头时,该构型可以通过缩写名称“IL-12p35-接头-IL-12p40”来表示。

[0208] 如本文所用,术语“hIL-12p35”是指异二聚体IL-12蛋白的人α亚基。示例性参考IL-12p35的氨基酸序列可以在Uniprot登录号P29459下找到,并且在本文中如SEQ ID NO:30所示。为了本披露的目的,本文所述的hIL-12p35多肽的所有氨基酸(和例如氨基酸取代)的编号是相对于含有天然信号肽的hIL-12p35的未成熟形式的氨基酸序列(即SEQ ID NO:30)来列出的。如本文所述,SEQ ID NO:30的氨基酸1-22是天然信号肽,其在体内被切割以形成成熟蛋白质(SEQ ID NO:31)。使用hIL-12p35的未成熟形式来指定氨基酸编号只是为了一致性,并且并不将利用该编号的实施例的范围限制为含有hIL-12p35的信号肽的多肽。例如,本文所述的包含具有Y189A氨基酸取代的SEQ ID NO:31(hIL-12p35的成熟形式)的氨基酸序列的hIL-12p35多肽不需要hIL-12p35的信号肽,尽管氨基酸位置Y189的编号是基于蛋白质的未成熟形式。本领域通常利用蛋白质的成熟形式来产生变体和融合蛋白。基于相对于hIL-12p35的未成熟形式的氨基酸编号,本领域普通技术人员可以容易地确定hIL-12p35的成熟形式(SEQ ID NO:31)中的氨基酸位置。如上所述,hIL-12p35蛋白的未成熟形式的氨基酸1-22是信号序列。因此,hIL-12p35蛋白的成熟形式中的特定氨基酸的氨基酸位置可以通过相对于hIL-12p35的未成熟形式指定的特定氨基酸的氨基酸位置减去22来确定。例如,氨基酸位置Y189(相对于SEQ ID NO:30编号)将对应于成熟形式的蛋白质(SEQ ID NO:32)中的氨基酸位置Y167。

[0209] 本文使用的术语“hIL-12p40”是指异二聚体IL-12蛋白的人β亚基。示例性参考IL-12p40的氨基酸序列可以在Uniprot登录号P29460下找到,并且在本文中如SEQ ID NO:32所示。为了本披露的目的,本文所述的hIL-12p40多肽的所有氨基酸(和例如氨基酸取代)的编号是相对于含有天然信号肽的hIL-12p40的未成熟形式的氨基酸序列(即SEQ ID NO:32)来列出的。如本文所述,SEQ ID NO:32的氨基酸1-22是天然信号肽,其在体内被切割以形成成

熟蛋白质(SEQ ID NO:33)。使用hIL-12p40的未成熟形式来指定氨基酸编号只是为了一致性,并且并不将利用该编号的实施例的范围限制为含有hIL-12p40的信号肽的多肽。例如,本文所述的包含具有W37A氨基酸取代的SEQ ID NO:33(hIL-12p40的成熟形式)的氨基酸序列的hIL-12p40多肽不需要hIL-12的信号肽,尽管氨基酸位置W37的编号是基于蛋白质的未成熟形式。本领域通常利用蛋白质的成熟形式来产生变体和融合蛋白。基于相对于hIL-12p40的未成熟形式的氨基酸编号,本领域普通技术人员可以容易地确定hIL-12p40的成熟形式(SEQ ID NO:33)中的氨基酸位置。如上所述,hIL-12p40蛋白的未成熟形式的氨基酸1-22是信号序列。因此,hIL-12p40蛋白的成熟形式中的特定氨基酸的氨基酸位置可以通过相对于hIL-12p40的未成熟形式指定的特定氨基酸的氨基酸位置减去22来确定。例如,氨基酸位置W37(相对于SEQ ID NO:32编号)将对应于成熟形式的蛋白质(SEQ ID NO:33)中的氨基酸位置W15。

[0210] 如本文所用,关于多肽、蛋白质或多核苷酸的术语“分离的”是指基本上不含在天然状态下与其相关联的其他细胞组分或其他污染物的多肽、蛋白质或多核苷酸。

[0211] 如本文所用,术语“Kabat编号系统”是指抗体可变区的Kabat编号惯例,参见,例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫目的蛋白质序列],U.S.Dept.Health and Services[美国卫生与公众服务部],第5版,1991,出于所有目的,其完整内容通过引用并入本文。除非另有说明,抗体可变区的编号根据Kabat编号系统表示。

[0212] 如本文所用,术语“接头”是指两个元件(例如多肽或蛋白质结构域)之间的连接。接头可以是共价键或肽接头。术语“键”是指化学键(例如酰胺键、二硫键或由化学反应产生的任何类型的键(例如化学缀合)。术语“肽接头”是指可用于连接两个多肽或蛋白质结构域的氨基酸或多肽。在一些实施例中,肽接头可用于在两个多肽或蛋白质结构域之间提供空间和/或灵活性。

[0213] 如本文所用,术语“轻链”是指免疫球蛋白的部分(例如,人免疫球蛋白),其从N末端到C末端包含轻链可变区(VL)可操作地连接至轻链恒定区(CL)。CL可以是任何不同的类型,例如,基于CL的氨基酸序列的kappa(κ)或lambda(λ)。在一些实施例中,本文所述的多特异性蛋白质包含一个或多个轻链。

[0214] 如本文所用,术语“信使RNA”或“mRNA”是指编码至少一个肽或蛋白质并且可以在体外、原位或离体翻译以产生所编码的肽或蛋白质的任何RNA。

[0215] 如本文所用,关于多核苷酸的术语“修饰”是指与参考多核苷酸相比包含至少一个核苷酸取代、改变、倒位、添加或缺失(例如一个或多个氨基酸取代)的多核苷酸。修饰可包括包含非天然存在的核苷酸残基。如本文所用,术语“修饰”在涉及氨基酸序列时是指与参考氨基酸序列相比包含至少一个氨基酸残基的取代、改变、倒置、添加或缺失的氨基酸序列。修饰可包括包含非天然存在的氨基酸残基。出于确定两个氨基酸序列的同一性百分比的目的,天然存在的氨基酸衍生物不被视为经修饰的氨基酸。例如,出于确定两个氨基酸序列的同一性百分比的目的,天然存在的谷氨酸氨基酸残基至焦谷氨酸氨基酸残基的修饰不被认为是氨基酸修饰。此外,例如,谷氨酸氨基酸残基到焦谷氨酸氨基酸残基的天然存在的修饰将不被认为是本文定义的氨基酸“修饰”。

[0216] “促进第一Fc区和第二Fc区异源二聚化的修饰”(或类似措辞)是对肽主链或Fc区

的翻译后修饰的操作,其减少或防止包含Fc区的多肽与相同多肽相关联形成同二聚体。如本文所用,促进关联的修饰特别地包括对期望关联的两个Fc区(即第一Fc区和第二Fc区)中的每一个进行的单独修饰,其中所述修饰彼此互补从而促进两个Fc区的关联。例如,促进相关联的修饰可以改变一个或两个Fc区的结构或电荷,以便分别使它们在空间或静电上有利的相关联。因此,异二聚化发生在包含第一Fc区的多肽和包含第二Fc区的多肽之间,它们在融合至每个Fc区的其他组分(例如抗原结合域)的意义上可能是不相同的。在一些实施例中,促进相关联的修饰包括Fc区中的氨基酸突变,特别是氨基酸取代。在特定的实施例中,促进相关联的修饰包含第一Fc区和第二Fc区各自中的单独的氨基酸突变,特别地一个或多个氨基酸取代。参见,例如,§5.3.2.2。

[0217] 如本文所用,术语"部分"一般用于描述可以可操作地连接至本文所述的多肽或蛋白质的任何大分子或微分子。示例性部分包括但不限于小分子、多肽、多核苷酸(例如DNA、RNA)、碳水化合物、脂质、合成聚合物(例如PEG的聚合物)。

[0218] 如本文所用,术语"可操作地连接"是指两个部分(例如两个多肽或两个多核苷酸)以功能关系连接。例如,当多肽在框内连接(直接或通过肽接头间接)时,多肽与另一多肽可操作地连接,使得两个多肽都具有功能(例如,本文所述的融合蛋白或多肽)。或者例如,如果转录调节多核苷酸例如启动子、增强子或其他表达控制元件影响编码蛋白质的多核苷酸的转录,则其可操作地连接至编码蛋白质的多核苷酸。术语"可操作地连接"还可以指部分与例如多核苷酸或多肽的缀合(例如PEG聚合物与蛋白质或多肽的缀合)。

[0219] 可以使用数学算法来确定两个序列(例如肽或蛋白质(氨基酸序列)或多核苷酸(核酸序列))之间的"同一性百分比"。用于比较两个序列的数学算法的特定非限制性实例是Karlin S&Altschul SF(1990)PNAS 87:2264-2268的算法,如Karlin S&Altschul SF(1993)PNAS 90:5873-5877中修改,其每一篇均通过引用以其整体并入本文。这样的算法被并入Altschul SF等人,(1990)J Mol Biol[分子生物学杂志]215:403(其通过引用以其整体并入本文)的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集例如得分=100、字长=12进行,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。可以使用XBLAST程序参数集例如得分50,字长=3进行BLAST蛋白质搜索以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的空位比对,可以如Altschul SF等人,(1997)Nuc Acids Res[核酸研究]25:3389-3402(其通过引用以其整体并入本文)中所述使用Gapped BLAST。可替代地,PSI BLAST可用于执行迭代搜索,其检测分子之间的远距离关系(同上)。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI Blast程序时,可以使用各个程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见,例如,万维网ncbi.nlm.nih.gov上美国国家生物技术信息中心(NCBI))。用于比较序列的数学算法的另一个特定的非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11-17(其通过引用以其整体并入本文)的算法。这种算法被合并到ALIGN程序(2.0版)中,该程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。两个序列之间的同一性百分比可以使用类似于上述技术的技术来确定,无论是否存在空位。在计算同一性百分比时,通常只计算完全匹配。

[0220] 如本文所用,术语"药物组合物"是指适合施用于动物例如人受试者并且包含治疗剂和药学上可接受的载剂或稀释剂的组合物。"药学上可接受的载剂或稀释剂"是指用于与

人和/或非人动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症、与合理的治疗益处/风险比相称的物质。

[0221] 术语“多核苷酸”和“核酸分子”在本文中可互换使用并且是指DNA或RNA的聚合物。核酸分子可以是单链或双链;含有天然、非天然或改变的核苷酸;并且含有天然的、非天然的或改变的核苷酸间键联,例如氨基磷酸酯键联或硫代磷酸酯键联,而不是在未修饰的核酸分子的核苷酸之间发现的磷酸二酯。核酸分子包括但不限于通过本领域可用的任何手段获得的所有核酸分子,所述手段包括但不限于重组手段,例如使用普通克隆技术和聚合酶链式反应等从重组文库或细胞基因组克隆核酸分子,以及通过合成手段。技术人员将理解,除非另有说明,本申请中提出的核酸序列将在代表性DNA序列中列举胸苷(T),但在该序列代表RNA(例如mRNA)时,胸苷(T)将取代为尿嘧啶(U)。因此,由特定序列识别号鉴定的DNA编码的任何RNA多核苷酸也可包含由该DNA编码的相应RNA(例如mRNA)序列,其中该DNA的每个胸苷(T)序列被尿嘧啶(U)取代。

[0222] 如本文所用,术语“多肽”是指通过肽键连接的至少2个(例如至少5个)氨基酸的聚合物。术语“多肽”并不表示特定长度的氨基酸聚合物链。本领域通常将较短的氨基酸聚合物(例如约2-50个氨基酸)称为肽;以及将更长的氨基酸聚合物(例如,约超过50个氨基酸)称为多肽。然而,术语“肽”和“多肽”在本文中可互换使用。

[0223] 如本文所用,术语“蛋白质”是指多肽或一组(即至少两个)多肽。在蛋白质包含一组多肽的实施例中,该组多肽相关联形成功能性单元(即四级结构)。在一些实施例中,多肽或多肽组折叠成其三维结构(即三级或四级结构)。当本文考虑多肽或多肽组时,应当理解,本文还提供了包含折叠成其三维结构(即三级或四级结构)的多肽或多肽组的蛋白质,反之亦然。

[0224] “预防性”治疗是对未表现出疾病体征或仅表现出早期体征的受试者进行的治疗,其目的是降低发生病理学的风险。

[0225] 术语“RNA”和“多核糖核苷酸”在本文中可互换使用,并且是指包括通过磷酸二酯键聚合的多个核糖核苷酸的大分子。核糖核苷酸是其中糖为核糖的核苷酸。RNA可能含有经修饰的核苷酸;并且含有天然的、非天然的或改变的核苷酸间键联,例如氨基磷酸酯键联或硫代磷酸酯键联,而不是在未修饰的核酸分子的核苷酸之间发现的磷酸二酯。

[0226] 如本文所用,术语“样品”涵盖从受试者获得的多种生物样品。示例性样品类型包括例如生物来源的血液和其他液体样品(包括但不限于全血、外周血单核细胞(PBMC)、血清、血浆、尿液、唾液、羊水、粪便、滑液等)、鼻咽拭子、实体组织样品如活组织检查(或衍生自其的细胞及其后代)、组织培养物(或衍生自其的细胞及其后代)和细胞培养物(或衍生自其的细胞及其后代)。该术语还包括从受试者获取后以任何方式进行操作的样品,例如通过离心、过滤、洗涤、沉淀、透析、色谱、裂解、用试剂处理、富集某些细胞群、冷藏、冷冻、染色等。

[0227] 术语“scFv”或“单链可变片段”是指包含通过肽接头可操作地连接至VL区的VH区的抗体,其中VH和VL区相关联以特异性结合抗原(例如,形成抗原结合结构域)。在一些实施例中,scFv从N末端到C末端包含VH区、肽接头和VL区。在一些实施例中,scFv从N末端到C末端包含VL区、肽接头和VH区。

[0228] 如本文所用,术语“$(scFv)_2$”是指包含与第二scFv可操作地连接(例如经由肽接

头)的第一scFv的抗体。第一和第二scFv可以特异性结合相同或不同的抗原。在一些实施例中,第一和第二scFv通过肽接头可操作地连接。

[0229] 如本文所用的术语“scFv-Fc”指包含与Fc区可操作地连接(例如通过肽接头)的scFv的抗体。在一些实施例中,scFv仅可操作地连接至包含第一和第二Fc区的蛋白质的第一Fc区。在一些实施例中,第一scFv可操作地连接至第一Fc区,并且第二scFv可操作地连接至包含第一和第二Fc区的蛋白质的第二Fc区。

[0230] 如本文所用,术语“$(scFv)_2$-Fc”是指$(scFv)_2$可操作地连接(例如,通过肽接头)至Fc区。在一些实施例中,$(scFv)_2$仅可操作地连接至包含第一和第二Fc区的蛋白质的第一Fc区。在一些实施例中,第一$(scFv)_2$可操作地连接至第一Fc区并且第二$(scFv)_2$可操作地连接至包含第一和第二Fc区的蛋白质的第二Fc区。

[0231] 如本文所用,术语“单结构域抗体”或“sdAb”是指具有单个单体可变抗体结构域的抗体。sdAb能够特异性结合特定抗原。VHH(如本文所定义)是sdAb的实例。

[0232] 如本文所用,术语“信号肽”或“信号序列”是指可以引导蛋白质转运或定位至特定细胞器、细胞区室或细胞外输出的序列(例如氨基酸序列)。所述术语涵盖信号序列肽和编码信号肽的核酸序列。因此,在核酸上下文中提及信号肽是指编码信号肽的核酸序列。

[0233] 如本文所用,术语“特异性结合”是指第一蛋白质(例如配体)和第二蛋白质(例如配体的同源受体)之间相对于其他氨基酸序列的优先相互作用,即显著更高的结合亲和力。本文中,当第一蛋白质或多肽被称为“特异性结合”第二蛋白质或多肽时,应理解第一蛋白质或多肽特异性结合第二蛋白质或多肽的表位。术语“表位”是指第二蛋白质或多肽的被第一蛋白质或多肽特异性识别的部分。术语特异性结合包括与不同物种的相同表位交叉反应的分子。例如,特异性结合人CAIX的抗体可以与另一物种(例如食蟹猴、鼠等)的CAIX交叉反应,并且在本文中仍然被认为特异性结合人CAIX。

[0234] 如本文所用,术语“受试者”包括任何动物,例如人或其他动物。在一些实施例中,受试者是脊椎动物(例如,哺乳动物、鸟、鱼、爬行动物或两栖动物)。在一些实施例中,受试者是人。在一些实施例中,方法受试者是非人哺乳动物。在一些实施例中,受试者是非人哺乳动物,例如非人灵长类动物(例如猴、猿)、有蹄类动物(例如家牛、水牛、绵羊、山羊、猪、骆驼、美洲驼、羊驼、鹿、马、驴)、肉食动物(例如狗、猫)、啮齿动物(例如大鼠、小鼠)或兔类动物(例如兔)。在一些实施例中,受试者是鸟,诸如鸟类类群鸡形目(例如鸡、火鸡、野鸡、鹌鹑)、雁形目(例如鸭、鹅)、古颚下纲(例如鸵鸟、鸸鹋)、鸽形目(例如鸽子、野鸽)或鹦形目(例如鹦鹉)的成员。

[0235] 如本文所用,治疗剂的术语“治疗有效量”是指当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时,保护受试者免受疾病发作或促进疾病消退的治疗剂的任何量,所述疾病消退通过疾病或感染症状严重性的降低、无疾病或感染症状期的频率和持续时间的增加或预防由于疾病或感染痛苦引起的损伤或残疾来证明。治疗剂促进疾病消退的能力可以使用熟练的技术人员已知的多种方法,诸如在临床试验期间的人受试者中、在可预测人中的功效的动物模型系统中或通过在体外测定中测定药剂的活性来评估。

[0236] 如本文所用,术语“治疗(treat、treating、treatment)”等是指减轻或改善疾病和/或与其相关的一个或多个症状或获得期望的药理学和/或生理学作用。应当理解,尽管不排除,治疗疾病并不需要完全消除所述疾病或与其相关的一个或多个症状。在一些实施

例中,所述作用是治疗性的,即但不限于,所述作用部分地或完全地降低、减弱、消除、减轻、缓解、降低疾病和/或由疾病引起的不良症状的强度或治愈疾病和/或疾病引起的不良症状。在一些实施例中,作用是预防性的,即,作用保护或预防疾病的发生或复发。为此,本发明披露的方法包括施用治疗有效量的本文所述的组合物。

[0237] 如本文所用,术语"可变区"是指抗体的一部分,通常是轻链或重链的一部分,通常是成熟重链中约氨基末端的110至120个氨基酸或110至125个氨基酸,以及成熟轻链中约90至115个氨基酸,它们在抗体之间在序列上差异很大,并用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。序列的变异性集中在称为互补决定区(CDR)的区域,而可变结构域中高度保守的区域称为框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论的束缚,认为轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施例中,可变区是人可变区。在某些实施例中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人构架区(FR)。在特定实施例中,可变区是灵长类动物(例如,非人灵长类动物)可变区。在某些实施例中,可变区包含啮齿类动物或鼠类CDR和灵长类动物(例如,非人灵长类动物)框架区(FR)。

[0238] 术语"VL"和"VL区"可互换使用,指免疫球蛋白轻链可变区。VL区可掺入抗体(例如scFv、Fab、全长抗体)中。例如,scFv包含通过肽接头可操作地连接至VH区的VL区。

[0239] 术语"VH"和"VH区"可互换使用,指免疫球蛋白重链可变区。VH区可掺入抗体(例如scFv、Fab、全长抗体)中。例如,scFv包含通过肽接头可操作地连接至VL区的VH区。

[0240] 本文使用的术语"VHH"是指具有单个单体重链可变抗体结构域(VH)的一类单结构域抗体(sdAb)。此类抗体可以在天然缺乏轻链的骆驼科哺乳动物(例如骆驼、美洲驼)中发现或产生或合成产生。

[0241] 如本文所用,术语"$(VHH)_2$"指包含可操作地连接至第二VHH的第一VHH的抗体(例如,通过肽接头)。第一和第二VHH可以特异性结合相同或不同的抗原。在一些实施例中,第一和第二VHH通过肽接头可操作地连接。

[0242] 如本文所用的术语"VHH-Fc"指包含与Fc区可操作地连接(例如通过肽接头)的VHH的抗体。在一些实施例中,VHH仅可操作地连接至包含第一Fc区和第二Fc区的蛋白质的第一Fc区。在一些实施例中,第一VHH可操作地连接至第一Fc区,并且第二VHH可操作地连接至包含第一和第二Fc区的蛋白质的第二Fc区。

[0243] 如本文所用,术语"$(VHH)_2$-Fc"是指$(VHH)_2$可操作地连接(例如,通过肽接头)至Fc区。在一些实施例中,$(VHH)_2$仅可操作地连接至包含第一和第二Fc区的蛋白质的第一Fc区。在一些实施例中,第一$(VHH)_2$可操作地连接至第一区域并且第二$(VHH)_2$可操作地连接至包含第一和第二Fc区的蛋白质的第二Fc结构域。

5.1.1人源化抗CAIX抗体

[0244] 人CAIX(hCAIX)是具有细胞外活性位点的跨膜二聚体金属酶,其可促进胃肠道中的酸分泌并且是人中发现的14种碳酸酐酶亚型之一。表1中提供了示例性成熟(SEQ ID NO:1)和未成熟(SEQ ID NO:2)参考hCAIX多肽的氨基酸序列。SEQ ID NO:2的N末端氨基酸1-37(下划线)代表信号肽。

表1.示例性hCAIX多肽的氨基酸序列

说明	SEQ ID NO	氨基酸序列
hCAIX 成熟（无信号序列）	1	QRLPRMQEDSPLGGGSSGEDDPLGEEDLPSEEDSPREEDPPG EEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPGD PQEPQNNAHRDKEGDDQSHWRYGGDPPWPRVSPACAGRFQSP VDIRPQLAAFCPALRPLELLGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLT LPPGLEMALGPGREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHTVEGHRFP
细胞外结构域粗体 UniProt ID：Q16790		AEIHVVHLSTAFARVDEALGRPGGLAVLAAFLEEGPEENSAY EQLLSRLEEIAEEGSETQVPGLDISALLPSDFSRYFQYEGSL TTPPCAQGVIWTVFNQTVMLSAKQLHTLSDTLWGPGDSRLQL NFRATQPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLNSCLAAGDI LALVFGLLFAVTSVAFLVQMRRQHRRGTKGGVSYRPAEVAET GA
hCAIX 不成熟（信号序列下划线） **细胞外结构域粗体** UniProt ID：Q16790	2	MAPLCPSPWLPLLIPAPAPGLTVQLLLSLLLLVPVHPQRLPR MQEDSPLGGGSSGEDDPLGEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLP GEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGSLKLEDLPTVEAPGDPQEPQ NNAHRDKEGDDQSHWRYGGDPPWPRVSPACAGRFQSPVDIRP QLAAFCPALRPLELLGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLTLPPGL EMALGPGREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHTVEGHRFPAEIHV VHLSTAFARVDEALGRPGGLAVLAAFLEEGPEENSAYEQLLS RLEEIAEEGSETQVPGLDISALLPSDFSRYFQYEGSLTTPPC AQGVIWTVFNQTVMLSAKQLHTLSDTLWGPGDSRLQLNFRAT QPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLNSCLAAGDILALVF GLLFAVTSVAFLVQMRRQHRRGTKGGVSYRPAEVAETGA

[0245] 一方面,本文提供了特异性结合hCAIX的抗体(及其功能性片段和变体(例如其抗原结合结构域)),此类抗体在本文中也称为抗CAIX抗体。

[0246] 表2中提供了示例性抗hCAIX抗体的VH和VL区的氨基酸序列。

表2.示例性抗hCAIX VH和VL多肽的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
VH		
HC1	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHR SGYFSMDYWGQGTTVTVSS	3
HC2	LVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPGKGLEWVSA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHR SGYFSMDYWGQGTLVTVSS	4
HC3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVAA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHR SGYFSMDYWGQGTLVTVSS	5
HC4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDDSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARHR SGYFSMDYWGQGTTVTVSS	6

HC5	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHR SGYFSMDYWGQGTSVTVSS	7
HC5 变体 3	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHR SGYFSMDYWGQGTSVTVSS	7
HC5 变体 27	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSA INSDGAITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHR SGYFSMDYWGQGTSVTVSS	8
HC5 变体 29	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHR SGYFSMDYWGQGTSVTVSS	9
HC5 变体 36	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSA INSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHR SGYFSMDYWGQGTSVTVSS	9
HC5 变体 74	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSA INSDGAITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHR SGYFSMDYWGQGTSVTVSS	8
VL		
LC1	DIVMTQSPATLSLSPGDRATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPGQAPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYSNYPWTFGG GTKVEIK	10
LC2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPGQAPRLLVYS ASNRYTGIPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYSNYPWTFGQ GTKLEIK	11
LC3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYSNYPWTFGG GTKVEIK	12
LC4	DIQMTQSPFSLSASVGDRVTITCKASQNVVSAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYSNYPWTFGG GTKLEIK	13
LC5	AIQLTQSQRFLSASVGDRVTITCRASQNVVSALAWYQQKPGQSPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADFFCQQYSNYPWTFGG GTKLEIK	14
LC3 变体 3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGG GTKVEIK	15

LC3 变体 27	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGG GTKVEIK	15
LC3 变体 29	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGG GTKVEIK	15
LC3 变体 36	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVGWYQQKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYSNYPWTFGG GTKVEIK	16
LC3 变体 74	EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSCKASQNVVSAVGWYQKKPGQSPRLLIYS ASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYNNYPWTFGG GTKVEIK	17

[0247] 在一些实施例中,抗hCAIX抗体(或其功能性片段或变体)包含VH和VL。

[0248] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与表2中列出的任何VH多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与表2中列出的任何VL多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0249] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含表2中列出的任何VH多肽的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含表2中列出的任何VL多肽的氨基酸序列。

[0250] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3-9中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10-17中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0251] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0252] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些

实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0253] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0254] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:6中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0255] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸

序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0256] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸

序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0257] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、

88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0258] 表3中提供了示例性抗hCAIX抗体的VH和VL区的核苷酸序列。

表3.示例性抗CAIX VH和VL多肽的核苷酸序列

说明	核苷酸序列	SEQ ID NO
VH		
HC1	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGAGGAGGCCTTGTGCAACCTGGAGGCAG CCTGAAGCTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTACA TGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTGCC ATCAACTCTGATGGAGGCATCACCTACTACCTGGACACAGTGAAGGGCAG ATTCACCATCAGCAGAGATAATAGCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACAGCTGTGTACTACTGTGCTAGACACAGA TCTGGCTACTTCAGCATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACAGTGACTGT GAGCTCT	18
HC2	CTGGTGCAACTGGTAGAATCTGGAGGAGGCCTTGTGAAACCTGGAGGCAG CCTGAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTACA	19

	TGAGCTGGATCAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTGCC ATCAACTCTGATGGAGGCATCACCTACTACCTGGACACAGTGAAGGGCAG ATTCACCATCAGCAGAGATAATGCCAAAAACAGCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACAGCTGTGTACTACTGTGCTAGACACAGA TCTGGCTACTTCAGCATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGT GAGCTCT	
HC3	GAGGTGCAACTGGTAGAATCTGGAGGAGGCCTTGTGCAGCCTGGAGGCAG CCTGAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTACA TGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTGCC ATCAACTCTGATGGAGGCATCACCTACTACCTGGACACAGTGAAGGGCAG ATTCACCATCAGCAGAGATAATGCCAAAAACAGCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACAGCTGTGTACTACTGTGCTAGACACAGA TCTGGCTACTTCAGCATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGACTGT GAGCTCT	20
HC4	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGAGGAGGCCTTGTGCAACCTGGAGGCAG CCTGAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTACA TGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTGCC ATCAACTCTGATGGAGGCATCACCTACTACCTGGACACAGTGAAGGGCAG ATTCACCATCAGCAGAGATGACAGCAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGA GCAGCCTGAGAGCTGAGGACACAGCTGTGTACTACTGTGCTAGACACAGA TCTGGCTACTTCAGCATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACAGTGACTGT GAGCTCT	21
HC5	GAGGTCAGACTGGTAGAATCTGGAGGAGGCCTTGTGAAACCTGGAGGCAG CCTGAGACTGAGCTGTGCTGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCAACTACTACA TGAGCTGGATCAGACAAGCCCCTGAGAAGAGACTGGAGCTGGTGTCTGCC ATCAACTCTGATGGAGGCATCACCTACTACCTGGACACAGTGAAGGGCAG ATTCACCATCAGCAGAGATAATGCCAAAAACAGCCTGTACCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCTGAGGACACAGCCCTGTTCTACTGTGCTAGACACAGA TCTGGCTACTTCAGCATGGACTACTGGGGCCAAGGCACCTCTGTGACTGT GAGCTCT	22
HC5 密码子优化的	GAAGTCCGTCTGGTCGAGAGCGGGGGGGGCCTGGTGAAGCCTGGCGGCAG CCTGAGGCTGTCTTGCGCCGCTTCCGGCTTCACCTTTTCTAACTACTATA TGTCCTGGATCAGACAGGCCCCAGAGAAGAGGCTGGAGCTGGTGTCCGCC ATCAACTCTGACGGCGGCATCACATACTATCTGGATACCGTGAAGGGCAG ATTCACAATCTCTCGCGATAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTCCAGATGA ACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCTCTGTTCTATTGCGCTAGGCACCGG TCCGGCTACTTTAGCATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTCCGTCACAGT GTCCAGC	23

VL		
LC1	GACATTGTGATGACACAGTCTCCTGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGAGA CAGAGCTACCCTGAGCTGCAAGGCTTCTCAGAATGTGGTGTCTGCTGTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAAGCCCCTAGACTGCTGATCTACTCT GCTAGCAACAGATACACTGGAATCCCTGCTAGATTCTCTGGCTCTGGCTC TGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGACTTTG CTGTGTACTACTGTCAGCAGTACAGCAACTACCCTTGGACCTTTGGAGGA GGCACCAAGGTGGAGATCAAG	24
LC2	GAGATTGTGATGACACAGTCTCCTGCCACCCTGTCTGTGAGCCCTGGAGA GAGAGCTACCCTGAGCTGCAAGGCTTCTCAGAATGTGGTGTCTGCTGTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAAGCCCCTAGACTGCTGGTGTACTCT GCTAGCAACAGATACACTGGAATCCCTGACAGATTCTCTGGCTCTGGCTC TGGCACAGAGTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGACTTTG CTGTGTACTACTGTCAGCAGTACAGCAACTACCCTTGGACCTTTGGACAA GGCACCAAGCTGGAGATCAAG	25
LC3	GAGATTGTGATGACACAGTCTCCTGCCACCCTGTCTGTGAGCCCTGGAGA GAGAGCTACCCTGAGCTGCAAGGCTTCTCAGAATGTGGTGTCTGCTGTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGAGCCCTAGACTGCTGATCTACTCT GCTAGCAACAGATACACTGGAATCCCTGCTAGATTCTCTGGCTCTGGCTC TGGCACAGAGTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGACTTTG CTGCCTACTACTGTCAGCAGTACAGCAACTACCCTTGGACCTTTGGAGGA GGCACCAAGGTGGAGATCAAG	26
LC3 密码子优化的	GAAATTGTGATGACTCAGAGCCCCGCAACTCTGAGCGTGTCTCCCGGCGA GAGAGCCACCCTGTCTTGCAAGGCTTCCCAGAACGTGGTGTCTGCCGTGG CTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCAAGGCTGCTGATCTACTCC GCCAGCAATAGGTATACCGGCATCCCTGCTCGGTTCTCTGGCTCCGGCAG CGGCACAGAGTTTACCCTGACCATCTCCTCCCTCCAGAGCGAGGACTTCG CCGCTTACTATTGCCAGCAGTACTCTAACTATCCTTGGACCTTTGGCGGC GGCACAAAGGTGGAGATCAAG	27
LC4	GACATTCAGATGACACAGTCTCCTTTCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGA CAGAGTGACCATCACCTGCAAGGCTTCTCAGAATGTGGTGTCTGCTGTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACTCT GCTAGCAACAGATACACTGGAGTGCCTAGCAGATTCTCTGGCTCTGGCTC TGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTG CCACCTACTTCTGTCAGCAGTACAGCAACTACCCTTGGACCTTTGGAGGA GGCACCAAGCTGGAGATCAAG	28
LC5	GCCATTCAGCTGACACAGTCTCAGAGATTCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGA CAGAGTGACCATCACCTGCAGAGCTTCTCAGAATGTGGTGTCTGCTCTGG	29

	CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCT GCTAGCAACAGATACACTGGAGTGCCTAGCAGATTCTCTGGCTCTGGCTC TGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTTG CTGACTTCTTCTGTCAGCAGTACAGCAACTACCCTTGGACCTTTGGAGGA GGCACCAAGCTGGAGATCAAG	

[0259] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列包含与表3中列出的任何VH的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核苷酸序列;并且VL的核苷酸序列包含与表3中列出的任何VL的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的核苷酸序列。

[0260] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:18-23中任一个所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:24-29中任一个所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0261] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:23中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:27中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0262] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:18中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0263] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:18中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:25中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0264] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:18中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0265] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:18中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:27中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0266] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:18中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0267] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:18中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:29中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0268] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:19中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0269] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:19中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:25中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0270] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:19中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0271] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:19中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:27中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0272] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:19中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0273] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:19中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:29中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0274] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:20中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0275] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:20中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:25中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0276] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:20中所示的核苷酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列至少85%、86%、

87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0277] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:20中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:27中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0278] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:20中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0279] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:20中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:29中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0280] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0281] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:25中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0282] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0283] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:27中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0284] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0285] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:21中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:29中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0286] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:22中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或

100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0287] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:22中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:25中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0288] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:22中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0289] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:22中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:27中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0290] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:22中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0291] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:22中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:29中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0292] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:23中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:24中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0293] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:23中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:25中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0294] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:23中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:26中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0295] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:23中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:27中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0296] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:23中所示的核苷酸序列至少

85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0297] 在一些实施例中,VH的核苷酸序列与SEQ ID NO:23中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的核苷酸序列与SEQ ID NO:29中所示的核苷酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

5.2hIL-12蛋白质和多肽

[0298] hIL-12是一种多效性分泌细胞因子,由α亚基hIL-12p35和β亚基hIL-12p40构成。天然存在的hIL-12p35和hIL-12p40亚基通过二硫键连接形成具有生物活性的hIL12-p70细胞因子。参见,例如,Sun,Lin等人“Interleukin 12(IL-12)family cytokines:Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease[白介素12(IL-12)家族细胞因子:在中枢神经系统自身免疫性疾病的免疫发病机制和治疗中的作用],”Cytokine[细胞因子],75(2):249-55(2015)(下文中“Sun 2015”),其全部内容出于所有目的通过引用并入本文。hIL-12是尤其是促炎性的,并且通过与hIL-12受体(hIL-12R)结合来介导其功能。高亲和力hIL-12R是包含hIL-12Rβ1亚基和hIL-12Rβ2亚基的异二聚体。hIL-12R在多种免疫细胞(包括NK细胞、T细胞和B细胞)中以组成型或诱导型方式表达。hIL-12与例如激活的T细胞、NK细胞和DC上表达的hIL-12R结合,激活TYK2、JAK2和STAT途径。在STAT转录因子家族中,STAT4被认为是hIL-12引发的细胞应答中最特异的介质。参见,例如,Sun 2015。

[0299] 参考未成熟hIL-12p35多肽和成熟hIL-12p35多肽的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:30和31所示。参考未成熟hIL-12p40多肽和成熟hIL-12p40多肽的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:32和33所示。参考未成熟人IL-12Rβ1(hIL-12Rβ1)多肽和成熟hIL-12Rβ1多肽的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:34和35所示。参考未成熟人IL-12Rβ2(hIL-12Rβ12)多肽和成熟hIL-12Rβ2多肽的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:36和37中列出。参见本文中的表4。

表4.参考hIL-12p35、hIL-12p40、hIL-12Rβ1;和hIL-12Rβ2多肽的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
hIL-12p35（未成熟 - 信号肽下划线） UniProt ID：P29459	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLARNLPVATPDPGMFPCLHHSQN LLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACL PLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSY LNAS	30
hIL-12p35（成熟 - 无信号肽） UniProt ID：P29459	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCT SEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNG SCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKR QIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIK LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	31
hIL-12p40（未成熟 - 信号肽下划线） UniProt ID：P29460	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPG EMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAG QYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFL RCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGA ATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV HKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY PDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	32
hIL-12p40（成熟 - 无信号肽） UniProt ID：P29460	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQS SEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTD LTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDP PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWA SVPCS	33
hIL-12Rβ1（未成熟 - 信号肽下划线） UniProt ID：P42701	MEPLVTWVVPLLFLFLLSRQGAACRTSECCFQDPPYPDADSGS ASGPRDLRCYRISSDRYECSWQYEGPTAGVSHFLRCCLSSGRC CYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLYTVTLWVESWARNQTEKSPEV TLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLAGQLRMEWETPDNQVGAEVQF RHRTPSSPWKLGDCGPQDDDTESCLCPLEMNVAQEFQLRRRQL GSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQPQVRFSVEQLGQDGRRRLTL KEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVTYRLQLHMLSCPCKAKATRTL HLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQFGPGLNQTWHIPADTHTEPVA LNISVGTNGTTMYWPARAQSMTYCIEWQPVGQDGGLATCSLTA	34

	PQDPDPAGMATYSWSRESGAMGQEKCYYITIFASAHPEKLTLW STVLSTYHFGGNASAAGTPHHVSVKNHSLDSVSVDWAPSLLST CPGVLKEYVVRCRDEDSKQVSEHPVQPTETQVTLSGLRAGVAY TVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSIEVQVSDWLIFFASLGSFLSI LLVGVLGYLGLNRAARHLCPPLPTPCASSAIEFPGGKETWQWI NPVDFQEEASLQEALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELA LDTELSLEDGDRCKAKM	
hIL-12Rβ1 （成熟 - 无信号肽） UniProt ID：P42701	CRTSECCFQDPPYPDADSGSASGPRDLRCYRISSDRYECSWQY EGPTAGVSHFLRCCLSSGRCCYFAAGSATRLQFSDQAGVSVLY TVTLWVESWARNQTEKSPEVTLQLYNSVKYEPPLGDIKVSKLA GQLRMEWETPDNQVGAEVQFRHRTPSSPWKLGDCGPQDDDTES CLCPLEMNVAQEFQLRRRQLGSQGSSWSKWSSPVCVPPENPPQ PQVRFSVEQLGQDGRRRLTLKEQPTQLELPEGCQGLAPGTEVT YRLQLHMLSCPCKAKATRTLHLGKMPYLSGAAYNVAVISSNQF GPGLNQTWHIPADTHTEPVALNISVGTNGTTMYWPARAQSMTY CIEWQPVGQDGGLATCSLTAPQDPDPAGMATYSWSRESGAMGQ EKCYYITIFASAHPEKLTLWSTVLSTYHFGGNASAAGTPHHVS VKNHSLDSVSVDWAPSLLSTCPGVLKEYVVRCRDEDSKQVSEH PVQPTETQVTLSGLRAGVAYTVQVRADTAWLRGVWSQPQRFSI EVQVSDWLIFFASLGSFLSILLVGVLGYLGLNRAARHLCPPLP TPCASSAIEFPGGKETWQWINPVDFQEEASLQEALVVEMSWDK GERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSLEDGDRCKAKM	35
hIL-12Rβ2 （未成熟 - 信号肽下划线） UniProt ID：Q99665	MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILL GSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLN SQVTGLPLGTTLFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQN LSCIQKGEQGTVACTWERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQ CKDIYCDYLDFGINLTPESPESNFTAKVTAVNSLGSSSSLPST FTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCTLYWRDEGLVLLNRLR YRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTEYEFQISSKLHLY KGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHIDYSRQQISLF WKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQNITGHTSWTTVI PRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVSAN SEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLNW LRSRPYNVSALISENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNS KHKAPLSGPHINAITEEKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIY WKERDSNSQPQLCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALT AAGESSHGNEREFCLQGKANWMAFVAPSICIAIIMVGIFSTHY FQQKVFVLLAALRPQWCSREIPDPANSTCAKKYPIAEEKTQLP	36

	LDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPCSNWPQREK GIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQAESRQLVDLYKVLESRG SDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLAD SLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSL ML	
hIL-12Rβ2 （成熟 - 无信号肽） UniProt ID：Q99665	KIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNITCSLKPRQGCFHYSRRN KLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTTLFVCKLACINSD EIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTWERGRDTH LYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPESN FTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKAS VSRCTLYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDL LDLKPFTEYEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGM LDVWYMKRHIDYSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQEL TGGKAMTQNITGHTSWTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTR INIMNLCEAGLLAPRQVSANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQE YVVEWRELHPGGDTQVPLNWLRSRPYNVSALISENIKSYICYE IRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPLSGPHINAITEEKGSILI SWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQLCEIPYRVSQNS HPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCLQGKANWMA FVAPSICIAIIMVGIFSTHYFQQKVFVLLAALRPQWCSREIPD PANSTCAKKYPIAEEKTQLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVL HQVTPVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPR ALQAESRQLVDLYKVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTH DGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPL TFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	37

5.2.1 hIL-12p40蛋白质和多肽

[0300] 一方面,本文提供与参考hIL-12p40多肽(例如SEQ ID NO:33)相比具有减弱活性的hIL-12p40多肽。如本文所述,本文所述的任何hIL-12p40多肽可以是分离的和/或重组的。在一些实施例中,hIL-12p40多肽特异性结合hIL-12R。在一些实施例中,hIL-12p40多肽特异性结合hIL-12Rβ1(另参见,§5.2.3)。在一些实施例中,hIL-12p40多肽特异性结合hIL-12Rβ2(另参见,§5.2.2)。

[0301] 如上所述,为了本披露的目的,本文所述的hIL-12p40多肽的所有氨基酸(和例如氨基酸取代)的编号是相对于含有天然信号肽的hIL-12p40的未成熟形式的氨基酸序列(即SEQ ID NO:32)来列出的。使用hIL-12p40的未成熟形式来指定氨基酸编号(例如W37)只是为了一致性,并且并不将利用该编号方案的实施例的范围限制为含有hIL-12p40的信号肽的多肽。例如,本文所述的包含具有W37A氨基酸取代的SEQ ID NO:33的氨基酸序列的hIL-12p40多肽不需要hIL-12p40的信号肽,尽管氨基酸位置W37的编号是基于蛋白质的未成熟形式。本领域通常利用蛋白质的成熟形式来产生变体和融合蛋白。

[0302] 基于相对于hIL-12p40的未成熟形式的氨基酸编号,本领域普通技术人员可以容易地确定hIL-12p40的成熟形式(SEQ ID NO:33)中的氨基酸位置。如上所述,hIL-12p40蛋

白的未成熟形式的氨基酸1-22是信号序列(下划线)。因此,hIL-12p40蛋白的成熟形式中的特定氨基酸的氨基酸位置可以通过相对于hIL-12p40的未成熟形式指定的特定氨基酸的氨基酸位置减去22来确定。例如,氨基酸位置W37(相对于SEQ ID NO:32编号)将对应于成熟形式的蛋白质(SEQ ID NO:33)中的氨基酸位置W15。

[0303] 一方面,本文提供hIL-12p40多肽,其包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%有94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)在以下氨基酸位置的每个处包含氨基酸修饰(例如取代、添加、缺失(例如取代)或由所述氨基酸修饰组成:(i)W37、F82和K219;(ii)W37、F82、和K217;(iii)K106、K217、和K219;(iv)W37和F82;(v)W37和K217;(vi)W37和K219;(vii)W37和K106;(viii)F82和K106;(xiv)F82和K217;(xv)F82和K219;(xvi)K217和K219;(xvii)K106和K217;或(xviii)K106和K219,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0304] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)在以下氨基酸位置的每个处包含氨基酸取代或由氨基酸取代组成:(i)W37、F82和K219;(ii)W37、F82、和K217;(iii)K106、K217、和K219;(iv)W37和F82;(v)W37和K217;(vi)W37和K219;(vii)W37和K106;(viii)F82和K106;(xiv)F82和K217;(xv)F82和K219;(xvi)K217和K219;(xvii)K106和K217;或(xviii)K106和K219,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施例中,每个氨基酸取代是用丙氨酸替换天然氨基酸残基。

[0305] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下氨基酸取代中的每一个或由以下氨基酸取代中的每一个组成:(i)W37A、F82A和K219A;(ii)W37A、F82A、和K217A;(iii)K106A、K217A、和K219A;(iv)W37A和F82A;(v)W37A和K217A;(vi)W37A和K219A;(vii)W37A和K106A;(viii)F82A和K106A;(xiv)F82A和K217A;(xv)F82A和K219A;(xvi)K217A和K219A;(xvii)K106A和K217A;或(xviii)K106A和K219A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0306] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:在氨基酸位置(i)W37、F82和K219中的每一个处的氨基酸修饰(例如取代),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0307] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代(i)W37A、F82A和K219A中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0308] 表5中提供了本文所述的示例性hIL-12p40多肽的氨基酸序列。

表5.示例性hIL-12p40多肽的氨基酸序列

说明	SEQ ID NO	氨基酸序列
hIL-12p40 变体O （成熟 - 无信号肽） （W37A/F82A/K219A）	38	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSF

		FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 N （成熟 - 无信号肽） （W37A/F82A/K217A）	39	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 P （成熟 - 无信号肽） （K106A/K217A/K219A ）	40	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALAYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 T （成熟 - 无信号肽） （W37A/F82A）	41	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 U （成熟 - 无信号肽） （W37A/K217A）	42	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 V	43	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL

（成熟 - 无信号肽） （W37A/K219A）		TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 W （成熟 - 无信号肽） （W37A/K106A）	44	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 X （成熟 - 无信号肽） （F82A/K106A）	45	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 Y （成熟 - 无信号肽） （F82A/K217A）	46	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 Z （成熟 - 无信号肽） （F82A/K219A）	47	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS

hIL-12p40 变体 AA （成熟 - 无信号肽） （K217A/K219A）	48	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALAYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 BB （成熟 - 无信号肽） （K106A/K217A）	49	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 CC （成熟 - 无信号肽） （K106A/K219A）	50	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSF FIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSY FSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR AQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 H （成熟 - 无信号肽） （K217 + L218 取代为 I）	51	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKE YEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHIKYENYTSSFF IRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYF SLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRA QDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 O （未成熟 - 信号肽下划线） （W37A/F82A/K219A）	52	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDAYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEA GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL

		KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 N （未成熟 - 信号肽下划线） （W37A/F82A/K217A）	53	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDAYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEA GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 P （未成熟 - 信号肽下划线） （K106A/K217A/K219A）	54	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHALAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 T （未成熟 - 信号肽下划线） （W37A/F82A）	55	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDAYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEA GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 U （未成熟 - 信号肽下划线） （W37A/K217A）	56	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDAYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 V	57	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDAYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD

（未成熟 - 信号肽下划线） （W37A/K219A）		PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 W （未成熟 - 信号肽下划线） （W37A/K106A）	58	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDAYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 X （未成熟 - 信号肽下划线） （F82A/K106A）	59	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEA GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 Y （未成熟 - 信号肽下划线） （F82A/K217A）	60	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEA GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 Z （未成熟 - 信号肽下划线） （F82A/K219A）	61	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEA GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40	62	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF

变体 AA （未成熟 - 信号肽下划线） （K217A/K219A）		GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHALAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 BB （未成熟 - 信号肽下划线） （K106A/K217A）	63	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 CC （未成熟 - 信号肽下划线） （K106A/K219A）	64	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPL KNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 H （未成熟 - 信号肽下划线） （K217 + L218 取代为 I）	65	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDA PGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEP KNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEES LPIEVMVDAVHIKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLK NSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

[0309] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表5中列出的多肽的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38-65中任一个所示的氨基酸序列或。在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列。

