



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118510794 A

(43) 申请公布日 2024.08.16

(21) 申请号 202280069536.1

(22) 申请日 2022.08.16

(30) 优先权数据

63/233,511 2021.08.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/075002 2022.08.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/023503 EN 2023.02.23

(71) 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 A·林 J·哈克

(74) 专利代理机构 北京聿华联合知识产权代理有限公司 11611

专利代理师 刘华联

(51) Int.Cl.

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

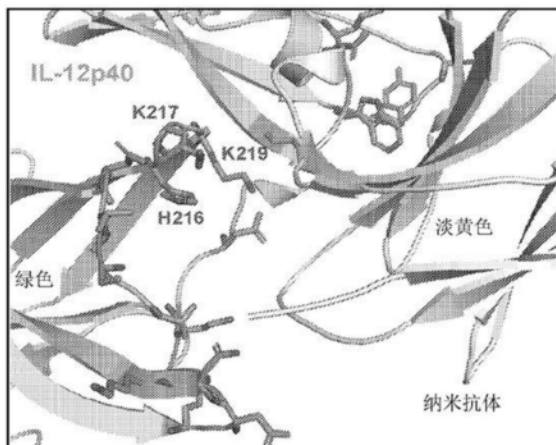
权利要求书2页 说明书61页  
序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称

白细胞介素-12变体和使用方法

(57) 摘要

本公开提供了用于在治疗和非治疗应用中使用的包括IL-12变体多肽的组合物和方法,相对于野生型IL-12,所述IL-12变体多肽具有部分激动作用。



1. 一种组合物,其包括IL-12变体多肽,其中相对于野生型(WT) IL-12,所述IL-12变体多肽通过其受体具有次最大信号传导功效。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中相对于WT IL-12,所述IL-12变体多肽包括至少一个突变。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽包括具有或不具有信号肽的p35亚基(IL-12p35)和具有或不具有信号肽的p40亚基(IL-12p40)。

4. 根据权利要求2所述的组合物,其中相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

6. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽的所述IL-12p35包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。

8. 根据权利要求7所述的组合物,进一步地其中所述IL-12p40、所述IL-12p35或其组合与至少一个选自由以下组成的组的体内半衰期延长融合体融合:IgG Fc结构域、IgG Fc变体结构域、人血清白蛋白(HSA)、聚乙二醇(PEG)和抗HSA纳米抗体。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述IgG Fc结构域包括人IgG1结构域,所述人IgG1结构域包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列,并且其中所述IgG Fc变体结构域包括选自由以下组成的组的至少一个:包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列的人IgG1 Fc“杆”结构域;以及包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列的人IgG1 Fc“臼”结构域。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽包括二价同源二聚体IgG Fc,所述二价同源二聚体IgG Fc包括至少两个人IgG1 Fc结构域。

11. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽包括双特异性异源二聚体IgG Fc,所述双特异性异源二聚体IgG Fc包括至少一个人IgG1 Fc“杆”和至少一个IgG Fc“臼”。

12. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体IgG Fc,所述单链二价同源二聚体IgG Fc包括通过接头与所述IL-p35融合的所述IL-12p40和至少两个人IgG1 Fc结构域。

13. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体IgG Fc,所述单链单体IL-12包括通过接头与IL-p35融合的IL-12p40,所述双特异性异源二聚体IgG Fc包括至少一个人IgG1 Fc“杆”和至少一个IgG Fc“臼”。

14. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述IL-12变体多肽包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体IgG Fc,所述二聚体IL-12包括所述IL-12p40和所述IL-p35,所述双特异性异源二聚体IgG Fc包括至少一个人IgG1 Fc“杆”和至少一个IgG Fc“臼”。

15. 一种组合物,其包括编码至少一种选自由以下组成的组的IL-12p40肽的一个或多个核酸分子:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9以及SEQ ID NO:34。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其进一步包括编码IL-12p35肽的核酸分子,所述IL-12p35肽包括选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中编码所述IL-12p40的所述核酸、编码所述IL-12p35的所述核酸或其组合进一步编码核酸序列,所述核酸序列编码选自自由以下组成的组的体内半衰期延长融合体:IgG Fc结构域、IgG Fc变体结构域、人血清白蛋白(HSA)、聚乙二醇(PEG)和抗HSA纳米抗体。

18. 一种治疗或预防有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用包括IL-12变体多肽的组合物,其中相对于WTIL-12,所述IL-12变体多肽通过其受体具有次最大信号传导功效。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述IL-12变体多肽包括p35亚基(IL-12p35)和p40亚基(IL-12p40)。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述IL-12变体多肽的所述IL-12p35包括选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。

22. 根据权利要求21所述的方法,进一步地其中所述IL-12p40、所述IL-12p35或其组合与至少一个选自自由以下组成的组的体内半衰期延长融合体融合:IgG Fc结构域、IgG Fc变体结构域、人血清白蛋白(HSA)、聚乙二醇(PEG)和抗HSA纳米抗体。

23. 根据权利要求18所述的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

24. 根据权利要求23所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用选自自由以下组成的组的至少一种另外的药剂:化合物、多肽、肽、肽模拟物、抗体、细胞因子、核酸分子(例如,mRNA)、核酶、小分子化合物和反义核酸分子。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述至少一种另外的药剂包括选自自由以下组成的组的一种或多种:癌症治疗剂或癌症免疫治疗剂。

26. 根据权利要求18所述的方法,其包括通过一种或多种选自自由以下组成的组的机制施用所述IL-12变体多肽:

- a) 编码所述IL-12变体多肽的脂质纳米颗粒包封的mRNA分子;
- b) 表达所述IL-12变体多肽的病毒载体;以及
- c) 表达所述IL-12变体多肽的经工程化的免疫细胞。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述施用包括选自自由以下组成的组的一种或多种:

- a) 全身施用;以及
- b) 局部施用于至少一种特定组织。

## 白细胞介素-12变体和使用方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年8月16日提交的美国临时申请第63/233,511号的优先权和权益,所述美国临时申请的公开内容通过引用整体并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号U01CA233096在政府支持下进行的。政府享有本发明中的某些权利。

### 背景技术

[0005] 白细胞介素-12(IL-12)协调Th1免疫并强力诱导NK细胞和细胞毒性T细胞分泌IFN- $\gamma$ ,使其成为癌症免疫疗法的有吸引力的候选物。IL-12的施用在临床前刺激抗肿瘤应答方面已经显示出巨大的前景,但是由于不可接受的毒性和窄的治疗指数,尚未在人体内转化。IL-12的完全治疗潜能可能受到其多效性的限制,从而导致促进有益和不利作用的多种细胞类型的激活。

[0006] 因此,本领域需要提供具有最小毒性和广泛治疗指数的IL-12来治疗和预防癌症和其它疾病和病症的经改善的组合物和方法。本公开满足此未满足的需求。

### 发明内容

[0007] 在一个实施例中,本公开涉及一种组合物,所述组合物包括IL-12变体多肽,其中相对于野生型(WT)IL-12,所述IL-12变体多肽通过其受体具有次最大信号传导功效。在一个实施例中,相对于WT IL-12,所述IL-12变体多肽包括至少一个突变。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽包括具有或不具有信号肽的p35亚基(IL-12p35)和具有或不具有信号肽的p40亚基(IL-12p40)。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0008] 在本公开的组合物的一个实施例中,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p35包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。

[0009] 在本公开的组合物的一个实施例中,所述IL-12p40、所述IL-12p35或其组合与至少一个选自由以下组成的组的体内半衰期延长融合体融合:IgG Fc结构域、IgG Fc变体结构域、人血清白蛋白(HSA)、聚乙二醇(PEG)和抗HSA纳米抗体。

[0010] 在本公开的组合物的一个实施例中,所述IgG Fc结构域包括人IgG1结构域,所述人IgG1结构域包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列,并且其中所述IgG Fc变体结构域包括选自由以下组成的组的至少一个:包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列的人IgG1 Fc“杆”结构域;以及包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列的人IgG1 Fc“臼”结构域。在一个实施例中,所述IL-12

变体多肽包括二价同源二聚体IgG Fc,所述二价同源二聚体IgG Fc包括至少两个人IgG1 Fc结构域。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽包括双特异性异源二聚体IgG Fc,所述双特异性异源二聚体IgG Fc包括至少一个人IgG1 Fc“杆”和至少一个IgG Fc“臼”。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体IgG Fc,所述单链二价同源二聚体IgG Fc包括通过接头与所述IL-p35融合的所述IL-12p40和至少两个人IgG1 Fc结构域。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体IgG Fc,所述单链单体IL-12包括通过接头与IL-p35融合的IL-12p40,所述双特异性异源二聚体IgG Fc包括至少一个人IgG1 Fc“杆”和至少一个IgG Fc“臼”。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体IgG Fc,所述二聚体IL-12包括所述IL-12p40和所述IL-p35,所述双特异性异源二聚体IgG Fc包括至少一个人IgG1 Fc“杆”和至少一个IgG Fc“臼”。

[0011] 在一个实施例中,本公开涉及一种组合物,所述组合物包括编码至少一种选自由以下组成的组的IL-12p40肽的一个或多个核酸分子:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9以及SEQ ID NO:34。在一个实施例中,所述组合物进一步包括编码IL-12p35肽的核酸分子,所述IL-12p35肽包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。

[0012] 在本公开的组合物中的一个实施例中,编码所述IL-12p40的所述核酸、编码所述IL-12p35的所述核酸或其组合进一步编码核酸序列,所述核酸序列编码选自由以下组成的组的体内半衰期延长融合体:IgG Fc结构域、IgG Fc变体结构域、人血清白蛋白(HSA)、聚乙二醇(PEG)和抗HSA纳米抗体。

[0013] 在一个实施例中,本公开涉及一种治疗或预防有需要的受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用包括IL-12变体多肽的组合物,其中相对于WT IL-12,所述IL-12变体多肽通过其受体具有次最大信号传导功效。

[0014] 在本公开的方法的一个实施例中,所述IL-12变体多肽包括p35亚基(IL-12p35)和p40亚基(IL-12p40)。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p40包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。在一个实施例中,所述IL-12变体多肽的所述IL-12p35包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。在一个实施例中,所述IL-12p40、所述IL-12p35或其组合与至少一个选自由以下组成的组的体内半衰期延长融合体融合:IgG Fc结构域、IgG Fc变体结构域、人血清白蛋白(HSA)、聚乙二醇(PEG)和抗HSA纳米抗体。在一个实施例中,所述疾病或病症是癌症。

[0015] 在一个实施例中,所述方法进一步包括向所述受试者施用选自由以下组成的组的至少一种另外的药剂:化合物、多肽、肽、肽模拟物、抗体、细胞因子、核酸分子(例如,mRNA)、核酶、小分子化合物和反义核酸分子。在一个实施例中,所述至少一种另外的药剂包括选自由以下组成的组的一种或多种:癌症治疗剂或癌症免疫治疗剂。