[0310] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表5中所示任一多肽的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表5中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0311] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:38-65的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列);

并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-65中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0312] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38的氨基酸序列中所示的氨基酸取代组(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列);并且除了所述氨基酸取代组之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

5.2.2hIL-12p40蛋白质和多肽的效力和亲和力

[0313] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中STAT4水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的STAT4的增加更低。在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加更低。

[0314] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加低约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加低至少约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0315] 适合测量本文所述hIL-12p40多肽的EC50的测定法是标准的并且是本领域普通技术人员已知的。例如,EC50可以通过构建剂量-应答曲线并检查不同浓度的hIL-12p40蛋白或多肽在特定功能测定中诱导活性的效果来确定(例如,STAT4信号传导、STAT4磷酸化、STAT4诱导型SEAP表达(参见例如实例4))。§6.4描述了利用hIL-12HEKBlue报告细胞系(InvivoGen#hkb-IL12)测定本文所述的hIL-12p40多肽或蛋白(包括本文所述的hIL-12融合蛋白)的EC50的示例性方法。hIL-12HEKBlue报告细胞系表达hIL-12Rβ1和hIL-12Rβ2亚基、人STAT4和STAT4诱导型SEAP(分泌型胚胎碱性磷酸酶)报告子。因此,蛋白质与hIL-12R的结合触发JAK2/STAT4信号传导和随后SEAP的产生,其可以使用本领域已知的标准方法进行定量。另外例如,磷酸化STAT4的水平可以通过将表达hIL-12R的细胞与本文所述的一种或多种浓度的hIL-12p40蛋白或多肽接触、裂解细胞并评估磷酸化STAT4的水平来评估,例如,通过ELISA、蛋白质印迹、基于FRET的测定或化学发光测定(例如,基于ELISA的测定)。基于细胞的测定中的细胞可以是重组表达hIL-12R和/或人STAT4的细胞,例如HEK293细胞;或天然表达hIL-12R和人STAT4的细胞。

[0316] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。

[0317] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在合适的对照(例如参考hIL-12p40蛋白(例如参考hIL-12p40蛋白(例如SEQ ID NO:33))存在下产生的IFN-γ水平的增加低0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

[0318] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的由在表面上表达hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在合适的对照(例如参考hIL-12p40蛋白(例如SEQ ID NO:33)存在下产生的IFN-γ水平的增加低至少约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

[0319] 在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的由在表面上表达hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p40蛋白(例如,SEQ ID NO:33))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0320] 适合测量培养细胞产生的蛋白质(例如IFN-γ)水平的测定是标准的并且是本领域普通技术人员已知的。例如,可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA)测定IFN-γ的水平(参见例如实例5))。§6.5描述了测定用本文所述的hIL-12p40蛋白或参考hIL-12p40蛋白处理的培养细胞产生的IFN-γ水平的示例性方法。

[0321] 在一些实施例中,与参考hIL-12p40蛋白(例如参考hIL-12p40蛋白(例如SEQ ID NO:33))相比,hIL-12p40蛋白以较低的亲和力与hIL-12Rβ1结合。结合亲和力可以通过本领域已知的标准测定来测量。例如,结合亲和力可以通过表面等离振子共振(SPR)(例如,基于BIAcore®的测定)来测量,这是本领域已知的常用方法(参见例如Wilson,Science[科学]295:2103,2002;Wolff等人,Cancer Res.[癌症研究]55:2560,1993;以及美国专利号5,283,173、No.5,468,614,出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文)。SPR测量当分子与表面结合或解离时传感器表面分子浓度的变化。SPR信号的变化直接与表面附近质量浓度的变化成比例,从而可以测量两个分子(例如蛋白质)之间的结合动力学。当缓冲液通过芯片时,通过监测折射率相对于时间的变化,可以确定复合物的解离常数。

[0322] 用于测量一种蛋白质与另一种蛋白质的结合(例如本文所述的蛋白质与hIL-12Rβ1的结合)的其他合适的测定法包括例如免疫测定,如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA),或通过荧光、UV吸收、圆二色性或核磁共振(NMR)监测蛋白质光谱或光学性质的变化来确定结合。其他示例性测定包括但不限于蛋白质印迹、分析型超速离心、光谱学、流式细胞术、测序和用于检测蛋白质结合的其他方法。

5.2.3hIL-12p35蛋白质和多肽

[0323] 一方面,本文提供与参考hIL-12p35多肽(例如SEQ ID NO:31)相比具有减弱活性的hIL-12p35多肽。如本文所述,本文所述的任何hIL-12p35多肽可以是分离的和/或重组的。在一些实施例中,hIL-12p35多肽特异性结合hIL-12R。在一些实施例中,hIL-12p35多肽特异性结合hIL-12Rβ1(另参见,§5.2.3)。在一些实施例中,hIL-12p35多肽特异性结合hIL-

12Rβ2(另参见,§5.2.3)。

[0324] 如上所述,为了本披露的目的,本文所述的hIL-12p35多肽的所有氨基酸(和例如氨基酸取代)的编号是相对于含有天然信号肽的hIL-12p35的未成熟形式的氨基酸序列(即SEQ ID NO:30)来列出的。使用hIL-12p35的未成熟形式来指定氨基酸编号(例如Y189)只是为了一致性,并且并不将利用该编号方案的实施例的范围限制为含有hIL-12p35的信号肽的多肽。例如,本文所述的包含具有Y189A氨基酸取代的SEQ ID NO:31的氨基酸序列的hIL-12p35多肽不需要hIL-12p35的信号肽,尽管氨基酸位置Y189的编号是基于蛋白质的未成熟形式。本领域通常利用蛋白质的成熟形式来产生变体和融合蛋白。

[0325] 基于相对于hIL-12p35的未成熟形式的氨基酸编号,本领域普通技术人员可以容易地确定hIL-12p35的成熟形式(SEQ ID NO:31)中的氨基酸位置。如上所述,hIL-12p35蛋白的未成熟形式的氨基酸1-22是信号序列。因此,hIL-12p35蛋白的成熟形式中的特定氨基酸的氨基酸位置可以通过相对于hIL-12p35的未成熟形式指定的特定氨基酸的氨基酸位置减去22来确定。例如,氨基酸位置Y189(相对于SEQ ID NO:30编号)将对应于成熟形式的蛋白质(SEQ ID NO:31)中的氨基酸位置Y167。

[0326] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;以及(b)包含以下或由以下组成:一个或多个以下氨基酸位置E60、F61、P63、K150、F188、Y189A处的氨基酸修饰(例如,取代、添加、缺失(例如,取代)),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0327] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:在以下氨基酸位置的每个处的氨基酸修饰(例如,取代、添加、缺失(例如,取代)):(i)F188;(ii)Y189;(iii)F188和Y189;或(iv)E60、F61、P63、K150和F188,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0328] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下氨基酸取代中的一个或多个或由其组成:E60K、F61H、P63S、K150H、F188P、F188A和/或Y189A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0329] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下氨基酸取代中的每一个或由其组成:(i)F188A;(ii)Y189A;(iii)F188A和Y189A;或(iv)E60K、F61H、P63S、K150H和F188P,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0330] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含

以下或由以下组成:氨基酸A55-K92、N50-K92、M51-K92、L52-K92、Q53-K92、K54-K92、N50-N93、M51-N93、L52-N93、Q53-N93、K54-N93、N50-E94、M51-E94、L52-E94、Q53-E94、K54-E94、N50-S95、M51-S95、L52-S95、Q53-S95、K54-S95、N50-C96、M51-C96、L52-C96、Q53-C96、K54-C96、N50-L97、M51-L97、L52-L97、Q53-L97、K54-L97、N50-P87、M51-P87、L52-P87、Q53-P87、K54-P87、N50-L88、M51-L88、L52-L88、Q53-L88、K54-L88、N50-E89、M51-E89、L52-E89、Q53-E89、K54-E89、N50-L90、M51-L90、L52-L90、Q53-L90、K54-L90、N50-T91、M51-T91、L52-T91、Q53-T91、K54-T91、R56-K92、Q57-K92、T58-K92、L59-K92、E60-K92 A55-N93、R56-N93、Q57-N93、T58-N93、L59-N93、E60-N93、A55-E94、R56-E94、Q57-E94、T58-E94、L59-E94、E60-E94、A55-S95、R56-S95、Q57-S95、T58-S95、L59-S95、E60-S95、A55-C96、R56-C96、Q57-C96、T58-C96、L59-C96、E60-C96、A55-L97、R56-L97、Q57-L97、T58-L97、L59-L97、E60-L97、A55-P87、R56-P87、Q57-P87、T58-P87、L59-P87、E60-P87、A55-L88、R56-L88、Q57-L88、T58-L88、L59-L88、E60-L88、A55-E89、R56-E89、Q57-E89、T58-E89、L59-E89、E60-E89、A55-L90、R56-L90、Q57-L90、T58-L90、L59-L90、E60-L90、A55-T91、R56-T91、Q57-T91、T58-T91、L59-T91或E60-T91(氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列)的缺失。

[0331] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下或由以下组成:氨基酸A55-K92的缺失,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列。

[0332] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸A55-K92、N50-K92、M51-K92、L52-K92、Q53-K92、K54-K92、N50-N93、M51-N93、L52-N93、Q53-N93、K54-N93、N50-E94、M51-E94、L52-E94、Q53-E94、K54-E94、N50-S95、M51-S95、L52-S95、Q53-S95、K54-S95、N50-C96、M51-C96、L52-C96、Q53-C96、K54-C96、N50-L97、M51-L97、L52-L97、Q53-L97、K54-L97、N50-P87、M51-P87、L52-P87、Q53-P87、K54-P87、N50-L88、M51-L88、L52-L88、Q53-L88、K54-L88、N50-E89、M51-E89、L52-E89、Q53-E89、K54-E89、N50-L90、M51-L90、L52-L90、Q53-L90、K54-L90、N50-T91、M51-T91、L52-T91、Q53-T91、K54-T91、R56-K92、Q57-K92、T58-K92、L59-K92、E60-K92 A55-N93、R56-N93、Q57-N93、T58-N93、L59-N93、E60-N93、A55-E94、R56-E94、Q57-E94、T58-E94、L59-E94、E60-E94、A55-S95、R56-S95、Q57-S95、T58-S95、L59-S95、E60-S95、A55-C96、R56-C96、Q57-C96、T58-C96、L59-C96、E60-C96、A55-L97、R56-L97、Q57-L97、T58-L97、L59-L97、E60-L97、A55-P87、R56-P87、Q57-P87、T58-P87、L59-P87、E60-P87、A55-L88、R56-L88、Q57-L88、T58-L88、L59-L88、E60-L88、A55-E89、R56-E89、Q57-E89、T58-E89、L59-E89、E60-E89、A55-L90、R56-L90、Q57-L90、T58-L90、L59-L90、E60-L90、A55-T91、R56-T91、Q57-T91、T58-T91、L59-T91或E60-T91(氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列)的缺失,并且除了氨基酸A55-K92、N50-K92、M51-K92、L52-K92、Q53-K92、K54-K92、N50-N93、M51-N93、L52-N93、Q53-N93、K54-N93、N50-E94、M51-E94、L52-E94、Q53-E94、K54-E94、N50-S95、M51-S95、L52-S95、Q53-S95、K54-S95、N50-C96、M51-C96、L52-C96、Q53-C96、K54-C96、N50-L97、M51-L97、L52-L97、Q53-L97、K54-L97、N50-P87、M51-P87、L52-P87、Q53-P87、K54-P87、N50-L88、M51-L88、L52-L88、Q53-L88、K54-L88、N50-E89、M51-E89、L52-E89、Q53-E89、K54-E89、N50-L90、M51-L90、L52-L90、Q53-L90、K54-L90、

N50-T91、M51-T91、L52-T91、Q53-T91、K54-T91、R56-K92、Q57-K92、T58-K92、L59-K92、E60-K92 A55-N93、R56-N93、Q57-N93、T58-N93、L59-N93、E60-N93、A55-E94、R56-E94、Q57-E94、T58-E94、L59-E94、E60-E94、A55-S95、R56-S95、Q57-S95、T58-S95、L59-S95、E60-S95、A55-C96、R56-C96、Q57-C96、T58-C96、L59-C96、E60-C96、A55-L97、R56-L97、Q57-L97、T58-L97、L59-L97、E60-L97、A55-P87、R56-P87、Q57-P87、T58-P87、L59-P87、E60-P87、A55-L88、R56-L88、Q57-L88、T58-L88、L59-L88、E60-L88、A55-E89、R56-E89、Q57-E89、T58-E89、L59-E89、E60-E89、A55-L90、R56-L90、Q57-L90、T58-L90、L59-L90、E60-L90、A55-T91、R56-T91、Q57-T91、T58-T91、L59-T91或E60-T91的缺失,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0333] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸A55-K92(氨基酸编号相对于SEQ ID NO:30的氨基酸序列)的缺失,并且除了氨基酸A55-K92的缺失,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0334] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在一个或多个氨基酸位置E60、F61、P63、K150、F188或Y189处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在以下氨基酸位置E60、F61、P63、K150、F188或Y189的1、2、3、4、5、6或7个处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。

[0335] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在一个或多个氨基酸位置E60、F61、P63、K150和F188处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在一个或多个氨基酸位置F188和Y189处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸位置F188处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸位置Y189A处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。

[0336] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代中的一个或多个:E60K、F61H、P63S、K150H、F188P、F188A或Y189A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代或由以下氨基酸取代组成:E60K、F61H、P63S、K150H和F188P,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代或由以下氨基酸取代组成:F188A和Y189A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代F188A或由其组成,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代Y189A或由其组成,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0337] 在一些实施例中,hIL12-p35多肽的氨基酸序列包含氨基酸残基50-95、50-94、50-93、50-92、50-91、50-90、50-89、51-95、51-94、51-93、51-92、51-91、51-90、51-89、52-95、52-94、52-93、52-92、52-91、52-90、52-89、53-95、53-94、53-93、53-92、53-91、53-90、53-89、54-95、54-94、54-93、54-92、54-91、54-90、54-89、55-95、55-94、55-93、55-92、55-91、55-90或55-89的缺失;氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL12-p35多肽的氨基酸序列包含氨基酸残基A55-K92的缺失;氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。

[0338] 表6中提供了示例性hIL-12p35多肽的氨基酸序列。

表6.示例性hIL-12p35多肽的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
hIL-12p35 - 变体 A (ΔA55-K92)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	110
hIL-12p35 - 变体 B (E60K、F61H、P63S、K150H、F188P)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLKHYSCTS EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC LASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPHRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDPYKTKIKLCIL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	111
hIL-12p35 - 变体 C (F188A、Y189A)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTS EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC LASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDAAKTKIKLCIL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	112
hIL-12p35 - 变体 D (F188A)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTS EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC LASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDAYKTKIKLCIL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	113
hIL-12p35 - 变体 E (Y189A)	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTS EEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSC LASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIF LDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFAKTKIKLCIL LHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	114

[0339] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含与表6中所示的任一多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0340] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:31或110-114中

任一个的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0341] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表6中所示任一多肽的氨基酸序列中所示的一组氨基酸修饰(例如取代、缺失)(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述组的氨基酸修饰(例如取代、缺失)之外,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与表6中所示多肽的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0342] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:110-114的氨基酸序列中所示的一组氨基酸修饰(例如取代、缺失)(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述组的氨基酸修饰(例如取代、缺失)之外,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:110-114中任一个所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

5.2.4 hIL-12p35蛋白质和多肽的效力和亲和力

[0343] 在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中STAT4水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p35蛋白(例如,SEQ ID NO:31))介导的STAT4的增加更低。在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p35蛋白(例如,SEQ ID NO:30))介导的pSTAT4的增加更低。

[0344] 在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p35蛋白(例如,SEQ ID NO:30))介导的pSTAT4的增加低约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p35蛋白(例如,SEQ ID NO:30))介导的pSTAT4的增加低至少约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,当与hIL-12p35蛋白组合时,hIL-12p40蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12p35蛋白(例如,SEQ ID NO:30))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0345] 适合测量本文所述hIL-12p35多肽的EC50的测定法是标准的并且是本领域普通技术人员已知的。例如,EC50可以通过构建剂量-应答曲线并检查不同浓度的hIL-12p35蛋白或多肽在特定功能测定中诱导活性的效果来确定(例如,STAT4信号传导、STAT4磷酸化、STAT4诱导型SEAP表达(参见例如实例21))。§6.4描述了利用hIL-12HEKBlue报告细胞系(InvivoGen#hkb-IL12)测定本文所述的hIL-12p35多肽或蛋白(包括本文所述的hIL-12融合蛋白)的EC50的示例性方法。hIL-12HEKBlue报告细胞系表达hIL-12Rβ1和hIL-12Rβ2亚基、人STAT4和STAT4诱导型SEAP(分泌型胚胎碱性磷酸酶)报告子。因此,蛋白质与hIL-12R的结合触发JAK2/STAT4信号传导和随后SEAP的产生,其可以使用本领域已知的标准方法进行定量。另外例如,磷酸化STAT4的水平可以通过将表达hIL-12R的细胞与本文所述的一种

或多种浓度的hIL-12p35蛋白或多肽接触、裂解细胞并评估磷酸化STAT4的水平来评估,例如,通过ELISA、蛋白质印迹、基于FRET的测定或化学发光测定(例如,基于ELISA的测定)。基于细胞的测定中的细胞可以是重组表达hIL-12R和/或人STAT4的细胞,例如HEK293细胞;或天然表达hIL-12R和人STAT4的细胞。

[0346] 在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p35蛋白(例如,SEQ ID NO:30))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。

[0347] 在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在合适的对照(例如参考hIL-12p35蛋白(例如参考hIL-12p35蛋白(例如SEQ ID NO:30))存在下产生的IFN-γ水平的增加低0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

[0348] 在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的由在表面上表达hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在合适的对照(例如参考hIL-12p35蛋白(例如SEQ ID NO:33)存在下产生的IFN-γ水平的增加低至少约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。

[0349] 在一些实施例中,当与hIL-12p40蛋白组合时,hIL-12p35蛋白介导的由在表面上表达hIL-12R的细胞产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12p35蛋白(例如,SEQ ID NO:30))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。

[0350] 适合测量培养细胞产生的蛋白质(例如IFN-γ)水平的测定是标准的并且是本领域普通技术人员已知的。例如,可以使用酶联免疫吸附测定(ELISA)测定IFN-γ的水平(参见例如实例22-23))。§6.5描述了测定用本文所述的hIL-12p40蛋白或参考hIL-12p40蛋白处理的培养细胞产生的IFN-γ水平的示例性方法。

[0351] 在一些实施例中,与参考hIL-12p35蛋白(例如参考hIL-12p35蛋白(例如SEQ ID NO:30))相比,hIL-12p35蛋白以较低的亲和力与hIL-12Rβ1结合。结合亲和力可以通过本领域已知的标准测定来测量,参见例如§5.2.2。

5.2.5 hIL-12单链多肽和蛋白质

[0352] 一方面,本文提供了schIL-12多肽,其包含本文§5.2.1中描述的hIL-12p40多肽和/或本文§5.2.3中描述的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,其中schIL-12多肽包含本文§5.2.1中描述的hIL-12p40多肽,hIL-12p35多肽是本文第5.3.1.2节中描述的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,其中schIL-12多肽包含本文§5.2.1中描述的hIL-12p40多肽,hIL-12p35多肽是本文§5.2.3中描述的hIL-12p35多肽。

[0353] 在一些实施例中,其中schIL-12多肽包含本文§5.2.3中描述的hIL-12p35多肽,hIL-12p40多肽是本文§5.2.1中描述的hIL-12p40多肽。在一些实施例中,其中schIL-12多肽包含本文§5.2.3中描述的hIL-12p35多肽,hIL-12p40多肽是本文§5.3.1.1中描述的hIL-12p35多肽。

[0354] 在一些实施例中,schIL-12包含直接融合至hIL-12p40多肽的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p35多肽、任选的肽接头和hIL-

12p40多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p40多肽、任选的肽接头和hIL-12p35多肽。

[0355] 在一些实施例中,schIL-12多肽包含通过肽键直接可操作连接的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽包含通过肽接头间接融合至hIL-12p40多肽的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p35多肽、肽接头和hIL-12p40多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p40多肽、肽接头和hIL-12p35多肽。

[0356] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽和hIL-12p35多肽通过肽接头可操作地连接。在一些实施例中,肽接头具有足够的长度,使得hIL-12p35多肽和hIL-12p40多肽能够相关联,使得schIL-12能够结合hIL-12受体。在一些实施例中,肽接头包含约5-30、5-25、5-20、5-15、10-30、10-25、10-20或10-15个氨基酸。在一些实施例中,肽接头包含以下或由以下组成:甘氨酸(G)和丝氨酸(S)氨基酸残基。

[0357] 表7中提供了用于schIL-12多肽(以将hIL-12p35多肽可操作地连接至schIL-12多肽的hIL-12p40多肽)的示例性接头的氨基酸序列。

表7.示例性肽接头的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
接头 A	GGGS	66
接头 B	GGGSGGGS	67
接头 C	GGGSGGGSGGGS	68
接头 D	GGGSGGGSGGGSGGGS	69
接头 E	GGGGS	70
接头 F	GGGGSGGGGS	71
接头 G	GGGGSGGGGSGGGGS	72
接头 H	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	73
接头 I	GGGGGGGS	74
接头 J	GGGGGGGSGGGGGGGS	75
接头 K	GGGGGGGSGGGGGGGSGGGGGGGS	76
接头 L	GGGGGGGSGGGGGGGSGGGGGGGSGGGGGGGS	77
接头 M	SGGGG	78
接头 N	SGGGGSGGGG	79
接头 O	SGGGGSGGGGSGGGG	80
接头 P	SGGGGSGGGGSGGGGSGGGG	81
接头 EE	GGGGGGS	369

[0358] 在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含表7中列出的任何肽接头的氨基酸序列;或表7中列出的任何肽接头包含1、2或3个氨基酸修饰(例如取代、缺失或添加)的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头包含SEQ ID NO:66-81或369中任一个的氨基酸序列,或SEQ

ID NO:66-81或369中任一个的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如取代、缺失或添加)的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头包含SEQ ID NO:72中任一个的氨基酸序列,或SEQ ID NO:72中任一个的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如取代、缺失或添加)的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头包含SEQ ID NO:369中任一个的氨基酸序列,或SEQ ID NO:369中任一个的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如取代、缺失或添加)的氨基酸序列。

5.2.6信号肽

[0359] 在一些实施例中,hIL-12p40和/或hIL-12p35多肽包含可操作地连接至hIL-12p40和/或hIL-12p35多肽的N末端的同源或异源信号肽。

[0360] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:38-65中任一个所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的同源信号肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:38-65中任一个所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的异源信号肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的同源信号肽。在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的异源信号肽。

[0361] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽包含SEQ ID NO:110-114中任一个所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的同源信号肽。在一些实施例中,hIL-12p35多肽包含SEQ ID NO:110-114中任一个所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的异源信号肽。在一些实施例中,hIL-12p35多肽包含SEQ ID NO:110中所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的同源信号肽。在一些实施例中,hIL-12p35多肽包含SEQ ID NO:110中所示的氨基酸序列并且包含可操作地连接至所述多肽的N末端的异源信号肽。

[0362] 常用的信号肽是本领域已知的,例如人白介素2(hIL-2)、人制瘤素M(hOSM)、人胰凝乳蛋白酶原(hCTRB1)、人胰蛋白酶原2(hTRY2)和人胰岛素(hINS)的天然信号肽。普通技术人员可以使用本领域已知的标准方法确定合适的信号肽。示例性信号肽的氨基酸序列提供于表8中;连同hIL-12p40的天然信号序列。

表8.示例性信号肽的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
hIL-12p40	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA	82
hIL-12p35	MCPARSLLLVATLVLLDHLSLA	394
hIL-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNS	83
hOSM	MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASM	84
hCTRB1	MASLWLLSCFSLVGAAFG	85
hTRY2	MNLLLILTFVAAAVA	86
hINS	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA	87

[0363] 在一些实施例中,信号肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表8中列出的任一信号肽的氨基酸序列。在一些实施例中,信号肽的氨基酸序列包含表8中列出的任一信号肽的氨基酸序列或由其组成,并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,信号肽的氨基酸序列

包含以下或由以下组成:表8中列出的任一信号肽的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。

[0364] 在一些实施例中,信号肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:82-87或394中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,信号肽的氨基酸序列包含SEQ ID NO:82-87或394中任一个的氨基酸序列或由其组成,并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,信号肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:82-87或394中任一个的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。

5.3 hIL-12融合蛋白和缀合物

[0365] 一方面,本文提供了包含hIL-12和异源部分(例如抗体(例如全长抗体)、Fc区等)的融合蛋白。在一些实施例中,融合蛋白包含抗体和hIL-12(参见例如§5.3.3)。在一些实施例中,融合蛋白包含Fc区和hIL-12(参见例如§5.3.2)。

[0366] 在一些实施例中,融合蛋白包含半衰期延长部分。示例性半衰期延长部分包括但不限于人免疫球蛋白(hIg)、hIg片段、hIg恒定区、hIg恒定区片段、Fc区、人转铁蛋白、人血清白蛋白(HSA)、HSA结合蛋白或肽、以及聚乙二醇(PEG)(及其聚合物)。在一些实施例中,融合蛋白包含半衰期延长多肽。示例性半衰期延长多肽包括但不限于hIg、hIg片段、一个或多个hIg重链恒定区、hIg恒定区片段、hIg Fc区、人转铁蛋白、人血清白蛋白(HSA)和HSA结合蛋白或肽。可以利用本领域已知的标准体外方法评估与半衰期延长部分融合或缀合的hIL-12多肽的药代动力学特性。

5.3.1 hIL-12蛋白质和多肽

[0367] 如上所述,本文所述的融合蛋白包含hIL-12蛋白。在一些实施例中,hIL-12蛋白的至少一个亚基(例如hIL-12p40或hIL-12p35)的氨基酸序列包含以下或由以下组成:天然存在的亚基(例如,hIL-12p40或hIL-12p35)的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35亚基的氨基酸序列包含以下或由以下组成:天然存在的hIL-12p35蛋白的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:31)。在一些实施例中,hIL-12蛋白的IL-12p40的氨基酸序列包含以下或由以下组成:天然存在的hIL-12p40蛋白的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:33)。

[0368] 在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p40的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p40蛋白(例如,天然存在的hIL-12p40蛋白,例如SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35亚基的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p35蛋白(例如,天然存在的hIL-12p35蛋白,例如SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p40亚基的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p40蛋白(例如,天然存在的hIL-12p40蛋白,例如SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰;并且hIL-12蛋白的hIL-12p35亚基的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p35蛋白(例如,天然存在的hIL-12p35蛋白,例如SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰。

[0369] 在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35亚基的氨基酸序列包含以下或由以下组成:天然存在的hIL-12p35蛋白的氨基酸序列并且hIL-12蛋白的hIL-12p40亚基的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p40蛋白(例如,天然存在的hIL-12p40蛋白,例如SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p40亚基

的氨基酸序列包含以下或由以下组成:天然存在的hIL-12p40蛋白的氨基酸序列并且hIL-12蛋白的hIL-12p35亚基的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p35蛋白(例如,天然存在的hIL-12p35,例如SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰。

5.3.1.1 hIL-12p40亚基

[0370] 如上所述,本文所述的融合蛋白和多肽包含hIL-12蛋白,其包含hIL-12p40亚基。

[0371] 在一些实施例中,hIL-12蛋白的IL-12p40的氨基酸序列包含以下或由以下组成:天然存在的hIL-12p40蛋白的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:33)。在一些实施例中,hIL-12蛋白的IL-12p40的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p40亚基的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p40蛋白(例如,天然存在的hIL-12p40蛋白,例如SEQ ID NO:33)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰。

[0372] 在一些实施例中,hIL-12p40亚基是本文中描述的hIL-12p40多肽,参见例如§5.2(例如§§5.2.1、5.2.2、5.2.5和5.2.6)。§5.2(例如,§§5.2.1、5.2.2、5.2.5和5.2.6)的完整披露内容通过引用并入本案§[00369]中。§5.2中提供的任何hIL-12p40多肽和实施例可以掺入本文所述的融合蛋白(例如抗体(例如抗CAIX抗体)融合蛋白)中。在一些实施例中,hIL-12p40亚基是§5.2(例如,§§5.2.1、5.2.2、5.2.5和5.2.6)中描述的hIL-12p40多肽。

[0373] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含在以下氨基酸位置的每个处的氨基酸取代或由所述氨基酸取代组成:(i)K280、K282、R283、K285、K286和R288;(ii)E81、K121、和K286;(iii)S205、L206、P207、I208、E209、和V210;(iv)S205、L206、P207、I208、E209、和V210;(v)S205、L206、P207、I208、E209、和V210;(vi)K217、L218、K219、Y220、和E221;(vii)E81和F82;(viii)E81、F82、和K106;(xiv)E81、F82、K106、和K217;(xv)P39、D40、E81、和F82;(xvi)W37、F82、和K217;(xvii)W37、F82、和K219;或(xviii)K106、K217和K219;(xxix)W37、F82、K106、和K219;(xxx)H216、K217、和K219;(xxxi)P207;W37和F82;(xxxii)W37和K217;(xxxiii)W37和K219;(xxxiv)W37和K106;(xxxv)F82和K106;(xxxvi)F82和K217;(xxxvii)F82和K219;(xxxviii)K217和K219;(xxxix)K106和K217;(xl)K106和K219;(xli)W37;(xlii)F82;(xliii)K106;(xliv)K217;或(xlv)K219;氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0374] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列(a)与SEQ ID NO:33的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同;并且(b)包含以下氨基酸取代或由其组成:(i)K280A、K282A、R283A、K285A、K286A、和R288A;(ii)E81K、K121E、和K286E;(iii)S205I、L184E、P207S、I208I、E209K、和V210S;(iv)S205I、L206V、P207S、I208I、E209K、V210I;(v)S205I、L206Q、P207S、I208I、E209K、V210G;(vi)K217S、L218I、K219T、Y220S、E221A;(vii)E81A和F82A;(viii)E81A、F82A、K106A;(xiv)E81A、F82A、K106A、和K217A;(xv)P39A、D40A、E81A、和F82A;(xvi)W37A、F82A、和K217A;(xvii)W37A、F82A、和K219A;(xviii)K106A、K217A、和K219A;(xxix)W37A、F82A、K106A、和K219A;(xxx)H216A、K217A、和K219A;(xxxi)P207S;W37A和F82A;(xxxii)W37和K217A;(xxxiii)W37A和K219A;(xxxiv)W37A和K106A;(xxxv)F82A和K106A;(xxxvi)F82A和K217A;(xxxvii)F82A和K219A;(xxxviii)K217A

和K219A;(xxxix)K106A和K217A;(xl)K106A和K219A;(xli)W37A;(xlii)F82A;(xliii)K106A;(xliv)K217A;或(xlv)K219A;氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0375] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,并且还包含氨基酸残基23-127的缺失,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0376] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,并且还包含氨基酸残基208-328的缺失以及在以下氨基酸位置S205、L206、P207中的每一个处的氨基酸取代,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,并且还包含氨基酸残基208-328的缺失以及以下氨基酸取代S205I、L206E、P207S中的每一个,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0377] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,并且还包含氨基酸K217和L218被取代为I,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0378] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含经修饰的肝素结合结构域。在一些实施例中,与肝素结合结构域中不含修饰的参考hIL-12p40多肽相比,hIL-12p40多肽包含破坏、抑制或降低hIL-12p40多肽结合肝素化合物的能力的经修饰的肝素结合。在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含经修饰的肝素结合结构域,并且表现出与肝素结合结构域中不包含修饰的参考hIL-12p40多肽基本上相同、更多或更少的免疫刺激活性。在一些实施例中,hIL-12p40多肽包含经修饰的肝素结合结构域,并且表现出与肝素结合结构域中不包含修饰的参考hIL-12p40多肽基本上相同的免疫刺激活性。

[0379] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的未修饰的肝素结合结构域包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:88的以下氨基酸序列。在一些实施例中,经修饰的肝素结合结构域包含以下或基本上由以下组成或由以下组成:SEQ ID NO:89的氨基酸序列。

[0380] 表9中提供了hIL-12p40参考肝素结合结构域及其变体的氨基酸序列。

表9.hIL-12p40肝素结合结构域及其变体

说明	氨基酸序列		SEQ ID NO
参考的未修饰的肝素结合域	VQVQGKSKREKK		88
经修饰的肝素结合域	VX1X2QX3K*X4X5X6X7K*X8	其中 X1 是 R 或 Q， X2 是 V、A 或 I， X3 是 G 或 R*， X4 是 S、N 或 K*， X5 是 K*、N 或 E， X6 是 R 或 K， X7 是 E、M 或 T，并且 X8 是 K*或 E，并且 其中用“*”指定的一个或多个氨基酸残基被选自由 A、G、I、L、M、F、P 和 V 组成的组的非极性氨基酸残基取代	89

[0381] 在一些实施例中,SEQ ID NO:89中用“*”指定的一个或多个氨基酸残基是丙氨酸。在一些实施例中,SEQ ID NO:89中用“*”指定的每个氨基酸残基是丙氨酸。在一些实施例中,氨基酸残基X3是丙氨酸。

[0382] 具有经修饰的肝素结合结构域的示例性hIL-12p40多肽描述于US 8617557中,其全部内容出于所有目的通过引用并入本文。

[0383] 表10中提供了可掺入本文所述融合蛋白中的示例性hIL-12p40多肽的氨基酸序列。

表10.示例性hIL-12p40多肽的氨基酸序列

说明	SEQ ID NO	氨基酸序列
hIL-12p40（成熟–无信号肽）	33	参见表 4。

hIL-12p40 变体 A （K280A、K282A、 R283A、K285A、 K286A、R288A）	90	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGASAAEAA DAVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 B （Δ23-127）	91	FLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV HKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 C （Δ208-328；S205I、 L206E、P207S）	92	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEEIES
hIL-12p40 变体 D （E81K、K121E、 K286E）	93	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKKFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQEEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKE DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 E （S205I、L206E、 P207S、I208I、E209K、 V210S）	94	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEEIESIKSMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 F （S205I、L206V、 P207S、I208I、E209K、 V210I）	95	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEEIVSIKIMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

hIL-12p40 变体 G （S205I、L206Q、P207S、I208I、E209K、V210G）	96	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEEIQSIKGMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 H （成熟 - 无信号肽） （K217 + L218 取代为 I）	51	*参见表 5。*
hIL-12p40 变体 I （K217S、L218I、K219T、Y220S、E221A）	97	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHSITSANYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 J （E81A、F82A）	98	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 K （E81A、F82A、K106A）	99	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 L	100	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF

（E81A、F82A、K106A、K217A）		SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 M （P39A、D40A、E81A、F82A）	101	IWELKKDVYVVELDWYAAAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 N （W37A/F82A/K217A）	39	参见表 5。
hIL-12p40 变体 O （W37A/F82A/K219A）	38	参见表 5。
hIL-12p40 变体 P （K106A/K217A/K219A）	40	参见表 5。
hIL-12p40 变体 Q （W37A、F82A、K106A、K219A）	102	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 R （H216A、K217A、K219A）	103	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVAALAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

hIL-12p40 变体 S （P207S）	104	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLSIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 T （W37A/F82A）	41	参见表 5。
hIL-12p40 变体 U （W37A/K217A）	42	参见表 5。
hIL-12p40 变体 V （W37A/K219A）	43	参见表 5。
hIL-12p40 变体 W （W37A/K106A）	44	参见表 5。
hIL-12p40 变体 X （F82A/K106A）	45	参见表 5。
hIL-12p40 变体 Y （F82A/K217A）	46	参见表 5。
hIL-12p40 变体 Z （F82A/K219A）	47	参见表 5。
hIL-12p40 变体 AA （K217A/K219A）	48	参见表 5。
hIL-12p40 变体 BB （K106A/K217A）	49	参见表 5。
hIL-12p40	50	参见表 5。

变体 CC （K106A/K219A）		
hIL-12p40 变体 DD （W37A）	105	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 EE （F82A）	106	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 FF （K106A）	107	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 GG （K217A）	108	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 HH （K219A）	109	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSA CPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQ LKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS

[0384] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含与表10中所示的任一多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0385] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:38-51或90-109

中任一个的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0386] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表10中所示任一多肽的氨基酸序列中所示的一组氨基酸修饰(例如取代、缺失)(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列);并且除了所述组的氨基酸修饰(例如取代、缺失)之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与表10中所示多肽的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0387] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38-51或90-109中任一个所示的氨基酸序列中所示的一组氨基酸修饰(例如取代、缺失)(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列);并且除了所述组的氨基酸修饰(例如取代、缺失)之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-51或90-109中任一个所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0388] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列中所示的一组氨基酸修饰(例如取代、缺失)(相对于SEQ ID NO:33的氨基酸序列);并且除了所述组的氨基酸修饰(例如取代、缺失)之外,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

5.3.1.2 hIL-12p35亚基

[0389] 如上所述,本文所述的融合蛋白和多肽包含hIL-12蛋白,其包含hIL-12p35亚基。

[0390] 在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35亚基的氨基酸序列包含以下或由以下组成:天然存在的hIL-12p35蛋白的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:31)。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35亚基的氨基酸序列包含相对于参考hIL-12p35蛋白(例如,天然存在的hIL-12p35蛋白,例如SEQ ID NO:31)的氨基酸序列的至少一个氨基酸修饰。

[0391] 在一些实施例中,hIL-12p35亚基是本文中描述的hIL-12p35多肽,参见例如§5.2(例如§§5.2.3、5.2.4、5.2.5和5.2.6)。§5.2(例如,§§5.2.3、5.2.4、5.2.5和5.2.6)的完整披露内容通过引用并入本案§5.3.1.2中。§5.2(例如§§5.2.3、5.2.4、5.2.5和5.2.6)中提供的任何hIL-12p35多肽和实施例可以掺入本文所述的融合蛋白(例如抗体(例如抗CAIX抗体)融合蛋白)中。在一些实施例中,hIL-12p35亚基是§5.2(例如,§§5.2.3、5.2.4、5.2.5和5.2.6)中描述的hIL-12p35多肽。

[0392] 在一些实施例中,至少一个氨基酸修饰降低hIL-12p35亚基对hIL-12R的结合亲和力。在一些实施例中,至少一个氨基酸修饰降低hIL-12p35亚基对hIL-12Rβ1的结合亲和力。在一些实施例中,至少一个氨基酸修饰降低hIL-12p35亚基对hIL-12Rβ2的结合亲和力。在一些实施例中,至少一个氨基酸修饰降低hIL-12p35亚基对hIL-12Rβ1和hIL-12Rβ1的结合亲和力。

[0393] 如上所述,为了本披露的目的,本文所述的hIL-12p35多肽的所有氨基酸(和例如氨基酸取代)的编号是相对于含有天然信号肽的hIL-12p35的未成熟形式的氨基酸序列(即SEQ ID NO:30)来列出的。使用hIL-12p35的未成熟形式来指定氨基酸编号(例如Y189)只是为了一致性,并且并不将利用该编号方案的实施例的范围限制为含有hIL-12p35的信号肽

的多肽。例如,本文所述的包含具有Y189A氨基酸取代的SEQ ID NO:31的氨基酸序列的hIL-12p35多肽不需要hIL-12p35的信号肽,尽管氨基酸位置Y189的编号是基于蛋白质的未成熟形式。本领域通常利用蛋白质的成熟形式来产生变体和融合蛋白。

[0394] 基于相对于hIL-12p35的未成熟形式的氨基酸编号,本领域普通技术人员可以容易地确定hIL-12p35的成熟形式(SEQ ID NO:31)中的氨基酸位置。如上所述,hIL-12p35蛋白的未成熟形式的氨基酸1-22是信号序列。因此,hIL-12p35蛋白的成熟形式中的特定氨基酸的氨基酸位置可以通过相对于hIL-12p35的未成熟形式指定的特定氨基酸的氨基酸位置减去22来确定。例如,氨基酸位置Y189(相对于SEQ ID NO:30编号)将对应于成熟形式的蛋白质(SEQ ID NO:31)中的氨基酸位置Y167。

[0395] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在一个或多个氨基酸位置E60、F61、P63、K150、F188或Y189处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在以下氨基酸位置E60、F61、P63、K150、F188或Y189的1、2、3、4、5、6或7个处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。

[0396] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在一个或多个氨基酸位置E60、F61、P63、K150和F188处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:在一个或多个氨基酸位置F188和Y189处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸位置F188处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:氨基酸位置Y189A处的氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。

[0397] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:以下氨基酸取代中的一个或多个:E60K、F61H、P63S、K150H、F188P、F188A或Y189A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代或由以下氨基酸取代组成:E60K、F61H、P63S、K150H和F188P,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代或由以下氨基酸取代组成:F188A和Y189A,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代F188A或由其组成,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下氨基酸取代Y189A或由其组成,氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0398] 在一些实施例中,hIL12-p35多肽的氨基酸序列包含氨基酸残基50-95、50-94、50-93、50-92、50-91、50-90、50-89、51-95、51-94、51-93、51-92、51-91、51-90、51-89、52-95、52-94、52-93、52-92、52-91、52-90、52-89、53-95、53-94、53-93、53-92、53-91、53-90、53-89、54-95、54-94、54-93、54-92、54-91、54-90、54-89、55-95、55-94、55-93、55-92、55-91、55-90或55-89的缺失;氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。在一些实施例

中,hIL12-p35多肽的氨基酸序列包含氨基酸残基A55-K92的缺失;氨基酸编号是相对于SEQ ID NO:30所示氨基酸序列。

[0399] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含与表6中所示的任一多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0400] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:31或110-114中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0401] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表6中所示任一多肽的氨基酸序列中所示的一组氨基酸修饰(例如取代、缺失)(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述组的氨基酸修饰(例如取代、缺失)之外,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与表6中所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0402] 在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列包含以下或由以下组成:任一SEQ ID NO:110-114的氨基酸序列中所示的一组氨基酸修饰(例如取代、缺失)(相对于SEQ ID NO:31的氨基酸序列);并且除了所述组的氨基酸修饰(例如取代、缺失)之外,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:110-114中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

5.3.1.3schIL-12多肽

[0403] 在一些实施例中,本文所述融合蛋白的hIL-12是单多肽链的形式(本文称为schIL-12)。schIL-12多肽可包含本文所述的任何hIL-12p40多肽(参见例如§5.2(例如§5.2.1)和§5.3.1.1);以及本文所述的任何hIL-12p35多肽(参见例如§5.2(例如§5.2.3)和§5.3.1.2)。schIL-12多肽可以包含本文§5.2.5中描述的schIL-12多肽。

[0404] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:38-51或90-109中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。在一些实施例中,hIL-12p35多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:31或110-114中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0405] 在一些实施例中,schIL-12包含直接融合至hIL-12p40多肽的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p35多肽、任选的肽接头和hIL-12p40多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p40多肽、任选的肽接头和hIL-12p35多肽。

[0406] 在一些实施例中,schIL-12多肽包含通过肽键直接可操作连接的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽包含通过肽接头间接融合至hIL-12p40多肽的hIL-12p35多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p35多肽、肽接头和hIL-12p40多肽。在一些实施例中,schIL-12多肽从N末端到C末端包含hIL-12p40多肽、肽接头和hIL-12p35多肽。

[0407] 表11中提供了用于schIL-12多肽(以可操作地将hIL-12p35多肽与hIL-12p40多肽连接)的示例性接头的氨基酸序列。

[0408] 在一些实施例中,hIL-12p40多肽和hIL-12p35多肽通过肽接头可操作地连接。在一些实施例中,肽接头具有足够的长度,使得hIL-12p35多肽和hIL-12p40多肽能够相关联,使得schIL-12能够结合hIL-12受体。在一些实施例中,肽接头包含约5-30、5-25、5-20、5-15、10-30、10-25、10-20或10-15个氨基酸。在一些实施例中,肽接头包含以下或由以下组成:甘氨酸(G)和丝氨酸(S)氨基酸残基。

[0409] 在一些实施例中,肽接头包含SEQ ID NO:66-81中任一个的氨基酸序列,或SEQ ID NO:66-81中任一个的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如取代、缺失或添加)的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头包含SEQ ID NO:72中任一个的氨基酸序列,或SEQ ID NO:72中任一个的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如取代、缺失或添加)的氨基酸序列。

[0410] 表11中提供了示例性schIL-12多肽的氨基酸序列。

表11.示例性人scIL-12多肽的氨基酸序列

说明	SEQ ID NO	氨基酸序列
野生型 hIL-12p35-接头-野生型 hIL-12p40	115	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPD APGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAG QYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCE AKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYT SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
野生型 hIL-12p40-接头-野生型 hIL-12p35	116	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSR GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESL PIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQV EVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATV ICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEI DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRK TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLA

		VIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAV TIDRVMSYLNAS
野生型 hIL-12p35-接头-hIL-12p40 变体 O	117	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDAYPD APGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAG QYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCE AKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYT SSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
hIL-12p40 变体 O-接头-野生型 hIL-12p35	118	IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWST DILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSR GSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESL PIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQV EVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATV ICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGS RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEE IDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNML AVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRA VTIDRVMSYLNAS

[0411] 在一些实施例中,schIL-12多肽的氨基酸序列与表11中所示的任一多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0412] 在一些实施例中,schIL-12多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:115-118中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

5.3.1.4 hIL-12融合蛋白和多肽的效力和亲和力

[0413] 在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的由在表面上表达hIL-12R的细胞中的STAT4水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的STAT4水平的增加更低。在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加更低。在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平

的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加低约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加低至少约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的在表面上表达hIL-12R的细胞中磷酸化STAT4(pSTAT4)水平的增加相对于由合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))介导的pSTAT4的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。适合测量本文所述hIL-12融合蛋白的EC50的测定法是标准的并且是本领域普通技术人员已知的,如尤其是§5.2.3中所述。

[0414] 在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的干扰素γ(IFN-γ)水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加更低。在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的IFN-γ水平的增加相对于在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371,372,383))存在下产生的IFN-γ水平的增加低0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的IFN-γ水平的增加相对于在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NO:371,372,383))存在下产生的IFN-γ水平的增加低至少约0.5倍、1倍、2倍、5倍、10倍、100倍或1000倍。在一些实施例中,hIL-12融合蛋白介导的通过在表面上表达hIL-12R产生的IFN-γ水平的增加相对于在存在合适的对照(例如,参考hIL-12融合蛋白(例如,SEQ ID NOS:371、372、383))的情况下产生的IFN-γ水平的增加低约0.5-1000倍、0.5-100倍、0.5-10倍、0.5-5倍、0.5-2倍、1-1000倍、1-100倍、1-10倍、1-5倍、1-2倍、10-1000倍或100-1000倍。适合测量培养细胞产生的蛋白质(例如IFN-γ)水平的测定是标准的且是本领域普通技术人员已知,如尤其是§5.2.3中所述。

[0415] 在一些实施例中,与参考hIL-12p40蛋白(例如参考hIL-12融合蛋白(例如SEQ ID NO:371、372、383))相比,hIL-12融合蛋白以较低的亲和力与hIL-12Rβ1结合。结合亲和力可以通过本领域已知的标准测定来测量,尤其如§5.2.25.2.3中所述。

5.3.2 Ig融合蛋白和多肽

[0416] 在一些实施例中,融合蛋白包含一个或多个hIg重链恒定区(例如CH1区、铰链区、CH2区、CH3区、Fc区)。在一些实施例中,一个或多个hIg重链恒定区是抗体(例如全长抗体)的一部分(参见例如§5.3.3)。在一些实施例中,hIg是人IgG(hIgG)。在一些实施例中,hIgG是hIgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施例中,hIgG是IgG1或IgG4。在一些实施例中,hIgG是hIgG1。在一些实施例中,hIgG是hIgG4。