[0016] 在一个实施例中,本公开的方法包括通过一种或多种选自由以下组成的组的机制施用所述IL-12变体多肽:a) 编码所述IL-12变体多肽的脂质纳米颗粒包封的mRNA分子;b)

表达所述IL-12变体多肽的病毒载体;以及c)表达所述IL-12变体多肽的经工程化的免疫细胞。在一个实施例中,所述施用包括选自以下组成的组的一种或多种:a)全身施用;以及b)局部施用于至少一种特定组织。

### 附图说明

[0017] 当结合附图阅读时,将更好地理解本公开的实施例的以下详细描述。应当理解,本公开不限于在附图中示出的实施例的精确布置和手段。

[0018] 图1A和图1B描绘了预测IL-12R $\beta$ 1:IL-12p40界面处的残基的模型。图1A描绘了IL-12p40与中和纳米抗体复合物的放大模型。预测介导与纳米抗体相互作用并且因此也可能与IL-12R $\beta$ 1相互作用的残基用蓝色描绘(颜色参见书面标签),IL-12p40用绿色描绘,并且纳米抗体用淡黄色描绘。图1B描绘了包括IL-12p40和IL-12p35亚基的IL-12与IL-12R $\beta$ 2和IL-12R $\beta$ 1之间的预测相互作用的示意图。灰色“X”指示IL-12R $\beta$ 1与IL-12p40之间的界面,所述界面如果被选择性破坏,则可能会减少IL-12R $\beta$ 1向IL-12:IL-12R $\beta$ 2复合物的募集并且减弱下游STAT4信号传导。

[0019] 图2A和图2B描绘了展示了野生型(WT)IL-12和突变变体的蛋白质表达和纯化的示例性结果。图2A描绘了展示了WT和突变IL-12蛋白的表达和迁移率相当的示例性结果。将蛋白质在SDS-PAGE凝胶上分离并且用考马斯亮蓝染色。图2B描绘了展示了IL-12和突变变体的纯化的示例性结果。将蛋白质通过镍-NTA亲和色谱法分离,并且然后通过尺寸排阻色谱法进一步纯化。

[0020] 图3A至图3D描绘了展示了相对于WT的分级应答的示例性结果,这取决于突变成丙氨酸残基的界面残基的数量和性质。图3A描绘了展示了与WT IL-12相比H216A/K217A/K219A三重突变体(HKK)的激动作用降低的示例性结果。图3B描绘了展示了与WT相比H216A/K219A双重突变体中的激动作用降低至较小程度的示例性结果。图3C描绘了与WT IL-12和未经刺激的细胞相比,对所有变体的单点应答的示例性结果,证明了可以针对所期望的特定激动作用水平定制的分级应答。图3D描绘了3C作为激动作用相对于WT的百分比的结果。在所有情况下,将人NK细胞用IL-12(一种突变变体)刺激或保持未刺激,并且通过流式细胞术测量磷酸化STAT4作为IL-12激动作用的量度。

[0021] 图4A至图4B描绘了作为双特异性异源二聚体Fc融合蛋白表达的IL-12的示例性结果,这是一种延长体内半衰期的方法。图4A描绘了针对IL-12激动作用测试的IL-12的双特异性异源二聚体Fc融合蛋白的示意图。图4B描绘了示例性结果,所述示例性结果表明,与WT IL-12相比,IL-12的双特异性异源二聚体Fc融合蛋白出乎意料地具有减弱的激动作用,但是不如图3A至3D中描述的HKK三重突变体减弱得那么严重。如图3A至3D中通过流式细胞术测量磷酸化STAT4。

[0022] 图5A至图5D描绘了采用Fc融合IL-12变体来延长本公开的部分IL-12激动剂的半衰期的示例性方法。图5A描绘了与p40或p35融合并与对应亚基共表达以产生二聚体IL-12的二价Fc的示意图。图5B描绘了与p35融合的二价Fc的示意图,所述p35又与p40融合并表达为单链构建体以形成二聚体IL-12。图5C描绘了与p35融合的双特异性Fc“杵”的示意图,所述p35又与p40融合,表达为单链构建体,并且与对应双特异性Fc“臼”共表达以形成单体IL-12。图5D描绘了与p40或p35融合并且与对应亚基和对应双特异性Fc“臼”共表达以形成单体

IL-12的双特异性Fc“杆”的示意图。

[0023] 图6A至图6B描绘了展示了精选的Fc融合变体的Fc融合体的激动作用进一步降低的示例性结果。图6A描绘了与WT IL-12和IL-12H216A/K217A/K219A三重突变体(HKK)相比,对Fc融合变体的单点应答的示例性结果,表明如图3A至3D中示出的分级应答可以通过Fc融合进一步调整。图6B描绘了WT IL-12、IL-12HKK和Fc融合变体响应于滴定量的上清液对人NK细胞中的STAT4磷酸化的影响。在Expi293细胞中表达蛋白质,并且使用含有分泌蛋白的细胞培养物上清液刺激NK细胞。x轴描绘了细胞培养物上清液的滴定,显示为用于刺激NK细胞的总体积的百分比。

[0024] 图7描绘了延长本公开的部分IL-12激动剂的体内半衰期的另外的示例性方法的示意图。示例性方法包含但不限于与人血清白蛋白(HSA)融合、与聚乙二醇(PEG)融合或与抗HSA纳米抗体融合。