[0417] 在一些实施例中,融合蛋白包含Fc区。在一些实施例中,Fc区是抗体的一部分。在一些实施例中,Fc区是全长抗体的一部分。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:CH2区和CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:铰链区的至少一部分、CH2区和CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:铰链区、CH2区和CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG CH2区的至少一部分和hIgG CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG铰链区的至少一部分、hIgG CH2区和hIgG CH3区。

在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG铰链区、hIgG CH2区和hIgG CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG1 CH2区和hIgG1 CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG1铰链区的至少一部分、hIgG1 CH2区和hIgG1 CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG1铰链区、hIgG1 CH2区和hIgG1 CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG4CH2区和hIgG4 CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG4铰链区的至少一部分、hIgG4 CH2区和hIgG4 CH3区。在一些实施例中,Fc区包含以下或由以下组成:hIgG4铰链区、hIgG4 CH2区和hIgG4 CH3区。

[0418] 表12中提供示例性参考hIgG1和hIgG4重链恒定区和轻链恒定区的氨基酸序列,其可并入本文所述的一个或多个实施例中(例如本文所述的hIL-12融合蛋白(例如本文所述的抗CAIX抗体(例如全长抗体)hIL-12融合蛋白)(或其一个或多个多肽))。

表12.示例性hIg重链和轻链恒定区组分的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
hIgG1 CH1 区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKV	119
hIgG1 铰链区	EPKSCDKTHTCP	120
hIgG1 CH2 区	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	121
hIgG1 CH3 区 含 C 末端赖氨酸	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	122
hIgG1 CH3 区 无 C 末端赖氨酸	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	123
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 含 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	124
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 无 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD	125

	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	126
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	127
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	128
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	129
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	130
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT	131

无 C 末端赖氨酸	KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
hIgG4 CH1 区	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRV	132
hIgG4 铰链区	ESKYGPPCPSCP	133
hIgG4 CH2 区	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK	134
hIgG4 CH3 区 含 C 末端赖氨酸	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	135
hIgG4 CH3 区 无 C 末端赖氨酸	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLG	136
hIgG4 CH2 区 +CH3 区 含 C 末端赖氨酸	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL GK	137
hIgG4 CH2 区 +CH3 区 无 C 末端赖氨酸	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL G	138
hIgG4 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 含 C 末端赖氨酸	PCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK	139

hIgG4 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 无 C 末端赖氨酸	PCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLG	140
hIgG4 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 含 C 末端赖氨酸	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK	141
hIgG4 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 无 C 末端赖氨酸	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLG	142
hIgG4 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	143
hIgG4 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	144
Ig 轻链 κ 恒定区 （κCL）	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	145

Ig 轻链 κ 恒定区 （λCL）	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	146

[0419] 在一些实施例中,融合蛋白包含一个或多个hIg恒定区。在一些实施例中,一个或

多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与表12所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0420] 在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示的多肽的氨基酸序列,并且进一步包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸变异(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示多肽的氨基酸序列,其包含以下或由以下组成:至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示多肽的氨基酸序列,其包含以下或由以下组成:约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示多肽的氨基酸序列,其包含以下或由以下组成:约不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。

[0421] 在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示的多肽的氨基酸序列,并且进一步包含1个或更多个但小于15%(小于12%、小于10%、小于8%)氨基酸取代。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示多肽的氨基酸序列,其包含以下或由以下组成:至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸取代。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示多肽的氨基酸序列,其包含以下或由以下组成:约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸取代。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表12中所示多肽的氨基酸序列,其包含以下或由以下组成:约不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸取代。

[0422] 在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:119-146中任一个(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个)所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0423] 在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个所示的氨基酸序列),并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个所示的氨基酸序列),其包含以下或由以下组成:至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个所示的氨基酸序列),其包含以下或由以下组成:约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131

或137-144中任一个所示的氨基酸序列),其包含以下或由以下组成:不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。

[0424] 在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个所示的氨基酸序列),并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸取代。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个所示的氨基酸序列),其包含以下或由以下组成:至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸取代。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个所示的氨基酸序列),其包含以下或由以下组成:约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代。在一些实施例中,一个或多个hIg恒定区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:119-146中任一个所示的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:124-131或137-144中任一个所示的氨基酸序列),其包含以下或由以下组成:不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代。

[0425] 在一些实施例中,融合蛋白包含轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:145-146中任一序列所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

5.3.2.1 Ig效应子功能

[0426] 如本文所述,在一些实施例中,融合蛋白包含Fc区。在一些实施例中,本文所述的融合蛋白或多肽的Fc区相对于参考(例如野生型)Fc区表现出一种或多种Fc效应子功能的降低。示例性的Fc效应子功能包括但不限于抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、补体依赖性细胞毒性(CDC)以及与一种或多种人Fc受体(例如Fcγ受体(例如FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc、FcγRIIIa和/或FcγRIIIb(例如FcγRI、FcγIIa和/或FcγIIIa))的结合亲和力。

[0427] 可以进行本领域已知的标准体外和/或体外测定来评估Fc效应子功能,包括ADCC、CDC、ADCP、Fc受体(例如Fcγ受体)结合亲和力和C1q结合亲和力中的任何一种或多种。

[0428] 例如,ADCC活性可以利用本领域已知的标准(放射性和非放射性)方法进行评估(参见例如WO 2006/082515、WO 2012/130831),出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文)。例如,ADCC活性可以使用5价铬(^{51}Cr)测定进行评估。简而言之,将^{51}Cr预加载到表达CD20的靶细胞中,将NK细胞添加到培养物中,并评估细胞培养物上清液中的放射性(表明NK细胞对靶细胞的裂解)。也可以使用类似的非放射性测定,其采用类似的方法,但靶细胞预先装载有荧光染料,例如钙黄绿素-AM、CFSE、BCECF或镧系元素荧光团(铕)。参见,例如,Parekh,Bhavin S等人"Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay.[抗体依赖性细胞介导的细胞毒性报告基因测定的开发和验证]"mAbs[单克隆抗体]第4卷,3(2012):310-8。Doi:10.4161/mabs.19873,出于所有目的,其完整内容通过引用并入本文。示例性的市售非放射性测定包括例如用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(细胞技术公司(Cell Technology,Inc.)山景城,加利福尼亚州;和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定(普洛麦格公司

(Promega),麦迪逊,威斯康星州)。可用于评估本文所述融合蛋白的ADCC活性的体外测定的其他非限制性实例包括以下中描述的那些:US5500362;US5821337;Hellstrom,I.,等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]83(1986)7059-7063;Hellstrom,I.,等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]82(1985)1499-1502;和Bruggemann,M.,等人,J.Exp.Med.[实验医学杂志]166(1987)1351-1361,其每个的全部内容通过引用并入本文。可替代地或另外地,本文所述融合蛋白的ADCC活性可例如在动物模型(例如Clynes,等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]95(1998)652-656(其全部内容出于所有目的通过引用并入本文)中所披露)中在体外评估。

[0429] C1q结合测定可用于评估本文所述的hIg融合蛋白或多肽结合C1q(或以比参考融合蛋白更低的亲和力结合)的能力,并因此缺乏(或具有降低的)CDC活性。本文所述的hIg融合蛋白或多肽与C1q的结合可以通过本领域已知的多种体外测定法(例如基于生物化学或免疫学的测定法)来测定Fc-C1q相互作用,包括例如,平衡方法(例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)),或动力学方法(例如,表面等离子共振(SPR)分析),以及其他方法,例如间接结合测定、竞争性抑制测定、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱(例如凝胶过滤)。这些和其他方法可以利用被检查的一种或多种组分上的标记和/或采用多种检测方法,包括但不限于显色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和力和动力学的详细描述可以在例如Paul,W.E.,编辑,Fundamental Immunology[基础免疫学],第4版,Lippincott-Raven[利平科特-雷文公司],费城(1999)中找到,其全部内容通过引用并入本文。例如,参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中描述的C1q和C3c结合性ELISA,出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文。其他CDC活性测定包括以下中描述的那些:例如Gazzano-Santoro,等人,J.Immunol.Methods[免疫学方法杂志]202(1996)163;Cragg,M.S.,等人,Blood[血液]101(2003)1045-1052;和Cragg,M.S.,和Glennie,M.J.,Blood[血液]103(2004)2738-2743),出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文。

[0430] ADCP活性可以通过本领域已知的体外或体外方法以及市售测定法来测量(参见例如van de Donk NW,Moreau P,Plesner T,等人"Clinical efficacy and management of monoclonal antibodies targeting CD38 and SLAMF7 in multiple myeloma[CD38和SLAMF7单克隆抗体治疗多发性骨髓瘤的临床疗效和管理],"Blood[血液],127(6):681-695(2016),出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文)。例如,可以使用基于原代细胞的ADCP测定,其中使用标准程序分离新鲜人外周血单核细胞(PBMC)、分离单核细胞并在培养物中分化为巨噬细胞。将荧光标记的巨噬细胞添加到含有表达CD20和本文所述的融合蛋白的经荧光标记的靶细胞的培养物中。可以使用FACS筛选和/或显微镜检查来分析吞噬作用事件。还可以使用上述测定法的改良报告版本,其采用稳定表达Fc γ RIIa(CD32a)的工程改造细胞系作为效应细胞系(例如,工程改造T细胞系,例如THP-1),其消除了对原代细胞的要求。示例性的ADCP分析描述于例如,Ackerman,M.E.等人A robust,high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples[一种稳健的高通量检测方法,用于测定临床抗体样品的吞噬活性].J.Immunol.Methods[免疫学方法]366,8-19(2011);和Mcandrew,E.G.等人。Determining the phagocytic activity of clinical antibody samples.[确定临床抗体样品的吞噬活性]J.Vis.Exp.[视觉实验

杂志]3588(2011).Doi:10.3791/3588;其每一篇的完整内容通过引用并入本文。

[0431] 本文所述的hIg融合蛋白或多肽与Fc受体的结合可通过本领域已知的用于测定Fc-Fc受体相互作用(即Fc区与Fc受体的特异性结合)的多种体外测定法(例如基于生物化学或免疫学的测定法)来测定。常见的测定包括平衡法(例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)),或动力学方法(例如,表面等离子共振(SPR)分析),以及其他方法,例如间接结合测定、竞争性抑制测定、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱(例如凝胶过滤)。这些和其他方法可以利用被检查的一种或多种组分上的标记和/或采用多种检测方法,包括但不限于显色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和力和动力学的详细描述可以在以下中找到:例如,Paul,W.E.,编辑,Fundamental Immunology[基础免疫学],第4"版,利平科特-拉文(Lippincott-Raven),费城(1999),出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文)。

[0432] 在一些实施例中,相对于参考Fc区(例如野生型Fc区,例如SEQ ID NO:124-131中的任一个)的氨基酸序列,本文所述的融合蛋白(或其一个或多个多肽)的Fc区被修饰(例如包含一个或多个氨基酸修饰(例如一个或多个氨基酸取代、缺失、添加等))(在本文中称为"经修饰的Fc区")。在一些实施例中,一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失、添加等))相对于不包含修饰(例如,一个或多个修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失、添加等))的参考Fc,减少或消除一种或多种Fc效应子功能。

[0433] 在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)不表现出可检测的或降低的ADCC。在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)不表现出可检测的或降低的CDC。在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)不表现出可检测的或降低的ADCP。在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对一个或多个人Fc受体(例如,Fcγ受体(例如,FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc、FcγRIIIa和/或FcγRIIIb(例如,FcγRI、FcγIIa和/或FcγIIIa)))表现出降低的或检测不到的特异性结合亲和力。在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对FcγRI、FcγIIa和/或FcγIIIa的特异性结合亲和力降低或检测不到。在一些实施例中,与不包含Fc修饰(例如,一个或多个修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc的融合蛋白(或其多肽)或多肽对FcγRI的特异性结合亲和力降低或检测不到。在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其多肽)或多肽相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对FcγIIa的特异性结合亲和力降低或检测不到。在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个修饰

(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的参考融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对Fc γ IIIa的特异性结合亲和力降低或检测不到。在一些实施例中,与不包含Fc区修饰(例如,一个或多个修饰(例如,一个或多个氨基酸取代、缺失或添加))的融合蛋白(或其一个或多个多肽)相比,包含经修饰的Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对C1q的特异性结合亲和力降低或检测不到。

[0434] 在一些实施例中,包含Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)不表现出可检测的ADCC。在一些实施例中,包含Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)不表现出可检测的CDC。在一些实施例中,包含Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)不表现出可检测的ADCP。在一些实施例中,包含Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对一个或多个人Fc受体(例如Fc γ 受体(例如,Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa和/或Fc γ RIIIb(例如,Fc γ RI、Fc γ IIa和/或Fc γ IIIa)))不表现出可检测的特异性结合亲和力。在一些实施例中,包含Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对Fc γ RI、Fc γ IIa和/或不表现出可检测的特异性结合亲和力。在一些实施例中,包含Fc的融合蛋白(或其多肽)对Fc γ RI不表现出可检测的特异性结合亲和力。在一些实施例中,包含Fc的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对Fc γ IIa不表现出可检测的特异性结合亲和力。在一些实施例中,包含Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对Fc γ IIIa不表现出可检测的特异性结合亲和力。在一些实施例中,包含Fc区的融合蛋白(或其一个或多个多肽)对C1q不表现出可检测的特异性结合亲和力。

[0435] 降低或消除一种或多种Fc效应子功能的氨基酸取代是本领域已知的。参见例如,Saunders Kevin,“Conceptual Approaches to Modulating Antibody Effector Functions and Circulation Half-Life[调节抗体效应子功能和循环半衰期的概念性方法],”Frontiers in Immunology[免疫学前沿],v10(2019年6月7日)DOI＝10.3389/fimmu.2019.01296,其全部内容出于所有目的通过引用并入本文,参见,更特别地例如,比如,Saunders的表3。

[0436] 在一些实施例中,经修饰的Fc包含hIgG1 Fc区,其包含一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个氨基酸取代)。在一些实施例中,hIgG1 Fc区在根据Kabat的EU编号的氨基酸位置L234、L235和/或P329处包含氨基酸取代。在一些实施例中,hIgG1 Fc区包含根据Kabat的EU编号的以下氨基酸取代L234A和/或L235A。在一些实施例中,hIgG1 Fc区包含根据Kabat的EU编号的以下氨基酸取代L234A、L235A和P329G。在一些实施例中,hIgG1 Fc区包含根据Kabat的EU编号的以下氨基酸取代L234A、L235A和P329A。

[0437] 在一些实施例中,经修饰的Fc区包含hIgG4 Fc区,其包含一个或多个氨基酸修饰(例如,一个或多个氨基酸取代)。在一些实施例中,hIgG4 Fc区在根据Kabat的EU编号的氨基酸位置S228、F234和/或L235处包含氨基酸取代。在一些实施例中,hIgG4 Fc区包含根据Kabat的EU编号的以下氨基酸取代S228P、F234A和/或L235A。在一些实施例中,hIgG4 Fc区包含根据Kabat的EU编号的以下氨基酸取代S228P、F234A和/或L235E。在一些实施例中,hIgG4 Fc包含根据Kabat的EU编号的以下氨基酸取代S228P和/或L235E。

[0438] 表13中提供了本领域已知的表现出一种或多种效应子功能降低的示例性经修饰的Fc区的氨基酸序列。

表13.示例性经修饰的Fc区的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A 含 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	147
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY	148

无 C 末端赖氨酸	KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG	
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	149
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG	150
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329G 含 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	151
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329G 无 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG	152
hIgG1 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	153
hIgG1 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE	154

无 C 末端赖氨酸	NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	
hIgG1 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	155
hIgG1 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	156
hIgG1 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329G 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	157
hIgG1 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A/P329G 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG	158
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 L234A/L235A 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	159
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK	160

L234A/L235A 无 C 末端赖氨酸	AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	161
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	162
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A/P329G 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	163
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A/P329G 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	164
hIgG4 CH2 区 + CH3 区 S228P/F234A/L235A 含 C 末端赖氨酸	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK	165
hIgG4 CH2 区 + CH3 区	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD	166

S228P/F234A/L235A 无 C 末端赖氨酸	WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG	
hIgG4 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 S228P/F234A/L235A 含 C 末端赖氨酸	PCPSCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	167
hIgG4 部分铰链区 +CH2 区 +CH3 区 S228P/F234A/L235A 无 C 末端赖氨酸	PCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLG	168
hIgG4 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 S228P/F234A/L235A 含 C 末端赖氨酸	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	169
hIgG4 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 S228P/F234A/L235A 无 C 末端赖氨酸	ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	170
hIgG4 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 （经修饰的） S228P/F234A/L235A 含 C 末端赖氨酸	AESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	171

hIgG4 铰链区 +CH2 区 +CH3 区（经修饰的） S228P/F234A/L235A 无 C 末端赖氨酸	AESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	172

[0439] 在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸和/或位置L235处的丙氨酸氨基酸。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸和位置L235处的丙氨酸氨基酸。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置P329处的丙氨酸或甘氨酸氨基酸。

[0440] 在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号,位置L234处的丙氨酸氨基酸;位置L235处的丙氨酸氨基酸;以及位置P329处的丙氨酸或甘氨酸氨基酸。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号,位置L234处的丙氨酸氨基酸;位置L235处的丙氨酸氨基酸;以及位置P329处的丙氨酸氨基酸。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号,位置L234处的丙氨酸氨基酸;位置L235处的丙氨酸氨基酸;和位置P329处的甘氨酸氨基酸。

[0441] 在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和/或位置P329处的丙氨酸或甘氨酸氨基酸;并且包含与表13所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸和/或位置L235处的丙氨酸氨基酸;并且包含与表13所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸和位置L235处的丙氨酸氨基酸;并且包含与表13所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和位置P329处的丙氨酸或甘氨酸氨基酸;并且包含与表13所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和位置P329处的丙氨酸氨基酸;并且包含与表13所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例

中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和位置P329处的甘氨酸氨基酸;并且包含与表13所示多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0442] 在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和/或位置P329处的丙氨酸或甘氨酸氨基酸;并且包含与SEQ ID NO:147-163中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸和/或位置L235处的丙氨酸氨基酸;并且包含与SEQ ID NO:147-163中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸和位置L235处的丙氨酸氨基酸;并且包含与SEQ ID NO:147-163中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和位置P329处的丙氨酸或甘氨酸氨基酸;并且包含与SEQ ID NO:147-163中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和位置P329处的丙氨酸氨基酸;并且包含与SEQ ID NO:147-163中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施例中,hIgG1 Fc区的氨基酸序列包含以下或由以下组成:根据Kabat的EU编号的位置L234处的丙氨酸氨基酸、位置L235处的丙氨酸氨基酸和位置P329处的甘氨酸氨基酸;并且包含与SEQ ID NO:147-163中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

5.3.2.2异二聚化的促进

[0443] 如本文所述,在一些实施例中,融合蛋白(或其一个或多个多肽)包含第一和第二Fc区。如本文所述,在一些实施例中,异源部分包含第一和第二Fc区。在一些实施例中,第一Ig Fc区和第二Ig Fc区各自包含相对于彼此的一个或多个氨基酸修饰以促进异二聚化。Ig(例如IgG)衍生的异二聚形式可以通过本领域已知的方法产生,例如通过强制重链异二聚化产生。强制重链异二聚化可以使用本领域已知的方法获得,例如,杵臼(knob-in-hole)或链交换工程改造结构域(SEED),参见,例如Ji-Hee等人.,“Immunoglobulin Fc Heterodimer Platform Technology:From Design to Applications in Therapeutic Antibodies and Proteins[免疫球蛋白Fc异二聚体平台技术:从设计到治疗性抗体和蛋白质的应用]”Frontiers in Immunology[免疫学前沿],v7(第394章)(2016)DOI＝10.3389/fimmu.2016.00394(以下简称“Ji-Hee 2016”),其全部内容出于所有目的通过引用并入本

文。

[0444] 在一些实施例中,第一和第二Ig Fc区的界面被修饰,例如,引入氨基酸取代,以增加异二聚化,例如,相对于非-修饰的界面,例如,自然发生的界面。例如,可以通过向第一和第二Fc区的Ig Fc界面提供以下一种或多种来增强第一和第二Ig Fc区的二聚化:成对的突起-腔("杵臼")、静电相互作用或链交换,使得例如相对于未修饰的界面,异多聚体比同多聚体形式更大的比例。

[0445] 杵臼氨基酸配对修饰是本领域已知的,并且描述于,例如US 5731116;US 7476724;Ji-Hee 2016;和Ridgway,J."'Knobs-into-holes'engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization[用于重链异二聚化的抗体CH3结构域的杵臼工程改造]"等.Prot.Engineering[蛋白质工程改造]9(7):617-621(1996),其每一篇的完整内容通过引用并入本文。一般而言,杵臼包括1)在第一和第二主题Ig Fc区之一或两者的CH3结构域中引入一个或多个氨基酸取代以促进异二聚化;和2)在促进异二聚化的条件下组合经修饰的Ig Fc区。"杵"通常是通过用较大的氨基酸取代亲本Ig Fc区中的小氨基酸(例如,T366Y或T366W)来产生;"臼"是通过用较小的氨基酸取代亲本Ig Fc区中的较大残基(例如,Y407T、T366S、11368A或Y407V)来产生。示例性的杵臼突变包括"杵"Ig Fc区中的S354C、T366W和"臼"Ig Fc区中的Y349C、T366S、L368A、Y407V。表14中提供了可并入任何一个或多个实施例中的其他示例性孔中杵臼突变,以及另外的示例性任选的稳定Ig Fc半胱氨酸突变。

表14.示例性杵臼和稳定性半胱氨酸修饰

氨基酸位置(根据 Kabat 的 EU 编号)	杵 Ig Fc 氨基酸取代	臼 Ig Fc 氨基酸取代
杵臼氨基酸取代		
T366	T366W	T366S
L368	-	L368A
Y407	-	Y407V
稳定性半胱氨酸氨基酸取代		
S354	S354C	-
Y349	-	Y349C

[0446] 表15中提供了本领域已知的促进异二聚化的示例性Fc区的氨基酸序列。

表15.示例性的经修饰异二聚体Fc区对的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 杵 T366W 含 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	173
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 杵 T366W 无 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	174
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	175
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	176
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 杵 T366W 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	177
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 杵 T366W 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	178

hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 杵 T366W 含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	179
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 杵 T366W 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	180
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 杵 T366W/S354C 含 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	181
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 杵 T366W/S354C 无 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	182
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 杵 T366W/S354C 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	183
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 杵 T366W/S354C 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	184
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR	185

杵 T366W/S354C 含 C 末端赖氨酸	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	186
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C 含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	187
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	188
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V 含 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	189
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V 无 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	190
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP	191

含 C 末端赖氨酸	VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	192
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	193
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	194
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V 含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	195
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	196
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD	197

含 C 末端赖氨酸	SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C 无 C 末端赖氨酸	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	198
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	199
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	200
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	201
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	202

无C末端赖氨酸		
hIgG1 CH1+铰链区+CH2区+CH3区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C 含C末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	203
hIgG1 CH1+铰链区+CH2区+CH3区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C 无C末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	204

[0447] 如本文所述,在一些实施例中,融合蛋白(或其一个或多个多肽)包含第一Fc区和第二Fc区。

[0448] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的T366W氨基酸取代;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的以下每个氨基酸取代:T366S、L368A和Y407V;各自相对于示例性参考Fc区的氨基酸序列(例如,表12中列出的参考Fc区)。在一些实施例中,第一h的氨基酸序列进一步包含根据Kabat的EU编号的S354C氨基酸取代;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的Y349C氨基酸取代;各自相对于示例性参考Fc区的氨基酸序列(例如,表12中列出的参考Fc区)。

[0449] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的以下每个氨基酸取代:T366W和S354C;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的以下每个氨基酸取代:T366S、L368A、Y407V和Y349C;各自相对于示例性参考Fc区的氨基酸序列(例如,表12中列出的参考Fc区)。

[0450] 在一些实施例中,第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的T366W氨基酸取代;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的以下每个氨基酸取代:T366S、L368A和Y407V;各自相对于示例性参考Fc区的氨基酸序列(例如,表12中列出的参考Fc区)。在一些实施例中,第二h的氨基酸序列进一步包含根据Kabat的EU编号的S354C氨基酸取代;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的Y349C氨基酸取代;各自相对于示例性参考Fc区的氨基酸序列(例如,表12中列出的参考Fc区)。

[0451] 在一些实施例中,第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的以下每个氨基酸取代:T366W和S354C;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的以下每个氨基酸取代:T366S、L368A、Y407V和Y349C;各自相对于示例性参考Fc区的氨基酸序列(例如,表12中列出的参考Fc区)。

[0452] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝

氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸。

[0453] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸。

[0454] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:173-180中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:189-196中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0455] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:182-188中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:197-204中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0456] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:173中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:189中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0457] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:174中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:190中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0458] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:175中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:191中所示的氨基酸序列至

少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0459] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的W氨基酸,并且与SEQ ID NO:176中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:192中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0460] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:177中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:193中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0461] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:178中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:194中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0462] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:179中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:195中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0463] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:180中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:196中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0464] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:181中所示的氨基酸

序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:197中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0465] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:182中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:198中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0466] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:183中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:199中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0467] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:184中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:200中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0468] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:185中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:201中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0469] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:186中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:202中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、

88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0470] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:187中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:203中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0471] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸和位置S354处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:188中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:204中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

5.3.2.3示例性经修饰的Fc区

[0472] 如本文所述,在一些实施例中,融合蛋白(或其一个或多个多肽)包含第一和第二Fc区。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含本文所述的多个氨基酸修饰,例如一个或多个氨基酸修饰,其降低或消除一种或多种Fc效应子功能(例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、补体依赖性细胞毒性(CDC)以及对一个或多个人Fc受体(例如Fcγ RI、Fcγ RIIa、Fcγ RIIc、Fcγ RIIIa和/或Fcγ RIIIb(例如Fcγ RI、Fcγ IIa和/或Fcγ IIIa))的结合亲和力)(参见例如§5.3.2.1);以及促进第一和第二Fc区异二聚化的一个或多个氨基酸修饰(参见,例如,§5.3.2.2)。

[0473] 在一些实施例中,第一和第二Fc区各自包含一个或多个氨基酸修饰,其降低或消除一种或多种Fc效应子功能(例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)、补体依赖性细胞毒性(CDC)以及对一个或多个人Fc受体(例如Fcγ RI、Fcγ RIIa、Fcγ RIIc、Fcγ RIIIa和/或Fcγ RIIIb(例如Fcγ RI、Fcγ IIa和/或Fcγ IIIa))的结合亲和力)(参见例如§5.3.2.1);以及促进第一和第二Fc区异二聚化的一个或多个氨基酸修饰(参见,例如,§5.3.2.2)。

[0474] 示例性经修饰的Fc区的氨基酸序列提供于表16中。

表16.示例性经修饰的Fc区的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	205
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	206
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	207
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	208
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	209

含 C 末端赖氨酸		
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	210
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	211
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	212
hIgG1 CH2 区 +CH3 区 臼 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	213
hIgG1 CH2 区 +CH3 区	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD	214

白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	215
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	216
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	217
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR	218

白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	219
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A/P329A 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	220
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	221
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 杵 T366W/S354C	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD	222

L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	223
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	224
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	225
hIgG1 铰链区 +CH2 区 +CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	226
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 +CH3 区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT	227

杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 杵 T366W/S354C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	228
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	229
hIgG1 CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	230
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y 349C L234A/L235A/P329A	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	231

含 C 末端赖氨酸		
hIgG1 部分铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	232
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 含 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	233
hIgG1 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	234
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS	235

含 C 末端赖氨酸	DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
hIgG1 CH1 + 铰链区 + CH2 区 + CH3 区 L234A/L235A/P329A 白 T366S/L368A/Y407V/Y349C L234A/L235A/P329A 无 C 末端赖氨酸	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	236

[0475] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸残基、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:205-212中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:213-220中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0476] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:221-228中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:229-236中任一个所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0477] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:205中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的

缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:213中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0478] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:206中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:214中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0479] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:207中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:215中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0480] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:208中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366的丝氨酸氨基酸、位置Y349的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234的丙氨酸氨基酸残基、位置L235的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的氨基酸残基、位置L368处的丙氨酸氨基酸和位置Y407处的缬氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:216中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0481] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:209中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat

的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:217中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0482] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:210中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:218中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0483] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:211中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:219中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0484] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:212中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、以及位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的丙氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:220中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同。

[0485] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:221中所示的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基、和位置P329处的甘氨酸氨基酸残基、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:229中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0486] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:222中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且所述第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基、和位置P329处的甘氨酸氨基酸残基、和及位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:230中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0487] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:223中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基、和位置P329处的甘氨酸氨基酸残基、和及位置Y349处的半胱氨酸氨基酸,并且与SEQ ID NO:231中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0488] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:224中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:232中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0489] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:

225中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:233中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0490] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:226中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:234中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0491] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:227中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的G氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:235中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0492] 在一些实施例中,第一Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的色氨酸氨基酸、位置S354处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基以及位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:228中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且第二Fc区的氨基酸序列包含根据Kabat的EU编号的位置T366处的丝氨酸氨基酸、位置L368处的丙氨酸氨基酸、位置Y407处的缬氨酸氨基酸和位置Y349处的半胱氨酸氨基酸、位置Y349处的半胱氨酸氨基酸残基、位置L234处的丙氨酸氨基酸残基、位置L235处的丙氨酸氨基酸残基和位置P329处的甘氨酸氨基酸残基,并且与SEQ ID NO:236中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

5.3.3抗体融合蛋白

[0493] 在一些实施例中,融合蛋白包含抗体(或其抗原结合结构域)(例如,全长抗体)。融

合蛋白的抗体组分可以发挥作用以进一步将hIL-12蛋白或多肽例如靶向表达特定细胞表面蛋白的特定细胞类型。示例性抗体包括但不限于全长抗体(或其抗原结合结构域)、scFv、$(scFv)_2$、Fab、单结构域抗体(例如VHH)、scFv-Fc、Fab-Fc、单结构域抗体-Fc(例如,VHH-Fc)、双亲和力重靶向抗体(DART)、微型抗体和双抗体。

[0494] 抗体可以包含本文,例如§5.3.2中所述的任何Ig区。在一些实施例中,抗体包含§5.3.2节中所述的一个或多个Ig区。在一些实施例中,抗体包含§5.3.2节中所述的一个或多个Fc区。在一些实施例中,抗体是包含§5.3.2节中所述的一个或多个Ig区的全长抗体。在一些实施例中,抗体是包含§5.3.2节中所述的一个或多个Fc区的全长抗体。

[0495] 在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合人肿瘤相关抗原(hTAA)。示例性的人肿瘤相关抗原包括但不限于碳酸酐酶IX(CAIX)、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、间皮素(MSLN)、生腱蛋白-C的A1结构域(TNC A1)、生腱蛋白-C的A2结构域(TNC A2)、纤连蛋白的额外结构域B(EDB)、黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖(MCSP)、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶IV(DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白(ADAbp)、亲环蛋白b、结直肠相关抗原(CRC)-C017-1A/GA733、癌胚抗原(CEA)、ETV6、AML1、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、MAGE肿瘤抗原家族(例如MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2(MAGE-B2)、MAGE-Xp3(MAGE-B3)、MAGE-Xp4(MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、肿瘤抗原的GAGE家族(例如GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC家族、p21ras、RCAS1、甲胎蛋白、E-钙粘蛋白、α-连环蛋白、β-连环蛋白和γ-连环蛋白、p120ctn、gp100 Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤性结肠息肉病蛋白(APC)、胞衬蛋白、连接蛋白37、Ig独特型、p15、gp75、GM2和GD2神经节苷脂、病毒产物如人乳头瘤病毒蛋白、肿瘤抗原Smad家族、Imp-1、P1A、EBV编码的核抗原(EBNA)-1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2(HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1和CT-7、c-erbB-2、Her2、EGFR、IGF-1R、CD23、CD30、CD33、CD40、IL-6R、MCSP、PDGFβR、EpCAM、EGFR变体III、CD19、二唾液酸神经节苷脂GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、神经胶质瘤相关抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、MN-CAIX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、LAGA-1a、p53、前列腺素、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、ELF2M、中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI受体、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、跨膜4结构域A1(MS4A1;CD20);CD22(SIGLEC2);CD27(TNFRSF7);TNFRSF8(CD30);CD33(SIGLEC3);CD37;CD38;CD40(TNFRSF5)、CD44;CD47;CD48(SLAMF2);CD52;CD70(TNFSF7;CD27L);外5'-核苷酸酶(NT5E;CD73)、胞外核苷三磷酸二磷酸水解酶1(CD39)、CD74;CD79B;CD80;CD86;白介素3受体亚基α(IL3RA)、prominin 1(PROM1;CD133);TNFRSF9(CD137);多配体聚糖(Syndecan)1(SDC1;CD138);CD200分子(CD200);甲胎蛋白(AFP)、BAG协同伴侣分子6(BAG6);MET原癌基因,受体酪氨酸激酶(MET);KIT原癌基因,受体酪氨酸激酶(KIT);C型凝集素结构域家族12成员A(CLEC12A;CD371);含C型凝集素结构域的9A(CLEC9A;CD370);钙粘蛋白3(CDH3);碳酸酐酶6(CA6);碳酸酐酶9(CA9);癌胚抗原相关细胞粘附分子3(CEACAM3);癌胚抗原相关细胞粘附分子5(CEACAM5);癌胚抗原相关细胞粘附分子6(CEACAM6);绒毛膜生长激素1(CSH1);凝血因子III、组织因子(F3);集合素亚家族成员

10(COLEC10;CLL1);δ样规范Notch配体3(DLL3);外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶3(ENPP3);肝配蛋白A1(EFNA1);表皮生长因子受体(EGFR;ERBB;HER1);EGFR变体III(EGFRvIII);EPH受体A2(EPHA2);上皮细胞粘附分子(EPCAM);erb-b2受体酪氨酸激酶2(ERBB2;HER-2/neu);成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2);成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3);叶酸水解酶1(FOLH1);叶酸受体1(FOLR1);GD2神经节苷脂;糖蛋白NMB(GPNMB;骨激活素);鸟苷酸环化酶2C(GUCY2C);人乳头瘤病毒(HPV)E6;HPV E7;主要组织相容性复合体(MHC)I类呈递的新抗原、主要组织相容性复合体(MHC)II类呈递的新抗原、主要组织相容性复合体I类E(HLA-E);主要组织相容性复合体I类F(HLA-F);主要组织相容性复合体I类G(HLA-G);MHC I类多肽相关序列A(MICA);MHC I类多肽相关序列B(MICB);整合素亚基β7(ITGB7);白细胞免疫球蛋白样受体B1(LILRB1;ILT2);白细胞免疫球蛋白样受体B2(LILRB2;ILT4);含LY6/PLAUR结构域的3(LYPD3);磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3);KRAS原癌基因,GTP酶(KRAS);粘蛋白1(MUC1)及其剪接变体(例如,包括MUC1/A、C、D、X、Y、Z和REP);粘蛋白16(MUC16;CA125);自然杀伤细胞细胞毒性受体3配体1(NCR3LG1;B7-H6);necdin,MAGE家族成员(NDN);连接蛋白细胞粘附分子2(NECTIN2);连接蛋白细胞粘附分子4(NECTIN4);SLIT和NTRK样家族成员6(SLITRK6);早幼粒细胞白血病(PML);蛋白酪氨酸激酶7(无活性)(PTK7);脊髓灰质炎病毒受体(PVR)细胞粘附分子(PVR);SLAM家族成员6(SLAMF6);SLAM家族成员7(SLAMF7);唾液酸结合Ig样凝集素7(SIGLEC7);唾液酸结合Ig样凝集素9(SIGLEC9);唾液酸结合Ig样凝集素10(SIGLEC10);信号调节蛋白α(SIRPA)溶质载体家族34(磷酸钠)成员2(SLC34A2);溶质载体家族39成员6(SLC39A6);STEAP家族成员1(STEAP1);抑制致瘤性2(ST2);TNF受体超家族成员4(TNFRSF4;OX40);TNF超家族成员9(TNFSF9;4-1BB-L,CD137L);TNFRSF10A(DR4、TRAILR1);TNFRSF10B(DR5、TRAILR2);TNFRSF13B(BAFF);TNFRSF17(BCMA);TNFRSF18(GITR);转铁蛋白(TF);转化生长因子β1(TGFB1)及其亚型;骨髓细胞上表达的触发受体1(TREM1);骨髓细胞上表达的触发受体2(TREM2);滋养层糖蛋白(TPBG);肌营养蛋白(TRO);肿瘤相关钙信号转导器2(TACSTD2);岩藻糖基GM1;唾液酸路易斯粘附分子(sLe);和路易斯Y抗原。

[0496] 在一些实施例中,抗体(或其抗原结合结构域)特异性结合hCAIX。示例性抗CAIX抗体,包括CDR、可变重链区、可变轻链区、重链和轻链在本文中描述,参见,例如,§5.3.3.1,表2、3和17。在一些实施例中,本文描述了抗CAIX抗原结合结构域。在一些实施例中,所采用的抗CAIX抗原结合结构域是§5.3.3.1、表2、3和17中描述的结构域。

5.3.3.1 CAIX结合结构域

[0497] 在一些实施例中,本文所述的融合蛋白包含特异性结合CAIX的抗原结合结构域,本文也称为hCAIX结合结构域或抗CAIX结构域。在一些实施例中,hCAIX结合结构域包含Fab、Fab'、F(ab')2、F(v)、scFv、$(scFv)_2$、scFv-Fc、$(scFv)_2$-Fc、单结构域抗体(sdAb)、VHH、$(VHH)_2$、VHH-Fc或$(VHH)_2$-Fc。在一些实施例中,hCAIX结合结构域是全长抗体的一部分。在一些实施例中,hCAIX结合结构域是Ig Fc融合物的一部分(参见,例如,§5.3.2)。在一些实施例中,hCAIX结合结构域是非抗体抗原结合分子,例如本领域已知的充当抗原结合结构域的替代支架,例如比如重组纤连蛋白结构域。

[0498] 在一些实施例中,融合蛋白对于hCAIX是单价的。在一些实施例中,融合蛋白对于hCAIX是二价的。在一些实施例中,融合蛋白对于hCAIX来说是三价的。在一些实施例中,融合蛋白对于单个hCAIX表位是单特异性的。在一些实施例中,融合蛋白是双特异性的。在一

些实施例中,融合蛋白是双特异性的,其中融合蛋白或多肽特异性结合第一hCAIX表位和第二hCAIX表位,其中第一和第二表位不同。在一些实施例中,抗体结合CAIX胞外结构域的表位(例如,SEQ ID NO:1的氨基酸1-193)。

[0499] 特异性结合hCAIX的抗体是本领域已知的。参见例如WO 2021000017 A1、WO 2020226612 A1、WO 2019204939 A1、WO 2018234463 A1、WO 2018157147 A1、WO 2016199097A1、US20180030147 A1、WO 2016100980 A1、WO 2014096163 A1、WO 2012027493A1、WO 2011139375 A1、WO 2011032973 A1、WO 2008091798 A1、WO 2008103327A2、WO 2007065027、WO 2004002526 A1、WO 2003100029 A2、US 20090162382 A1、US 20050031623 A1、US 20080176258 A1、WO 2003048328 A2、WO 2002063010 A2、Chang,DK等人Human anti-CAIX antibodies mediate immune cell inhibition of renal cell carcinoma in vitro and in a humanized mouse model in vitro[人抗CAIX抗体在体外和体外人源化小鼠模型中介导免疫细胞抑制肾细胞癌],Mol Cancer[分子癌症]14,119(2015);Ahlskog,J等人Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours[靶向碳酸酐酶IX的人单克隆抗体用于实体瘤缺氧区域的分子成像].Br JCancer[英国癌症杂志]101,645-657(2009);Oosterwijk-Wakka JC,Boerman OC,Mulders PF,Oosterwijk E.Application of monoclonal antibody G250 recognizing carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma[识别碳酸酐酶IX的单克隆抗体G250在肾细胞癌中的应用].Int J Mol Sci.[国际分子科学杂志]2013;14(6):11402-11423;De Luca R等人(2019)A Novel Fully-Human Potency-Matched Dual Cytokine-Antibody Fusion Protein Targets Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinomas[一种新的完全人类效力匹配的双细胞因子-抗体融合蛋白靶向肾细胞癌中的碳酸酐酶IX].Front.Oncol.[肿瘤学前沿]9:1228;Heike M.Petrul等人Therapeutic Mechanism and Efficacy of the Antibody-Drug Conjugate BAY 79-4620 Targeting Human Carbonic Anhydrase 9[靶向人碳酸酐酶9的抗体-药物缀合物BAY 79-4620的治疗机制和疗效],Mol Cancer Ther[分子癌症疗法];11(2);340-9(2011);出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文。

[0500] 在一些实施例中,抗CAIX抗体是吉伦妥昔单抗。吉伦妥昔单抗描述于例如WO 2002063010 A2中,其全部内容出于所有目的通过引用并入本文。在一些实施例中,CAIX结合结构域特异性结合与吉伦妥昔单抗相同的表位。在一些实施例中,抗体是吉伦妥昔单抗的人源化形式。在一些实施例中,TCRVα结合结构域是吉伦妥昔单抗的嵌合形式。

[0501] 表17中提供了示例性鼠抗CAIX抗体(包括吉伦妥昔单抗)的氨基酸序列。CDR是根据Kabat定义的。

表17.示例性抗CAIX结合结构域的氨基酸序列

说明	区	氨基酸序列	SEQ ID NO
A	VH CDR1	NYYMS	237
	VH CDR2	AINSDGGITYYLDTVKG	238
	VH CDR3	HRSGYFSMDY	239
	VL CDR1	KASQNVVSAVA	240
	VL CDR2	SASNRYT	241
	VL CDR3	QQYSNYPWT	242
	VH	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAP EKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSS	7
	VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPG QSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSED FAAYYCQQYSNYPWTFGGGTKVEIK	12
	HC（含C末端赖氨酸）	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAP EKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	243
	HC（不含C末端赖氨酸）	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAP EKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK	244

		ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
	LC	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPG QSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSED FAAYYCQQYSNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	245
B （吉伦妥昔单抗）	VH CDR1	NYYMS	237
	VH CDR2	AINSDGGITYYLDTVKG	238
	VH CDR3	HRSGYFSMDY	239
	VL CDR1	KASQNVVSAVA	240
	VL CDR2	SASNRYT	241
	VL CDR3	QQYSNYPWT	242
	VH	DVKLVESGGGLVKLGGSLKLSCAASGFTFSNYYMSWVRQTP EKRLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MSSLKSEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSS	246
	VL	DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSITCKASQNVVSAVAWYQQKPG QSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSED LADFFCQQYSNYPWTFGGGTKLEIKR	247
	HC	DVKLVESGGGLVKLGGSLKLSCAASGFTFSNYYMSWVRQTP EKRLELVAAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MSSLKSEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	248
	LC	DIVMTQSQRFMSTTVGDRVSITCKASQNVVSAVAWYQQKPG QSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSED LADFFCQQYSNYPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT	249

		EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
C	VH CDR1	SHGMA	250
	VH CDR2	GISNTGRYTNYGSAVKG	251
	VH CDR3	AAVNCVYGCPGSIDA	252
	VL CDR1	SGSSGSYG	253
	VL CDR2	YNDKRPS	254
	VL CDR3	GSADRSGAGI	255
	VH	AVTLDEPGGGLQTPGGTLSLVCKASGFDISSHGMAWVRQAP GKGLEYVAGISNTGRYTNYGSAVKGRATISRDNGQSTVRLQ LNDLRAEDAGTYFCARAAVNCVYGCPGSIDAWGLGTEV IVSS	256
	VL	ALTQPSSVSANLGETVEITCSGSSGSYGWYQQKSPGSAPVT VIYYNDKRPSDIPSRFSGSKSGSTGTLTITGVQAEDEAVYY CGSADRSGAGIFGAGTTLTVL	257
D	VH CDR1	GFTFTSCYIH	258
	VH CDR2	WIYPGNGNTKYNEIFKGR	259
	VH CDR3	GDTTANTMDY	260
	VL CDR1	RASGNIHNYLA	261
	VL CDR2	NTITLAD	262
	VL CDR3	QHFWIPFT	263
	VH	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGFTFTSCYIHWMKQRP GQGLEWIGWIYPGNGNTKYNEIFKGRATLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYFCARGDTTANTMDYWGQGTSVTVS	264
	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQG KSPQLLVYNTITLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPED FGSYYCQHFWIPFTFGAGTKLELK	265
	HC	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGFTFTSCYIHWMKQRP GQGLEWIGWIYPGNGNTKYNEIFKGRATLTTDKSSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYFCARGDTTANTMDYWGQGTSVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE	266

		WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	LC	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQG KSPQLLVYNTITLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQPED FGSYYCQHFWNIPFTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	267
E	VH CDR1	GFTFNTYAMY	268
	VH CDR2	RIRSKSNNYAIYYADSVKD	269
	VH CDR3	GWDWFAY	270
	VL CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	271
	VL CDR2	KVSNRFS	272
	VL CDR3	SQNTHVPPT	273
	VH	EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAP GKGLEWVARIRSKSNNYAIYYADSVKDRFTISRDDSQSMLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRGWDWFAYWGQGTPVTVSA	274
	VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFCSQNTHVPPTFGGGTKLEIK	275
	HC	EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMYWIRQAP GKGLEWVARIRSKSNNYAIYYADSVKDRFTISRDDSQSMLY LQMNNLKTEDTAMYYCVRGWDWFAYWGQGTPVTVSAASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	276
	LC	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFCSQNTHVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	277

F	VH CDR1	GYTFTNYGMN	278
	VH CDR2	WINTYTGEPTYADDFKG	279
	VH CDR3	GGIATPTSY	280
	VL CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN	281
	VL CDR2	LVSKLDS	282
	VL CDR3	CQGTHFPW	283
	VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVQQAP GKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQ INNLKNEDMATYFCARGGIATPTSYWGQGTTLTVSS	284
	VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWL LQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCCQGTHFPWTFGGGTKLEIK	285
	HC	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVQQAP GKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQ INNLKNEDMATYFCARGGIATPTSYWGQGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	286
	LC	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWL LQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCCQGTHFPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	287

[0502] 在一些实施例中,hCAIX结合结构域包含VH,其包含:VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3。在一些实施例中,HCAIX结合结构域包含VL,其包含:VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些实施例中,hCAIX结合结构域包含VH,其包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;VL,其包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0503] 在一些实施例中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列各自包含以下或由以下组成:表17中所示的抗体的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的氨基酸序列。

[0504] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:237的氨基酸序列,或SEQ ID NO:237的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:238的氨基酸序列,或SEQ ID NO:238的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:239的氨基酸序列,或SEQ ID NO:239的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的

氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:240的氨基酸序列,或SEQ ID NO:240的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:241的氨基酸序列,或SEQ ID NO:241的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:242的氨基酸序列,或SEQ ID NO:242的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0505] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:250的氨基酸序列,或SEQ ID NO:250的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:251的氨基酸序列,或SEQ ID NO:251的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:252的氨基酸序列,或SEQ ID NO:252的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:253的氨基酸序列,或SEQ ID NO:253的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:254的氨基酸序列,或SEQ ID NO:254的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:255的氨基酸序列,或SEQ ID NO:255的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0506] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:258的氨基酸序列,或SEQ ID NO:258的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:259的氨基酸序列,或SEQ ID NO:259的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:260的氨基酸序列,或SEQ ID NO:260的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:261的氨基酸序列,或SEQ ID NO:261的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:262的氨基酸序列,或SEQ ID NO:262的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:263的氨基酸序列,或SEQ ID NO:263的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0507] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:268的氨基酸序列,或SEQ ID NO:268的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:269的氨基酸序列,或SEQ ID NO:269的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:270的氨基酸序列,或SEQ ID NO:270的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:271的氨基酸序列,或SEQ ID NO:271的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:272的氨基酸序列,或SEQ ID NO:272的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:273的氨基酸序列,或SEQ ID NO:273的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0508] 在一些实施例中,VH CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:278的氨基酸序列,或SEQ ID NO:278的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:279的氨基酸序列,或SEQ ID NO:279的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VH CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:280的氨基酸序列,或SEQ ID NO:280的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR1的氨基酸序列包含SEQ ID NO:281的氨基酸序列,或SEQ ID NO:281的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;VL CDR2的氨基酸序列包含SEQ ID NO:282的氨基酸序列,或SEQ ID NO:282的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列;以及VL CDR3的氨基酸序列包含SEQ ID NO:283的氨基酸序列,或SEQ ID NO:283的具有1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加等)的氨基酸序列。

[0509] 在一些实施例中,hCAIX结合结构域包含VH和VL。

[0510] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与表17中所示的任何VH多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与表17中所示的任何VL多肽的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0511] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7、246、256、264、274或284中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0512] 在一些实施例中,VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12、247、257、265、275或285中任一个的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0513] 在一些实施例中,VH的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;并且VL的氨基酸序列包含以下或由以下组成:与SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0514] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含重链,其包含与SEQ ID NO:246的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及轻链,其包含与SEQ ID NO:247的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0515] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含重链,其包含与SEQ ID NO:256的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及轻链,其包含与SEQ ID NO:257的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0516] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含重链,其包含与SEQ ID NO:264的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列;以及轻链,其包含与SEQ ID NO:265的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0517] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含重链,其包含与SEQ ID NO:274的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列;以及轻链,其包含与SEQ ID NO:275的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0518] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含重链,其包含与SEQ ID NO:284的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列;以及轻链,其包含与SEQ ID NO:285的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸序列。

[0519] 在一些实施例中,hCAIX结合结构域包含本文所述的人源化抗CAIX抗体的VH、VL或VH和VL(例如参见§5.1.1和表2)。§5.1.1的全部内容通过引用并入本§5.3.3.1中。

[0520] 例如,在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

[0521] 例如,在一些实施例中,VH的氨基酸序列与SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同;并且VL的氨基酸序列与SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列至少85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同。

5.3.4接头

[0522] 本文所述融合蛋白的组分可以直接可操作地连接(例如,通过肽键)或间接可操作地连接(例如,通过肽接头)(例如,hIL-12可以直接或间接可操作地连接到全长)。在一些实施例中,本文所述融合蛋白的组分(例如hIL-12(或其亚基)和抗体(例如全长抗体))通过肽键直接可操作地连接。在一些实施例中,本文所述融合蛋白的组分(例如hIL-12(或其亚基)和抗体(例如全长抗体))通过接头间接可操作地连接。

[0523] 在一些实施例中,肽接头是可切割接头、不可切割接头、柔性接头、刚性接头、螺旋接头和/或非螺旋接头中的一种或任意组合。

[0524] 在一些实施例中,肽接头包含或来自约2-30、5-30、10-30、15-30、20-30、25-30、2-25、5-25、10-25、15-25、20-25、2-20、5-20、10-20、15-20、2-15、5-15、10-15、2-10或5-10个氨基酸残基。在一些实施例中,肽接头包含至少约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基。在一些实施例中,接头包含以下或由以下组成:约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基。在一些实施例中,接头包含以下或由以下组成:不超过约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸残基。

[0525] 在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:甘氨酸、丝氨酸、或甘氨酸和丝氨酸氨基酸残基。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:甘氨酸、丝氨酸和脯氨酸氨基酸残基。

[0526] 在一些实施例中,接头包含卷曲结构域,参见例如US9284375,其全部内容出于所

有目的通过引用并入本文。在一些实施例中,卷曲结构域选自US9284375中披露的那些。在一些实施例中,卷曲结构域包含E-卷曲结构域。在一些实施例中,E-卷曲结构域包含SEQ ID NO:302的氨基酸序列,或SEQ ID NO:302的包含1、2或3个氨基酸修饰的氨基酸序列。在一些实施例中,卷曲结构域是K-卷曲结构域。在一些实施例中,K-卷曲结构域包含SEQ ID NO:303的氨基酸序列,SEQ ID NO:303的包含1、2或3个氨基酸修饰的氨基酸序列。

[0527] 表18中提供了示例性肽接头和卷曲结构域的氨基酸序列,其可以并入本文所述的一个或多个实施例中(例如融合蛋白和多肽)。

表18.示例性肽接头的氨基酸序列

说明	氨基酸序列	SEQ ID NO
接头 A	GGGS	66
接头 B	GGGSGGGS	67
接头 C	GGGSGGGSGGGS	68
接头 D	GGGSGGGSGGGSGGGS	69
接头 E	GGGGS	70
接头 F	GGGGSGGGGS	71
接头 G	GGGGSGGGGSGGGGS	72
接头 H	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	73
接头 I	GGGGGGGS	74
接头 J	GGGGGGGSGGGGGGGS	75
接头 K	GGGGGGGSGGGGGGGSGGGGGGGS	76
接头 L	GGGGGGGSGGGGGGGSGGGGGGGSGGGGGGGS	77

接头 M	SGGGG	78
接头 N	SGGGGSGGGG	79
接头 O	SGGGGSGGGGSGGGG	80
接头 P	SGGGGSGGGGSGGGGSGGGG	81
接头 EE	GGGGGGS	369
接头 Q	LKGKKG	288
接头 R	LKGKKGC	289
接头 S	LQVYYRM	290
接头 T	LQVYYRMC	291
接头 U	VEPKSCGGGS	292
接头 V	VQVHYRM	293
接头 W	YLYLRARV	294
接头 X	FNRGECGGGS	295
接头 Y	LEGEEG	296
接头 Z	LEGEEGC	297
接头 AA	LGEEG	298
接头 BB	LGEEGC	299
接头 CC	LGKKG	300
接头 DD	LGKKGC	301
“E-卷曲”带正电	EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK	302
“K-卷曲”带负电	KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE	303

[0528] 在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的任一接头的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含表18中所示的任一接头的氨基酸序列或由其组成,并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的任一接头的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含表18中所示的任一接头的氨基酸序列或由其组成,并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸取代。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:表18中所示的任一接头的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸取代。

[0529] 在一些实施例中,第一肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81或288-303中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含SEQ ID NO:66-81或288-303中任一个的氨基酸序列或由其组成,并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸修饰(例如,氨基酸取代、缺失或添加)。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、缺失、添加)。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列或

由其组成,并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸取代。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:66-81、288-303或369中任一个的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸取代。

[0530] 在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列或由其组成,并且还包含1个或更多但小于15%(小于12%、小于10%、少于8%)氨基酸取代。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72中任一个的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸修饰(例如,取代、添加、缺失)。在一些实施例中,肽接头的氨基酸序列包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:72中任一个的氨基酸序列,其包含1、2或3个氨基酸取代。

5.3.5结构与方向

[0531] 本文所述的融合蛋白的组分可以以任何构型或顺序排列,只要融合蛋白或多肽的每个组分保持介导其功能的能力。例如,hIL-12蛋白将保持结合hIL-12R的能力。例如,在其中融合蛋白包含抗体(例如抗hCAIX抗体)的实施例中,抗体将保持结合其同源抗原(例如hCAIX)的能力。

5.3.6示例性结构和方向

5.3.6.1示例性全长抗体融合蛋白

[0532] 在一些实施例中,异源部分是全长抗体(例如,抗hCAIX全长抗体),其包含(i)第一Ig轻链,其从N末端到C末端包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL);(ii)第一Ig重链,其从N末端到C末端包含重链可变区(VH)、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;(iii)第二Ig重链,其从N末端到C末端包含VH区、CH1区、铰链区、CH2区和CH3区;(iv)第二Ig轻链,其从N末端到C末端包含VL区和VH区;其中所述第一轻链和所述第一重链相关联形成第一抗原结合结构域;其中所述第二轻链和所述第二重链相关联形成第二抗原结合结构域;并且其中所述第一重链和所述第二重链相关联形成二聚体。

[0533] 在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接到全长抗体的第一Ig重链的CH3区的C末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接到全长抗体的第二Ig重链的CH3区的C末端(参见例如图1)。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的N末端通过肽键直接可操作地连接到全长抗体的第一Ig重链的CH3区的C末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的N末端通过肽键直接可操作地连接到全长抗体的第二Ig重链的CH3区的C末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的N末端通过肽接头间接可操作地连接到全长抗体的第一Ig重链的CH3区的C末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的N末端通过肽接头间接可操作地连接到全长抗体的第二Ig重链的CH3区的C末端。在一些实施例中,(a)全长抗体的第一Ig重链的CH3区的C末端可操作地连接到肽接头的N末端,肽接头的C末端可操作地连接到hIL-12p35多肽的N末端;以及(b)全长抗体的第二Ig重链的CH3区的C末端可操作地连接到肽接头的N末端,肽接头的C末端可操作地连接到hIL-12p35多肽的N末端。示例性肽接头在本文中描述,参见例如§5.3.4,表18,SEQ ID NO:66-81、288-303或369。

[0534] 在一些实施例中,融合蛋白包含全长抗体(例如,抗hCAIX全长抗体),其包含a)第一多肽,其从N末端到C末端包含第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL);第二多肽,其

从N末端到C末端包含第一重链可变区(VH)、第一重链恒定区(CH)、任选的肽接头(例如本文所述的肽接头)和hIL-12p35;第三多肽,其从N末端到C末端包含第二VH、第二CH、任选的肽接头(例如本文所述的肽接头)和hIL-12p40;以及第四多肽,其从N末端到C末端包含第二VL和第二CL;其中第一多肽和第二多肽相关联形成第一抗原结合结构域(例如,特异性结合hCAIX的),并且第三多肽和第四多肽相关联形成特异性结合hCAIX的第二抗原结合结构域。在一些实施例中,第一CH区从N末端到C末端包含CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。在一些实施例中,第二CH区从N末端到C末端包含CH1区、铰链区、CH2区和CH3区。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第二多肽和第三多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第三多肽和第四多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一重链和第二重链各自包含至少一个促进第一重链与第二重链异二聚化的氨基酸修饰。在一些实施例中,第一重链的CH3结构域和第二重链的CH3结构域各自包含至少一个促进第一重链与第二重链异二聚化的氨基酸修饰。

[0535] 在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中全长抗体的第一或第二Ig重链的CH3区的C末端可操作地连接至hscIL-12多肽的N末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中全长抗体的第一或第二Ig重链的CH3区的C末端通过肽键直接可操作地连接到hscIL-12多肽的N末端(参见例如图2)。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中全长抗体的第一或第二Ig重链的CH3区的C末端通过肽接头间接可操作地连接至hscIL-12多肽的N末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中全长抗体的第一或第二Ig重链的CH3区的C末端直接可操作地连接到肽接头的N末端,肽接头的C末端直接可操作地连接到hscIL-12多肽的N末端。示例性肽接头在本文中描述,参见例如§5.3.4,表18,SEQ ID NO:66-81、288-303或369。

[0536] 在一些实施例中,全长抗体(例如,抗hCAIX全长抗体)包含a)第一多肽,其从N末端到C末端包含第一轻链可变区(VL)和第一轻链恒定区(CL);第二多肽,其从N末端到C末端包含第一重链可变区(VH)、第一重链恒定区(CH)和scIL-12;第三多肽,其从N末端到C末端包含第二VH和第二CH;以及第四多肽,其从N末端到C末端包含第二VL和第二CL。在一些实施例中,第一CH区从N末端到C末端包含CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些实施例中,第二CH区从N末端到C末端包含CH1结构域、铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第二多肽和第三多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第三多肽和第四多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一CH和第二CH各自包含促进第一CH和第二CH异二聚化的氨基酸修饰。

5.3.6.2示例性Fc融合蛋白

[0537] 在一些实施例中,融合蛋白包含第一Fc区和第二Fc区,其中第一和第二Fc区相关联形成二聚体。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的N末端可操作地连接到第一Fc区的CH3区的C末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的N末端可操作地连接到第二Fc区的CH3区的C末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的N末端通过肽键直接可操作地连接到第一Fc区的CH3区的C末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的N末端通过肽键直接可操作地连接到第二Fc区的CH3区的C末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-

12p35多肽的N末端通过肽接头间接可操作地连接到第一Fc区的CH3区的C末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的N末端通过肽接头间接可操作地连接到第二Fc区的CH3区的C末端。在一些实施例中,(a)第一Fc区的CH3区的C末端可操作地连接至肽接头的N末端,肽接头的C末端可操作地连接至hIL-12p35多肽的N末端;并且(b)第二Fc区的CH3区的C末端可操作地连接至肽接头的N末端,肽接头的C末端可操作地连接至hIL-12p35多肽的N末端。示例性肽接头在本文中描述,参见例如§5.3.4,表18,SEQ ID NO:66-81、288-303或369。

[0538] 在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的CH3区的C末端可操作地连接到hscIL-12多肽的N末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的CH3区的C末端通过肽键直接可操作地连接至hscIL-12多肽的N末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的CH3区的C末端通过肽接头间接可操作地连接至hscIL-12多肽的N末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的CH3区的C末端直接可操作地连接至肽接头的N末端,肽接头的C末端直接可操作地连接至hscIL-12多肽的N末端。示例性肽接头在本文中描述,参见例如§5.3.4,表18,SEQ ID NO:66-81、288-303或369。

[0539] 在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的C末端可操作地连接到第一Fc区的N末端,hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的C末端可操作地连接到第二Fc区的N末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的C末端通过肽键直接可操作地连接到第一Fc区的N末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的C末端通过肽键直接可操作地连接到第二Fc区的N末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白的hIL-12p35多肽的C末端通过肽接头间接可操作地连接到第一Fc区的N末端,并且hIL-12蛋白的hIL-12p40多肽的C末端通过肽接头间接可操作地连接到第二Fc区的N末端。在一些实施例中,(a)第一Fc区的N末端可操作地连接至肽接头的C末端,肽接头的N末端可操作地连接至hIL-12p35多肽的C末端;并且(b)第二Fc区的N末端可操作地连接至肽接头的C末端,肽接头的N末端可操作地连接至hIL-12p35多肽的C末端。示例性肽接头在本文中描述,参见例如§5.3.4,表18,SEQ ID NO:66-81、288-303或369。

[0540] 在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的N末端可操作地连接至hscIL-12多肽的C末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的N末端通过肽键直接可操作地连接至hscIL-12多肽的C末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的N末端通过肽接头间接可操作地连接至hscIL-12多肽的C末端。在一些实施例中,hIL-12蛋白是schIL-12蛋白(例如,本文所述的schIL-12蛋白),其中第一或第二Fc区的N末端直接可操作地连接至肽接头的C末端,肽接头的C末端直接可操作地连接至hscIL-12多肽的C末端。示例性肽接头在本文中描述,参见例如§5.3.4,表18,SEQ ID NO:66-81、288-303或369。

5.3.6.3示例性ScFv-Fc融合蛋白

[0541] 在一些实施例中,融合蛋白包含可操作地连接至第一Fc区的N末端的第一scFv;和可操作地连接至第二Fc区的N末端的第二scFv;并且其中hIL-12p35可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且IL-12p40可操作地连接至第二Fc区的C末端。例如参见图3。

[0542] 在一些实施例中,融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含第一scFv、第一Fc区、任选的第一肽接头和IL-12p35;以及第二多肽,其从N末端到C末端包含第二scFv、第二Fc区、任选的第二肽接头和IL-12p40。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰。

[0543] 在一些实施例中,融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含第一scFv、第一肽接头、第一Fc区、第二肽接头和IL-12p35;和第二多肽,其从N末端到C末端包含第二scFv、第三肽接头、第二Fc区、第四肽接头和IL-12p40。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰。

5.3.6.4示例性Dart Fc融合蛋白

[0544] 在一些实施例中,融合蛋白包含可操作地连接至第一Fc区的N末端的DART的第一多肽(即,包含DART的第一VH和VL的多肽);以及可操作地连接至第二Fc区的N末端的DART的第二多肽(例如,包含DART的第二VH和VL的多肽);其中hIL-12p35可操作地连接至第一Fc区的C末端;并且IL-12p40可操作地连接至第二Fc区的C末端。例如参见图6。

[0545] 在一些实施例中,所述融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含DART的第一VL和第一VH、第一Fc区和IL-12p35;以及第二多肽,其从N末端到C末端包含DART的第二VL和第二VH、第二Fc区和IL-12p40;其中第一VL与第二VH相关联以形成第一抗原结合结构域,并且第二VL与第一VH相关联以形成第二抗原结合结构域。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰。

[0546] 在一些实施例中,所述融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含DART的第一VH和第一VL、第一Fc区和IL-12p35;以及第二多肽,其从N末端到C末端包含DART的第二VH和第二VL、第二Fc区和IL-12p40;其中第一VL与第二VH相关联以形成第一抗原结合结构域,并且第二VL与第一VH相关联以形成第二抗原结合结构域。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰。

5.3.6.5示例性串联ScFv scIL-12Fc融合蛋白

[0547] 在一些实施例中,融合蛋白包含串联地可操作地连接的并且进一步可操作地连接至第一Fc区的N末端的两个scFv抗原结合结构域;和可操作地连接至第二Fc区的N末端的scIL-12。例如参见图7。

[0548] 在一些实施例中,融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含第一scFv、第二scFv和第一Fc区;和第二多肽,其从N末端到C末端包含scIL-12、任选的肽接头和第二Fc区。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰。

[0549] 在一些实施例中,融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含第一scFv、第一肽接头、第二scFv、第二肽接头和第一Fc区;和第二多肽,其从N末端到C末端包含scIL-12、任选的第三接头和第二Fc区。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化

的氨基酸修饰。

5.3.6.6示例性串联ScFv sdAb scIL-12Fc融合蛋白

[0550] 在一些实施例中,融合蛋白包含串联地可操作地连接的并且进一步可操作地连接至第一Fc区的N末端的两个scFv抗原结合结构域;和可操作地连接至第二Fc区的第一单结构域抗体(sdAb),以及可操作地连接至sdAb的N末端的scIL-12。例如参见图8。

[0551] 在一些实施例中,融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含第一scFv、第二scFv和第一Fc区;和第二多肽,其从N末端到C末端包含scIL-12、任选的第一肽接头、单结构域抗体、任选的第二肽接头和第二Fc区。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰。

[0552] 在一些实施例中,融合蛋白包含第一多肽,其从N末端到C末端包含第一scFv、第一肽接头、第二scFv、第二肽接头和第一Fc区;和第二多肽,其从N末端到C末端包含scIL-12、第三肽接头、单结构域抗体、第四肽接头和第二Fc区。在一些实施例中,第一多肽和第二多肽通过至少一个二硫键连接。在一些实施例中,第一Fc区和第二Fc区各自包含促进第一Fc区和第二Fc区异二聚化的氨基酸修饰。

5.3.7示例性融合蛋白和多肽

[0553] 表20中提供了本文所述的示例性抗hCAIX hIL-12融合多肽和蛋白质的氨基酸序列。表20中提供的抗hCAIX hIL-12融合多肽和蛋白质仅是示例性的,并且不旨在进行限制。

[0554] 表20中提供的一种或多种示例性抗hCAIX hIL-12融合蛋白共有的轻链和重链区的氨基酸序列提供于表19中。

表19.一种或多种示例性抗hCAIX hIL-12融合蛋白和多肽共有的轻链和重链区的氨基酸序列

说明	SEQ ID NO	氨基酸序列
重链 – 杵 IL-12p40	304	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAIN SDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYF SMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGS*IWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLR CEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRG DNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
重链 – 白 IL-12p35	305	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAIN SDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYF SMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH

		QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGS*RNLP VATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYED LKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
重链 – 白	306	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAIN SDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYF SMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
轻链	245	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSAS NRYTGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYSNYPWTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

[0555] 如上所述,表20中提供了本文所述的示例性抗hCAIX hIL-12融合多肽和蛋白质的氨基酸序列。表20中提供的抗hCAIX hIL-12融合多肽和蛋白质仅是示例性的,并且不旨在进行限制。

表20.示例性抗hCAIX hIL-12融合蛋白和多肽的氨基酸序列

说明		SEQ ID NO	氨基酸序列
BCA316（BCA351）*参见例如图1*	重链（HC）（杵） IL-12p40	304	*参见表*19。
	HC（白） IL-12p35	305	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG

			VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	轻链 (LC)	245	*参见表* 19。
BCA307.16 *参见例如图* 1	重链 (杵) IL-12p40	304	*参见表* 19。
	重链 (白) IL-12p35 (变体 A)	307	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKNESCLNSR ETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLE EPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA308.16	重链 (杵)	304	*参见表* 19。

参见例如图1	IL-12p40		
	重链（白） IL-12p35（变体B）	308	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLKHY SCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPHRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDP YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	轻链	245	*参见表*19。
BCA323.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40	304	*参见表*19。
	重链（白） IL-12p35（变体C）	309	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL

			MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDA AKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA324.16 *参见例如图* 1	重链（杵） IL-12p40	304	*参见表* 19。
	重链（白） IL-12p35（变体 D）	310	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDA YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA325.16 *参见例如图* 1	重链（杵） IL-12p40	304	*参见表* 19。
	重链（白） IL-12p35（变体 E）	311	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD

			IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF AKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA309.16 *参见例如图* 1	重链（杵） IL-12p40（变体 A）	312	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGASAAEAADAVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA310.16:	重链（杵）	313	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN

参见例如图1	IL-12p40（变体B）		TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*FLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQG VTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIE VMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQ VEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDK TSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA311.16: *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体C）	314	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GSI*WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEEIES
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。

BCA317: *参见例如图1*	重链 （杵） IL-12p40 （变体 D）	315	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKKFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQEEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKEDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA318.16 *参见例如图1*	重链 （杵） IL-12p40 （变体 E）	316	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL

			HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEEIESIKSMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA319.16 *参见例如图* 1	重链 (杵) IL-12p40 (变体 F)	317	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEEIVSIKIMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA320.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体G）	318	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEEIQSIKGMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA321.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体H）	319	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL

			HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHIKYENYTSSFFIRD IIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA322.16 *参见例如图* 1	重链 （杵） IL-12p40 （变体 I）	320	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHSITSANYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA326.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体J）	321	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA327.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体K）	322	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL

			HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA328.16 *参见例如图* 1	重链 (杵) IL-12p40 (变体 L)	323	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA329.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体M）	324	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYAAAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA330.16（BCA376） *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体N）	325	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL

			HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA331.16 （BCA356） *参见例如图* 1	重链 （杵） IL-12p40 （变体 O）	326	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA332.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体P）	327	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA333.16 *参见例如图1*	重链（杵） IL-12p40（变体Q）	328	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL

			HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA334.16 *参见例如图* 1	重链 (杵) IL-12p40 (变体 R)	329	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGG* *GS*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVAALAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA335.16（BCA373） 参见例如图1	重链（杵） hIL-12p40变体T	330	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白） IL-12p35	305	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA336.16（BCA374） 参见例如图1	重链（杵） hIL-12p40变体U	331	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT

			TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA337.16 （BCA375） *参见例如图* 1	重链 （杵） hIL-12p40 变体 V	332	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA338.16	重链 （杵） hIL-12p40	333	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN

参见例如图1	变体 W		TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA339.16 *参见例如图1*	重链 （杵） hIL-12p40 变体 X	334	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS

	重链（白）IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA340.16 *参见例如图* 1	重链（杵）hIL-12p40 变体 Y	335	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白）IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA341.16（BCA377）*参见例如图* 1	重链（杵）hIL-12p40 变体 Z	336	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

			QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA342.16 （BCA378） *参见例如图* 1	重链 （杵） hIL-12p40 变体 AA	337	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA343.16 *参见例如图1*	重链 (杵) hIL-12p40 变体 BB	338	VRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPEK RLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGG SIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLD QSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLH AKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEY SVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRD IIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY SSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA344.16 *参见例如图1*	重链 (杵) hIL-12p40 变体 CC	339	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT

			TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA345.16 （BCA369） *参见例如图* 1	重链 （杵） hIL-12p40 变体 DD	340	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 （白） IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA346.16 （BCA370）	重链 （杵） hIL-12p40	341	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN

参见例如图1	变体 EE		TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白）IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA347.16 *参见例如图1*	重链（杵）hIL-12p40 变体 FF	342	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HAKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS

	重链（白）IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA348.16（BCA371） *参见例如图* 1	重链（杵）hIL-12p40 变体 GG	343	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链（白）IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA349.16（BCA372） *参见例如图* 1	重链（杵）hIL-12p40 变体 HH	344	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

			QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIR DIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCS
	重链 (白) IL-12p35	305	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA315 ***参见例如图2***	重链 (杵) scIL-12	345	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS*GGGGGGS*IWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS

	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA307 *参见例如图* 2	重链（杵） scIL-12（IL-12p35 变体 A）	346	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKNESCLNSR ETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLE EPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGS IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHK KEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFC VQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA308 *参见例如图* 2	重链（杵） scIL-12（IL-12p35 变体 B）	347	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

			TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLKHY SCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPHRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDP YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 （白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA323: *参见例如图* 2	重链 （杵） scIL-12 （IL-12p35 变体 C）	348	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDA AKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG

			IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 （白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA324 *参见例如图* 2	重链 （杵） scIL-12 （IL-12p35 变体 D）	349	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDA YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 （白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA325 参见例如图2	重链（杵） scIL-12（IL-12p35变体E）	350	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF AKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链（臼）	306	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA309 参见例如图2	重链（杵） scIL-12（IL-12p40变体A）	351	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

			QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GASAAEAADAVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 （白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA310 *参见例如图* 2	重链 （杵） scIL-12 （IL-12p40 变体 B）	352	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSFLRC EAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAA TLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV HKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE

			YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVI CRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	重链 （白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA311 *参见例如图2*	重链 （杵） scIL-12 （IL-12p35 变体 C）	353	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEEIES
	重链 （白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA312 *参见例如图2*	重链 （杵） scIL-12 （IL-12p40 变体 S）	354	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

			TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLSIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 （白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA318 *参见例如图* 2	重链 （杵） scIL-12 （IL-12p40 变体 E）	355	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG

			IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEEIESIKSMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 (白)	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA319 *参见例如图* 2	重链 (杵) scIL-12 (IL-12p40 变体 F)	356	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEEIVSIKIMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 (白)	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

BCA320 参见例如图2	重链（杵） scIL-12（IL-12p40变体G）	357	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEEIQSIKGMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链（白）	306	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA321 参见例如图2	重链（杵） scIL-12（IL-12p40变体H）	358	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

			QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHIKYENYTSSFFIRDIIKPDP PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQG KSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCS
	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA322 *参见例如图2*	重链（杵） scIL-12（IL-12p40变体I）	359	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ

			EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHSITSANYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 (白)	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA326 *参见例如图2*	重链 (杵) scIL-12 (IL-12p40 变体 J)	360	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 (白)	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA327	重链 (杵)	361	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS

参见例如图2	scIL-12（IL-12p40变体A）		VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链（白）	306	*参见表*19。
	轻链	245	*参见表*19。
BCA328 *参见例如图2*	重链（杵） scIL-12（IL-12p40变体L）	362	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF

			ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 (白)	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA329 *参见例如图* 2	重链 (杵) scIL-12 (IL-12p40 变体 M)	363	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGS* RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFIT NGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMD PKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYK TKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWELKK DVYVVELDWYAAAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLG SGKTLTIQVKAAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIW STDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTF SVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPP KNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK

			SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW ASVPCS
	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA330 *参见例如图* 2	重链（杵） scIL-12（IL-12p40 变体 N）	364	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS	
	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA331	重链（杵）	365	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS

参见例如图2	scIL-12（IL-12p40变体O）		VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA332 *参见例如图2*	重链（杵） scIL-12（IL-12p40变体P）	366	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY

			PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHALAYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链 (白)	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA333.16 *参见例如图* 2	重链 (杵) scIL-12 (IL-12p40 变体 Q)	367	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG* *GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHAKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ

			GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。
BCA334 *参见例如图2*	重链（杵） scIL-12（IL-12p40变体R）	368	EVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWIRQAPE KRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGTSVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGG GS*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDF YKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGGGSIWEL KKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDG IWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQ EDSACPAAEESLPIEVMVDAVAALAYENYTSSFFIRDIIKPD PPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQ GKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWS EWASVPCS
	重链（白）	306	*参见表* 19。
	轻链	245	*参见表* 19。

[0556] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:304的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0557] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:304的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:307的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0558] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:304的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:308的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0559] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:304的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:309的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0560] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:304的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:310的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0561] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:304的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:311的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0562] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:312的氨基酸

序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0563] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:313的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0564] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:314的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0565] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:315的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0566] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:316的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0567] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:317的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0568] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序

列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:318的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0569] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:319的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0570] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:320的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0571] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:321的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0572] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:322的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0573] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:323的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;

以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0574] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:324的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0575] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:325的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0576] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:326的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0577] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:327的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0578] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:328的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0579] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第

一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:329的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0580] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:330的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0581] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:331的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0582] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:332的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0583] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:333的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0584] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:334的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、

95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0585] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:335的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0586] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:336的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0587] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:337的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0588] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:338的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0589] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:339的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0590] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、

96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:340的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0591] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:341的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0592] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:342的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0593] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:343的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0594] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:305的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:344的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0595] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:345的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0596] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:346的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0597] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:347的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0598] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:348的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0599] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:349的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0600] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:350的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0601] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:351的氨基酸

序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0602] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:352的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0603] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:353的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0604] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:354的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0605] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:355的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0606] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:356的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0607] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序

列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:357的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0608] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:358的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0609] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:359的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0610] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:360的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0611] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:361的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸。

[0612] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:362的氨基酸序列至少90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的氨基酸;

以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0613] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:363的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0614] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:364的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0615] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:365的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0616] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:366的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0617] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:367的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

[0618] 在一些实施例中,抗CAIX抗体包含第一轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第

一重链,其包含与SEQ ID NO:306的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;第二重链,其包含与SEQ ID NO:368的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸;以及第二轻链,其包含与SEQ ID NO:245的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸。

5.4制备多肽和蛋白质的方法

[0619] 本文所述的hIL-12p40蛋白、hIL-12p35蛋白、schIL-12蛋白、抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)和hIL-12融合蛋白(或任何(例如一个或多个多肽)可以使用本领域已知的标准方法产生。例如,各自都可以通过重组技术在已经用核酸表达载体(例如质粒、病毒载体(例如杆状病毒表达载体))转染或转导的宿主细胞(例如昆虫细胞、哺乳动物细胞、细菌)中产生,所述核酸表达载体编码hIL-12p40蛋白、hIL-12p35蛋白、sch-IL-12蛋白、抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)或hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)。这些一般方法是本领域的公知知识。表达载体通常含有表达盒,所述表达盒包括能够引起编码目的蛋白质或多肽的核酸分子表达的核酸序列,例如一个或多个启动子、一个或多个增强子、聚腺苷酸化信号等。本领域普通技术人员知道,各种启动子和增强子元件可用于获得核酸分子在宿主细胞中的表达。例如,启动子可以是组成型的或受调控的,并且可以从各种来源获得,例如病毒、原核或真核来源或人工设计的。转染或转导后,在有利于编码抗原肽或蛋白质的核酸分子表达的条件下培养含有编码目的蛋白质或多肽的表达载体的宿主细胞。培养基可从不同的供应商获得,并且可以常规地选择合适的培养基以使宿主细胞表达目的蛋白质或多肽。宿主细胞可以是贴壁或悬浮培养物,并且本领域普通技术人员可以针对所选的特定宿主细胞优化培养方法。例如,悬浮细胞可以在例如比如分批工艺或补料分批工艺中的生物反应器中培养。许多哺乳动物细胞系是本领域已知的并且包括可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系,例如但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、CHO悬浮细胞(CHO-S)、HeLa细胞、HEK293、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、VERO、HepG2、MadinDarby牛肾(MDBK)细胞、NOS、U2OS、A549、HT1080、CAD、P19、NIH3T3、L929、N2a、MCF-7、Y79、SO-Rb50、DUKX-X11和J558L。在一些实施例中,融合蛋白在CHO或CHO-S细胞中产生。

[0620] 所产生的蛋白质或多肽可以通过例如以流通或结合和洗脱模式的柱色谱从细胞培养物中分离。实例包括但不限于离子交换树脂和亲和树脂,例如扁豆凝集素琼脂糖凝胶,以及混合模式阳离子交换-疏水相互作用柱(CEX-HIC)。可以浓缩蛋白质或多肽,通过超滤进行缓冲液交换,并且可以通过适当的过滤器例如0.22μm过滤器过滤来自超滤的保留物。参见,例如,Hacker,David(编辑),Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology)[哺乳动物细胞中的重组蛋白表达:方法和方案(分子生物学方法)],Humana Press(2018)[哈玛纳出版社];和McPherson等人,“Development of a SARS Coronavirus Vaccine from Recombinant Spike Protein Plus Delta Inulin Adjuvant[重组刺突蛋白加δ菊粉佐剂制备SARS冠状病毒疫苗],”第4章,在Sunil Thomas(编辑),Vaccine Design:Methods and Protocols:Volume 1:Vaccines for Human Diseases[疫苗设计:方法和方案:第1卷:人类疾病疫苗],Methods in Molecular Biology[分子生物学方法],斯普林格出版社,纽约,2016。另请参

见美国专利5,762,939,出于所有目的,其每一篇的完整内容通过引用并入本文。

[0621] 本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的sch-IL12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽),以及本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)可以合成产生。

[0622] 本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、sch-IL12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)或本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)的氨基酸序列可以测定,即通过埃德曼降解的重复循环,随后通过HPLC进行氨基酸分析。氨基酸测序的其他方法也是本领域已知的。一旦纯化,可以使用本领域已知的和本文描述的标准测定法(例如免疫测定法,例如ELISA、基于细胞的测定法)评估蛋白质的功能性,参见例如实例4-15和21-23。例如,本文所述的抗体hIL-12融合蛋白的双功能性可以使用双功能ELISA来评估。

5.5多核苷酸、载体、载剂和宿主细胞

[0623] 一方面,本文提供了编码本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的sch-IL12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)或本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)的多核苷酸(例如DNA、RNA)。在一些实施例中,多核苷酸是DNA多核苷酸或RNA多核苷酸。在一些实施例中,多核苷酸是mRNA多核苷酸。

[0624] 在一些实施例中,多核苷酸是密码子优化的。密码子优化可用于匹配靶标生物体和宿主生物体中的密码子频率,以确保正确折叠;偏向鸟苷(G)和/或胞嘧啶I含量以增加核酸稳定性;尽量减少可能损害基因构建或表达的串联重复密码子或碱基段;定制转录和翻译控制区域;插入或去除蛋白质运输序列;去除/添加编码蛋白中的翻译后改变位点(例如,糖基化位点);添加、去除或改组蛋白质结构域;插入或缺失限制位点;修饰核糖体结合位点和mRNA降解位点;调整翻译速率以允许蛋白质的各个结构域正确折叠;或者减少或消除多核苷酸内的问题二级结构。在一些实施例中,密码子优化的核酸序列显示上述的一种或多种(与参考核酸序列相比)。在一些实施例中,与参考核酸序列相比,密码子优化的核酸序列显示出以下中的一种或多种:改善的体外降解抗性、改善的体外稳定性、减少的二级结构和/或改善的体外可翻译性。密码子优化方法、工具、算法和服务是本领域已知的,非限制性示例包括来自GeneArt(生命科技公司(Life Technologies))和DNA2.0(加利福尼亚州门洛帕克)的服务。在一些实施例中,使用优化算法来优化开放阅读框(ORF)序列。在一些实施例中,修饰核酸序列以与参考核酸序列相比优化G和/或C核苷酸的数量。G和C核苷酸数量的增加可以通过用含有G或C核苷酸的密码子取代含有腺苷(T)或胸苷(T)(或尿嘧啶(U))核苷酸的密码子来产生。

[0625] 一方面,本文提供了包含本文所述多核苷酸(例如,编码本文所述hIL-12p40蛋白、本文所述hIL-12p35蛋白、本文所述schIL-12蛋白、本文所述抗hCAIX抗体(或其任何(例如,一个或多个)多肽、或本文所述hIL-12融合蛋白(或其任何(例如,一个或多个)多肽的多核苷酸)的载体。在一些实施例中,载体是病毒载体。在一些实施例中,载体是非病毒载体(例如,质粒)。

[0626] 一方面,本文提供了包含本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的sch-IL12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)或

本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸或本文所述的载体的载剂。载剂包括但不限于基于脂质的载剂,例如脂质纳米颗粒(LNP)、脂质体、脂质复合物或纳米脂质体。在一些实施例中,载剂是LNP,例如,本文所述的LNP。

[0627] 一方面,本文提供了包含本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的schIL-12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)或本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、或本文所述的载剂的宿主细胞。

5.6药物组合物

[0628] 一方面,本文提供了药物组合物,其包含本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的schIL-12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)或本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞或本文所述的载剂以及药学上可接受的赋形剂(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿制药科学](1990)Mack Publishing Co.[麦克出版公司],伊斯顿,宾夕法尼亚州,其全部内容出于所有目的通过引用并入本文)。

[0629] 一方面,本文还提供了制备本文所述药物组合物的方法,所述方法包括提供本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的schIL-12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽、或本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞或本文所述的载剂,并且通过添加一种或多种药学上可接受的赋形剂将其配制成药学上可接受的组合物。

[0630] 可接受的赋形剂(例如载剂和稳定剂)优选在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐或其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸或甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;或间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖、二糖或其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖类,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,例如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0631] 药物组合物可以配制用于向受试者施用的任何途径。非限制性实施例包括肠胃外施用,例如肌内、皮内、皮下、经皮或粘膜施用,例如吸入、鼻内、口服等。在一个实施例中,药物组合物被配制用于通过肌内、皮内或皮下注射施用。在一个实施例中,药物组合物被配制用于通过肌内注射施用。在一个实施例中,药物组合物被配制用于通过皮内注射施用。在一个实施例中,药物组合物被配制用于通过皮下注射施用。注射剂可以以常规形式制备,例如液体溶液或悬浮液。注射剂可含有一种或多种赋形剂。示例性赋形剂包括例如水、盐水、葡萄糖、甘油或乙醇。另外,如果期望,待施用的药物组合物还可以含有少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂或其他这样的试剂,例如乙酸钠、脱

水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或环糊精。在一些实施例中,药物组合物被配制为单剂量。在一些实施例中,药物组合物配制为多剂量。

[0632] 用于本文所述的肠胃外制剂中的药学上可接受的赋形剂包括例如水性媒剂、非水性媒剂、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、多价螯合剂或螯合剂或其他药学上可接受的物质。可以掺入本文所述的一种或多种配制品中的水性媒剂的实例包括氯化钠注射液、林格注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖或乳酸盐林格注射液。可以掺入本文所述的一种或多种配制品中的非水性肠胃外媒剂包括植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油。可以将抑细菌或抑真菌浓度的抗微生物剂添加到本文所述的肠胃外制剂中并包装在多剂量容器中,其包括苯酚或甲酚、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵或苄索氯铵。可掺入本文所述的一种或多种配制品中的等渗剂包括氯化钠或葡萄糖。可掺入本文所述的一种或多种配制品中的缓冲剂包括磷酸盐或柠檬酸盐。可掺入本文所述的一种或多种配制品中的抗氧化剂包括硫酸氢钠。可掺入本文所述的一种或多种配制品中的局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。可掺入本文所述的一种或多种配制品中的悬浮剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮。可以掺入本文所述的一种或多种配制品中的乳化剂包括聚山梨醇酯80(TWEEN®80)。可掺入本文所述的一种或多种配制品中的金属离子多价螯合剂或螯合剂是EDTA。可以掺入本文所述的一种或多种配制品中的药物载剂还包括用于水混溶性媒剂的乙醇、聚乙二醇或丙二醇;或用于调节pH的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0633] 药物组合物中使用的精确剂量还取决于施用途径以及由其引起的病症的严重性,并且应当根据从业者的判断和每个受试者的情况来决定。例如,有效剂量还可以根据施用手段、靶标部位、受试者的生理状态(包括年龄、体重和健康状况)、施用的其他药物或者治疗是预防性的还是治疗性的而变化。优选滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

5.7使用方法

[0634] 本文提供了利用本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的schIL-12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂和本文所述的药物组合物的各种方法。在一些实施例中,所述方法包括向受试者施用本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的schIL-12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物。示例性受试者包括哺乳动物,例如人,非人哺乳动物,例如非人灵长类动物。在一些实施例中,受试者是人。

[0635] 根据本文所述的任何方法施用给受试者的本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的schIL-12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如,一个或多个)多肽)、本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如,一个或多个))多肽、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物的剂量可以根据本领域普通技术人员已知的标准技术来确定,包括施用途径、受试

者的年龄和体重以及所用佐剂的类型(如果有的话)。

5.7.1递送方法

[0636] 一方面,本文提供以下的方法:递送(i)本文所述的hIL-12p40蛋白、(ii)本文所述的hIL-12p35蛋白、(iii)本文所述的schIL-12蛋白、(iv)本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个))多肽),(v)本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个))多肽);(vi)本文所述的多核苷酸;(vii)本文所述的载体;(viii)本文所述的宿主细胞;(ix)本文所述的载剂;或(x)本文所述的药物组合物给受试者,所述方法包括向受试者施用本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个))多肽、hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个))多肽、多核苷酸、载体、宿主细胞、载剂或药物组合物,其量或时间足以将本文所述的hIL-12p40蛋白、本文所述的hIL-12p35蛋白、本文所述的schIL-12蛋白、本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个))多肽、hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个))多肽、多核苷酸、载体、宿主细胞、载剂或药物组合物递送至受试者。

5.7.2刺激NK细胞功能的T细胞的方法

[0637] 一方面,本文提供了刺激受试者中的T细胞或NK细胞效应子功能的方法,所述方法包括i)本文所述的hIL-12p40蛋白,(ii)本文所述的hIL-12p35蛋白,(iii)本文所述的schIL-12蛋白,(iv)本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个))多肽),(v)本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个))多肽);(vi)本文所述的多核苷酸;(vii)本文所述的载体;(viii)本文所述的宿主细胞;(ix)本文所述的载剂;或(x)本文所述的药物组合物施用给受试者,其量和时间足以刺激受试者中的T细胞或NK细胞效应子功能。在一些实施例中,效应子功能是细胞因子(例如,IFN-γ)的分泌。相关效应子功能可以通过本领域已知和本文所述的常用方法来评估(参见例如§6),例如可以使用ELISA进行IFN-γ分泌的评估,参见,例如,§6.5和6.6。

5.7.3预防或治疗癌症的方法

[0638] 一方面,本文提供了预防或治疗受试者中的癌症的方法,所述方法包括i)本文所述的hIL-12p40蛋白,(ii)本文所述的hIL-12p35蛋白,(iii)本文所述的schIL-12蛋白,(iv)本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个))多肽),(v)本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个))多肽);(vi)本文所述的多核苷酸;(vii)本文所述的载体;(viii)本文所述的宿主细胞;(ix)本文所述的载剂;或(x)本文所述的药物组合物施用给受试者,其量和时间足以预防或治疗受试者中的癌症。

[0639] 一方面,本文提供治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括:接收确定来自受试者的样品中存在可溶性CAIX的测试结果,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞);诊断受试者患有包含表达CAIX的癌细胞的癌症;以及施用(i)本文所述的hIL-12p40蛋白、(ii)本文所述的hIL-12p35蛋白、(iii)本文所述的schIL-12蛋白、(iv)本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个))多肽),(v)本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个))多肽);(vi)本文所述的多核苷酸;(vii)本文所述的载体;(viii)本文所述的宿主细胞;(ix)本文所述的载剂;或(x)药物组合物给受试者,其量和时间足以治疗受试者中的实体癌。

[0640] 在一些实施例中,癌症是转移性的。在一些实施例中,癌症是复发性的。在一些实

施例中,癌症是转移性的和复发性的。在一些实施例中,癌症对于批准的标准护理是难治性的。在一些实施例中,癌症对于至少一种批准的标准护理是难治性的。在一些实施例中,癌症对至少所有批准的标准护理疗法是难治性的。

[0641] 在一些实施例中,癌症是实体癌。在一些实施例中,癌症是血液恶性肿瘤。在一些实施例中,疾病是癌症。在一些实施例中,癌症是血液恶性肿瘤。示例性血液恶性肿瘤包括但不限于白血病(例如急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤)或骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)。

[0642] 在一些实施例中,癌症是上皮来源的癌症。在一些实施例中,癌症是实体癌。示例性实体瘤癌症包括但不限于肺癌、中枢神经系统癌(例如脑癌或脊髓癌,例如星形细胞瘤、胶质母细胞瘤)、乳腺癌、结直肠癌、结肠癌、直肠癌、食管癌、肾癌(kidney cancer)、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、皮肤癌、膀胱癌、子宫癌、脑癌、子宫内膜癌、唇癌、口腔癌、间皮瘤、肉瘤、甲状腺癌、胸腺癌、肾癌(renal cancer)、肛门癌、头癌、颈癌和头颈癌。

[0643] 在一些实施例中,癌症是肾细胞癌、小肠癌、结直肠癌、膀胱癌、胃腺癌、非小细胞肺癌、食管癌、宫颈癌、小细胞肺癌、头颈癌、黑素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、子宫内膜癌、胃肠道间质瘤、胃食管交界处癌、三阴性乳腺癌或胰腺腺癌。

[0644] 在一些实施例中,癌症是肾癌(例如,肾细胞癌)、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/食管胃交界处(GEJ)癌、中枢神经系统癌(例如,脑癌或脊髓癌,例如胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、肺癌(例如小细胞肺癌)或胃肠道癌。

[0645] 在一些实施例中,癌细胞在细胞表面表达hCAIX。在一些实施例中,癌症已被鉴定为在细胞表面上表达hCAIX。在一些实施例中,癌细胞样品(例如活组织检查)已确定样品中的至少一部分细胞在细胞表面表达hCAIX。在一些实施例中,所述方法包括鉴定癌组织样品(例如活组织检查)中的至少一部分癌细胞在细胞表面上表达hCAIX。

[0646] 在一些实施例中,使用本文披露的方法代替标准护理疗法。在某些实施例中,标准护理疗法与本文披露的任何方法组合使用。用于不同类型癌症的标准护理疗法是本领域技术人员众所周知的。例如,美国国家综合癌症网络(NCCN)是美国21个主要癌症中心的联盟,它发布了NCCN肿瘤学临床实践指南(NCCN GUIDELINES®),提供了各种癌症的标准护理疗法的详细最新信息。在一些实施例中,在标准护理疗法失败后使用本文披露的方法。

[0647] 在一些实施例中,融合蛋白与一种或多种预防剂或治疗剂组合(例如在预防剂或治疗剂之前、同时或之后)施用于受试者。在一些实施例中,治疗剂是抗癌剂。在一些实施例中,治疗剂是化疗剂。这些治疗剂可以是化合物、抗体、多肽或多核苷酸的形式。

5.7.4诊断方法

[0648] 本文进一步提供了诊断方法。本文所述的一些方法(例如,诊断方法(参见,例如,§5.7.4)和治疗方法(参见,例如,§5.7.3))使用来自受试者的样品。本领域普通技术人员可以根据所选方法中的用途来确定合适的样品来源、样品量等。示例性的受试者样品包括但不限于血液、血浆、细胞、组织、唾液样品和鼻拭子。其他样品包括但不限于精液、痰、粘液、汗液、尿液和粪便。在一些实施例中,样品是血液、血浆或血清。在一些实施例中,样品是血液。在一些实施例中,样品是血浆。在一些实施例中,样品是血液。在一些实施例中,样品是由血液样品加工而成的血浆。

[0649] 一方面,本文提供了测定受试者的实体癌的细胞中CAIX的表达的方法,所述方法包括:从受试者获得样品,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞),并且确定样品中是否存在可溶性CAIX(或其片段或变体)。

[0650] 一方面,本文提供诊断患有包含表达CAIX的癌细胞的实体癌的受试者的方法,所述方法包括:从受试者获得样品,其中所述样品不含有癌细胞(或不含有大量癌细胞),确定样品中是否存在可溶性CAIX(或其片段或变体;并且如果确定样品中存在可溶性CAIX,则诊断受试者患有包含表达CAIX的癌细胞的实体癌。