### 具体实施方式

[0025] 本公开总体上涉及IL-12的变体,所述变体相对于野生型IL-12通过其受体具有次最大信号传导功效。一方面,本文提供的公开内容涉及与IL-12R $\beta$ 2特异性结合的一种或多种IL-12变体多肽(其活性与野生型IL-12相当),但是相对于野生型IL-12与IL-12R $\beta$ 1的结合减少或中断。一方面,本公开涉及变体的一个或多个IL-12p40亚基(IL-12p40),其与IL-12p35亚基的二聚化与野生型IL-12相当,但是相对于野生型IL-12与IL-12R $\beta$ 1的结合减少或中断。

[0026] 在各个实施例中,本公开提供了一种核酸,所述核酸编码一种或多种IL-12变体,相对于野生型IL-12,所述一种或多种IL-12变体通过其受体具有次最大信号传导功效。在其它实施例中,本公开涉及施用组合物的方法,所述组合物包括一种或多种变体多肽或编码一种或多种IL-12变体的一个或多个核酸分子,相对于野生型IL-12,所述一种或多种IL-12变体通过其受体具有次最大信号传导功效。在一些实施例中,本公开涉及通过单独施用组合物或与其它治疗剂组合施用来治疗或预防一种或多种疾病或病症的方法,所述组合物包括一种或多种IL-12变体或编码一种或多种IL-12变体的一个或多个核酸分子,相对于野生型IL-12,所述一种或多种IL-12变体通过其受体具有次最大信号传导功效。

[0027] 定义

[0028] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。

[0029] 如本文所使用的,以下术语中的每个术语在此部分中具有与其相关联的含义。

[0030] 冠词“一个(a)”和“一种(an)”在本文中用于指代冠词的一个或多于一个(即,至少一个)语法宾语。举例来说,“要素”是指一个要素或多于一个要素。

[0031] 如本文所使用的,当提及如量、持续时间等可测量值时,“约”意味着涵盖偏离指定值 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这些变化适合于执行所公开的方法。

[0032] 如本文所使用的,术语“抗体”是指能够与抗原上的特定表位特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白并且可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。本公开中的抗体可以以各种形式存在,包含例如多克隆抗体、单克隆

抗体、细胞内抗体(“胞内抗体”)、Fv、Fab和F(ab)<sub>2</sub>,以及单链抗体(scFv)、重链抗体,如骆驼科抗体、合成抗体、嵌合抗体和人源化抗体(Harlow等人,1999,《使用抗体:实验室手册(Using Antibodies:A Laboratory Manual)》,纽约冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY);Harlow等人,1989,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,纽约冷泉港(Cold Spring Harbor, New York);Houston等人,1988,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》85:5879-5883;Bird等人,1988,《科学(Science)》242:423-426)。

[0033] 如本文所使用的,“癌症”是指细胞的异常生长或分裂。通常,癌细胞的生长和/或寿命超过了其周围正常细胞和组织的生长和/或寿命,并且与其不协调。癌症可以是良性的、恶变前的或恶性的。癌症发生在各种细胞和组织中,包含口腔(例如,嘴、舌、咽等)、消化系统(例如,食道、胃、小肠、结肠、直肠、肝、胆管、胆囊、胰腺等)、呼吸系统(例如,喉、肺、支气管等)、骨、关节、皮肤(例如,基底细胞、鳞状细胞、脑膜瘤等)、乳房、生殖系统(例如,子宫、卵巢、前列腺、睾丸等)、泌尿系统(例如,膀胱、肾、输尿管等)、眼睛、神经系统(例如,脑等)、内分泌系统(例如,甲状腺等)和造血系统(例如,淋巴瘤、骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性髓系白血病、慢性髓系白血病等)。

[0034] 术语“共同施用”、“共同施用”和“与…组合”包含在无特定时间限制内同时地、并发地或顺序地施用两种或更多种治疗剂(例如,IL-12变体多肽与另外的药剂的组合)。如本文所使用的,术语“共同施用”意味着涵盖缀合的化合物以及未缀合的化合物。

[0035] “疾病”是动物的健康状态,其中动物不能维持体内平衡,并且其中如果疾病没有得到改善,则动物的健康继续恶化。相比之下,动物的“病症”是健康状态,其中受试者能够维持体内平衡,但动物的健康状态不如没有病症的情况下有利的健康状态。如果不进行治疗,病症不一定会导致动物健康状况的进一步下降。

[0036] “编码”是指如基因、cDNA或mRNA等多核苷酸中的核苷酸的特异性序列的固有性质,所述序列用于充当在生物过程中合成其它聚合物和大分子的模板,所述其它聚合物和大分子具有定义的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或定义的氨基酸序列和由其产生的生物性质。因此,如果与基因相对应的mRNA的转录和转译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,则所述基因编码所述蛋白质。编码链(其核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常提供于序列表中)和非编码链(用作用于基因或cDNA转录的模板)两者都可以被称为编码所述基因或cDNA的蛋白质或其它产物。

[0037] 如本文在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中所使用的“同源”、“相同”或“同一性”意指序列在指定区域内具有相同的指定残基百分比。可以通过以下计算百分比:优化比对两个序列、比较指定区域内的两个序列、确定两个序列中出现相同残基的位置的数量以产生匹配位置的数量、将匹配位置数除以指定区域中的总位置数以及将结果乘以100得出序列同一性的百分比。在两个序列长度不同或比对产生一个或多个交错端并且指定的比较区仅包含单个序列的情况下,单个序列的残基包含在分母中但不包含在计算的分子中。在比较DNA和RNA时,胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可以被认为是等效的。可以手动或通过使用计算机序列算法(如BLAST或BLAST 2.0)执行同一性。