5.8试剂盒

[0651] 一方面,本文提供了试剂盒,其包含本文所述的hIL-12p40蛋白;本文所述的hIL-12p35蛋白;本文所述的schIL-12蛋白;本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽);本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽);本文所述的多核苷酸;本文所述的载体;本文所述的宿主细胞;本文所述的载剂;或本文所述的药物组合物给受试者、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物。另外,试剂盒可包含用于溶解或稀释的液体媒剂和/或技术说明书。试剂盒的技术说明书可能包含有关施用和剂量以及受试者组的信息。

[0652] 在一些实施例中,本文所述的hIL-12p40蛋白;本文所述的hIL-12p35蛋白;本文所述的schIL-12蛋白;本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽);本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂,或本文所述的药物组合物以试剂盒的单独部分提供,其中本文所述的多特异性蛋白质(或其多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物任选地被冻干、喷雾干燥或喷雾冷冻干燥。试剂盒还可以含有作为一部分的媒剂(例如,缓冲溶液),用于溶解本文所述的干燥或冻干的hIL-12p40蛋白;本文所述的hIL-12p35蛋白;本文所述的schIL-12蛋白;本文所述的抗hCAIX抗体(或其任何(例如一个或多个)多肽);本文所述的hIL-12融合蛋白(或其任何(例如一个或多个)多肽)、本文所述的多核苷酸、本文所述的载体、本文所述的宿主细胞、本文所述的载剂或本文所述的药物组合物。

[0653] 在一些实施例中,试剂盒包含单剂量容器。在一些实施例中,试剂盒包含多剂量容器。在一些实施例中,试剂盒包含施用装置(例如,用于皮内注射的注射器或用于肌内注射的注射器)。在一些实施例中,试剂盒包含在单独容器中的佐剂。

[0654] 本文所述的任何试剂盒可以用于本文所述的任何方法(参见例如§5.7)。

6.实施例

[0655] 本节中的实例(即第6节)是以说明的方式提供的,而不是以限制的方式提供的。

6.1实例1.人源化抗hCAIX抗体的生成

[0656] 根据下述方法产生鼠/人嵌合抗体吉伦妥昔单抗的五个不同的人源化轻链可变区(VL)和五个不同的人源化重链可变区(VH)(参见表21)。鉴定了几个人框架序列,它们用作吉伦妥昔单抗CDR序列的“受体”框架。因此,人源化序列预计是非免疫原性的,并保留亲本抗体CDR环的规范结构。为了最佳保留CDR环构象,使用IMGT和Kabat鉴定CDR。

[0657] 对于重链和轻链人源化,使用BLAST搜索算法搜索人IgG和IgGκ序列的数据库,分别与鼠VH结构域和鼠VL结构域进行比较。候选人可变结构域是从前200个BLAST结果中选出

的。基于框架同源性、保持关键框架残基和规范环结构的组合,选择了最接近的人种系IGHV3-11(对于重链)和IGKV1D-13(对于轻链)。

[0658] 针对MHC II类结合表位、Fv糖基化基序和脱酰胺基序筛选人源化重链和轻链。随后,瞬时表达轻链和重链的所有组合并测试各种参数,包括表达产率、抗原结合动力学和稳定性。

[0659] 人/鼠嵌合亲本抗体吉伦妥昔单抗(及其组分)的氨基酸序列列于表21中。

表21.亲本抗体吉伦妥昔单抗的氨基酸序列

说明		SEQ ID NO
吉伦妥昔单抗	VH CDR1	237
	VH CDR2	238
	VH CDR3	239
	VL CDR1	240
	VL CDR2	241
	VL CDR3	242
	VH	246
	VL	247
	重链	248
	轻链	249

[0660] 所产生的人源化抗hCAIX抗体的VH、重链、VL和轻链的氨基酸序列在上表2中列出。

[0661] 所产生的人源化抗hCAIX抗体的VH、重链、VL和轻链的核苷酸序列在上表3中列出。

[0662] 使用合理的亲和力成熟平台(RAMP)技术进一步对包含HC5(SEQ ID NO:7)和LC3(SEQ ID NO:15)的人源化抗hCAIX抗体进行亲和力成熟。RAMP结合了“自然”文库设计,探索抗体的体细胞超突变空间,生成每种抗体特有的自然突变。采用分子对接和计算机模拟选择来提高抗体结合潜力和稳定性。这些方法旨在平衡亲和力和可开发性。

[0663] 回复突变被纳入抗体的CDR和框架区,并以组合方式整合,这使得初始文库能够缩小为包含95个变体的富集“微文库”,这些变体在CHO细胞中表达,其特征在于完整的IgG格式,并根据亲和力和可开发性属性进行排名。“自然”的设计方法和对可开发性的内在考虑使RAMP不仅可以用来提高亲和力,还可以优化其他属性,例如稳定性、聚合、pI等,以改善抗体的整体可开发性谱。

[0664] 所产生的亲和力成熟的人源化抗hCAIX抗体的VH和重链区的氨基酸序列列于表22中。

表22.亲和力成熟的人源化抗hCAIX VH和VL区的氨基酸序列

说明	SEQ ID NO
VH	
HC5 变体 3	7
HC5 变体 27	8
HC5 变体 29	9
HC5 变体 36	9
HC5 变体 74	8
VL	
LC3 变体 3	15
LC3 变体 27	15
LC3 变体 29	15
LC3 变体 36	16
LC3 变体 74	17

6.2实例2.抗hCAIX IL-12融合蛋白的生成

[0665] 如下所述生成包含hCAIX结合结构域和hIL-12(例如hIL-12p35和hIL-12p40或schIL-12)的融合蛋白。

[0666] 具有BCA316形式的融合蛋白(即IL-12p35融合至第一Fc区并且IL-12p40融合至抗CAIX抗体的第二Fc区(参见例如图2和图4))根据以下方法生成。简言之,三种不同的多肽在体外的CHO细胞中共表达,如下所述。每个多肽都含有N末端信号肽,所述信号肽被切割形成成熟蛋白链并确保正确分泌到细胞外介质中。三种多肽如下:

• 1.人源化轻链(LC3)。

• 2.第一人源化重链(HC5),其包含CH3区中的杵突变(T366W)。重链的C末端通过肽接头$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:72)可操作地连接至成熟IL-12p40多肽的N末端。hIL-12p40亚基在C末端包含终止密码子以终止翻译。

• 3.第二人源化重链(HC5),其包含CH3结构域中的一组臼突变。重链的C末端通过肽接头$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:7)可操作地连接至成熟IL-12p35多肽的N末端。

[0667] 对编码三种多肽中每一种的多核苷酸进行密码子优化以在CHO细胞中表达,以最大化基因表达,并随后克隆至合适的真核表达载体中。将编码人源化重链杵和人源化重链臼多肽的多核苷酸克隆到单个基因表达载体中;并且将编码人源化轻链多肽的多核苷酸分别克隆到不同的基因表达载体中。将这两个载体一起共转染至CHO细胞中以产生所期望的抗CAIX hIL-12融合蛋白(使用标准方法从培养物上清液中分离和纯化)。在另一种表达策略中,将所有三种多核苷酸克隆到单个基因表达载体中,随后将其转染到CHO细胞中以产生所期望的抗CAIX hIL-12融合蛋白(使用标准方法从培养物上清液中分离和纯化)。

[0668] 具有BCA315形式的融合蛋白(即schIL-12(参见例如图1和图3))是根据以下方法生成的。简言之,三种不同的多肽在体外的CHO细胞中共表达,如下所述。三种多肽如下:

• 1.人源化轻链序列(LC3)。

• 2.在CH3区中具有杵突变(T366W)的人源化重链序列(HC5)。重链的C末端通过肽

接头(GGGGS)$_3$(SEQ ID NO:7)可操作地连接至成熟hIL-12p35的N末端。成熟hIL-12p35多肽的C末端通过(i)短肽接头(GGGGGGS)(SEQ ID NO:369)或长肽接头(GGGGS)$_3$(SEQ ID NO:7)可操作地连接至成熟hIL-12p40多肽的N末端。

• 3.人源化重链序列(HC5),其包含CH3结构域中的一组臼突变。

[0669] 对编码三种多肽中每一种的多核苷酸进行密码子优化以在CHO细胞中表达,以最大化基因表达,并随后克隆至合适的真核表达载体中。将编码人源化重链杵和人源化重链臼多肽的多核苷酸克隆到单个基因表达载体中;并且将编码人源化轻链多肽的多核苷酸分别克隆到不同的基因表达载体中。将这两个载体一起共转染至CHO细胞中以产生所期望的抗CAIX hIL-12融合蛋白(使用标准方法从培养物上清液中分离和纯化)。在另一种表达策略中,将所有三种多核苷酸克隆到单个基因表达载体中,随后将其转染到CHO细胞中以产生所期望的抗CAIX hIL-12融合蛋白(使用标准方法从培养物上清液中分离和纯化)。

[0670] 表23中提供了所产生的抗hCAIX hIL-12融合蛋白的氨基酸序列。

表23.生成的抗hCAIX hIL-12融合蛋白和多肽的氨基酸序列

说明		SEQ ID NO
BCA316	重链(HC)(杵)IL-12p40	304
	HC(白)IL-12p35	305
	轻链(LC)	245
BCA307.16	重链(杵)IL-12p40	304
	重链(白)IL-12p35(变体A)	307
	轻链	245
BCA308.16	重链(杵)IL-12p40	304
	重链(白)IL-12p35(变体B)	308

	轻链	245
BCA323.16	重链（杵）IL-12p40	304
	重链（白）IL-12p35（变体 C）	309
	轻链	245
BCA324.16	重链（杵）IL-12p40	304
	重链（白）IL-12p35（变体 D）	310
	轻链	245
BCA325.16	重链（杵）IL-12p40	304
	重链（白）IL-12p35（变体 E）	311
	轻链	245
BCA309.16	重链（杵）IL-12p40（变体 A）	312
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA310.16	重链（杵）IL-12p40（变体 B）	313
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA311.16	重链（杵）IL-12p40（变体 C）	314
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA317	重链（杵）IL-12p40（变体 D）	315
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA318.16	重链（杵）IL-12p40（变体 E）	316
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA319.16	重链（杵）IL-12p40（变体 F）	317
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA320.16	重链（杵）IL-12p40（变体 G）	318
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA321.16	重链（杵）IL-12p40（变体 H）	319

	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA322.16	重链（杵）IL-12p40（变体 I）	320
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA326.16	重链（杵）IL-12p40（变体 J）	321
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA327.16	重链（杵）IL-12p40（变体 K）	322
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA328.16	重链（杵）IL-12p40（变体 L）	323
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA329.16	重链（杵）IL-12p40（变体 M）	324
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA330.16	重链（杵）IL-12p40（变体 N）	325
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA331.16	重链（杵）IL-12p40（变体 O）	326
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA332.16	重链（杵）IL-12p40（变体 P）	327
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA333.16	重链（杵）IL-12p40（变体 Q）	328
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA334.16	重链（杵）IL-12p40（变体 R）	329
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245

BCA336.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 U）	331
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA337.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 V）	332
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA338.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 W）	333
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA339.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 X）	334
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA340.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 Y）	335
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA341.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 Z）	336
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA342.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 AA）	337
	重链（白） IL-12p35	305
	轻链	245
BCA343.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 BB）	338
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA344.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 CC）	339
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA345.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 DD）	340
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA346.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 EE）	341

	重链（白） IL-12p35	305
	轻链	245
BCA347.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 FF）	342
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA348.16	重链（杵）hIL-12p40（变体 GG）	343
	重链（白）IL-12p35	305
	轻链	245
BCA315	重链（杵）scIL-12	345
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA307	重链（杵）scIL-12（IL-12p35 变体 A）	346
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA308	重链（杵）scIL-12（IL-12p35 变体 B）	347
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA323	重链（杵）scIL-12（IL-12p35 变体 C）	348
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA324	重链（杵）scIL-12（IL-12p35 变体 D）	349
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA325	重链（杵）scIL-12（IL-12p35 变体 E）	350
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA309	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 A）	351
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA310	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 B）	352
	重链（白）	306

	轻链	245
BCA311	重链（杵）scIL-12（IL-12p35 变体 C）	353
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA312	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 S）	354
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA318	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 E）	355
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA319	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 F）	356
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA320	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 G）	357
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA321	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 H）	358
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA322	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 I）	359
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA326	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 J）	360
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA327	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 A）	361
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA328	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 L）	362
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA329	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 M）	363

	重链（白）	306
	轻链	245
BCA330	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 N）	364
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA331	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 O）	365
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA332	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 P）	366
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA333.16	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 Q）	367
	重链（白）	306
	轻链	245
BCA334	重链（杵）scIL-12（IL-12p40 变体 R）	368
	重链（白）	306
	轻链	245

6.3实例3.抗hCAIX hIL-12p40变体融合蛋白的生成

[0671] 根据标准方法生成以下抗hCAIX hIL-12p40融合蛋白。简言之,对每个融合蛋白变体的不同多肽序列进行密码子优化以获得DNA多核苷酸对应物,将其克隆到合适的哺乳动物表达质粒中。将各个质粒瞬时共转染至Expi-CHO-S细胞中。根据制造商的方案,通过适当的喂养,转染的细胞生长7-10天。收获细胞培养物的上清液并使用蛋白A和SEC亲和柱纯化融合蛋白。将纯化的蛋白在合适的缓冲液中洗脱,随后稀释至工作浓度。在一些实验中,还评估了参考构建体,包括重组人IL-12(rhIL-12)(R&D系统公司10018-IL)和非靶向Fc-hIL-12融合蛋白(SEQ ID NO:384-385)。

[0672] 表24提供了所生成的融合蛋白的hIL-12多肽中包含的氨基酸修饰的描述。

表24.hIL-12p40变体和对照的氨基酸序列

说明	hIL-12p40 氨基酸取代 （相对于 SEQ ID NO: 32 的氨基酸序列进行编号）	SEQ ID NO
BCA369	W37A	370-372

BCA370	F82A	371、372、373
BCA371	K217A	371、372、374
BCA372	K219A	371、372、375
BCA373	W37A、F82A	371、372、376
BCA374	W37A、K217A	371、372、377
BCA375	W37A、K219A	371、372、378
BCA376	F82A、K217A	371、372、379
BCA377	F82A、K219A	371、372、380
BCA378	K217A、K219A	371、372、381
BCA356	W37A/F82A/K219A	371、372、382
BCA351 （野生型 hIL-12）	无	371、372、383

[0673] 表25提供了所生成的每种融合蛋白的氨基酸序列。每个多肽链的信号序列都带有下划线。

表25.hIL-12p40变体和对照的氨基酸序列

说明		SEQ ID NO	氨基酸序列
BCA369 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	370	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT

			SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA370 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	373	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF

			PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA371 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	374	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS

			DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA372 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	375	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE

			EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA373 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	376	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL

			DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA374 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	377	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA375 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	378	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP

			SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA376 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	379	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

BCA377 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	380	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA378	HC 杵 hIL-12p40	381	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT

抗 hCAIX hIL-12			SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHALAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA356 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	382	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF

			PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
BCA351 （野生 型） 抗 hCAIX hIL-12	HC 杵 hIL-12p40	383	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS

			DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	HC 白 hIL-12p35	371	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
	LC	372	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
Fc-IL-12 （野生 型）	Fc-杵-接 头 1- p40：	384	MMSFVSLLLVGILFHATQAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQ SSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN

			LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKRE KKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	Fc-白-接头 1-p35:	385	MMSFVSLLLVGILFHATQAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNG SCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQ IFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

[0674] 评估表25中包含hIL-12p40变体的每种融合蛋白的生物活性:(1)HEK-IL-12报告细胞系中STAT4信号传导的激活(2)PHA刺激的hPBMC的IFN-γ释放;以及(3)IL-2引发的NK细胞的IFN-γ释放。每个测定和结果分别在实例4-7中完整描述。

6.4实例4.hIL-12p40变体活性的评估-pSTAT4信号传导

[0675] 使用HEK-Blue TM报告子测定(英杰公司(#hkb-IL12))评估通过表25中列出的每种hIL-12p40变体的hIL-12受体的信号传导。简而言之,测定中使用的HEK-Blue™IL-12细胞表达STAT4诱导型SEAP报告基因。IL-12与HEK-Blue™IL-12细胞表面的IL-12R结合会触发信号传导级联,导致STAT-4激活(和磷酸化),随后产生SEAP报告蛋白。使用QUANTI-Blue™溶液可以轻松评估HEK-Blue™IL-12细胞上清液中SEAP的检测。此处,HEK-Blue细胞与不同浓度的每种所示hIL-12p40变体在细胞培养板中孵育18-24小时。添加Quanti Blue溶液后读取板的读数。hIL-12p40变体的IL-12活性呈现在图9中并且IL-12活性相对于野生型Fc-IL-12的减弱倍数呈现于表26中。

表26.hIL-12p40变体相对于Fc-IL-12对照的减弱倍数

说明	Std (EC50)	样品 (EC50)	减弱倍数 (相对于 Fc-IL-12 对照)
BCA371	0.021	0.035	2
BCA372	0.024	0.048	2
BCA378	0.022	0.102	5
BCA369	0.025	0.19	8
BCA370	0.022	0.401	18
BCA374	0.024	1.041	43
BCA373	0.021	4.344	207
BCA376	0.019	4.058	214
BCA375	0.024	7.662	319
BCA377	0.021	9.668	460
BCA356	0.018	131.4	7300

[0676] 如图9和表26所示,与单hIL-12p40变体或双hIL-12p40变体相比,BCA356显示相对

较高的减弱(7300倍)。

6.5实例5.hIL-12p40变体活性评估-PHA刺激的PBMC的IFN-γ释放

[0677] IL-12由抗原呈递细胞分泌,通过STAT4磷酸化诱导IFN-γ来刺激活化T淋巴细胞的效应子功能,从而增强抗肿瘤免疫应答(参见,例如,Tugues,S等人."New insights into IL-12-mediated tumor suppression.[IL-12介导的肿瘤抑制的新见解]"Cell death and differentiation[细胞死亡和分化]第22卷,2(2015):237-46.doi:10.1038/cdd.2014.134)。评估了在每种hIL-12p40变体存在下刺激的T细胞释放的IFN-γ水平。简而言之,将hPBMC以10万个细胞/孔接种在96孔板中,并用100μl体积的PHA(1μg/ml)刺激过夜。第二天,再次以相同浓度添加PHA,同时滴定指定的hIL-12p40变体的浓度。随后将细胞在37℃ 5% CO_2培养箱中孵育约48小时。通过标准IFN-γELISA测量培养物上清液中的IFN-γ(图10A-10F)。如图10A所示,与野生型IL-12(BCA351)和重组人IL-12(rhIL-12)相比,hIL-12p40变体BCA356在T细胞活化方面高度减弱。

6.6实例6.hIL-12p40变体活性评估-hIL-2引发的人NK细胞的IFN-γ释放

[0678] IL-12刺激NK细胞分泌IFN-γ并增强其增殖和细胞溶解活性(参见,例如,Glassman,Caleb R等人"Structural basis for IL-12 and IL-23 receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells.[IL-12和IL-23受体共享的结构基础揭示了对T细胞和NK细胞形成作用的途径]"Cell[细胞]第184卷,4(2021):983-999.e24.doi:10.1016/j.cell.2021.01.018)。为了评估NK细胞释放的IFN-γ的水平,将hPBMC在含有10% HI-FBS和100IU/ml hIL-2的RPMI 1640中解冻。过夜孵育后收获细胞,并通过负选择富集NK细胞。NK细胞按50,000个细胞/孔接种,滴定hIL-12的浓度,并在37℃、5% CO_2中孵育约48小时。通过IFN-γ标准IFN-γELISA测量培养物上清液中的IFN-γ(图11A-11B)。如图11A所示,与野生型IL-12(BCA351)和rhIL-12相比,hIL-12p40变体BCA356在NK细胞活化方面高度减弱。

6.7实例7.总结hIL-12p40变体活性

[0679] 实例3-7中呈现的数据和表27中总结的数据表明,与野生型IL-12(实例4)相比,hIL-12p40变体BCA356减弱约7000x并且在NK(实例6)和T细胞(实例5)活化方面中高度减弱。然而,含有单或双氨基酸取代的hIL-12p40变体没有类似地减弱(参见例如表27)。因此,hIL-12p40变体BCA356的独特功能属性归因于所有三个取代W37A、F82A和K219A的独特组合。

表27.hIL-12p40变体的功能分析总结

		HEK-IL12 报告子测定	NK 细胞的 IFNγ 释放	PHA 刺激 PBMC 的 IFNγ 释放
说明	一个或多个氨基酸取代	减弱	*减弱水平	
BCA371	K217A	2	+	+
BCA372	K219A	2	+	+
BCA378	K217A、K219A	5	++	+
BCA369	W37A	7.6	++	+
BCA370	F82A	18	++	+
BCA374	W37A、K217A	43	++	++
BCA373	W37A、F82A	207	++	++
BCA376	F82A、K217A	214	+++	++
BCA375	W37A、K219A	319	+++	++
BCA377	F82A、K219A	460	+++	+++
BCA356	W37A、F82A、K219A	7300	+++	+++

[0680] *根据曲线变化进行定性排名,其中+、++、+++代表与野生型hIL-12相比的低、中和高减弱。

6.8实例8.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白在体外表现出减弱的活性

[0681] 根据标准方法生成以下抗hCAIX hIL-12融合蛋白。简言之,对每个hIL-12p40变体的不同多肽序列进行密码子优化以获得DNA多核苷酸对应物,将其克隆到合适的哺乳动物表达质粒中。将各个质粒瞬时共转染至Expi-CHO-S细胞中。根据制造商的方案,通过适当的喂养,转染的细胞生长7-10天。收获细胞培养物的上清液并使用蛋白A和SEC亲和柱纯化hIL-12p40蛋白。将纯化的蛋白在合适的缓冲液中洗脱,随后稀释至工作浓度。在一些实验中,还评估了参考构建体,包括重组人IL-12(rhIL-12)(R&D系统公司10018-IL)。生成的每种抗CAIX hIL-12融合蛋白的氨基酸序列列于表28中,连同对照抗白喉毒素(DT)hIL-12抗体融合物。每种多肽的信号序列都带有下划线。

表28.抗hCAIX hIL-12融合蛋白的氨基酸序列

说明		氨基酸序列	SEQ ID NO
BCA313（Fc-IL-12）	Fc 杵-hIL-12p40	MMSFVSLLLVGILFHATQAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQ SSEVLGSGKTLTIQVKKFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKE DGIWSTDILKDQEEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKRE KEDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	386
	Fc 臼-hIL-12p35	MMSFVSLLLVGILFHATQAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG GSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNG SCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQ IFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	387
BCA350（人源化抗 CAIX）	抗 CAIX HC 杵	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF	388

		PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	抗 CAIX HC 白	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	389
	抗 CAIX LC	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	372
BCA351（野生型）	抗 CAIX HC 杵-hIL-12p40	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL	383

		KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	
	抗 CAIX HC 白-hIL-12p35	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	371
	抗 CAIX LC	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	372
BCA356	抗 CAIX HC 杵-hIL-12p40	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSI WELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSE VLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFS	382

		VKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKD RVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	
	抗 CAIX HC 白-hIL-12p35	MMSFVSLLLVGILFHATQAEVRLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSNYYMSWIRQAPEKRLELVSAINSDGGITYYLDTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALFYCARHRSGYFSMDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSE EIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCL ASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFL DQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	371
	抗 CAIX LC	MMSFVSLLLVGILFHATQAEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKA SQNVVSAVAWYQQKPGQSPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGSGT EFTLTISSLQSEDFAAYYCQQYRNYPWTFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	372
BCA380	抗 DT HC 杵-hIL-12p40	MMSFVSLLLVGILFHATQAQVQLQQSGPGPAKPSQTLSLTCAIS GDSVSSDSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYRDYAPSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDKDSFESNGSLY TAKKMGFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTP	390

		EEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNK EYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI RDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSS SWSEWASVPCS	
	抗 DT HC 白-hIL-12p35	MMSFVSLLLVGILFHATQAQVQLQQSGPGPAKPSQTLSLTCAIS GDSVSSDSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYRDYAPSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDKDSFESNGSLY TAKKMGFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ KARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCL NSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM NAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEE PDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	391
	抗 DT LC	MMSFVSLLLVGILFHATQAETTLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPERFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	392
BCA382	抗 DT HC 杵-hIL-12p40	MMSFVSLLLVGILFHATQAQVQLQQSGPGPAKPSQTLSLTCAIS GDSVSSDSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYRDYAPSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDKDSFESNGSLY TAKKMGFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN	393

		QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSGGGGSIWELKKDVYVVELDAYPDAPGEMVVLTCDTP EEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEAGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNK EYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSSFFI RDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTF CVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSS SWSEWASVPCS	
	抗 DT HC 白-hIL-12p35	MMSFVSLLLVGILFHATQAQVQLQQSGPGPAKPSQTLSLTCAIS GDSVSSDSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSTWYRDYAPSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDKDSFESNGSLY TAKKMGFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ KARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCL NSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM NAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEE PDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS	391
	抗 DT LC	MMSFVSLLLVGILFHATQAETTLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPERFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTRLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	392

[0682] 根据制造商的说明(英杰公司),使用HEK-IL-12报告子测定法评估表28中每种蛋白质的生物活性。简而言之,HEK-Blue™IL-12细胞(英杰公司(hkb-IL-12))是稳定转染了编码人IL-12受体(hIL-12R)和表达STAT4诱导的SEAP报告基因的hIL-12信号通路的多核苷酸的HEK细胞。IL-12与HEK-Blue™IL-12细胞表面的IL-12R结合会触发信号传导级联,导致STAT-4激活(和磷酸化),随后产生SEAP。使用QUANTI-Blue™溶液可以轻松检测HEK-Blue™IL-12细胞上清液中的SEAP。此处,将约50,000个HEK-Blue™IL-12细胞(英杰公司(hkb-IL-12))接种于96孔板中并孵育过夜(37℃,5% CO_2),然后通过用指定的构建体处理18-24小时。IgG-对照构建体是抗白喉毒素抗体,根据制造商的说明,使用QUANTI-Blue™溶液在每种培养物的上清液中检测到SEAP。

[0683] 如图12所示,与BCA351(野生型IL-12融合物)相比,BCA356 IL-12活性减弱约7000倍。报告的值是三个独立实验的平均值。

6.9实例9.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白介导T细胞体外活化

[0684] IL-12由抗原呈递细胞分泌,通过STAT4磷酸化诱导IFN-γ来刺激活化T淋巴细胞的效应子功能,从而增强抗肿瘤免疫应答(参见,例如,Tugues,S等人."New insights into IL-12-mediated tumor suppression.[IL-12介导的肿瘤抑制的新见解]"Cell death and differentiation[细胞死亡和分化]第22卷,2(2015):237-46.doi:10.1038/cdd.2014.134)。评估了在每种抗CAIX hIL-12融合蛋白存在下刺激的T细胞释放的IFN-γ的水平。简而言之,将hPBMC以10万个细胞/孔接种在96孔板中,并用100μl体积的PHA(1μg/ml)刺激过夜。随后,再次以1μg/ml的相同浓度添加PHA,同时滴定指定构建体的浓度,并在5% CO_2中于37℃下孵育约48小时。通过标准IFN-γELISA测量培养物上清液中的IFN-γ水平。如图13所示,在存在抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356的情况下,活化的T细胞释放的IFN-γ的水平低于存在重组hIL-12和BCA351的情况。

[0685] hIL-12与其受体复合物的结合刺激STAT4(pSTAT)的磷酸化,后者易位至细胞核以促进IFN-γ基因转录(参见,例如Teng,Michele W L等人"IL-12 and IL-23 cytokines:from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases.[IL-12和IL-23细胞因子:从发现到免疫介导的炎症性疾病的靶向治疗]"Nature medicine[自然医学]第21卷,7(2015):719-29.doi:10.1038/nm.3895)。评估用每种抗CAIX IL-12融合蛋白处理的细胞中pSTAT4的水平。简而言之,用包被板的抗CD3(2.5μg/mL)和可溶性抗CD28(5μg/mL)抗体将hPBMC活化48小时,并在活化后静息过夜。静息后,将细胞用抗人CD45RA、CD4、CD8、CD25抗体染色30分钟,然后与指定浓度的rhIL-12、BCA351、BCA356或BCA313一起孵育20分钟。然后将细胞固定、透化并用抗pSTAT4抗体染色。呈现在图15中的读数是表达pSTAT4的$CD45RA^-CD8^+CD25^+$细胞的百分比频率。如图15所示,在BCA356存在下由活化的$CD8^+$T细胞表达的pSTAT4的水平低于在重组hIL-12或BCA351存在下的情况。

6.10实例10.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白介导NK细胞体外活化

[0686] IL-12活化NK细胞分泌IFN-γ并增强其增殖和细胞溶解活性(参见,例如,Glassman,Caleb R等人"Structural basis for IL-12and IL-23receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells.[IL-12和IL-23受体共享的结构基础揭示了对T细胞和NK细胞形成作用的途径]"Cell[细胞]第184卷,4(2021):983-999.e24.doi:10.1016/j.cell.2021.01.018)。评估从用每种抗CAIX hIL-12融合蛋白处理的NK细胞释放的IFN-γ的水平。简而言之,将hPBMC培养在含有10% HI-FBS和100IU/ml IL-2的RPMI 1640中。过夜孵育(37℃,5% CO_2)后收获细胞,并通过负选择富集NK细胞。NK细胞以50,000个细胞/孔接种在96孔板中,同时滴定指定构建体的浓度。细胞在37℃ 5% CO_2下孵育约48小时。通过标准IFN-γELISA测量培养物上清液中的IFN-γ水平。如图14所示,在存在抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356的情况下,活化的T细胞释放的IFN-γ的水平低于存在重组hIL-12和BCA351的情况。

6.11实例11.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白在体外表现出显著的细胞毒性和减少的细胞因子释放

[0687] 使用包含胃癌SNU16细胞和活化的hPBMC的共培养测定来评估抗CAIX hIL-12融合

蛋白BCA356的实时肿瘤杀伤。简而言之,使用慢病毒转导用核光绿(nuclight)标记过表达CAIX的SNU16癌细胞。将标记的SNU16细胞以5,000个细胞/孔与50,000个细胞/孔的hPBMC一起接种在96孔板中,靶细胞(T):效应细胞(E)比例为1:10。hPBMC用0.5pg/ml的SEB(金黄色葡萄球菌肠毒素B)活化并且滴定指定构建体的浓度。将板置于IncuCyte S3®(埃森生物科学公司(Essen BioScience))37℃且5% CO_2的培养箱中,并成像5天(120小时)。荧光信号的增加对应于靶细胞增殖,并且荧光信号的减少对应于靶细胞死亡。%杀伤计算为=｛(抗体在特定时间点的信号强度/T+E+SEB)*100｝。如图16所示,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356与抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA351相比显示出相似的细胞毒性,表明抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356降低T细胞活化不影响肿瘤细胞杀伤活性。BCA356显示出比BCA313改善的细胞毒性,这可能是由于CA-IX靶向。

[0688] 此外,活化的T细胞分泌趋化因子和细胞因子,有助于T细胞运输、活化和抗肿瘤免疫应答。使用人细胞因子luminex测定(44重试剂盒)来评估用所示构建体处理后24小时、72小时和120小时的细胞因子产生。用于选择关键细胞因子的标准是:24小时时,BCA351相对于人IgG增加2倍,BCA356相对于BCA351减少≥20%。将24小时时选定的细胞因子/趋化因子在72小时和120小时时间点进行比较。如图17A-H所示,与抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA351和rhIL-12相比,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356显示颗粒酶-B、IFN-γ、TNFα、IL-10、Flt3-L、GMCSF、MIP-3和CD40-L的有限释放。

6.12实例12.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白表现出NK细胞介导的体外靶细胞细胞毒性

[0689] 评估抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356增强基于NK细胞的肿瘤杀伤活性的能力。简而言之,用hCAIX转染HCT116结肠癌细胞,并以5,000个细胞/孔接种在超低附着96孔板中,并使其形成3D球体96小时。这些球体用20nM浓度的所示构建体处理并孵育1-2小时,然后以1:5的T:E比例添加IL-2引发和富集的NK细胞。缩写G250表示抗hCAIX抗体吉伦妥昔单抗。将细胞(共培养)孵育24小时,并使用CytoToxGlo®试剂评估肿瘤杀伤,该试剂可测量死细胞的蛋白酶。细胞毒性计算为构建体相对于hIgG的相对发光强度(RLU)的倍数变化。如图18所示,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356显示NK细胞介导的对hCAIX过表达HCT116细胞的杀伤,而FcIL-12融合蛋白BCA313则没有,可能是由于构建体缺乏CAIX靶向。由于与IL-12v的组合,BCA356显示出比G250更出色的NK细胞介导的靶细胞杀伤。

6.13实例13.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白在肺癌模型中表现出体外细胞毒性

[0690] 评估抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356介导A549肺癌模型的细胞毒性的能力。简而言之,用编码eGFP和CAIX-eGFP融合蛋白(eGFP融合到CAIX的C末端)的质粒稳定转染A549肺癌细胞。根据嘌呤霉素抗性选择表达eGFP-CAIX的单细胞克隆,并通过流式细胞术进行表征。显示eGFP-CAIX表达的代表性峰状图和点图显示在图19中。

[0691] 将上面生成的A459 CAIX-eGFP表达细胞接种到U形底96孔ULA板中并孵育四天以形成球体。第4天,α-CD3和α-CD28抗体(1μg/ml过夜)刺激PBMC(T:E为1:10),并将指定的构建体添加到球体培养物中并孵育72小时。随后使用Cytation 5成像仪捕获明场和荧光图像,代表性图像显示在图20中。使用Image J软件和图21A(A549细胞系eGFP强度密度)和图21B(细胞毒性-将IgG处理的球状体视为100%活力进行计算)中提供的数据对每组的单个eGFP球体进行定量。如图21A-21B所示,与BCA382(一种非靶向IgG减弱的IL-12融合蛋白)或

BCA313(一种非靶向Fc减弱的IL-12融合蛋白)相比,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356(20nM)在表达eGFP-CAIX的A549球体模型中具有相对更高的细胞毒性。

6.14实例14.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白抑制体内肿瘤生长,在结肠癌模型中毒性有限

[0692] 使用HCT116-hCAIX肿瘤模型评估抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356治疗结肠癌的功效。简而言之,将约500万个hCAIX转染的HCT116细胞皮下注射到NSG小鼠中。当肿瘤可触及时,约1000万个hPBMC被静脉注射到每只小鼠体内。当肿瘤为约100mm^{3}时,将小鼠随机分为测试组和对照组,并用以下构建体之一进行治疗:媒剂对照(磷酸盐缓冲盐水(PBS))、BCA351(0.3mg/kg)、BCA356(3mg/kg)或BCA313(1.69mg/kg,等摩尔剂量)每周腹膜内注射两次。每周两次测量肿瘤体积、体重和临床体征。值表示为每组6只小鼠的平均值±SEM(表29和图22)。

表29.肿瘤生长抑制和小鼠死亡

测试构建体	%TGI(平均值±SD)	%体重变化	死亡第17天
BCA351	30±31	-20	2/6
BCA356	26±21	-14	0/6
BCA313	16±26	-13	0/6

[0693] 如表29和图22所示,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356显示出与抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA351(野生型hIL-12融合物)相当的肿瘤生长抑制(分别是26%和30%),然而,与BCA351或BCA356相比,非靶向Fc-IL-12(BCA313)显示出降低的TGI(16%)。第17天,BCA351治疗组有两只小鼠死亡,而BCA356或BCA313治疗组均没有小鼠死亡。因此,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356与抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA351一样有效,但毒性降低。由于GvHD的发生,研究不能延长超过三个剂量。

6.15实例15.抗CAIX hIL-12变体融合蛋白抑制体内肿瘤生长,在黑色素瘤模型中毒性有限

[0694] 在携带hIL-12和hIL-12受体敲入转基因小鼠模型的表达B16F10的人CAIX同种异体移植物中评估了抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356在黑色素瘤治疗中的功效。简而言之,将约10万个表达hCAIX的B16F10细胞皮下注射至转基因小鼠皮下。当肿瘤为约80mm^{3}时,将小鼠随机分为测试组和对照组,并用以下构建体之一进行治疗:媒剂对照(PBS)、BCA356(1mg/kg)或BCA313(0.5mg/kg)以同等剂量每周腹膜内注射两次。每周两次测量肿瘤体积、体重和临床体征。值表示为每组6只小鼠的平均值±SEM(表30和图23)。

表30.肿瘤生长抑制和小鼠死亡

测试构建体	%TGI(平均值±SD)	%体重变化	死亡第9天
BCA356	55±42	4	0/6
BCA313	11±69	9	1/6

[0695] 如表30和图23所示,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356与BCA313相比显示出更高功效的趋势(分别为55%和11%)。第9天,BCA313治疗组中发现一只小鼠死亡,而BCA356治疗组中没有一只小鼠死亡。因此,抗CAIX hIL-12融合蛋白BCA356在转基因模型中是有效且安

全的。

6.16实例16.正常组织和癌组织中的CAIX表达

[0696] 通过免疫组织化学分析人正常组织和癌组织中人CAIX的表达水平。简言之,在Ventana Benchmark XT平台上,使用抗CAIX抗体[Genetex(TH22)]通过免疫组织化学(IHC)评估具有多种肿瘤组织类型的肿瘤微阵列(TMAs)上福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的四微米肿瘤组织切片中CAIX蛋白的表达。使用CellProfilerTM分析从每个TMA捕获的数字图像,并且病理学家将每个核心中的肿瘤区域注释为目的区域(ROI)。使用调谐膜算法分析每个核心的ROI,以获得肿瘤细胞膜的CAIX染色强度。数字阈值将像素染色分为0+(阴性)、1+(弱)、2+(中)和3+(强)。每个类别中ROI染色的百分比用于使用以下式计算每个核心的最终H得分:H-得分＝(1X％1+)+(2X％2+)+(3X％3+)(最大H-得分＝300)。

[0697] 如图24A和24B所示,免疫组织化学分析显示正常膀胱、结肠、子宫颈、肾和脑组织中不存在CAIX表达(图24A上分图);并且膜CAIX表达存在于不同实体瘤类型中(图24A下分图,图24B)。对癌症类型的不同患者的评估揭示了可变的CAIX表达,分类为低(H得分＝1-100)、中(101-200)和高(201-300)(图24B)。CAIX高表达病例见于肾细胞癌、膀胱癌、结直肠癌、小肠癌、食管/GEJ癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、胃癌、非小细胞肺癌和胃肠道间质瘤(图24A-24B)。CAIX表达显示在ER+乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤中不存在(图24B)。

6.17实例17.表达CAIX的肿瘤中的淋巴细胞浸润

[0698] 使用肿瘤组织核心的苏木精和伊红(H&E)染色评估表达CAIX的肿瘤中淋巴细胞浸润的水平。如图25A和25B所示,在不同的H&E染色的肿瘤组织核心中,观察到淋巴细胞浸润的异质密度[无(0)、低(1-199)、中(200-499)和高(≥500)](图25A-25B)。在表达CAIX的肿瘤中,分析显示肾细胞癌、膀胱癌、结直肠癌、食管/GEJ癌、胃肠道间质瘤、胶质母细胞瘤、肉瘤、小细胞肺癌、黑色素瘤和卵巢癌中存在低密度淋巴细胞浸润(图25C)。此外,在小肠癌、胃癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌和头颈癌中观察到中等密度的淋巴细胞浸润(图25C)。

6.18实例18.CA9、IL12RB1和IL12RB2在结直肠腺癌中的细胞特异性表达

[0699] 通过分析已发表的人结直肠腺癌组织的单细胞RNA测序数据,评估人癌组织中表达CA9、IL12RB1和IL12RB2的细胞类型,参见Zhang,Lei等人“Single-Cell Analyses Inform Mechanisms of Myeloid-Targeted Therapies in Colon Cancer.[单细胞分析揭示了结肠癌髓系靶向治疗的机制]”Cell[细胞]第181卷,2(2020):442-459.e29.doi:10.1016/j.cell.2020.03.048,其全部内容出于所有目的通过引用并入本文。如图26A-26D所示,本文呈现的代表性实例,来自初治结直肠腺癌患者(n＝10)的10468个细胞的单细胞RNA测序分析鉴定了八个不同的细胞簇,包括CD4+T细胞(30.02％)、CD8+T细胞(22.97％)、骨髓细胞(16.33％)、B细胞(9.47％)、先天淋巴细胞(9.10％)、上皮细胞(8.22％)、恶性细胞(2.57％)和成纤维细胞(1.32％)(图26A和26B)。在不同的细胞类型中,CA9表达在恶性细胞中显著观察到(32.7％),而其表达在所有免疫细胞类型中不存在(图26B和26C)。在CD4+(57.4％)、CD8+(55％)T细胞和先天淋巴细胞(53.3％)中观察到IL12RB1的广泛表达(图26B和26C)。在CD4+(39％)和CD8+(33.5％)T细胞中观察到IL12RB2表达(图26B和26C)。进一步分析揭示IL12RB1和IL12RB2的共表达存在于25.23％的CD4+T细胞和19.37％的CD8+T细胞

中(图26D)。

[0700] 此外,对来自胃腺癌、胶质母细胞瘤、头颈癌、肺癌、黑色素瘤、鼻咽癌和卵巢癌患者的公共数据库的单细胞RNA测序数据的分析显示恶性上皮细胞中的显著CA9表达。IL12RB1被确定在多种细胞类型中组成型表达,其中显著表达的是T细胞、NK细胞、先天淋巴细胞和骨髓细胞。与IL12RB1表达相比,在更低比例的T细胞和NK细胞中观察到IL12RB2表达。在所有肿瘤类型中,共表达CAIX、IL12RB1和IL12RB2转录本的肿瘤细胞比例非常低。

6.19实例19.总结-包含变体hIL-12p40多肽的hIL-12蛋白的减弱

[0701] 表31提供了包含本文所述的不同变体hIL-12p40多肽的hIL-12蛋白的减弱的总结,如通过实例4-18中描述的一种或多种测定法评估。

表31.包含hIL-12p40变体的hIL-12蛋白的减弱的总结

说明	HEK IL-12 报告子测定(EC50 比率)	PBMC 测定(PHA 刺激)16.9 nM 处的减少百分比	富集的 NK 细胞测定-16.9 nM 处的减少百分比	PSTAT(CD8)流式细胞术-16.9 nM 处的减少百分比	修饰
BCA331.16 (BCA356)	7300.00 (+++)	70.16 (++++)	86.95 (++++)	91.07 (++++)	W37A、F82A、K219A
BCA327.16	9566.00 (+++)	69.34 (++++)	82.88 (++++)	88.19 (+++)	E81A、F82A、K106A
BCA310.16	22740.00 (+++++)	77.04 (+++++)	97.73 (+++++)	98.81 (+++++)	D1 结构域缺失

BCA313 (阳性对照)	4996.00 (+++)	68.66 (++++)	70.16 (+++)	82.50 (+++)	E81K、 K121E、 K286E
BCA330.16	107.00 (+)	61.98 (+++)	40.98 (++)	NT	W37A、 F82A、 K217A
BCA329.16	4686.00 (+++)	54.17 (++)	73.31 (+++)	72.86 (++)	P39A、 D40A、 E81A、F82A
BCA321.16	6594.00 (+++)	74.35 (+++++)	93.45 (+++++)	93.87 (++++)	K217-L218 至 217I
BCA332.16	141.00 (+)	45.85 (+++++)	NT	NT	K106A、 K217A、 K219A
BCA326.16	374.00 (+)	34.31 (+)	-13.81 (无减弱)	50.24 (+)	E81A、F82A

[0702] 最小减弱用“+”表示,而最大减弱用“+++++”表示。NT表示未测试。

[0703] hIL-12p40亚基中包含F82A或/和E81A氨基酸取代的hIL-12变体并不表明是hIL-12减弱的驱动突变。例如,E81A/F82A(BCA326.16)减弱最小,而BCA329.16减弱中等。包含含有W37A、F82A、K219A氨基酸取代的hIL-12p40亚基的hIL-12蛋白质(BCA331.16(本文也称为BCA356))比含有W37A、F82A、K217A氨基酸取代的那些蛋白质(BCA330.16)更减弱,出乎意料地表明氨基酸位置K219起关键作用,而E81A、F82A、K106A的不同簇(BCA327.16)与(BCA331.16(本文也称为BCA356))相似。

6.20实例20.包含变体hIL-12p35蛋白的抗CAIX融合蛋白的生成

[0704] 根据标准方法生成以下抗hCAIX hIL-12融合蛋白。简言之,对每个hIL-12p35变体的不同多肽序列进行密码子优化以获得DNA多核苷酸对应物,将其克隆到合适的哺乳动物表达质粒中。将各个质粒瞬时共转染至细胞系中。根据制造商的方案,通过适当的喂养,转染的细胞生长几天。收获细胞培养物的上清液并纯化hIL-12p35蛋白。

[0705] 表32提供了所生成的融合蛋白的hIL-12多肽中包含的氨基酸修饰的描述。

表32.hIL-12p35变体的氨基酸序列

说明	hIL-12p35 氨基酸取代 （相对于 SEQ ID NO: 30 的氨基酸序列进行编号）	SEQ ID NO
BCA325.16	Y189A	304、311、245
BCA324.16	F188A	304、310、245
BCA323.16	F188A/Y189A	304、309、245
BCA307.16	Δ55-92	304、307、245
BCA308.16	E60K/F61H/P63S/K150H/F188P	304、308、245

[0706] 表33提供了所生成的每个hIL-12p35变体的描述和氨基酸序列。每个多肽链的信号序列都带有下划线。

表33.抗hCAIX hIL-12融合蛋白的氨基酸序列

说明		SEQ ID NO
BCA325.16	重链（杵） IL-12p40	304
	重链（白） IL-12p35（变体 E）	311
	轻链	245
BCA324.16	重链（杵） IL-12p40	304
	重链（白） IL-12p35（变体 D）	310
	轻链	245
BCA323.16	重链（杵） IL-12p40	304
	重链（白） IL-12p35（变体 C）	309
	轻链	245
BCA307.16	重链（杵）	304

	IL-12p40	
	重链（白） IL-12p35（变体 A）	307
	轻链	245
BCA308.16	重链（杵） IL-12p40	304
	重链（白） IL-12p35（变体 B）	308
	轻链	245

6.21实例21.hIL-12p35变体活性的评估-pSTAT4信号传导

[0707] 使用HEK-Blue TM报告子测定(英杰公司(#hkb-IL12))评估通过表32和33中列出的每种hIL-12p35变体的hIL-12受体的信号传导。简而言之,测定中使用的HEK-Blue™IL-12细胞表达STAT4诱导型SEAP报告基因。IL-12与HEK-Blue™IL-12细胞表面的IL-12R结合会触发信号传导级联,导致STAT-4激活(和磷酸化),随后产生SEAP报告蛋白。使用QUANTI-Blue™溶液可以轻松评估HEK-Blue™IL-12细胞上清液中SEAP的检测。此处,HEK-Blue细胞与不同浓度的每种所示hIL-12p35变体在细胞培养板中孵育18-24小时。添加Quanti Blue溶液后读取板的读数。hIL-12p35变体的IL-12活性呈现在图27中并且IL-12活性相对于野生型Fc-IL-12的减弱倍数呈现于表34中。

表34.hIL-12p35变体相对于Fc-IL-12对照的减弱倍数

说明	*减弱倍数 （相对于 Fc-IL-12 对照）
BCA307.16	>10,000*
BCA308.16	1.4
BCA323.16	15.4
BCA324.16	1.0
BCA325.16	4.5