[0038] “分离”是指从自然状态改变或去除。例如,天然存在于活体动物体内的核酸或多肽不是“分离的”,但与其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或多肽是“分离

的”。经分离的核酸或蛋白质可以基本上纯化形式存在,或者可以存在于非天然环境,例如宿主细胞中。

[0039] “经分离的核酸”是指已经与在天然存在的状态下与其侧接的序列分离的核酸区段或片段,例如已经从通常邻近所述片段的序列(例如,邻近其天然存在的基因组中的片段的序列)中去除的DNA片段。所述术语还适用于已经从天然伴随核酸的其它组分,例如在细胞中天然伴随核酸的RNA或DNA或蛋白质中基本纯化的核酸。因此,所述术语包含例如掺入到载体、自主复制质粒或病毒或原核生物或真核生物的基因组DNA中或以独立于其它序列的单独分子形式(例如,作为通过PCR或限制酶消化产生的cDNA或基因组或cDNA片段)存在的重组DNA。所述术语还包含作为编码另外的多肽序列的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0040] 如本文所使用的,术语“调节”意指与在不存在治疗或化合物的情况下受试者体内的mRNA、多肽或应答的活性和/或水平相比,和/或与在其它方面相同但未经治疗的受试者体内的mRNA、多肽或应答的活性和/或水平相比,介导受试者体内的mRNA、多肽或应答的活性和/或水平的可检测的增加或减少。所述术语涵盖激活、抑制和/或以其它方式影响天然信号或应答,由此介导受试者(例如,人)体内的有益的治疗性应答、预防性应答或其它期望应答。

[0041] 当提及凭借具有对第一靶标具有特异性的至少一个区域(例如,第一抗体的配体或Fab)和对第二靶标具有特异性的至少一个第二区域(例如,第二抗体的配体或Fab)而识别两种或更多种不同抗原的药剂(例如,配体或抗体)时,通常使用术语“多特异性”或“双特异性”。双特异性药剂与两个靶标特异性结合并且因此是一种类型的多特异性药剂。

[0042] 如本文所使用的,“突变”、“突变体”或“变体”是指核酸或多肽序列相对于参考序列(其可以是天然存在的正常序列或“野生型”序列)的变化,并且包含易位、缺失、插入和取代/点突变。如本文所使用的,“突变体”或“变体”是指包括突变的核酸或蛋白质。

[0043] “核酸”或“核酸分子”是指多核苷酸并且包含多聚核糖核苷酸和多聚脱氧核糖核苷酸。根据本公开的核酸可以包含嘧啶和嘌呤碱基的任何聚合物或寡聚物,如分别是胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以及腺嘌呤和鸟嘌呤。(参见Albert L. Lehninger,《生物化学原理(Principles of Biochemistry)》,在793-800处(沃斯出版社(Worth Pub.)1982),所述文献出于所有目的以其整体并入本文)。实际上,本公开考虑了任何脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或肽核酸组分以及其任何化学变体,如这些碱基的甲基化形式、羟甲基化形式或葡萄糖基化形式等。聚合物或寡聚物在组成上可以是异质的或同质的,并且可以从天然存在的来源中分离或可以人工或合成产生。另外,核酸可以是DNA或RNA或其混合物,并且可以以包含同源双链、异源双链和杂交状态在内的单链或双链形式永久地或过渡地存在。

[0044] “寡核苷酸”或“多核苷酸”是长度在至少2个、至少8个、至少15个或至少25个核苷酸的范围内,但可以为至多50个、100个、1000个或5000个核苷酸长的核酸或与多核苷酸特异性杂交的化合物。多核苷酸包含可以从天然来源分离、重组产生或人工合成的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其模拟物的序列。本公开的多核苷酸的另外的实例可以是肽核酸(PNA)。(参见美国专利第6,156,501号,所述美国专利特此通过引用整体并入。)本公开还涵盖以下情况:存在已经在某些tRNA分子中被鉴定并且假定以三重螺旋存在的非传统碱基配对如胡斯坦碱基配对(Hoogsteen base pairing)。在本公开中,“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换地使用。应当理解,当核苷酸序列在本文中由DNA序列(例如,A、T、G和C)表示时,

这也包含对应的RNA序列(例如,A、U、G、C),其中“U”替换“T”。

[0045] 术语“患者”“受试者”“个体”等在本文中可互换地使用,并且指无论是在体内、体外还是原位适用于本文所述的方法的任何动物或其细胞。在某些非限制性实施例中,患者、受试者或个体是人。

[0046] 如本文所使用的,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用,并且是指包含通过肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可以包括蛋白质的序列或肽的序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包含包括通过肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文所使用的,所述术语既指短链(在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚物),又指长链(在本领域中通常称为蛋白质),其中有许多类型。“多肽”包含例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包含天然肽、重组肽、合成肽、突变多肽、变体多肽或其组合。

[0047] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载剂”意指一种化学组合物,本公开的组合物可以与所述化学组合物组合并且在该组合之后,所述化学组合物可以用于将适当的组合物施用于受试者。

[0048] 如本文所使用的,“多核苷酸”包含cDNA、RNA、DNA/RNA杂交体、反义RNA、核酶、基因组DNA、合成形式和混合聚合物、正义链和反义链两者,并且可以被化学或生物化学修饰以表现出非天然的或衍生的、合成的或半合成的核苷酸碱基。此外,考虑了野生型或合成基因的改变,包含但不限于一个或多个核苷酸的缺失、插入、取代或与其它多核苷酸序列的融合。