[0708] *无法确定BCA307.16的IL-12活性减弱倍数,因为在HEK测定中测试浓度未达到足够的IL-12活性。

[0709] 如图27和表34所示,每种hIL-12p35变体显示hIL-12活性减弱1倍至15倍,除了BCA307.16显示超过10,000倍的减弱。

6.22实例22.hIL-12p35变体活性评估-PHA刺激的PBMC的IFN-γ释放

[0710] 评估了在每种hIL-12p35变体存在下刺激的T细胞释放的IFN-γ水平。简而言之,将hPBMC以10万个细胞/孔接种在96孔板中,并用100μl体积的PHA(1μg/ml)刺激过夜。第二天,再次以相同浓度添加PHA,同时滴定指定的hIL-12p40变体的浓度。随后将细胞在37℃ 5% CO_2培养箱中孵育约48小时。通过标准IFN-γELISA测量培养物上清液中的IFN-γ(图28A-28C)。如图28A-28C所示,BCA325.16、BCA323.16和BCA307.16在0.169nM下(不在更高浓度下)表现出减弱的IFN-γ释放。BCA324.16、BCA308.16未显示IFN-γ释放减弱。BCA356用作阳性对照,显示IFN-γ释放的最大减弱。

6.23实例23.hIL-12p35变体活性评估-hIL-2引发的人NK细胞的IFN-γ释放

[0711] IL-12刺激NK细胞分泌IFN-γ并增强其增殖和细胞溶解活性(参见,例如,Glassman,Caleb R等人"Structural basis for IL-12 and IL-23receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells.[IL-12和IL-23受体共享的结构基础揭示了对T细胞和NK细胞形成作用的途径]"Cell[细胞]第184卷,4(2021):983-999.e24.doi:10.1016/j.cell.2021.01.018)。为了评估NK细胞释放的IFN-γ的水平,将hPBMC在含有10% HI-FBS和100IU/ml hIL-2的RPMI 1640中解冻。过夜孵育后收获细胞,并通过负选择富集NK细胞。NK细胞按50,000个细胞/孔接种,滴定hIL-12的浓度,并在37℃、5% CO_2中孵育约48小时。通过IFN-γ标准IFN-γELISA测量培养物上清液中的IFN-γ(图29A-29C)。如图29A-29C所示,BCA307.16在16.95nM处的IFN-γ释放方面显示出与BCA356相当的减弱;BCA325.16、BCA323.16、BCA324.16和BCA308.16未显示IFN-γ释放减弱。

6.24实例24.总结hIL-12p35变体活性

[0712] 实例19-22中呈现并总结于表35中的数据表明,在HEK-IL-12报告子测定中,与野生型hIL-12相比,BCA307中的hIL-12减弱>10000倍;以及与其他hIL-12p35变体相比,BCA307在基于NK细胞的测定中高度减弱。

表35.hIL-12p35变体的功能分析总结

		HEK-IL12 报告子测定	NK 细胞的 IFNγ 释放	PHA 刺激 PBMC 的 IFNγ 释放
说明	氨基酸修饰	减弱	*基于曲线变化的减弱水平	
BCA307.16	Δ55-92	+++	+++	+
BCA308.16	E60K/F61H/P63S/K150H/F188P	没有减弱	没有减弱	没有减弱
BCA323.16	F188A/Y189A	+	没有减弱	+
BCA324.16	F188A	没有减弱	没有减弱	没有减弱
BCA325.16	Y189A	没有减弱	没有减弱	+

[0713] *根据曲线变化进行定性排名,其中+、++、+++代表与IL-12 WT相比的低、中和高减弱。

6.25实例25.可溶性CAIX作为替代生物标志物

[0714] 为了确定可溶性CAIX水平作为肿瘤中CAIX表达的替代生物标志物的效用,分别通过免疫组织化学(IHC)和酶联免疫吸附测定(ELISA)来确定胃癌、肾癌、结直肠癌、卵巢癌、非小细胞肺癌和子宫内膜癌病例的样品中肿瘤组织中的细胞CAIX表达和肿瘤匹配血浆中的可溶性CAIX水平。如图30所示,在所有癌症组合在一起的Pearson相关系数分析中,观察到细胞CAIX和可溶性CAIX之间呈正相关(r=0.2086,P=0.0539)。

***

[0715] 本发明在范围上不受本文所述的特定实施例的限制。实际上,根据上述说明和附图,除了所述的那些修改之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将是显而易见的。这些修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0716] 本文引用的所有参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)均以通过引用全文并入本文中,且出于所有目的,其程度与每个单独的参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)被特别且单独地指示以通过引用全文并入本文中的程度相同。

[0717] 其他实施例在所附权利要求内。

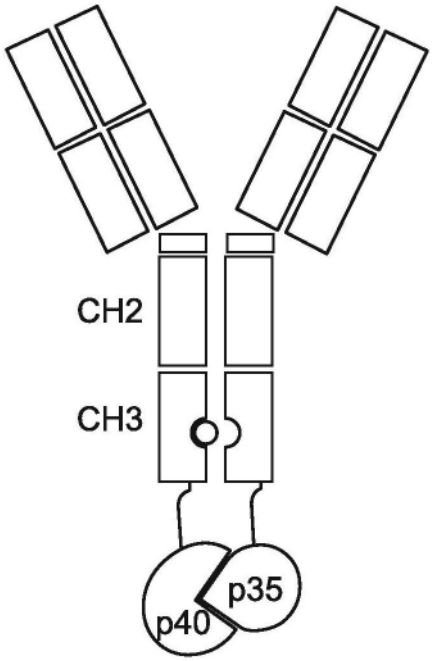


图1

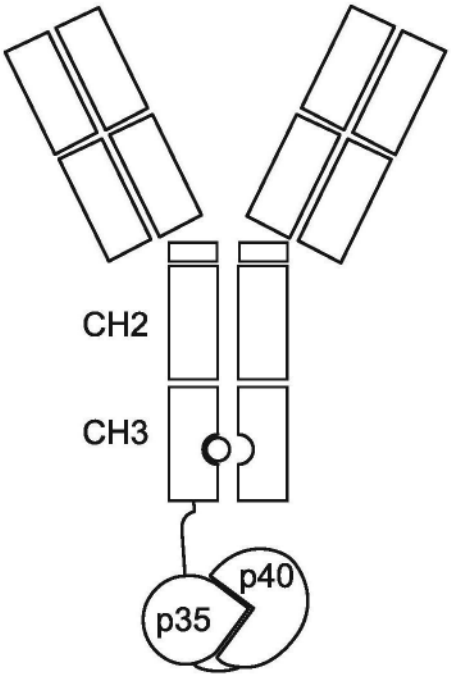


图2

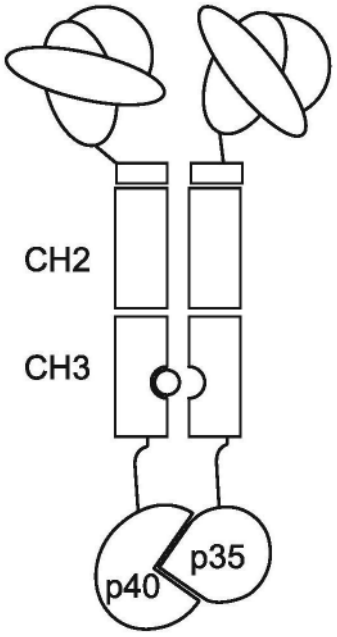


图3

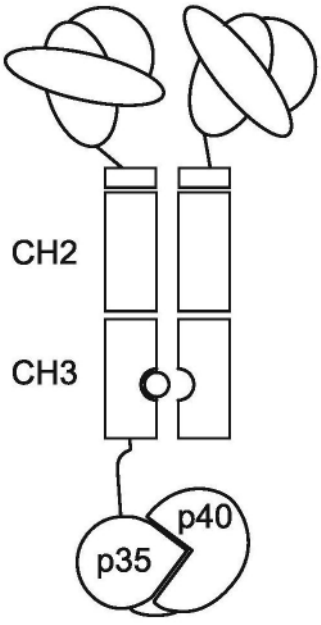


图4

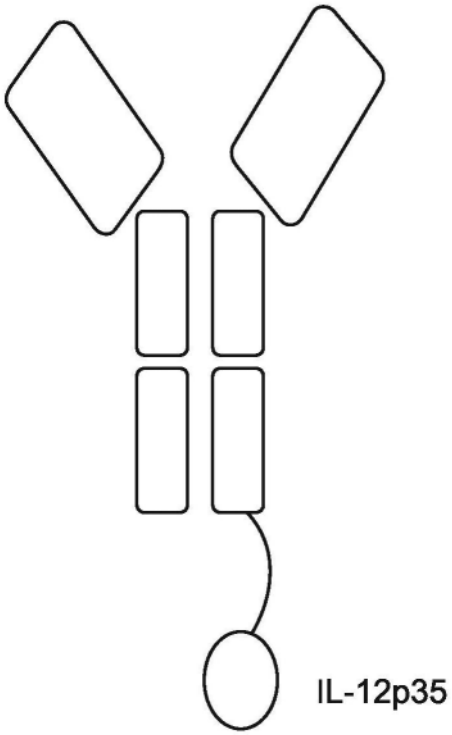


图5

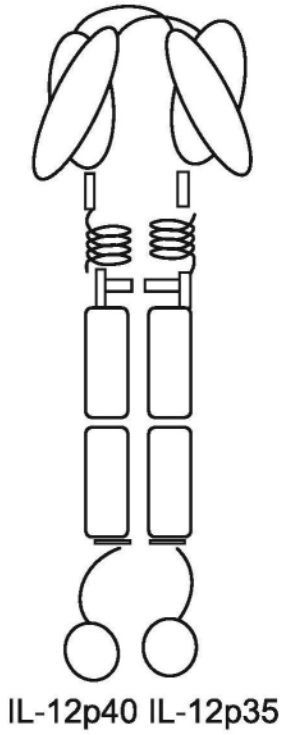


图6

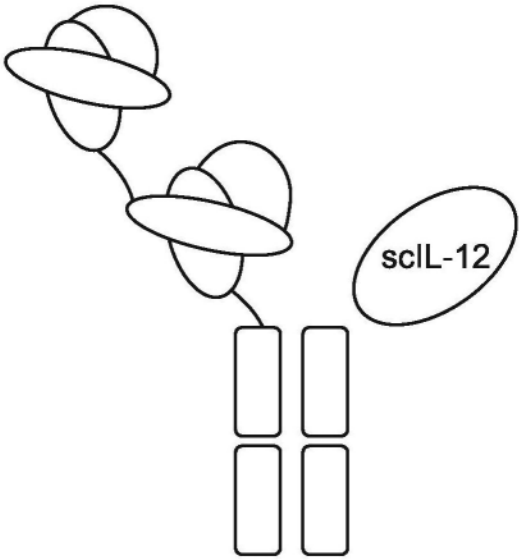


图7

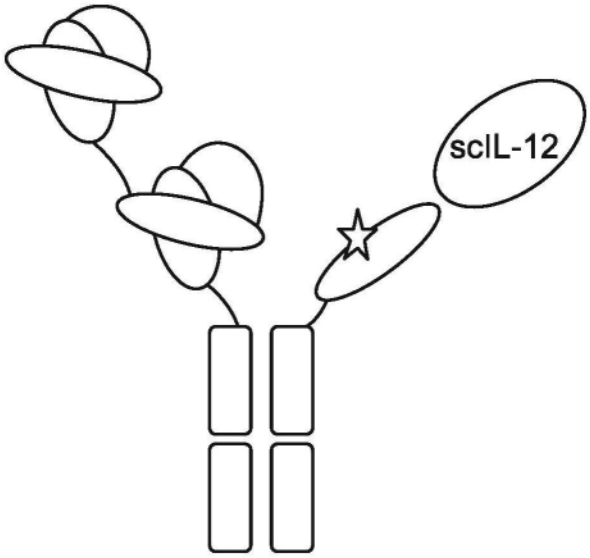


图8

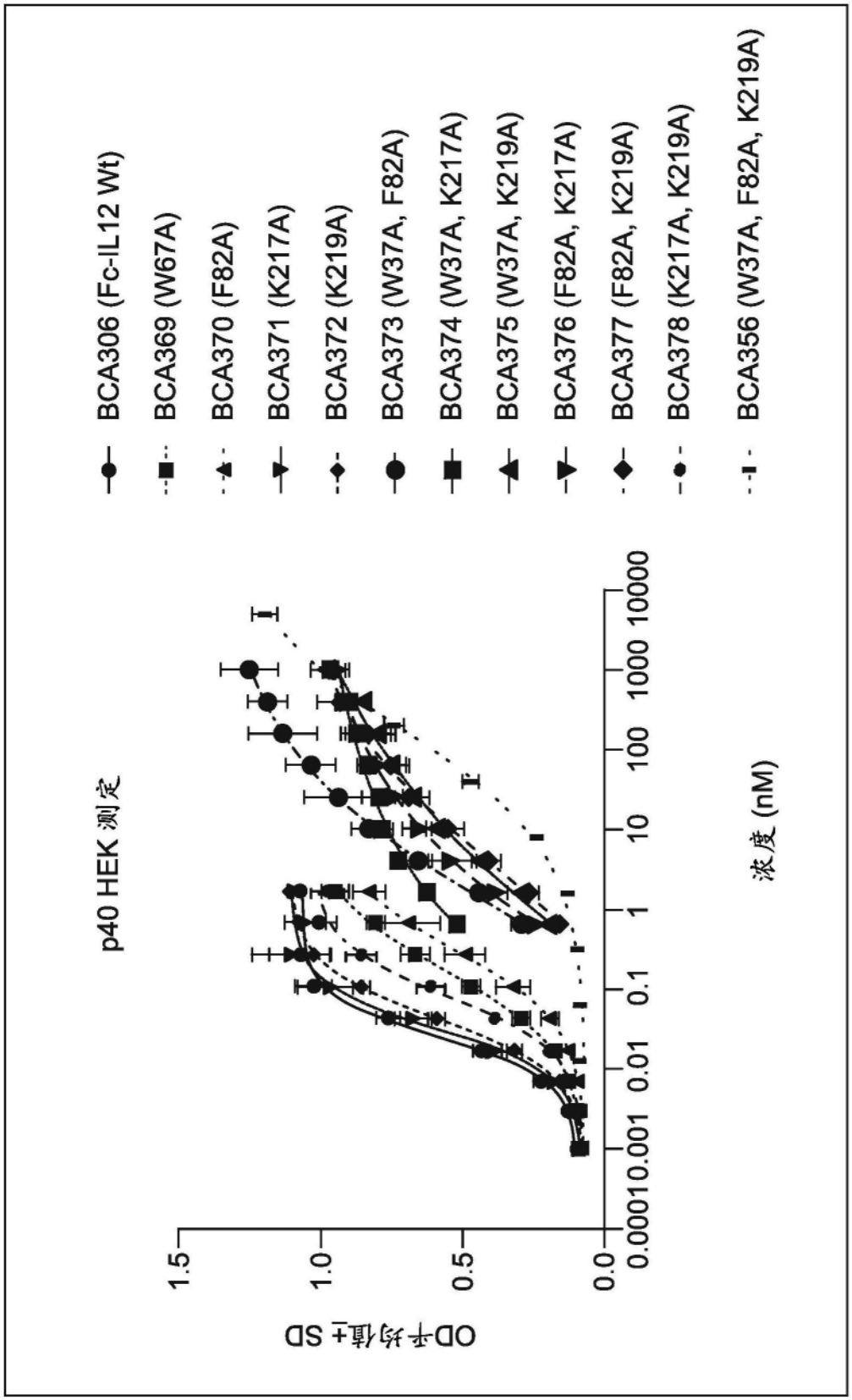

p40 HEK 测定
BCA306 (Fc-IL12 Wt)
BCA369 (W67A)
BCA370 (F82A)
BCA371 (K217A)
BCA372 (K219A)
BCA373 (W37A, F82A)
BCA374 (W37A, K217A)
BCA375 (W37A, K219A)
BCA376 (F82A, K217A)
BCA377 (F82A, K219A)
BCA378 (K217A, K219A)
BCA356 (W37A, F82A, K219A)
OD平均值± SD
1.5
1.0
0.5
0.0
0.00010.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
浓度 (nM)

图9

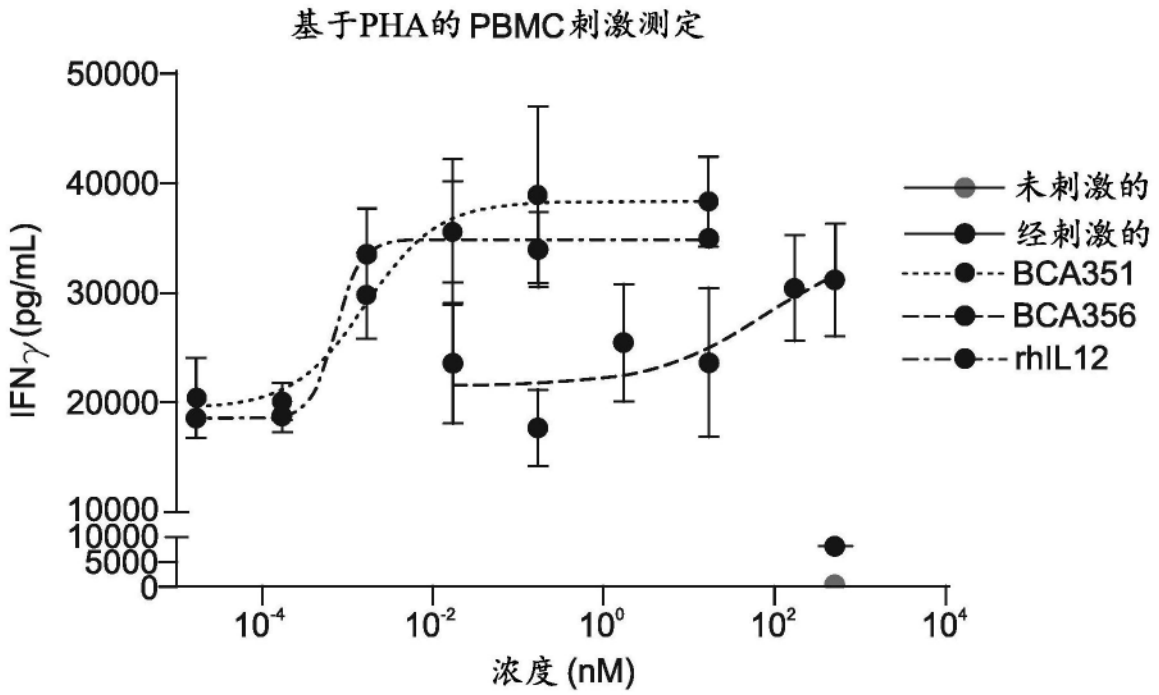

基于PHA的PBMC刺激测定
IFNγ(pg/mL)
50000
40000
30000
20000
10000
10000
5000
0
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA356
rhIL12

图10A

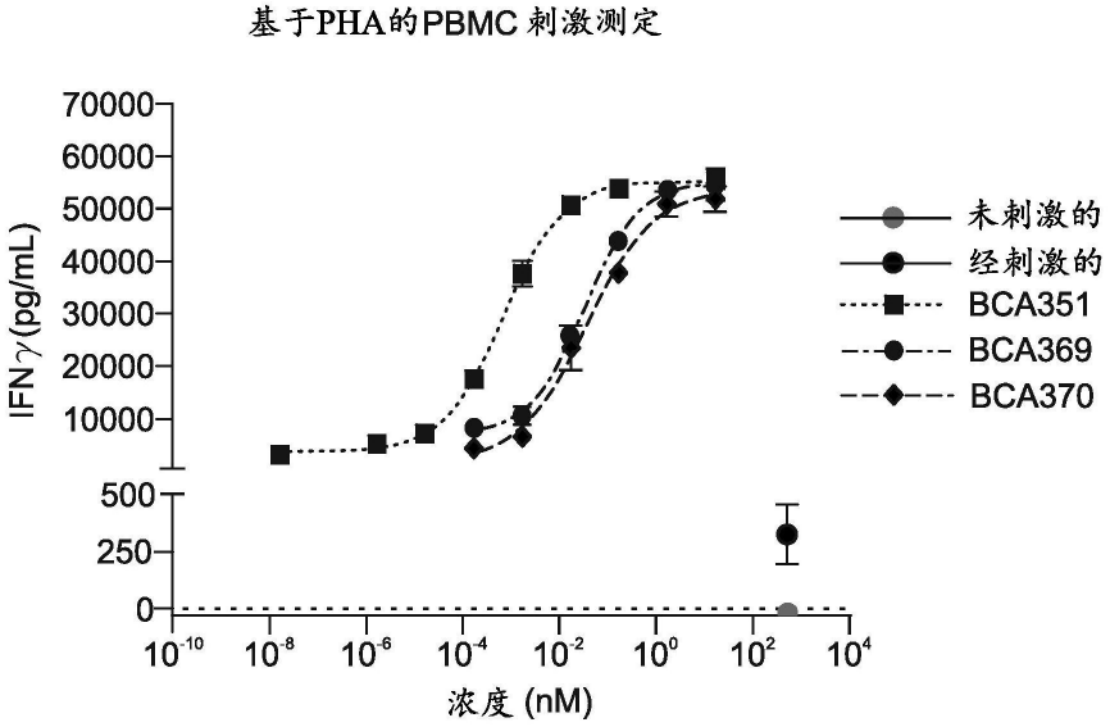

基于PHA的PBMC 刺激测定
IFNγ(pg/mL)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
500
250
0
10^{-10}
10^{-8}
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA369
BCA370

图10B

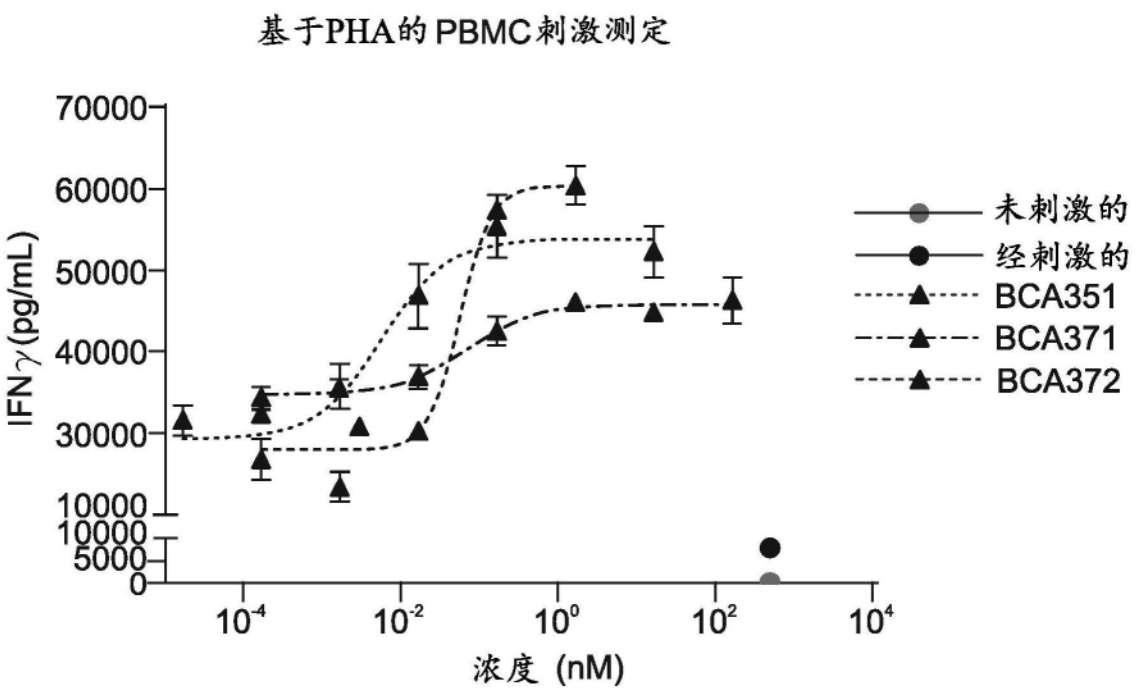

基于PHA的PBMC刺激测定
IFNγ(pg/mL)
70000
60000
50000
40000
30000
10000
10000
5000
0
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA371
BCA372

图10C

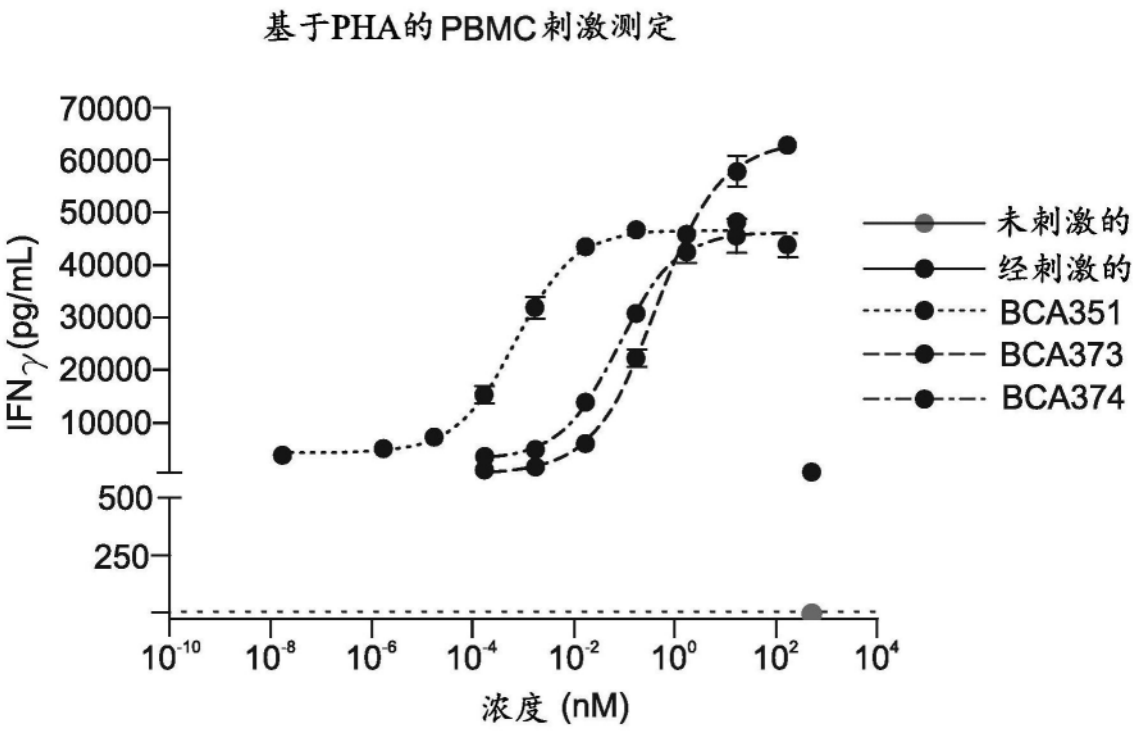

基于PHA的PBMC刺激测定
IFNγ(pg/mL)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
500
250
10^{-10}
10^{-8}
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA373
BCA374

图10D

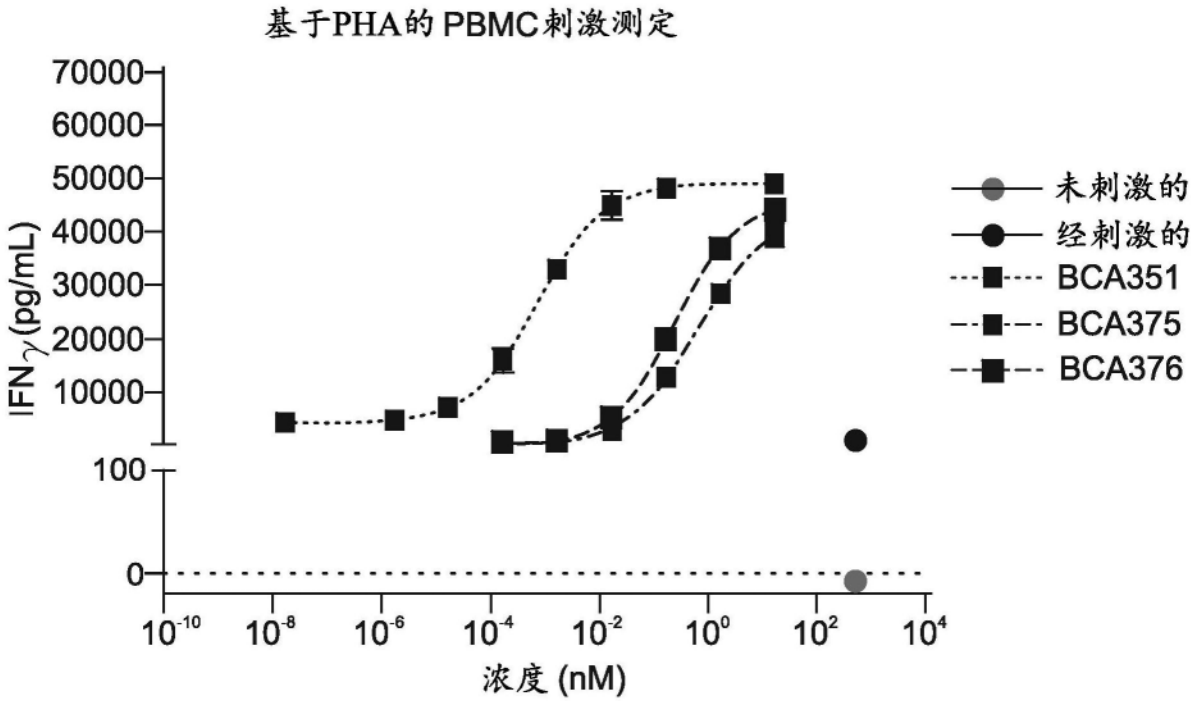

基于PHA的PBMC刺激测定
IFNγ(pg/mL)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
100
0
10-10
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
104
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA375
BCA376

图10E

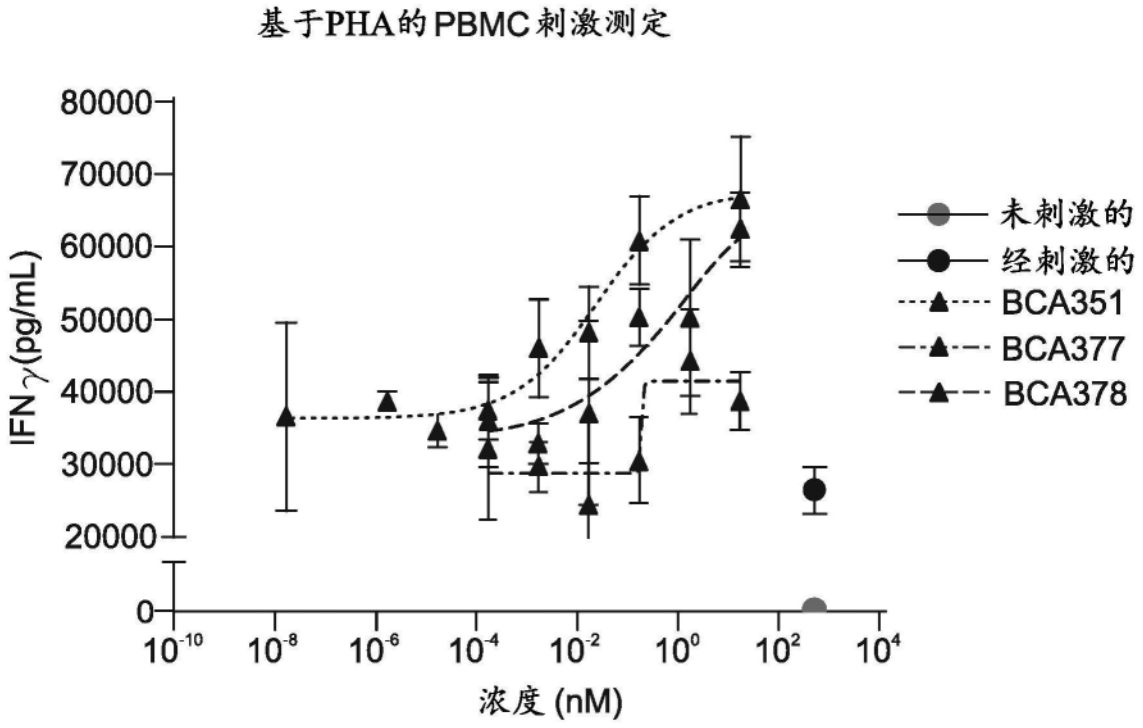

基于PHA的PBMC刺激测定
IFNγ(pg/mL)
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
0
10-10
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
104
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA377
BCA378

图10F

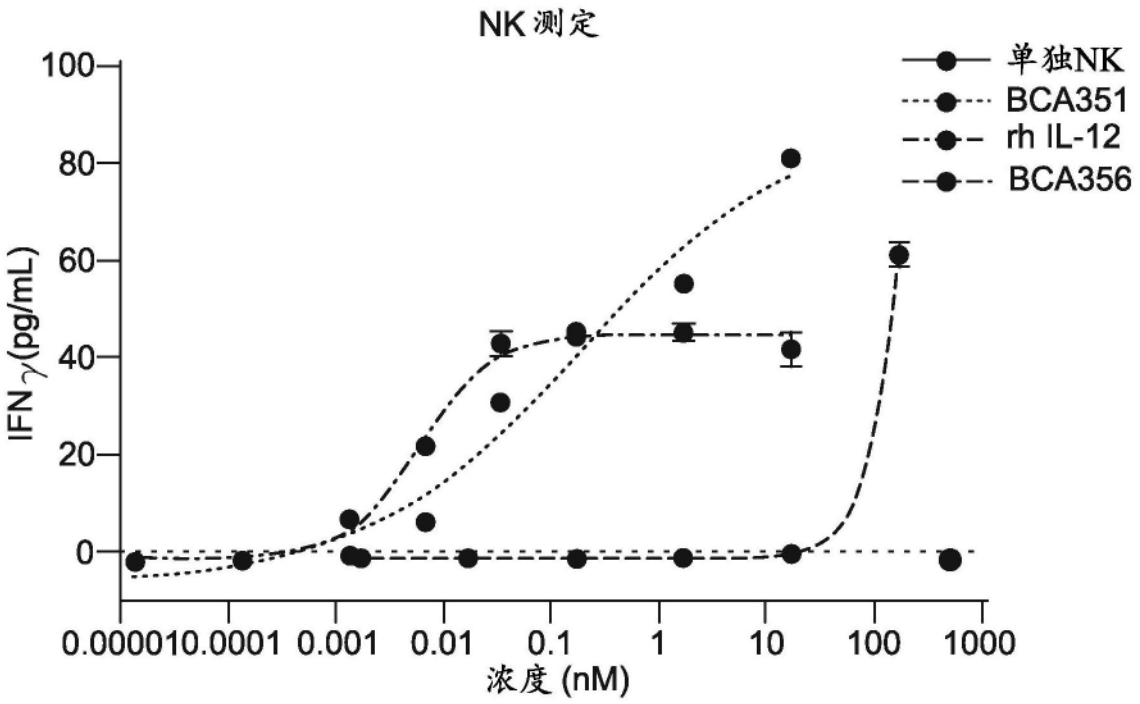

NK测定
单独NK
BCA351
rh IL-12
BCA356
IFNγ(pg/mL)
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)

图11A

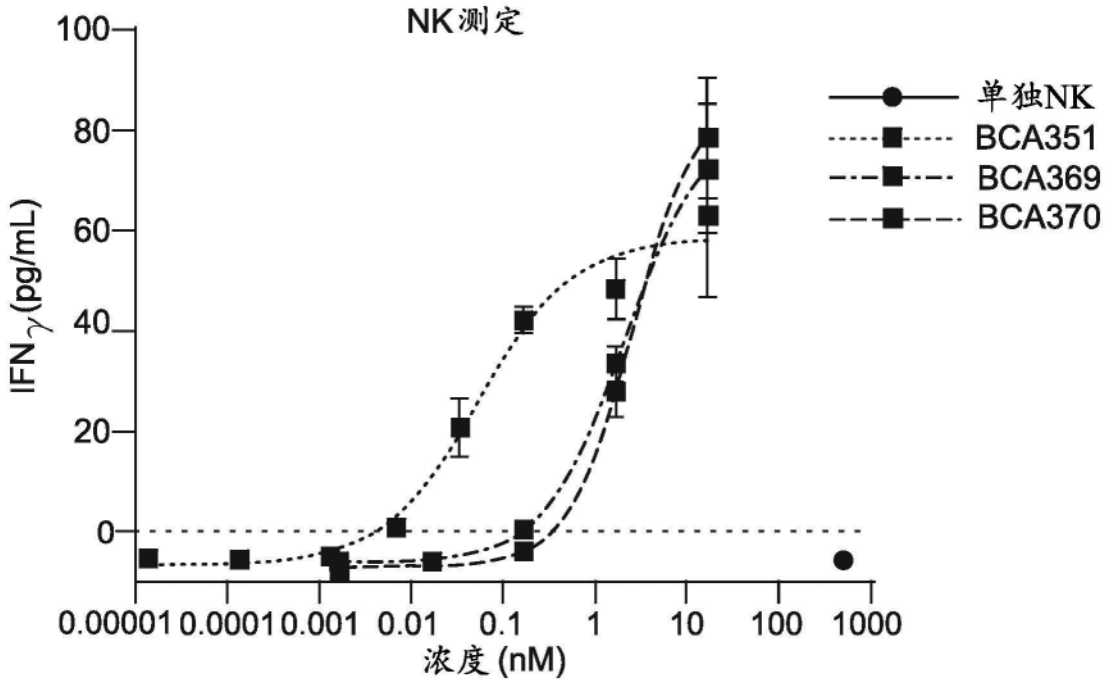

NK测定
单独NK
BCA351
BCA369
BCA370
IFNγ(pg/mL)
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)

图11B

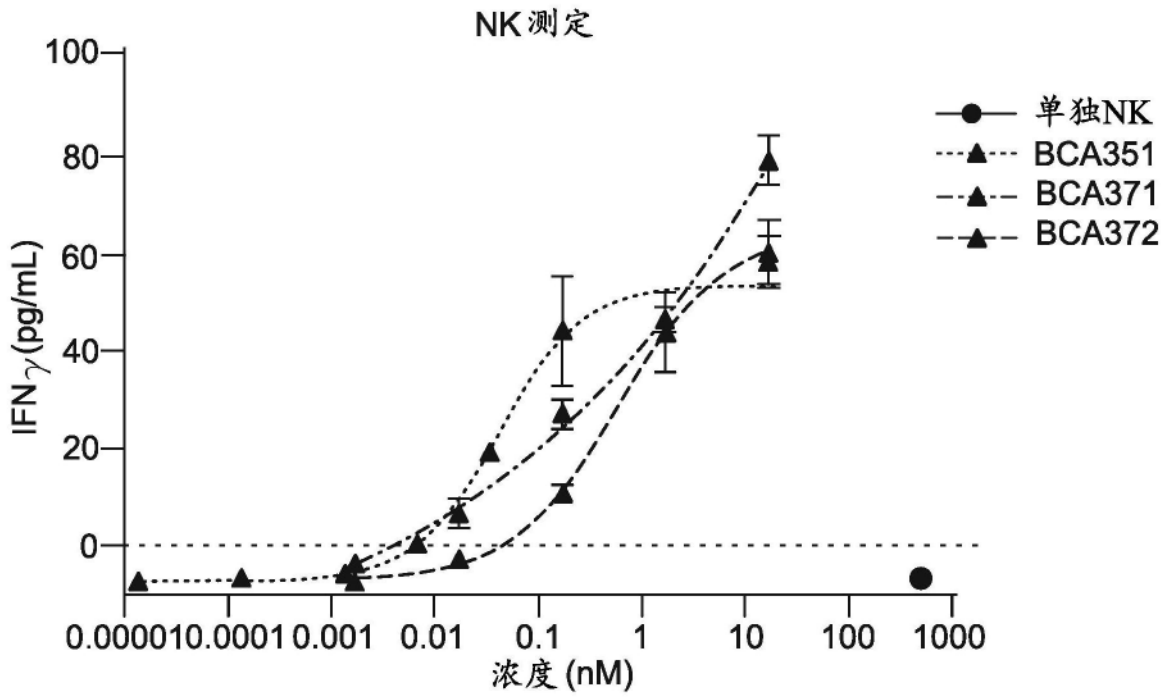

NK测定
100
80
60
40
20
0
IFNγ(pg/mL)
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
单独NK
BCA351
BCA371
BCA372

图11C

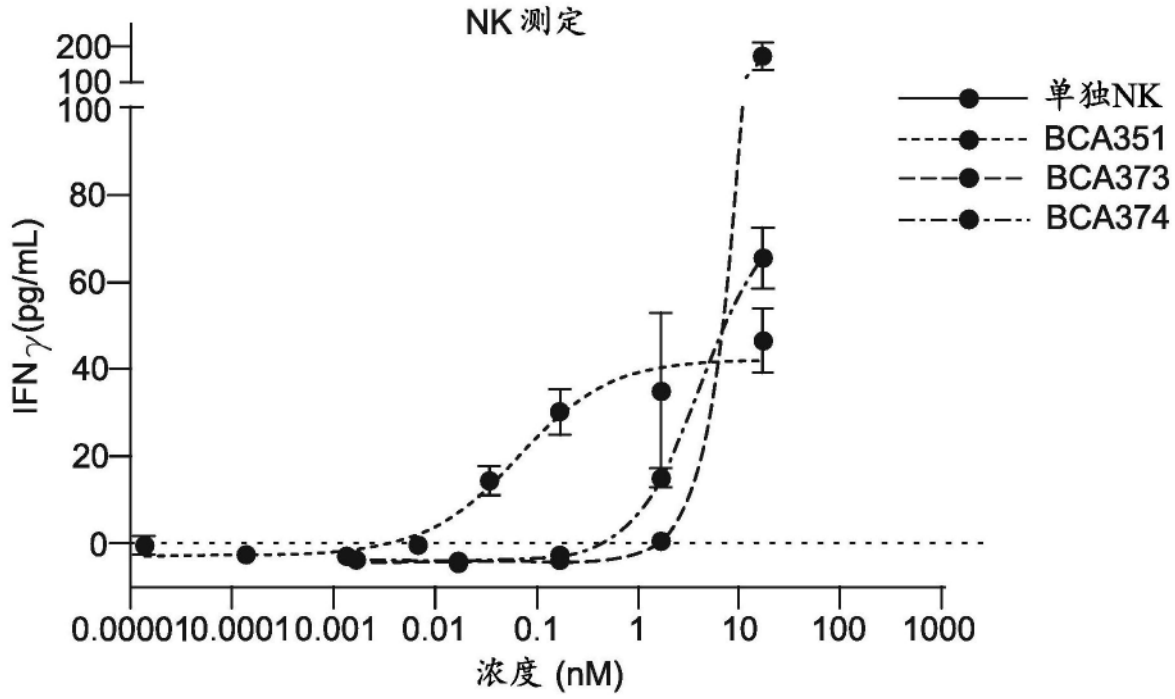

NK测定
200
100
100
80
60
40
20
0
IFNγ(pg/mL)
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(nM)
单独NK
BCA351
BCA373
BCA374

图11D

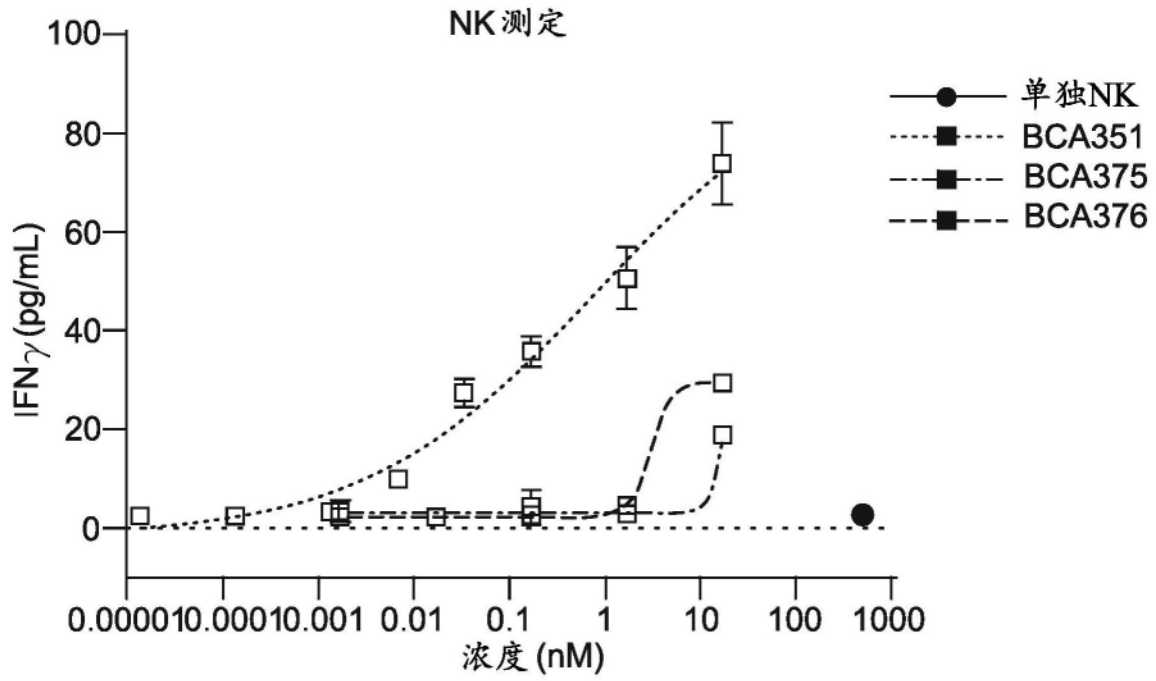

NK测定
100
80
60
40
20
0
IFNγ(pg/mL)
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
单独NK
BCA351
BCA375
BCA376

图11E

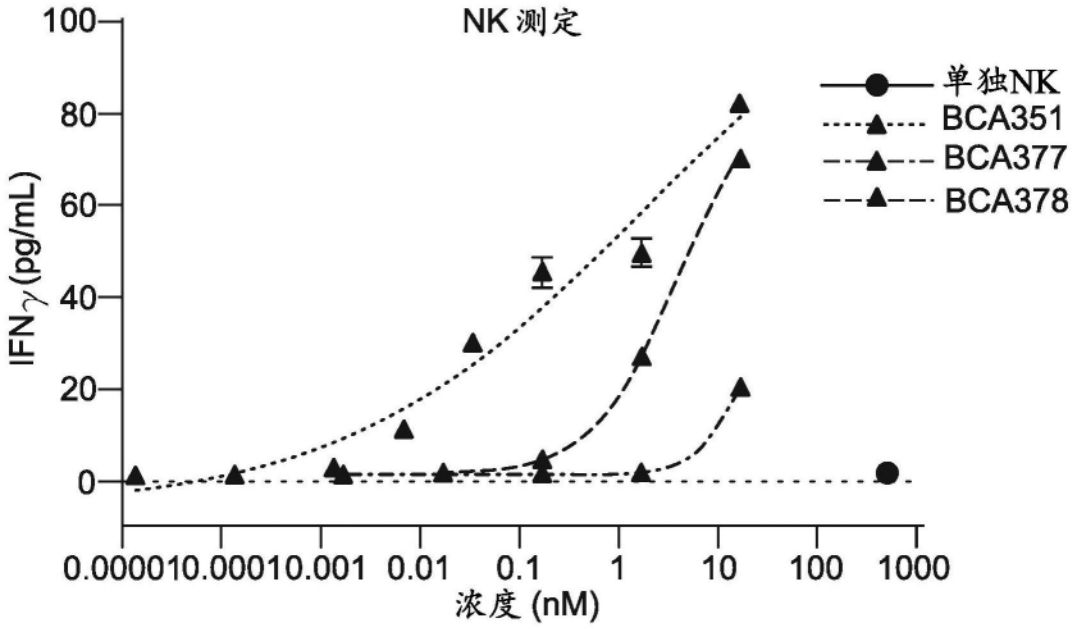

NK测定
100
80
60
40
20
0
IFNγ(pg/mL)
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
单独NK
BCA351
BCA377
BCA378

图11F

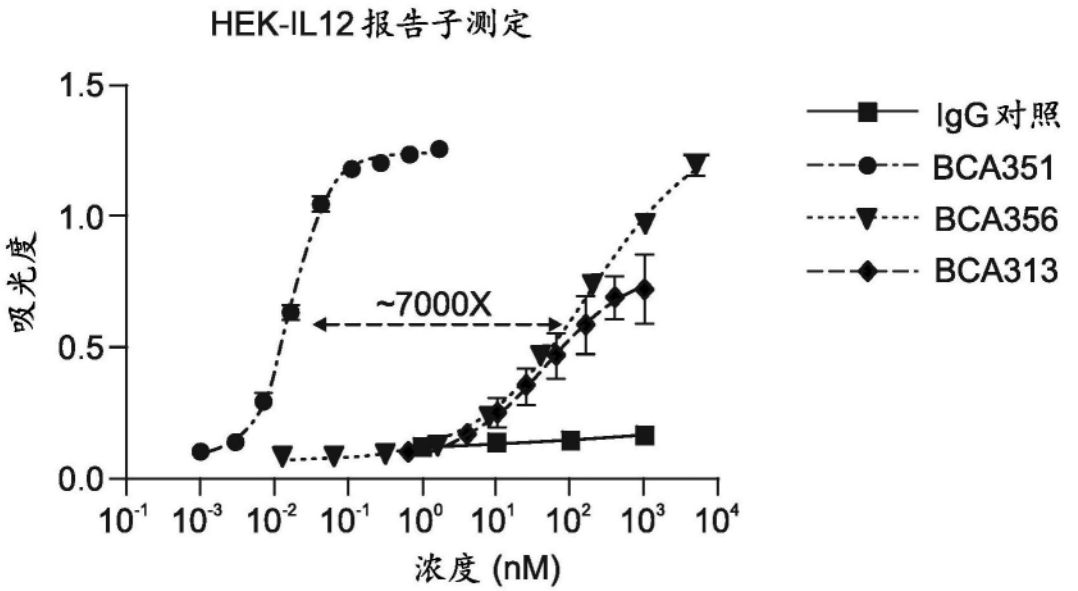

HEK-IL12报告子测定
吸光度
1.5
1.0
0.5
0.0
~7000X
10-1 10-3 10-2 10-1 100 101 102 103 104
浓度 (nM)
IgG对照
BCA351
BCA356
BCA313

图12

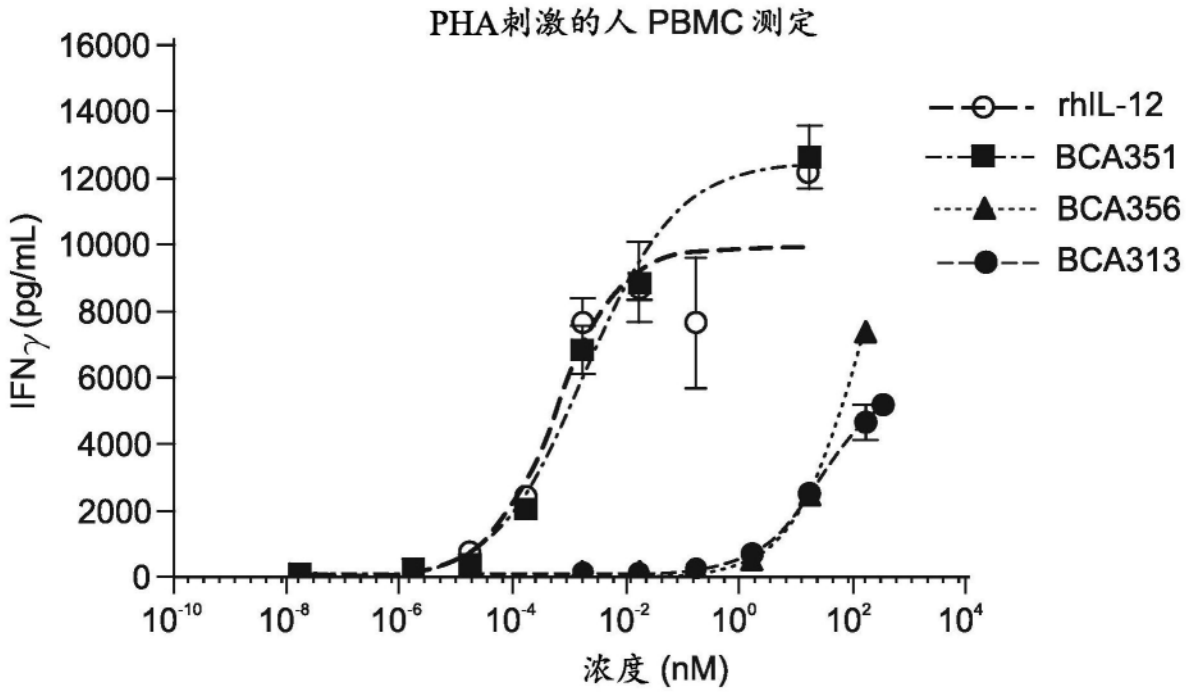

PHA刺激的人 PBMC 测定
IFNγ(pg/mL)
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10-10 10-8 10-6 10-4 10-2 100 102 104
浓度 (nM)
rhIL-12
BCA351
BCA356
BCA313

图13

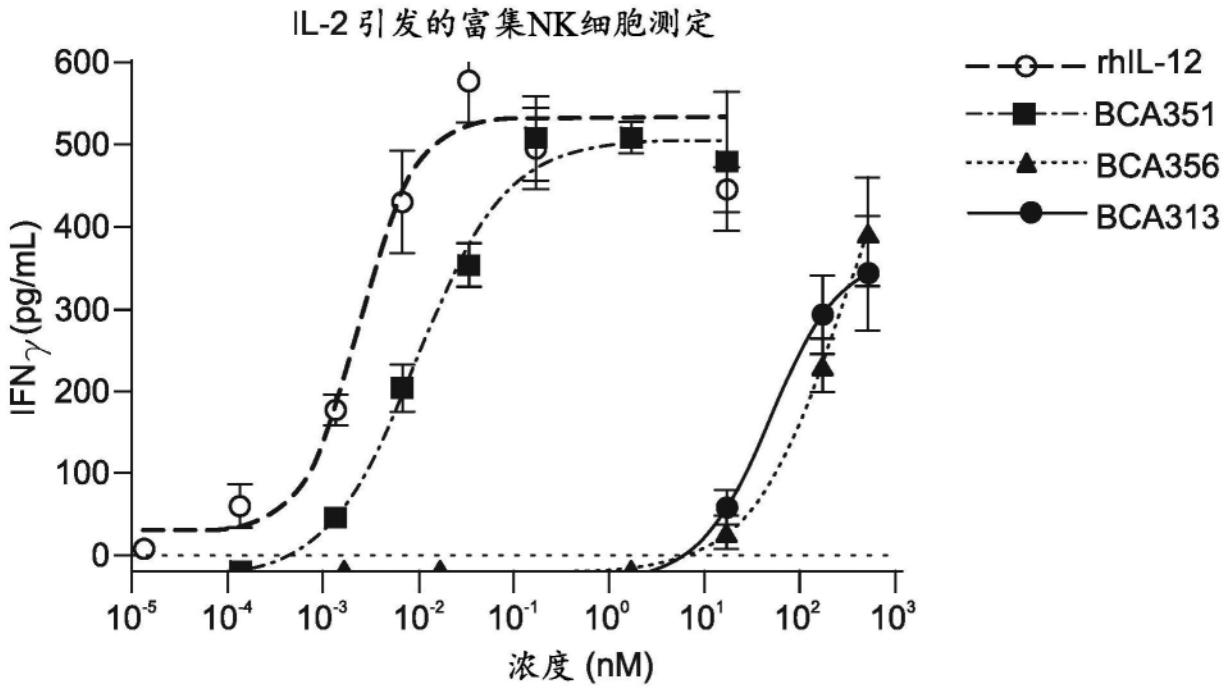

IL-2 引发的富集NK细胞测定
IFNγ(pg/mL)
600
500
400
300
200
100
0
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
浓度 (nM)
rhIL-12
BCA351
BCA356
BCA313

图14

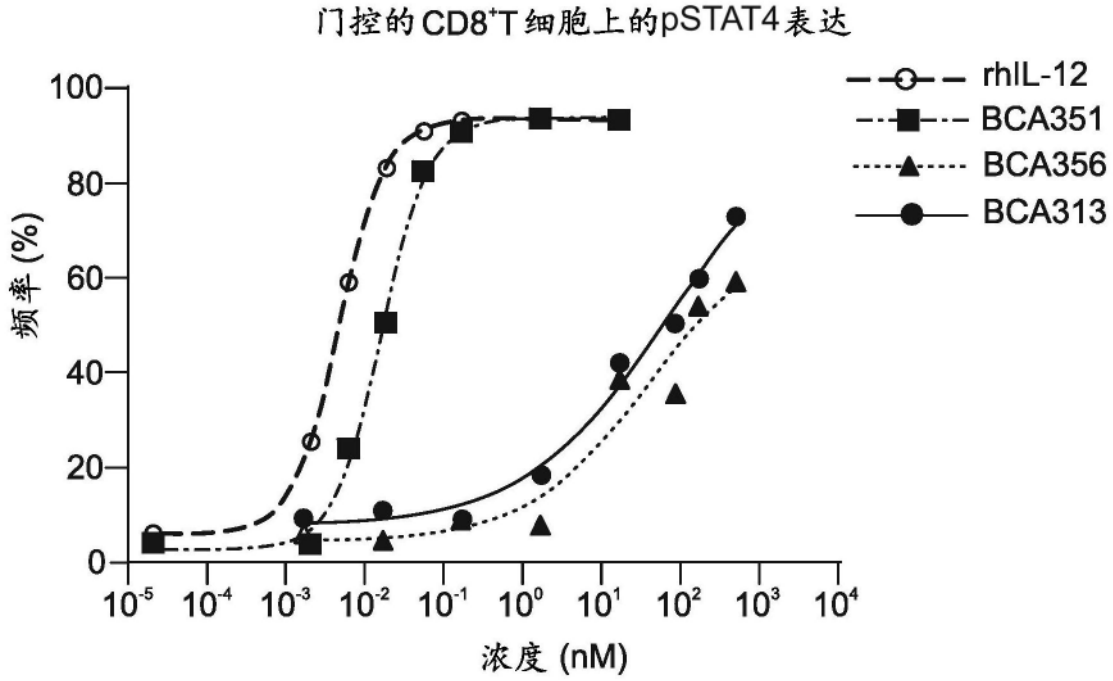

门控的CD8+T细胞上的pSTAT4表达
频率 (%)
100
80
60
40
20
0
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
浓度 (nM)
rhIL-12
BCA351
BCA356
BCA313

图15

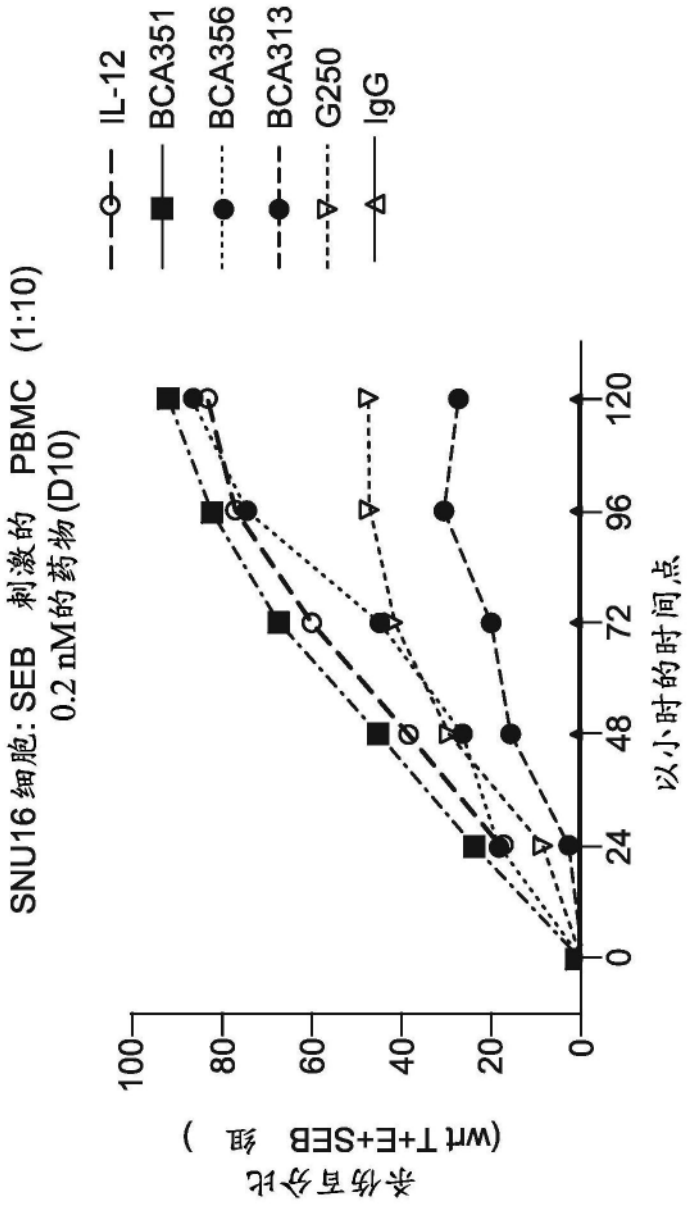

SNU16 细胞: SEB 刺激的 PBMC (1:10)
0.2 nM的药物(D10)
IL-12
BCA351
BCA356
BCA313
G250
IgG
杀伤百分比
(wt T+E+SEB 组)
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
120
以小时的时间点

图16

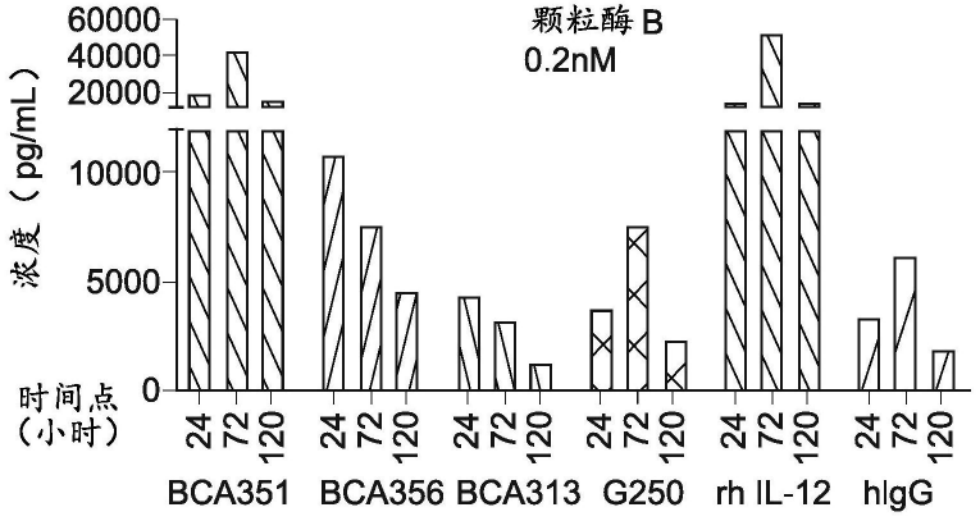

颗粒酶 B
0.2nM
浓度（pg/mL）
60000
40000
20000
10000
5000
0
时间点（小时）
24
72
120
BCA351
BCA356
BCA313
G250
rh IL-12
hIgG

图17A

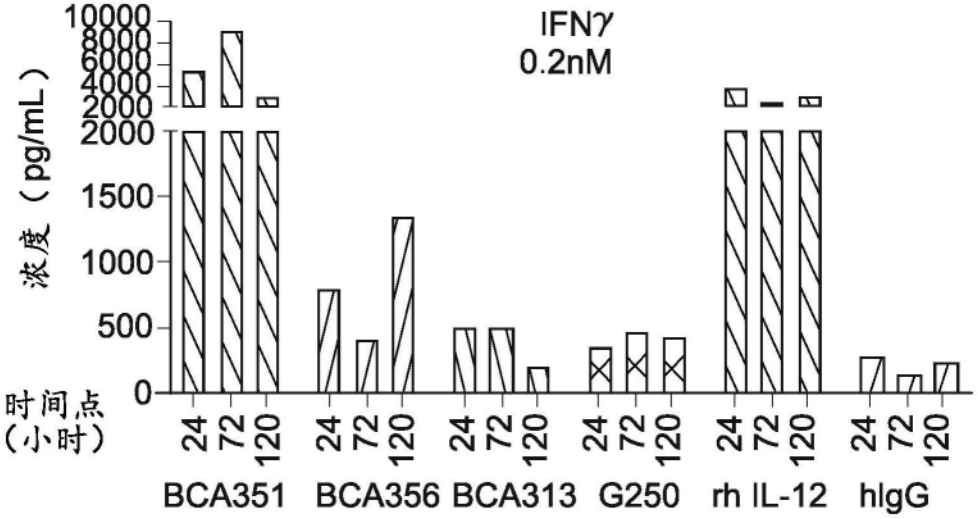

IFNγ
0.2nM
浓度（pg/mL）
10000
8000
6000
4000
2000
2000
1500
1000
500
0
时间点（小时）
24
72
120
BCA351
BCA356
BCA313
G250
rh IL-12
hIgG

图17B

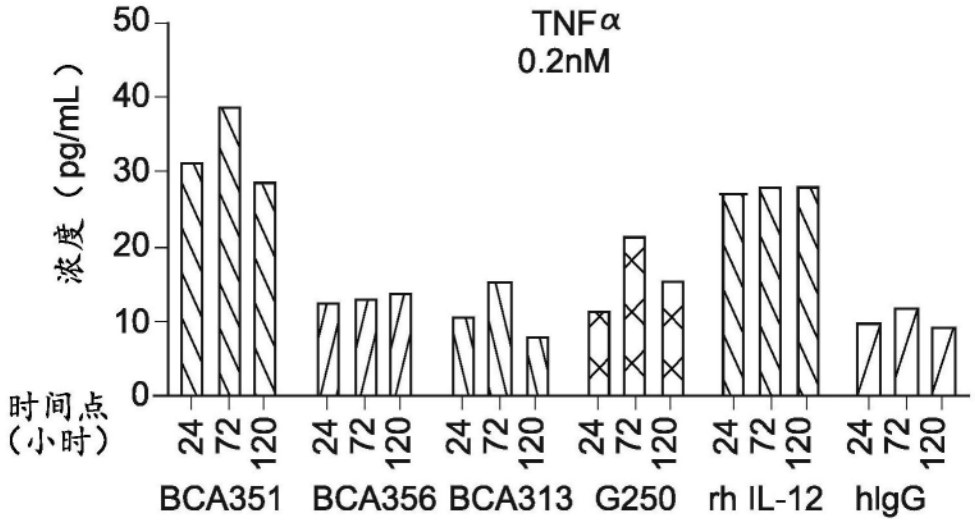

TNFα
0.2nM
浓度（pg/mL）
50
40
30
20
10
0
时间点
（小时）
24 72 120
BCA351
BCA356
BCA313
G250
rh IL-12
hIgG

图17C

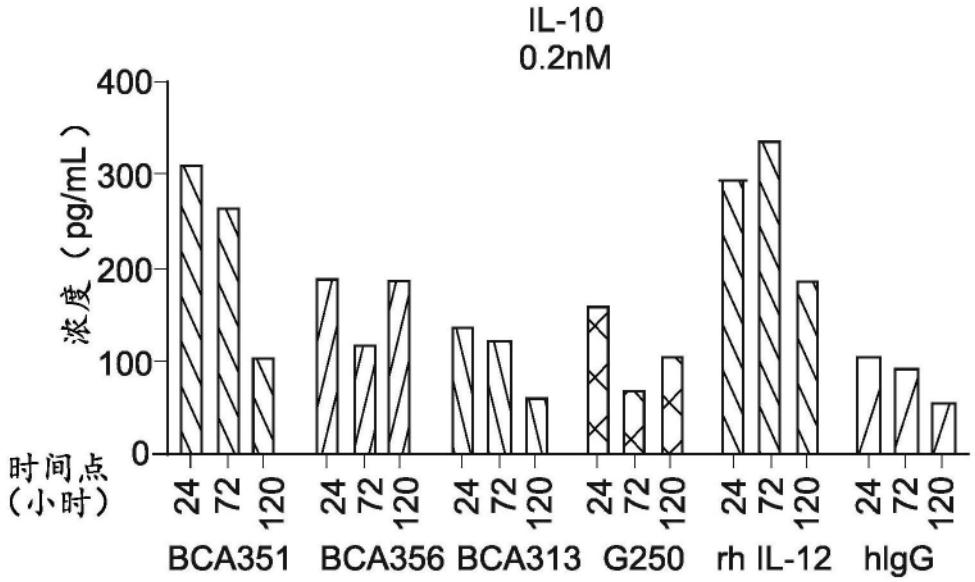

IL-10
0.2nM
浓度（pg/mL）
400
300
200
100
0
时间点
（小时）
24 72 120
BCA351
BCA356
BCA313
G250
rh IL-12
hIgG

图17D

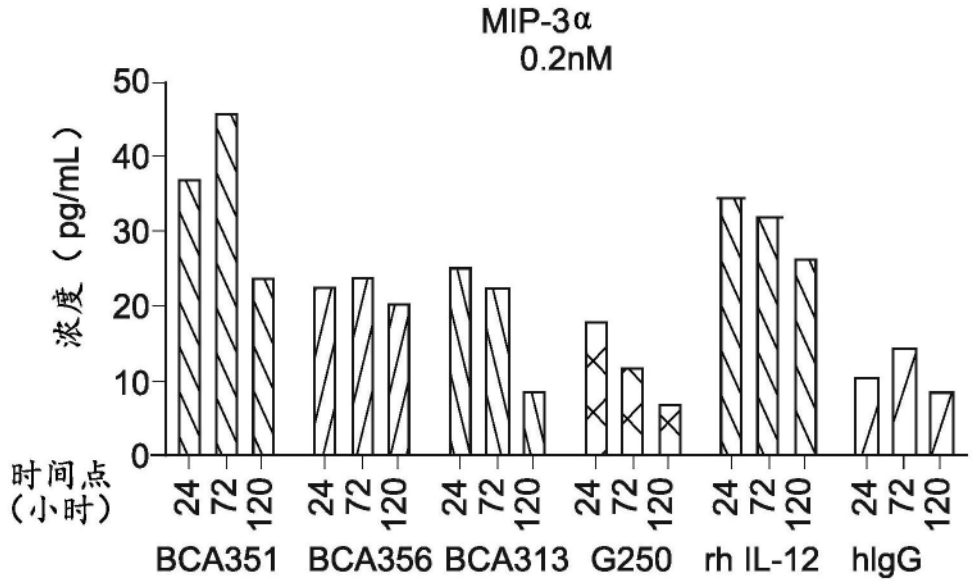

MIP-3α
0.2nM
浓度（pg/mL）
50
40
30
20
10
0
时间点
（小时）
24 72 120 24 72 120 24 72 120 24 72 120 24 72 120 24 72 120
BCA351 BCA356 BCA313 G250 rh IL-12 hIgG

图17E

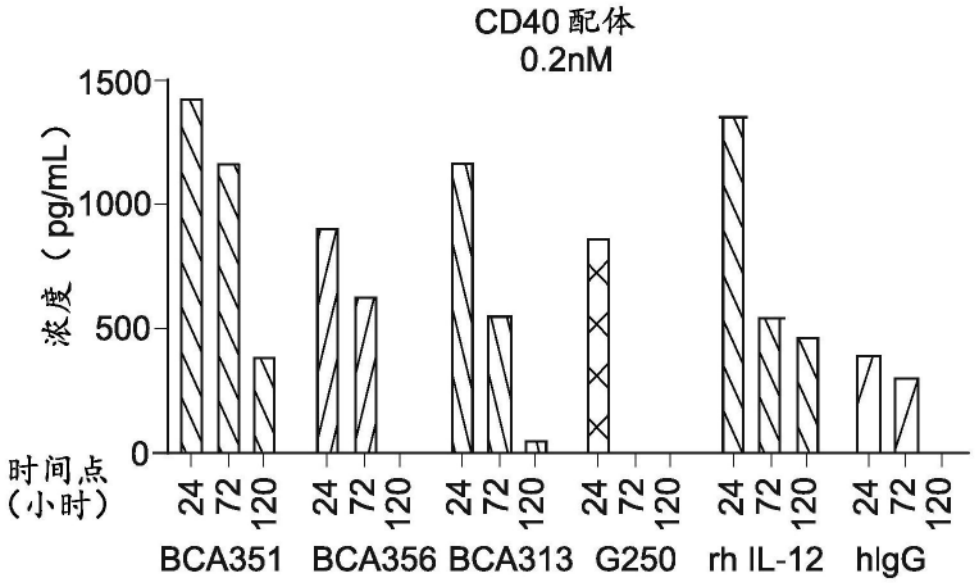

CD40 配体
0.2nM
浓度（pg/mL）
1500
1000
500
0
时间点
（小时）
24 72 120 24 72 120 24 72 120 24 72 120 24 72 120 24 72 120
BCA351 BCA356 BCA313 G250 rh IL-12 hIgG

图17F

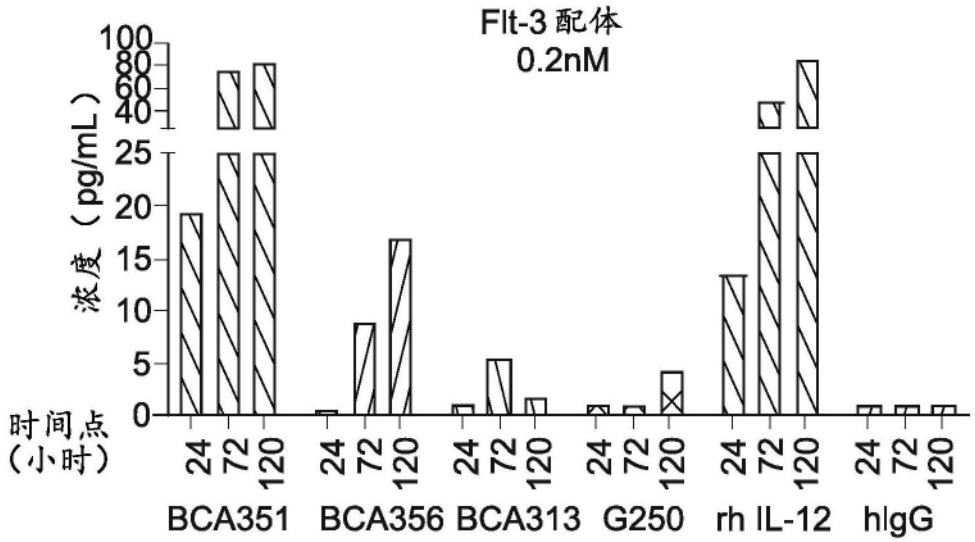

Flt-3 配体
0.2nM
浓度（pg/mL）
100
80
60
40
25
20
15
10
5
0
时间点
（小时）
24
72
120
BCA351
BCA356
BCA313
G250
rh IL-12
hIgG

图17G

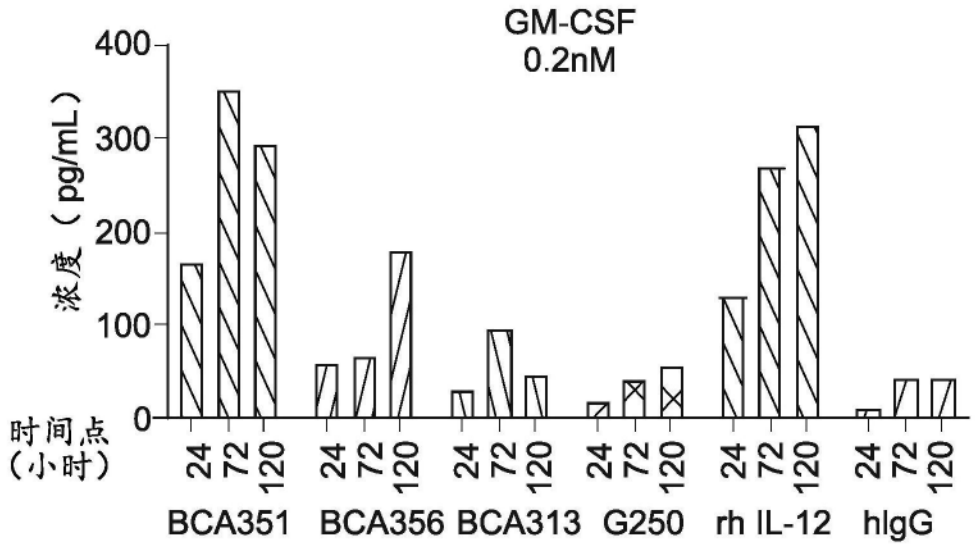

GM-CSF
0.2nM
浓度（pg/mL）
400
300
200
100
0
时间点
（小时）
24
72
120
BCA351
BCA356
BCA313
G250
rh IL-12
hIgG

图17H

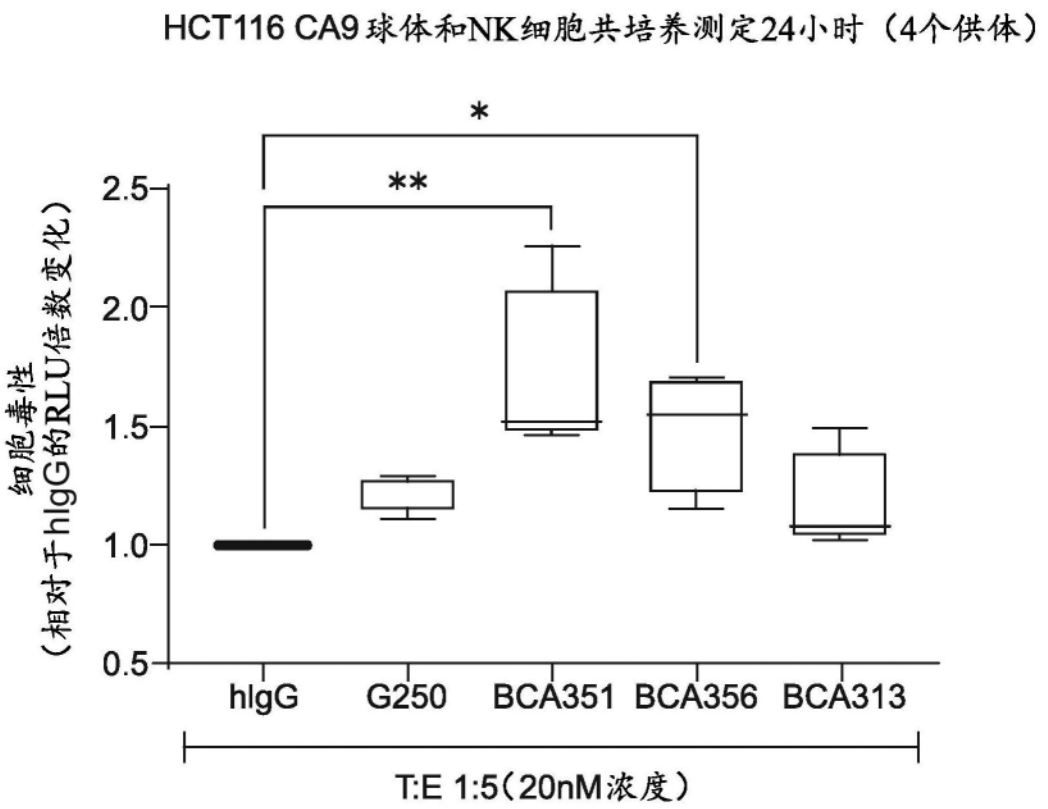

HCT116 CA9球体和NK细胞共培养测定24小时（4个供体）
*
**
细胞毒性
（相对于hIgG的RLU倍数变化）
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
hIgG
G250
BCA351
BCA356
BCA313
T:E 1:5（20nM浓度）

图18

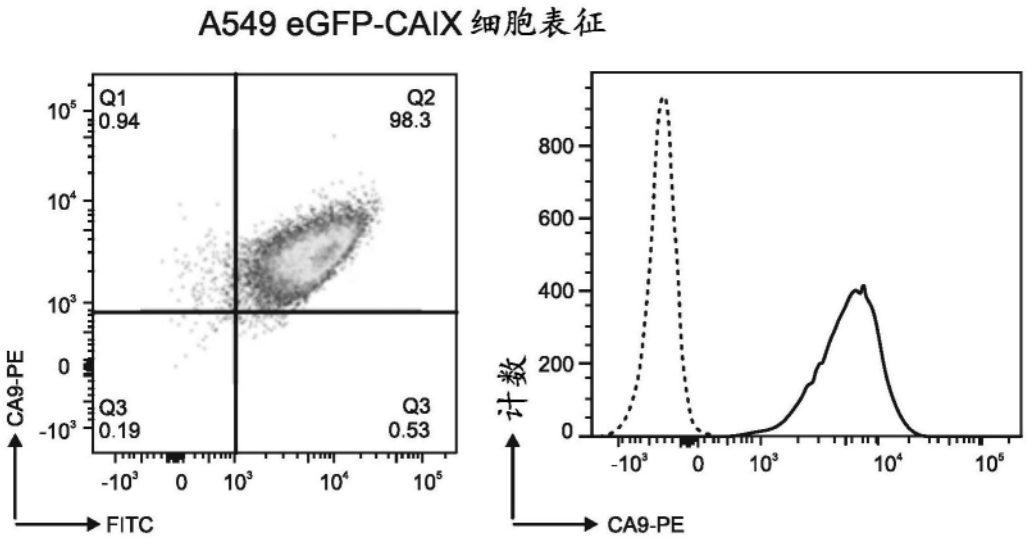

A549 eGFP-CAIX细胞表征
Q1
0.94
Q2
98.3
Q3
0.19
Q3
0.53
CA9-PE
FITC
计数
CA9-PE

图19

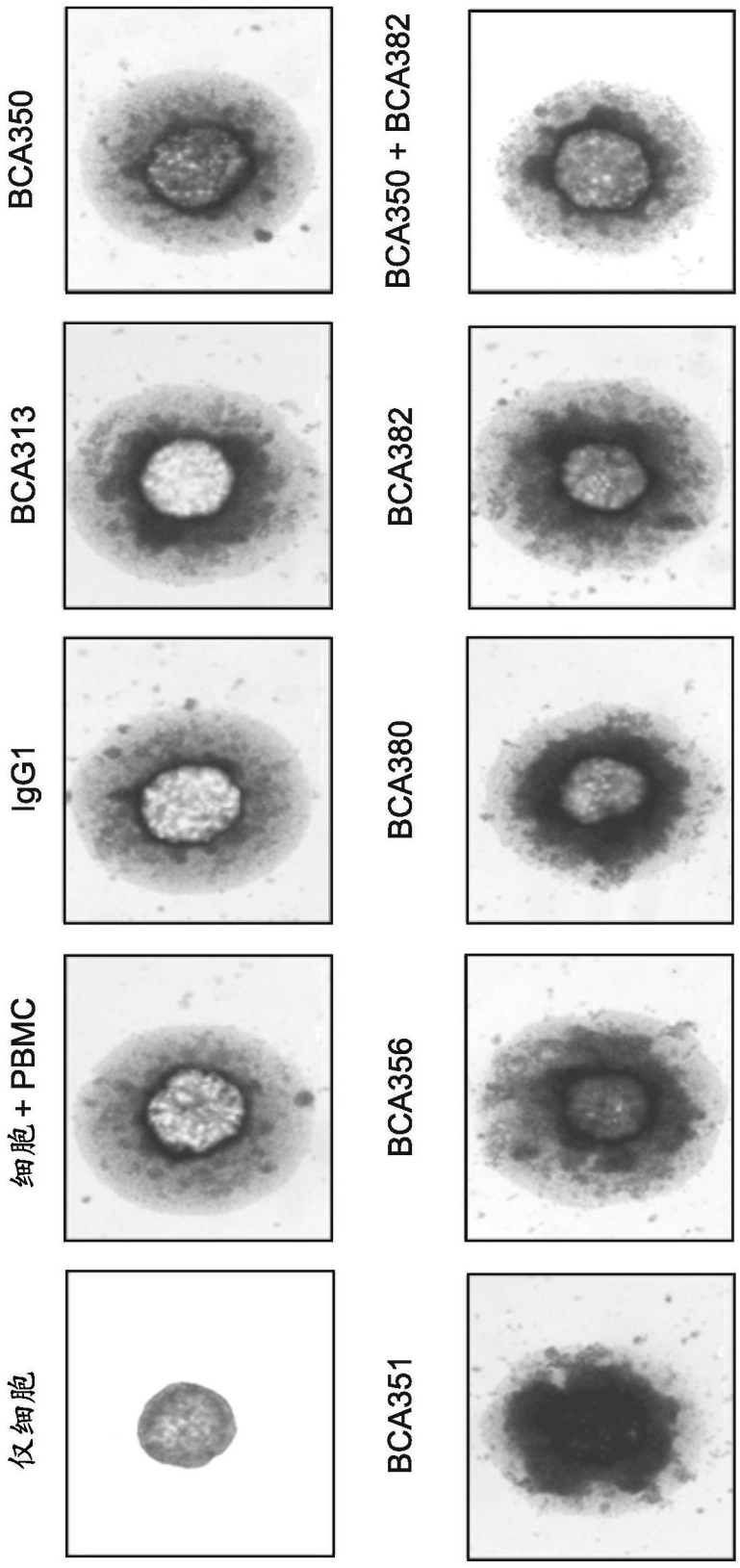

BCA350
BCA350 + BCA382
BCA313
BCA382
IgG1
BCA380
细胞 + PBMC
BCA356
仅细胞
BCA351

图20

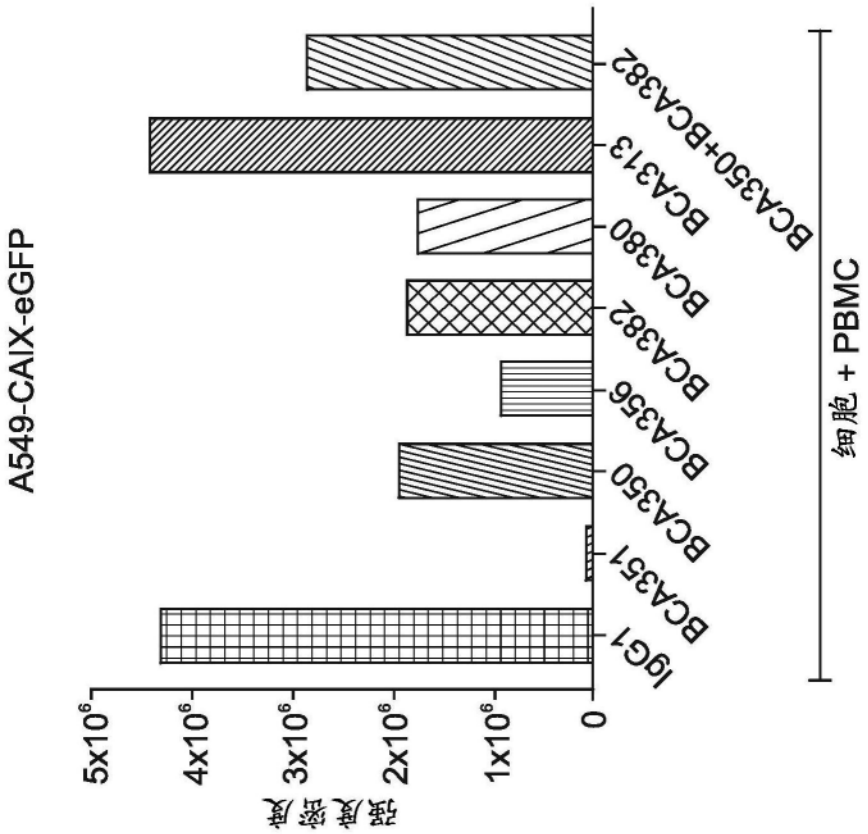

A549-CAIX-eGFP
强度密度
5x10^6
4x10^6
3x10^6
2x10^6
1x10^6
0
IgG1
BCA351
BCA350
BCA356
BCA382
BCA380
BCA313
BCA350+BCA382
细胞 + PBMC

图21A

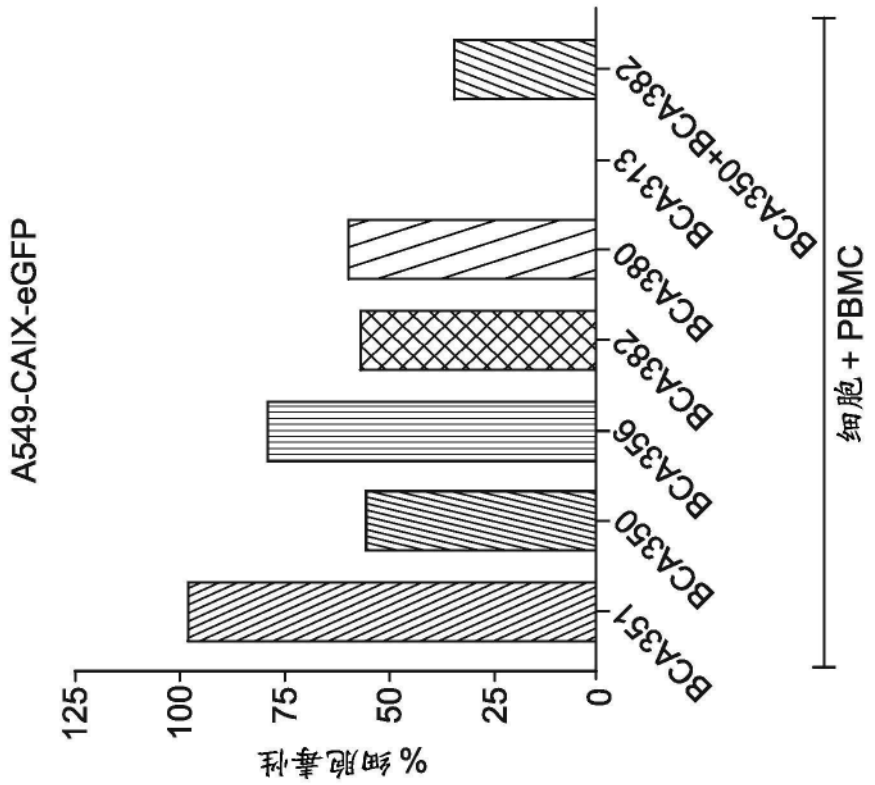

A549-CAIX-eGFP
BCA351
BCA350
BCA356
BCA382
BCA380
BCA313
BCA350+BCA382
细胞 + PBMC
125
100
75
50
25
0
% 细胞毒性

图21B

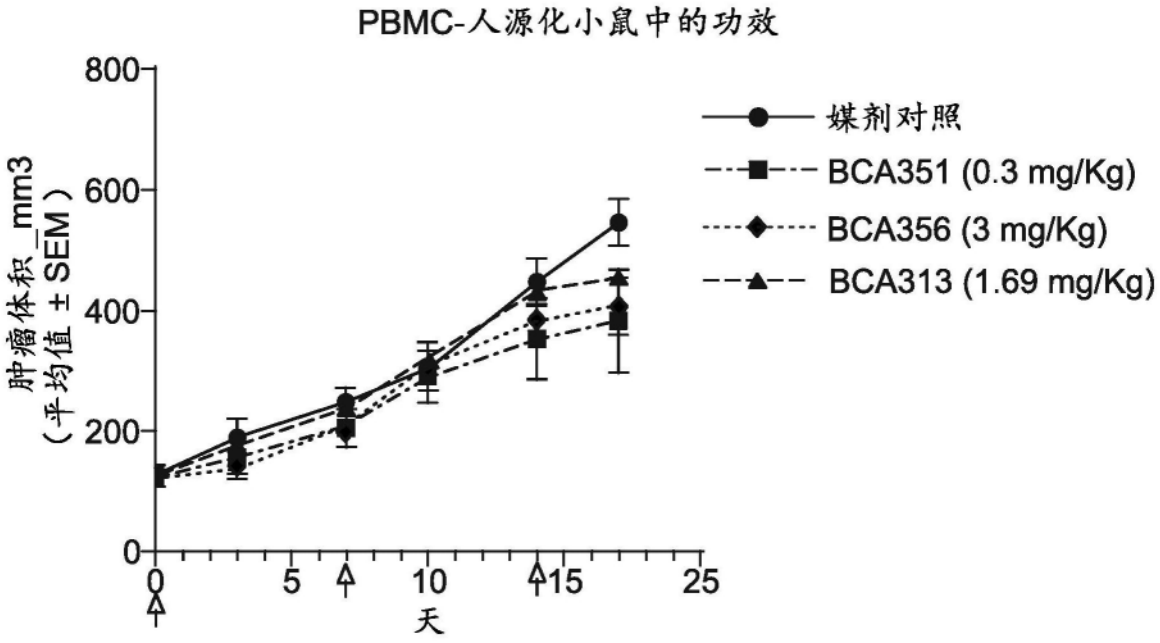

PBMC-人源化小鼠中的功效
肿瘤体积_mm3
（平均值 ± SEM）
800
600
400
200
0
0
5
10
15
25
天
媒剂对照
BCA351 (0.3 mg/Kg)
BCA356 (3 mg/Kg)
BCA313 (1.69 mg/Kg)

图22

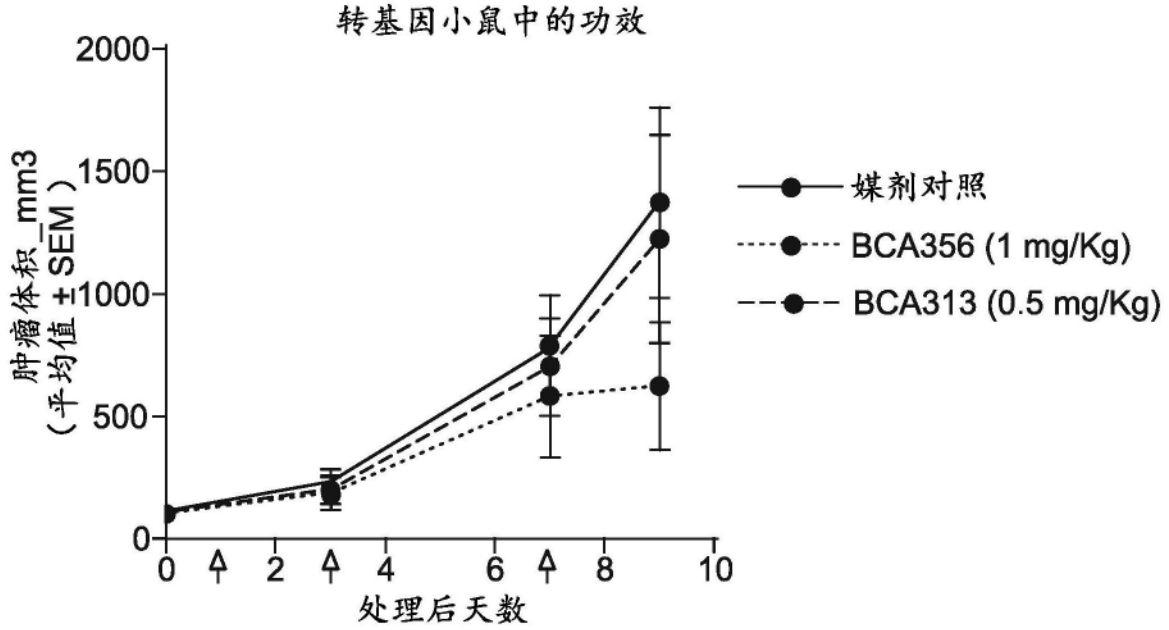

转基因小鼠中的功效
肿瘤体积_mm3
(平均值 ±SEM)
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
处理后天数
媒剂对照
BCA356 (1 mg/Kg)
BCA313 (0.5 mg/Kg)