[0049] 如本文所使用的,术语“预防”疾病或病症意指降低受试者所经历的疾病或病症的至少一种体征或症状的严重程度或频率。

[0050] 如本文所使用的,“样品”或“生物样品”意指从受试者身上分离的生物材料。生物样品可以含有适于检测受试者的生理或病理过程的mRNA、多肽或其它标志物的任何生物材料,并且可以包括从个体获得的流体、组织、细胞和/或非细胞材料。

[0051] 如本文所使用的,术语“疗法”或“治疗方案”是指使用药理学、外科手术、膳食和/或其它技术来预防、治疗或改变疾病或病症所采取的那些活动,例如旨在减少或消除疾病或病症的至少一种体征或症状的治疗过程。治疗方案可以包含一种或多种化合物的处方剂量或外科手术。疗法通常将是最有益的并且减少或消除病症或疾病状态的至少一种体征或症状,但在一些情况下,疗法的效果将具有不令人期望的或副作用。疗法的效果还将受到受试者的生理状态,例如年龄、性别、遗传学、体重、其它疾病状况等的影响。

[0052] 术语“治疗有效量”是指将引起研究员、兽医、医生或其它临床医生所寻求的细胞、组织、器官、系统或受试者的生物、生理、临床或医学应答的受试者化合物或组合物的量。术语“治疗有效量”包含施用时足以预防正治疗的病症或疾病的体征或症状中的一种或多种体征或症状的发展或在一定程度上治疗所述一种或多种体征或症状的化合物或组合物的量。治疗有效量将根据化合物或组合物、待治疗的受试者的疾病以及其严重程度和年龄、体重等而变化。

[0053] 如本文所使用的,术语“治疗”疾病或病症意指降低受试者所经历的疾病或病症的至少一种体征或症状的频率或严重程度。术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治

疗(treat)”等在本文中用于通常指获得期望的药理和/或生理效果。所述效果就完全或部分地预防疾病或其症状来说可以是预防性的,和/或就部分或完全稳定或治愈疾病和/或可归因于疾病的不良影响来说可以是治疗性的。术语“治疗”涵盖对哺乳动物,特别是人的疾病的任何治疗并且包含:(a)防止疾病和/或症状在可能易患疾病或症状但尚未被诊断为患有疾病或症状的受试者中发生;(b)抑制疾病和/或症状,例如减缓或阻止其发展(例如,停止肿瘤生长、减缓肿瘤生长速率、停止癌细胞增殖速率等);或(c)缓解疾病症状,即引起疾病和/或症状消退(例如,引起肿瘤大小减小、减少存在的癌细胞的数量等)。需要治疗的受试者包含已经患病的受试者(例如,患有癌症的受试者、患有感染的受试者、患有代谢紊乱的受试者、患有黄斑变性的受试者等)以及期望得到预防的受试者(例如,对癌症的易感性增加的受试者、感染可能性增加的受试者、疑似患有癌症的受试者、疑似携带感染的受试者、对代谢疾病的易感性增加的受试者、对黄斑变性的易感性增加的受试者等)。

[0054] 如本文所使用的,术语“野生型”是指从天然存在的来源分离的基因或基因产物。野生型基因是群体中最常观察到的基因,并且因此被任意指定为基因的“正常”或“野生型”形式。相比之下,术语“经修饰的”、“变体”或“突变体”是指与野生型基因或基因产物相比在序列和/或功能性质上具有修饰(即,改变的特性)的基因或基因产物。

[0055] 范围:贯穿本公开,本公开的各个方面可以以范围格式呈现。应当理解,以范围格式进行的描述仅仅是为了方便和简洁起见,并且不应被解释为是对本公开的范围的固定限制。因此,对范围的描述应被视为已经具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的单个数值。例如,对如1至6的范围的描述应被视为具有具体公开的子范围,如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及所述范围内的单独数量,例如1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0056] 如本文关于IL-12变体多肽使用的术语“特异性结合”是指识别并结合特异性受体(如IL-12R $\beta$ 2或IL-12R $\beta$ 1)的IL-12变体多肽。在一些情况下,IL-12变体多肽相对于野生型IL-12显著减少了与IL-12R $\beta$ 1的结合。例如,与来自一个物种的受体特异性结合的IL-12变体多肽还可以与来自一个或多个物种的所述受体结合。然而,这种跨物种反应性本身不改变IL-12变体多肽的特异性分类。在另一个实例中,与受体特异性结合的IL-12变体多肽还可以与受体的不同等位基因形式结合。然而,这种交叉反应性本身不改变IL-12变体多肽的特异性分类。在一些情况下,术语“特异性结合(specific binding)”或“特异性结合(specifically binding)”可以用于指抗体、蛋白质或肽与第二化学物种的相互作用,以意指相互作用取决于化学物种上特定结构(例如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,IL-12变体多肽识别并结合特定蛋白质结构而不是通常结合蛋白质。

[0057] 组合物

[0058] 在一些实施例中,本公开的组合物包括一种或多种IL-12变体多肽分子,其中变体增强免疫应答但具有相对低的毒性和相对宽的治疗指数。在一些实施例中,组合物包括通过减少IL-12R $\beta$ 1向由IL-12R $\beta$ 2和IL-12R $\beta$ 1两者组成的活性受体信号传导复合物的募集而产生的IL-12活性的部分诱导物。在一些实施例中,组合物包括能够与IL-12R $\beta$ 2结合但通过IL-12R $\beta$ 1减少或消除结合的一个或多个分子。在一些实施例中,组合物包括一种或多种IL-12变体多肽。在一些实施例中,组合物包括编码一种或多种IL-12变体多肽的一个或多个核酸分子。

**[0059] 多肽**

[0060] 在一些实施例中,本公开包括一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其与IL-12R $\beta$ 2特异性结合但与IL-12R $\beta$ 1的结合减少。在一些实施例中,与野生型(WT)IL-12相比,所述一种或多种IL-12变体多肽表现出与IL-12R $\beta$ 2的结合亲和力增加。在一些实施例中,与WT IL-12相比,所述一种或多种IL-12变体多肽表现出与IL-12R $\beta$ 2类似的结合亲和力。在一些实施例中,与WT IL-12相比,所述一种或多种IL-12变体多肽表现出与IL-12R $\beta$ 1的结合亲和力降低。

[0061] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽可以用于治疗或预防疾病或病症。在一些实施例中,疾病或病症是癌症。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽单独地或与一种或多种另外的治疗剂组合地可用于治疗或预防疾病或病症。在一些实施例中,另外的治疗剂是癌症免疫治疗剂。在一些实施例中,另外的治疗剂是化疗剂。在任何此类实施例中,疾病或病症可以包括癌症,如急性骨髓瘤白血病、间变性淋巴瘤、星形细胞瘤、B细胞癌、乳腺癌、结肠癌、室管膜瘤、食管癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、肝癌、肺癌、套细胞淋巴瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、少突神经胶质瘤、卵巢癌、胰腺癌、外周T细胞淋巴瘤、肾癌、肉瘤、胃癌、癌、间皮瘤或肉瘤。

[0062] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽与IL-12R $\beta$ 2结合并且表现出与IL-12R $\beta$ 1的结合显著减少。在一些实施例中,IL-12变体多肽以野生型IL-12与IL-12R $\beta$ 1的结合亲和力的约0.000000000001%至约95%的结合亲和力与IL-12R $\beta$ 1结合。在一些实施例中,IL-12变体多肽以野生型IL-12与IL-12R $\beta$ 1的结合亲和力的约97%、约96%、约95%、约94%、约93%、约92%、约91%、约90%、约89%、约88%、约87%、约86%、约85%、约84%、约83%、约82%、约81%、约80%、约79%、约78%、约77%、约76%、约75%、约74%、约73%、约72%、约71%、约70%、约69%、约68%、约67%、约66%、约65%、约64%、约63%、约62%、约61%、约60%、约59%、约58%、约57%、约56%、约55%、约54%、约53%、约52%、约51%、约50%、约49%、约48%、约47%、约46%、约45%、约44%、约43%、约42%、约41%、约40%、约39%、约38%、约37%、约36%、约35%、约30%、约29%、约28%、约27%、约26%、约25%、约24%、约23%、约22%、约21%、约20%、约19%、约18%、约17%、约16%、约15%、约14%、约13%、约12%、约11%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或约0%的结合亲和力与IL-12R $\beta$ 1结合。

[0063] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽以显著高于IL-12变体多肽和IL-12R $\beta$ 2的 $K_D$ 的解离常数( $K_D$ ;较高表示较低的结合亲和力)与IL-12R $\beta$ 1结合。在一些实施例中,IL-12变体多肽以与WT IL-12和IL-12R $\beta$ 2的 $K_D$ 基本上相同或更低的 $K_D$ 与IL-12R $\beta$ 2结合。

[0064] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽以显著高于WT IL-12和IL-12R $\beta$ 1的 $K_D$ 的 $K_D$ 与IL-12R $\beta$ 1结合。在一些实施例中,IL-12变体多肽以为WT IL-12和IL-12R $\beta$ 1的 $K_D$ 至少10倍、至少100倍、至少1,000倍、至少10,000倍、至少100,000倍、至少1,000,000倍、至少10,000,000倍或至少100,000,000倍的 $K_D$ 与IL-12R $\beta$ 1结合。在一些实施例中,IL-12变体多肽以10nM或更大、15nM或更大、20nM或更大、25nM或更大、30nM或更大、35nM或更大、40nM或更大、45nM或更大、50nM或更大、55nM或更大、60nM或更大、65nM或更大、70nM或更大、75nM或更大、80nM或更大、85nM或更大、90nM或更大、95nM或更大、100nM或更大、200nM或更大、300nM或更大、400nM或更大、500nM或更大、或1 $\mu$ M或更大的 $K_D$ 与IL-12R $\beta$ 1结合。

[0065] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽表现出对IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的激动作用显著降低。在一些实施例中,IL-12变体多肽提供了对IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的激动作用,所述激动作用为WT IL-12对IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的最大激动作用的约95%、约94%、约93%、约92%、约91%、约90%、约89%、约88%、约87%、约86%、约85%、约84%、约83%、约82%、约81%、约80%、约79%、约78%、约77%、约76%、约75%、约74%、约73%、约72%、约71%、约70%、约69%、约68%、约67%、约66%、约65%、约64%、约63%、约62%、约61%、约60%、约59%、约58%、约57%、约56%、约55%、约54%、约53%、约52%、约51%、约50%、约49%、约48%、约47%、约46%、约45%、约44%、约43%、约42%、约41%、约40%、约39%、约38%、约37%、约36%、约35%、约30%、约29%、约28%、约27%、约26%、约25%、约24%、约23%、约22%、约21%、约20%、约19%、约18%、约17%、约16%、约15%、约14%、约13%、约12%、约11%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或约0%。