图23

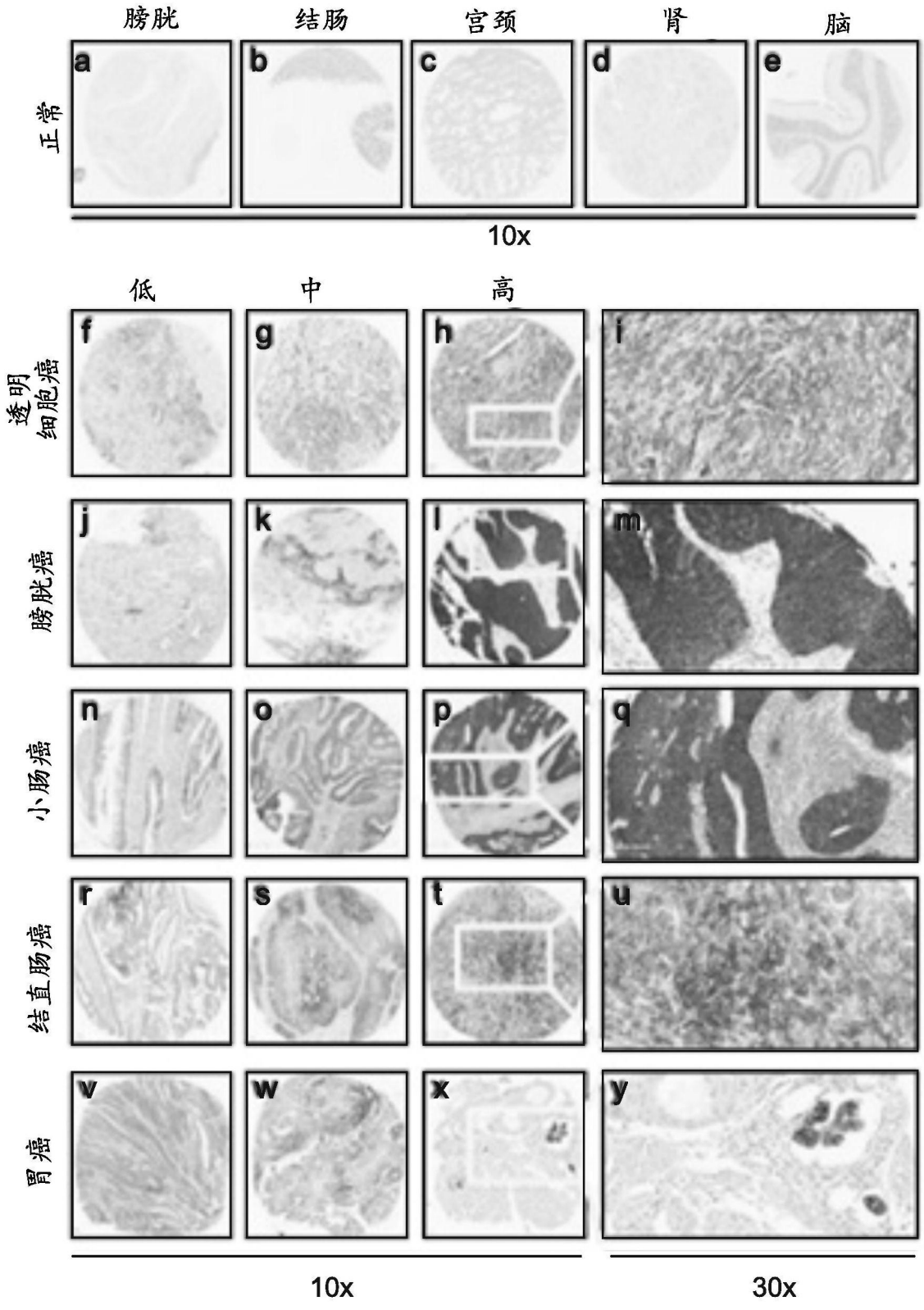

膀胱
结肠
宫颈
肾
脑
正常
a
b
c
d
e
10x
低
中
高
透明细胞癌
f
g
h
i
膀胱癌
j
k
l
m
小肠癌
n
o
p
q
结直肠癌
r
s
t
u
胃癌
v
w
x
y
10x
30x

图24A

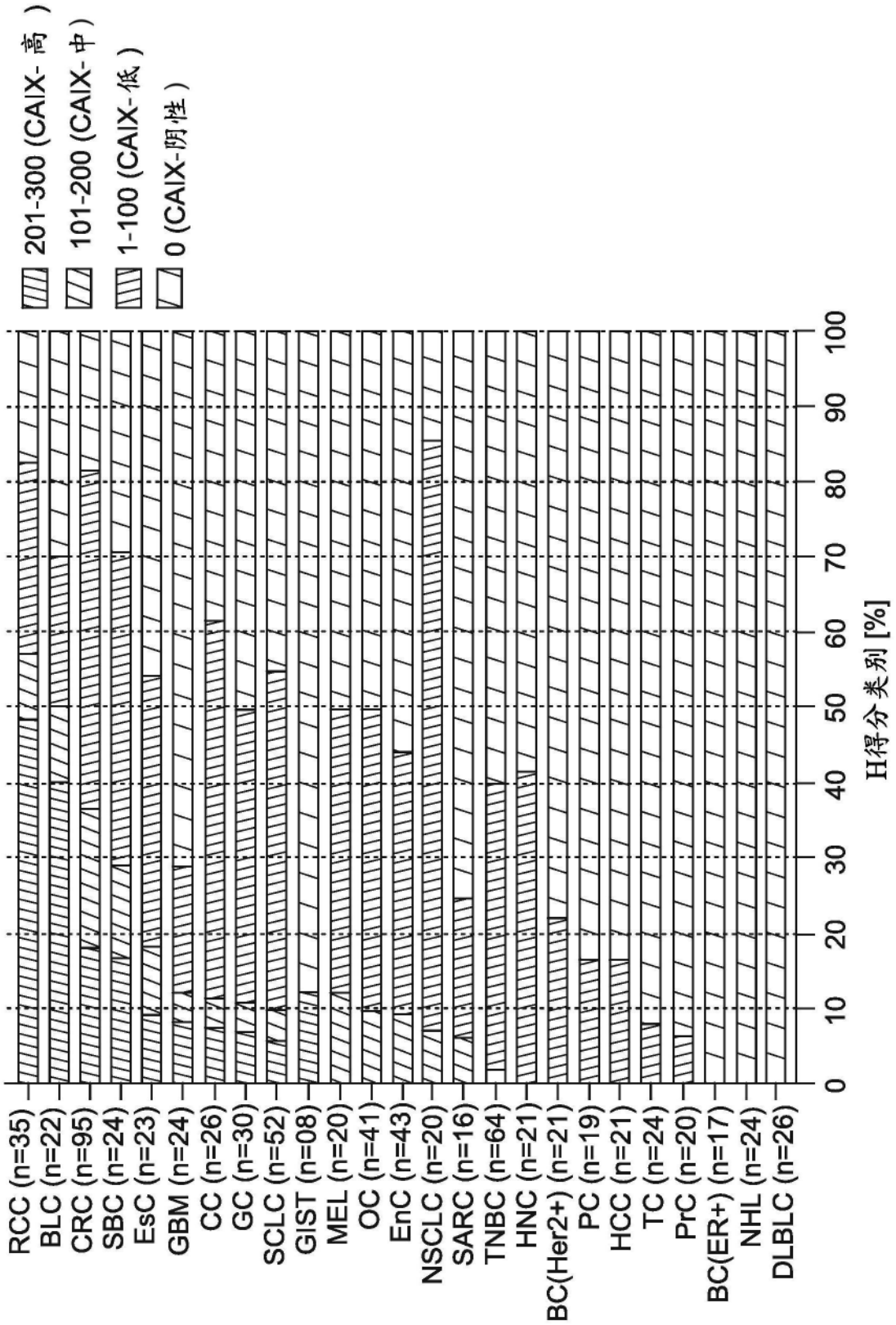

201-300 (CAIX- 高)
101-200 (CAIX- 中)
1-100 (CAIX- 低)
0 (CAIX- 阴性)
RCC (n=35)
BLC (n=22)
CRC (n=95)
SBC (n=24)
EsC (n=23)
GBM (n=24)
CC (n=26)
GC (n=30)
SCLC (n=52)
GIST (n=08)
MEL (n=20)
OC (n=41)
EnC (n=43)
NSCLC (n=20)
SARC (n=16)
TNBC (n=64)
HNC (n=21)
BC(Her2+) (n=21)
PC (n=19)
HCC (n=21)
TC (n=24)
PrC (n=20)
BC(ER+) (n=17)
NHL (n=24)
DLBLC (n=26)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
H得分类别 [%]

图24B

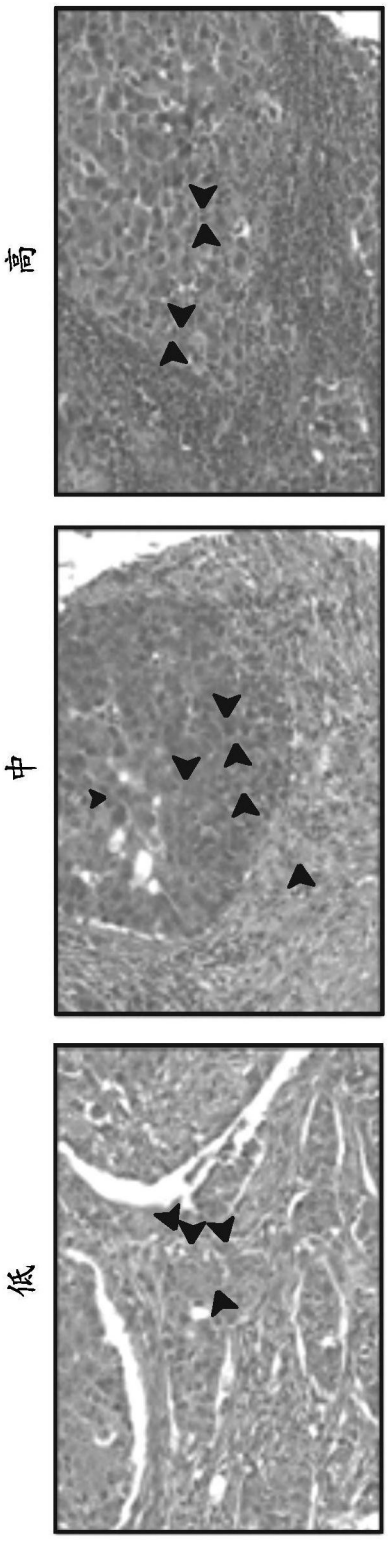


图25A

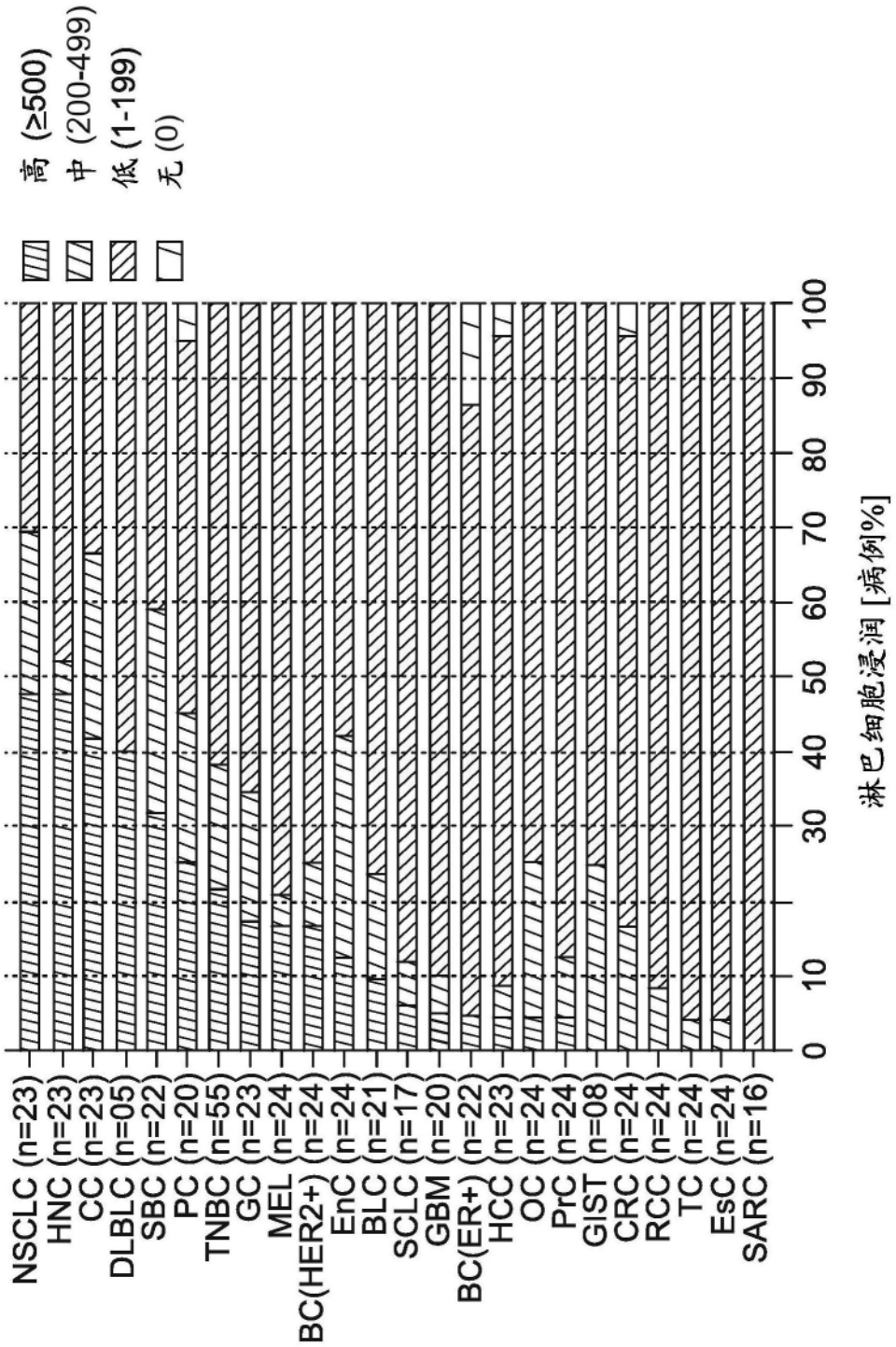

高 (≥500)
中 (200-499)
低 (1-199)
无 (0)
NSCLC (n=23)
HNC (n=23)
CC (n=23)
DLBLC (n=05)
SBC (n=22)
PC (n=20)
TNBC (n=55)
GC (n=23)
MEL (n=24)
BC(HER2+) (n=24)
EnC (n=24)
BLC (n=21)
SCLC (n=17)
GBM (n=20)
BC(ER+) (n=22)
HCC (n=23)
OC (n=24)
PrC (n=24)
GIST (n=08)
CRC (n=24)
RCC (n=24)
TC (n=24)
EsC (n=24)
SARC (n=16)
0
10
30
40
50
60
70
80
90
100
淋巴细胞浸润 [病例%]

图25B

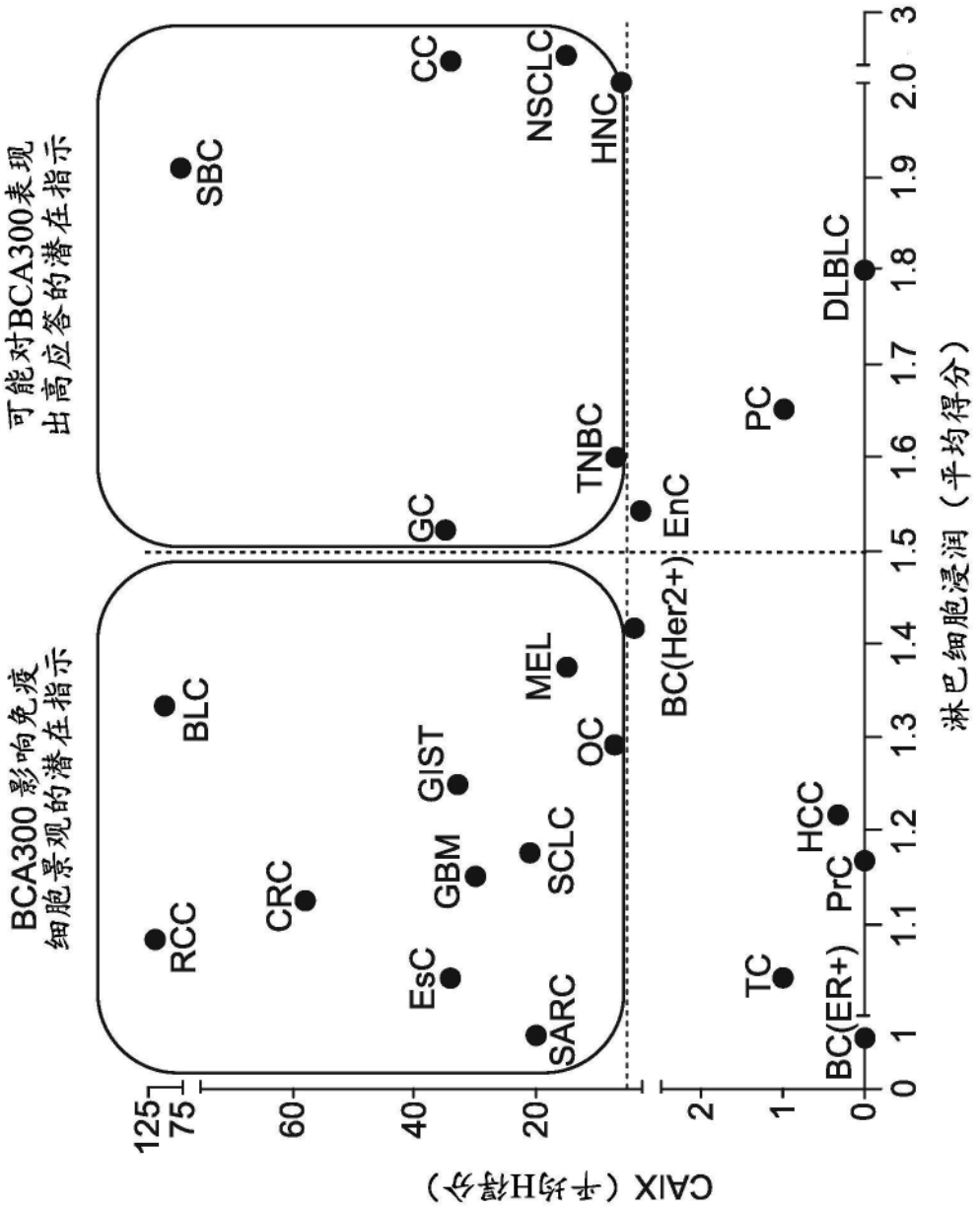

可能对BCA300表现
出高应答的潜在指示
BCA300影响免疫
细胞景观的潜在指示
CC
NSCLC
SBC
HNC
GC
TNBC
EnC
PC
DLBLC
BLC
MEL
GIST
OC
BC(Her2+)
CRC
GBM
SCLC
HCC
RCC
EsC
PrC
TC
SARC
BC(ER+)
CAIX（平均H得分）
125
75
60
40
20
2
1
0
0
1
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2.0
3
淋巴细胞浸润（平均得分）

图25C

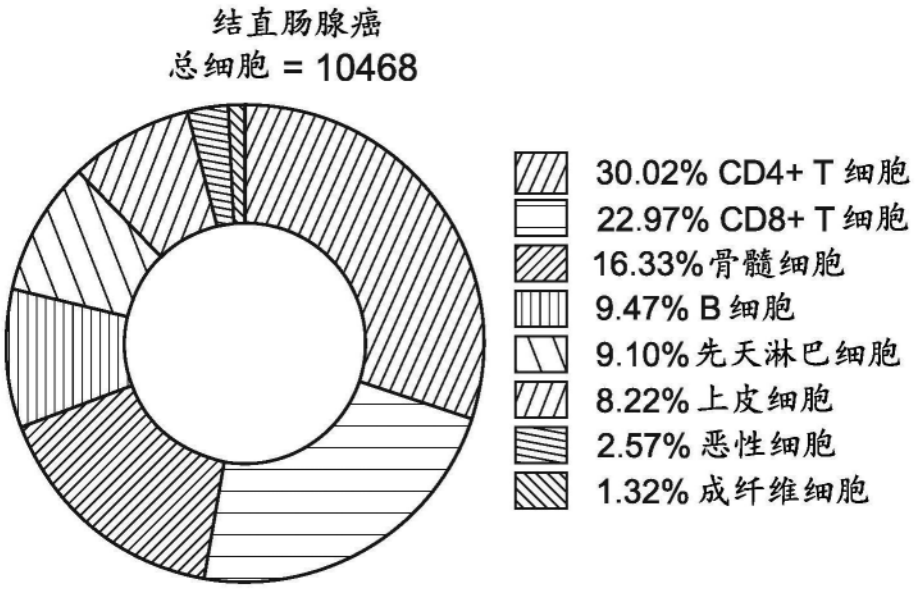

结直肠腺癌
总细胞 = 10468
30.02% CD4+ T 细胞
22.97% CD8+ T 细胞
16.33%骨髓细胞
9.47% B 细胞
9.10%先天淋巴细胞
8.22%上皮细胞
2.57%恶性细胞
1.32%成纤维细胞

图26A

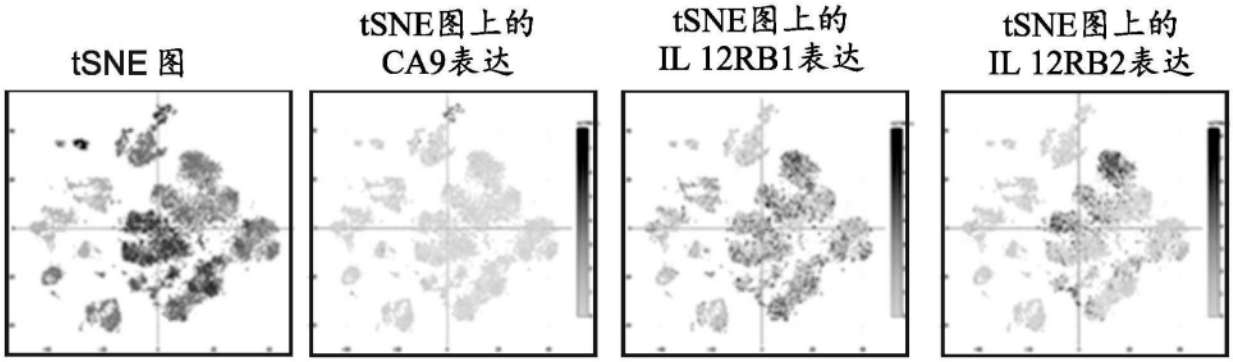

tSNE 图
tSNE图上的
CA9表达
tSNE图上的
IL 12RB1表达
tSNE图上的
IL 12RB2表达

图26B

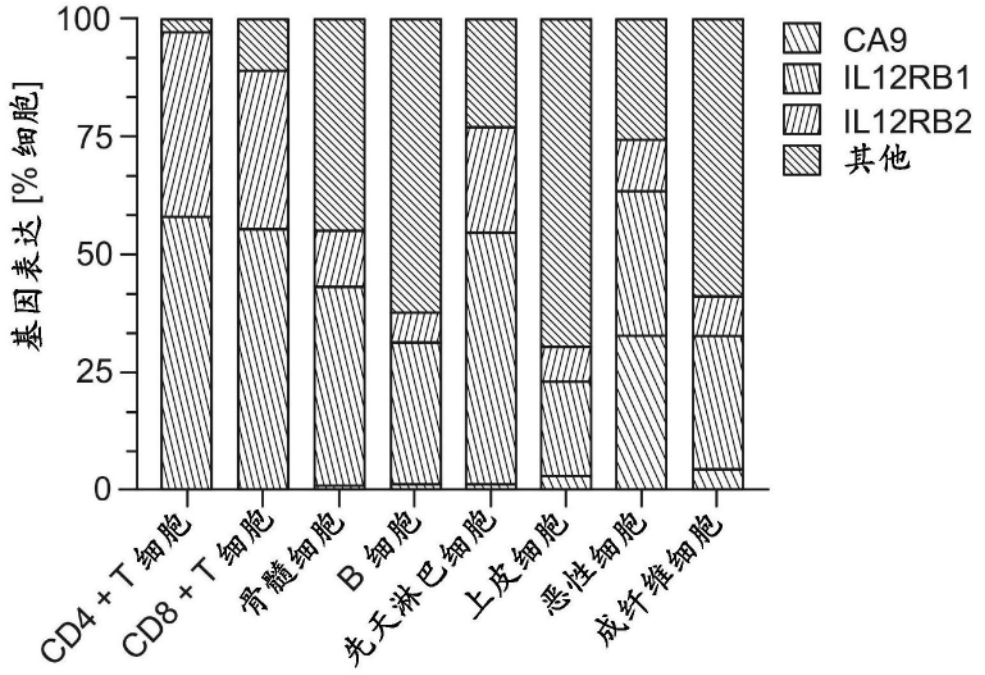

基因表达 [% 细胞]
100
75
50
25
0
CA9
IL12RB1
IL12RB2
其他
CD4 + T 细胞
CD8 + T 细胞
骨髓细胞
B 细胞
先天淋巴细胞
上皮细胞
恶性细胞
成纤维细胞

图26C

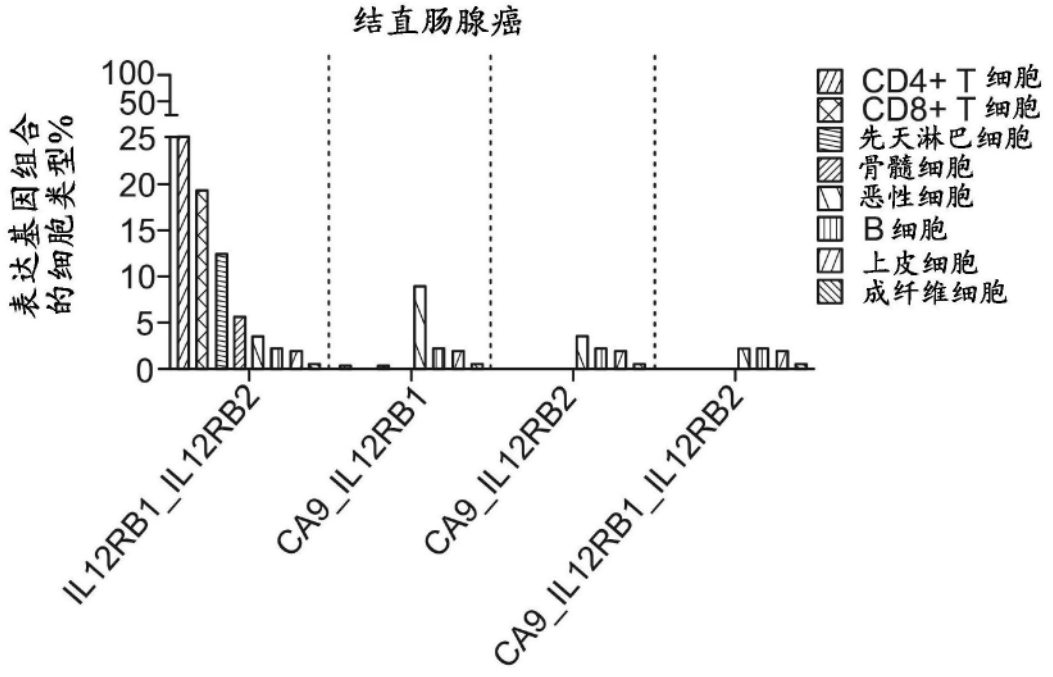

结直肠腺癌
表达基因组合的细胞类型%
100
50
25
20
15
10
5
0
CD4+ T 细胞
CD8+ T 细胞
先天淋巴细胞
骨髓细胞
恶性细胞
B 细胞
上皮细胞
成纤维细胞
IL12RB1_IL12RB2
CA9_IL12RB1
CA9_IL12RB2
CA9_IL12RB1_IL12RB2

图26D

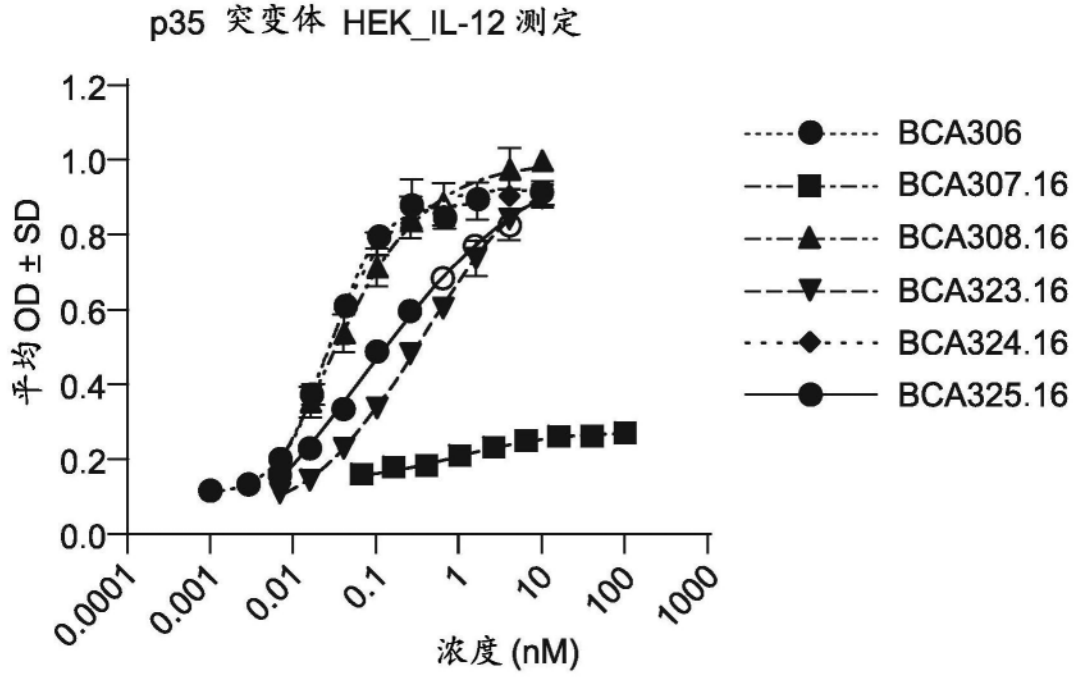

p35 突变体 HEK_IL-12 测定
平均 OD ± SD
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
BCA306
BCA307.16
BCA308.16
BCA323.16
BCA324.16
BCA325.16

图27

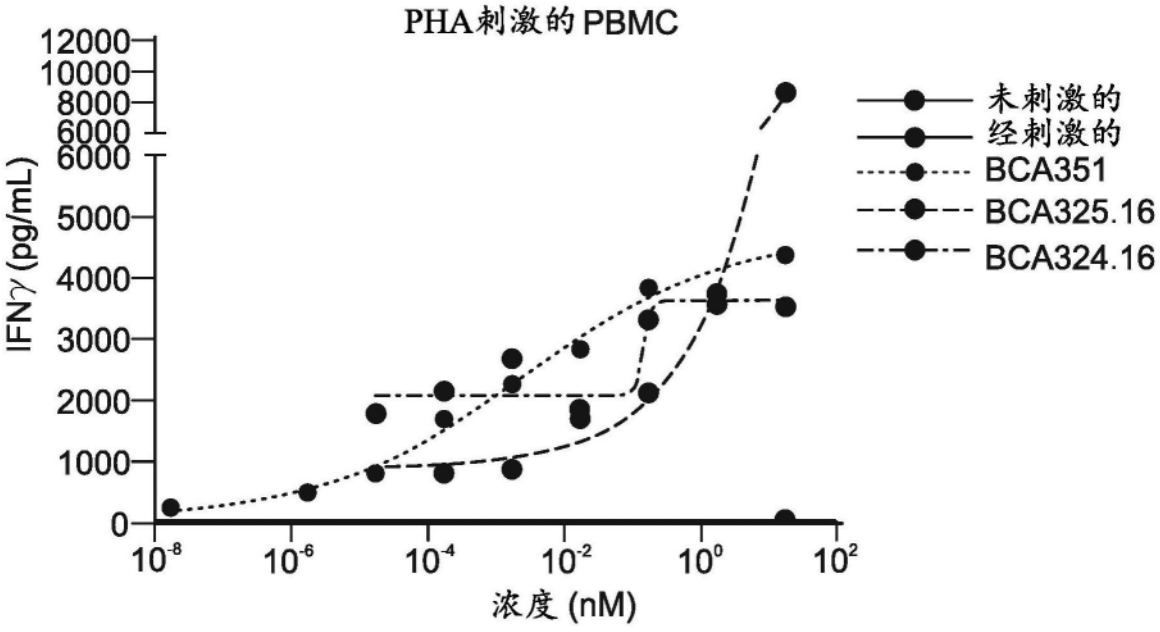

PHA刺激的 PBMC
IFNγ (pg/mL)
12000
10000
8000
6000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA325.16
BCA324.16

图28A

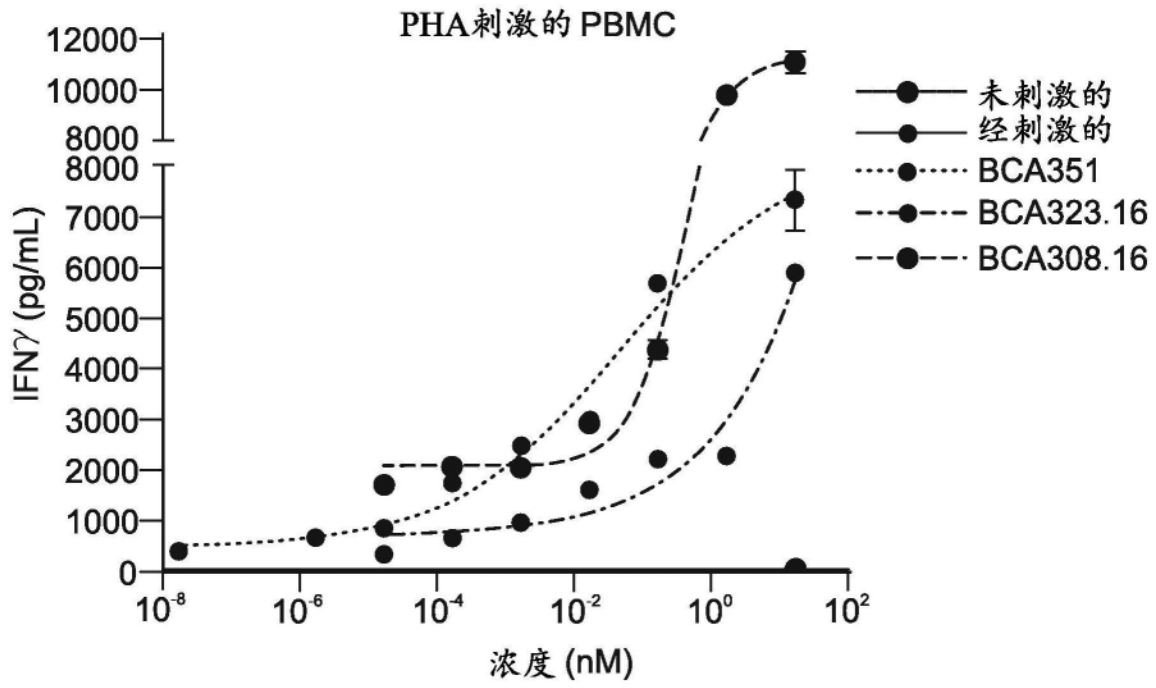

PHA刺激的 PBMC
IFNγ (pg/mL)
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA323.16
BCA308.16

图28B

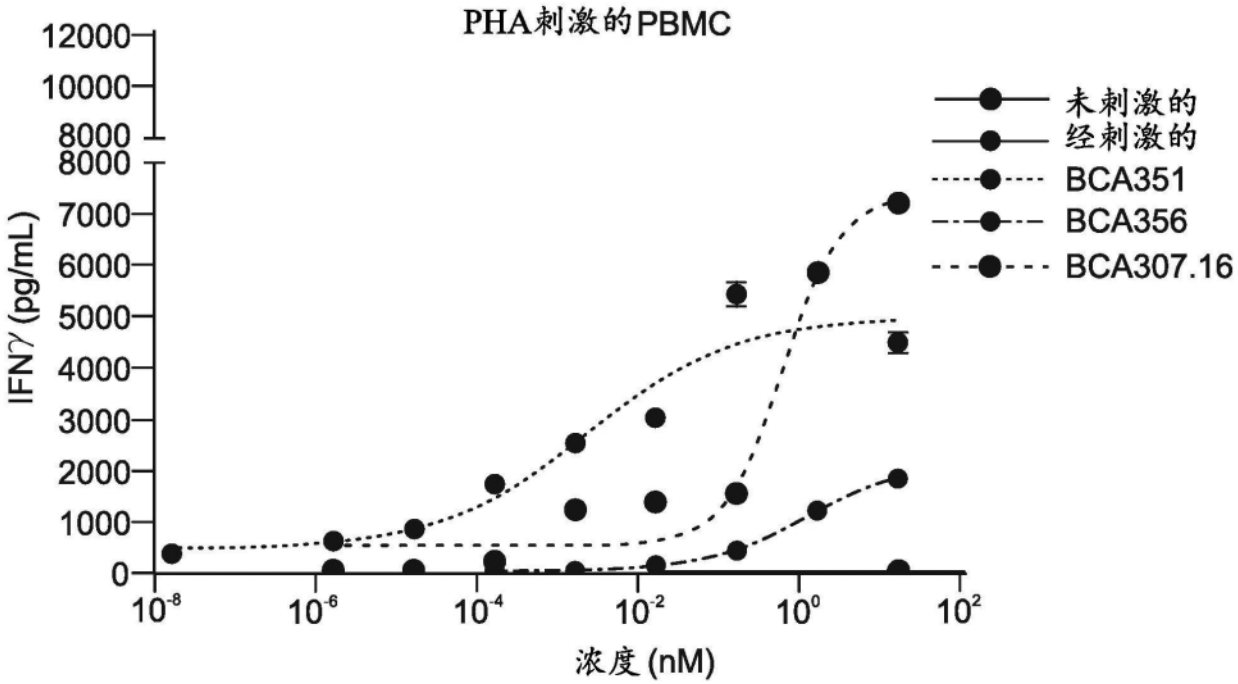

PHA刺激的PBMC
IFNγ (pg/mL)
浓度 (nM)
未刺激的
经刺激的
BCA351
BCA356
BCA307.16

图28C

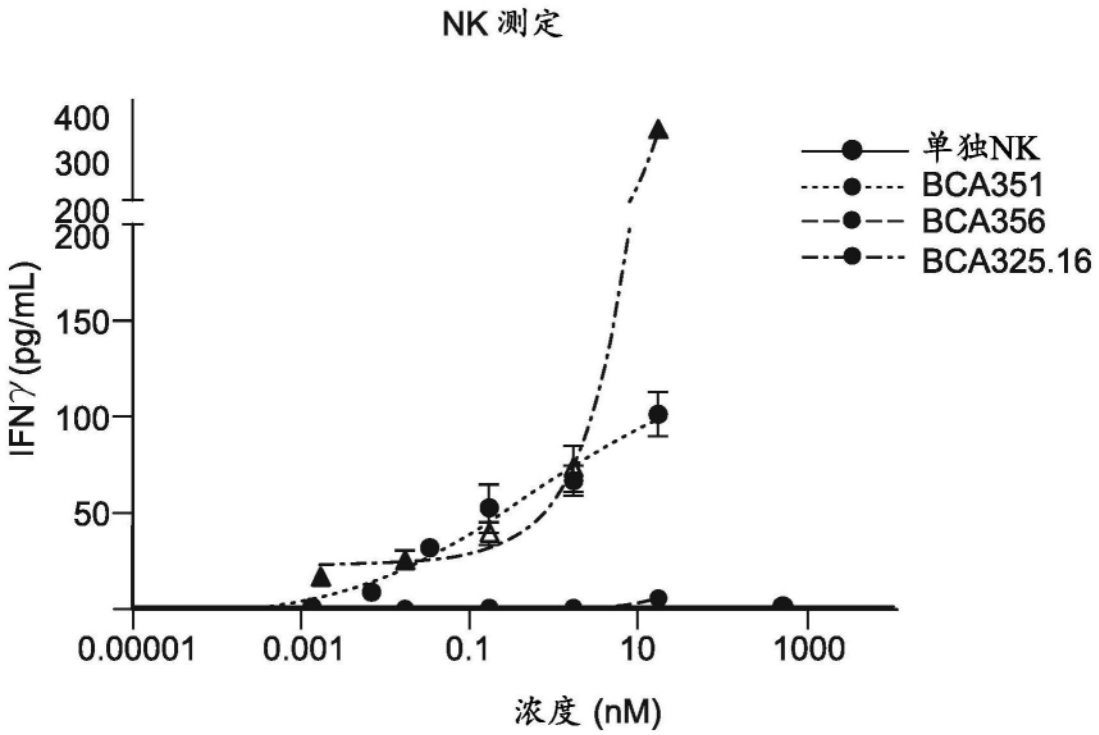

NK 测定
400
300
200
200
150
100
50
IFNγ(pg/mL)
0.00001
0.001
0.1
10
1000
浓度 (nM)
单独NK
BCA351
BCA356
BCA325.16

图29A

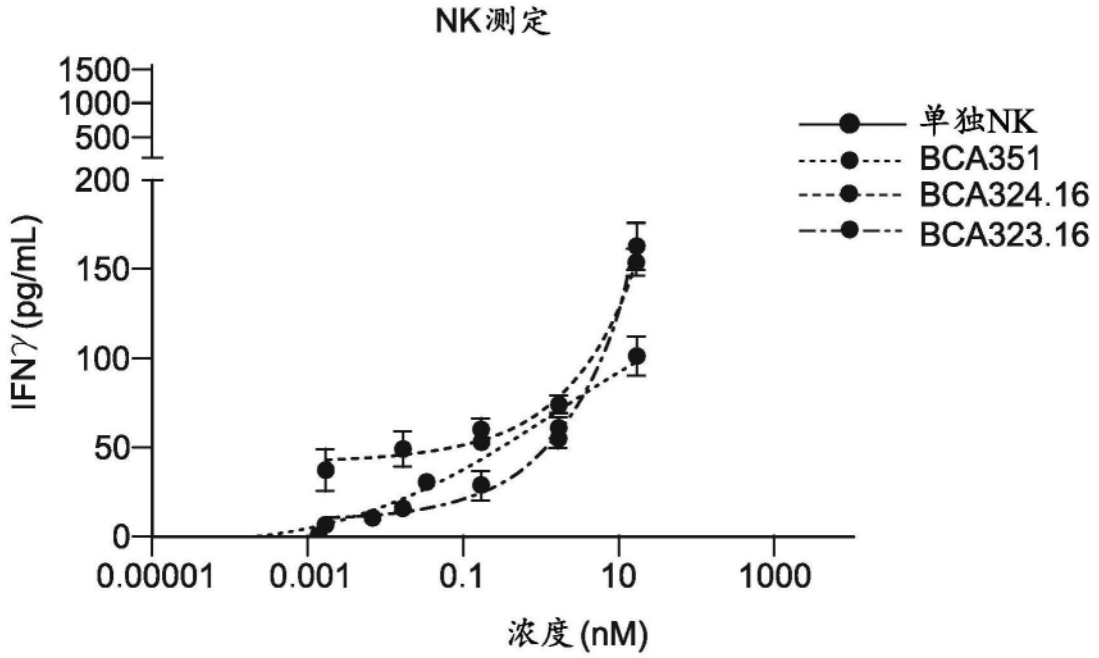

NK测定
1500
1000
500
200
150
100
50
0
IFNγ(pg/mL)
0.00001
0.001
0.1
10
1000
浓度(nM)
单独NK
BCA351
BCA324.16
BCA323.16

图29B

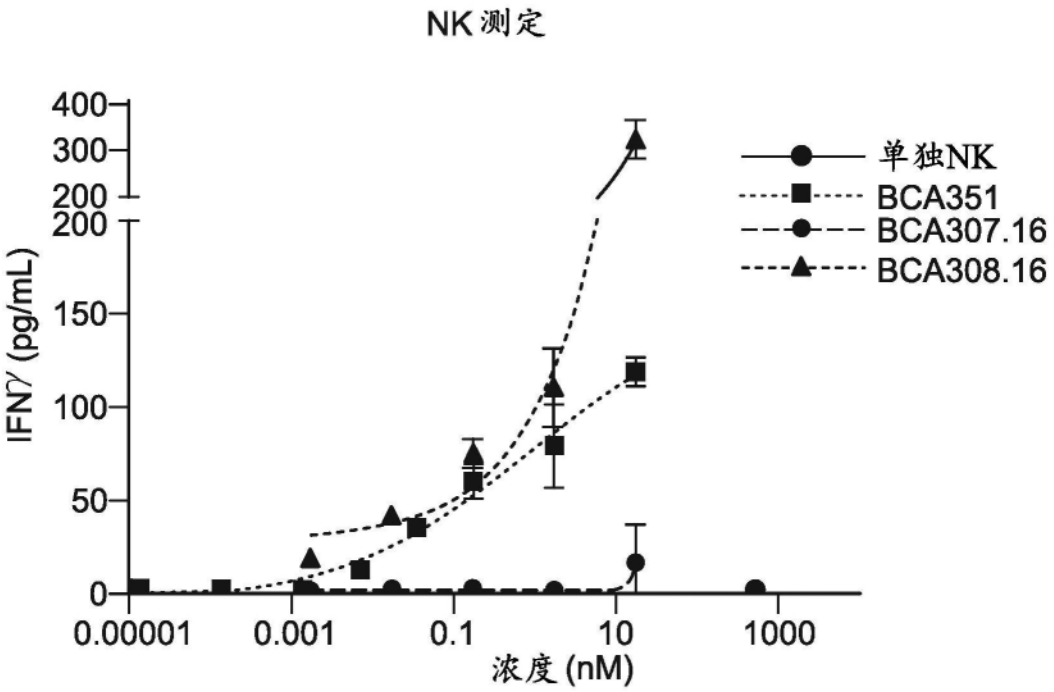

NK测定
400
300
200
200
150
100
50
0
IFNγ (pg/mL)
0.00001
0.001
0.1
10
1000
浓度 (nM)
单独NK
BCA351
BCA307.16
BCA308.16

图29C

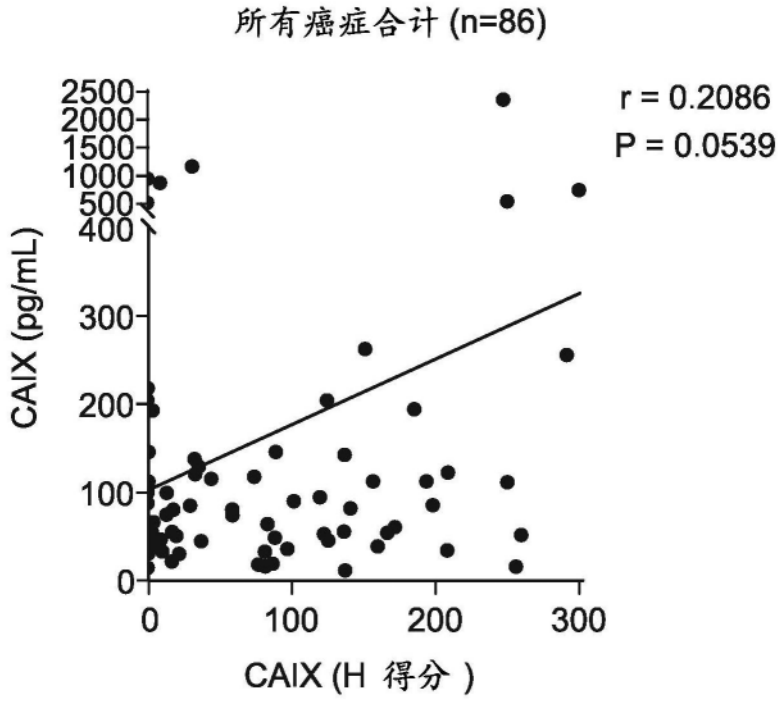

所有癌症合计 (n=86)
2500
2000
1500
1000
500
400
300
200
100
0
CAIX (pg/mL)
0
100
200
300
CAIX (H 得分)
r = 0.2086
P = 0.0539

图30