[0066] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽需要显著更高的有效浓度以达到IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的最大激动作用(EC<sub>50</sub>)的50%。在一些实施例中,IL-12变体对IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的EC<sub>50</sub>为野生型IL-12对IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的EC<sub>50</sub>的约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%、约160%、约170%、约180%、约190%、约200%、约210%、约220%、约230%、约240%、约250%、约260%、约270%、约280%、约290%、约300%、约310%、约320%、约330%、约340%、约350%、约360%、约370%、约380%、约390%、约400%、约410%、约420%、约430%、约440%、约450%、约460%、约470%、约480%、约490%、约500%、约550%、约600%、约650%、约700%、约750%、约800%、约850%、约900%、约950%、约1000%、约1100%、约1200%、约1300%、约1400%、约1500%、约1600%、约1700%、约1800%、约1900%、约2000%、约2100%或约2200%。在一些实施例中,IL-12变体对IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的EC<sub>50</sub>为WT IL-12对IL-12R $\beta$ 1和IL-12R $\beta$ 2的EC<sub>50</sub>的至少2倍、至少5倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少200倍、至少500倍或至少1000倍。

[0067] 在各个实施例中,相对于WT IL-12多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括一个或多个突变。在一些实施例中,WT IL-12多肽包括人WT IL-12。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽和WT IL-12多肽两者都包括p35亚基(IL-12p35)和p40亚基(IL-12p40)。在一些实施例中,WT IL-12的IL-12p40包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列(对于序列,参见下文实例1中的表1)。在一些实施例中,WT IL-12的IL-12p35包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0068] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p35包括具有或不具有信号肽的WT IL-12p35的氨基酸序列。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p35包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p35进一步包括纯化标签。在一些实施例中,纯化标签是聚组氨酸标签。在一些实施例中,聚组氨酸标签包括至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个或至少10个组氨酸残基。在一个实施例中,进一步包括纯化标签的所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p35包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列。除非另外指明,否则术语“X”在下文中用于表示任何氨基酸。

[0069] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40包括具有或不具有信号肽的WT IL-12p40的氨基酸序列。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一些实施例中,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。在一个实施例中,IL-12变体多肽的IL-12p40包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,具有或不具有信号肽。在一个实施例中,IL-12变体多肽的IL-12p40包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA (SEQ ID NO:31) 的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0070] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括与WT IL-12具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括具有以下性质的氨基酸序列:(i) 与WT IL-12具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii) 相对于WT IL-12包含至少一个、至少两个或至少三个突变。

[0071] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p35包括与WT IL-12p35具有100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p35包括具有以下性质的氨基酸序列:(i) 与WT IL-12p35具有100%序列同一性;并且(ii) 相对于WT IL-12p35不包含突变。

[0072] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括与WT IL-12p40具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i) 与WT IL-12p40具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii) 相对于WT IL-12p40包含至少一个、至少两个或至少三个突变。

[0073] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40,其包括与WT IL-12p40具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、

97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性并且相对于WT IL-12p40包含至少一个、至少两个或至少三个突变的氨基酸序列；以及(ii) IL-12p35,其包括与WT IL-12p35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0074] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p35包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p35包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35不包含突变。

[0075] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:1包含至少一个、至少两个或至少三个突变。

[0076] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:34包含至少一个、至少两个或至少三个突变。

[0077] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个、至少两个或至少三个突变的氨基酸序列;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0078] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性并且相对于SEQ ID NO:34包含至少一个、至少两个或至少三个突变的氨基酸序列;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0079] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有

以下性质的氨基酸序列：(i) 与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性；并且(ii) 相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变：H216X、K217X和K219X。

[0080] 在一些实施例中，所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列：(i) 与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性；并且(ii) 相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变：H216X、K217X和K219X。

[0081] 在一些实施例中，所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40，其包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变：H216X、K217X和K219X；以及(ii) IL-12p35，其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0082] 在一些实施例中，所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40，其包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变：H216X、K217X和K219X；以及(ii) IL-12p35，其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0083] 在一些实施例中，所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列：(i) 与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性；并且(ii) 相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变：H216A、K217A和K219A。

[0084] 在一些实施例中，所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列：(i) 与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性；并且(ii) 相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变：H216A、K217A和K219A。

[0085] 在一些实施例中，所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40，其包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变：H216A、K217A和K219A；以及(ii) IL-12p35，其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0086] 在一些实施例中，所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40，其包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、

90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0087] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,具有或不具有信号肽。

[0088] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0089] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40,其包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,具有或不具有信号肽;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段包括(i) IL-12p40,其包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被选自由以下组成的组的一种或多种不同的信号肽替换:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0091] 在一些情况下,可能期望延长如上所述的本公开的一种或多种IL-12变体多肽的体内半衰期。延长多肽体内半衰期的各种技术在本领域中是已知的,包含将多肽与一个或多个稳定的蛋白质或蛋白质结构域融合。示例性稳定化融合蛋白/结构域包含但不限于IgG Fc结构域(即,能够形成同源二聚体IgG Fc)、IgG Fc变体结构域(即,能够形成异源二聚体IgG Fc)、人血清白蛋白(HSA)、聚乙二醇(PEG)和抗HSA纳米抗体。

[0092] 在一个实施例中,如本文所述的IL-12变体多肽与增强融合蛋白的稳定性或半衰期的肽融合。在一个实施例中,融合肽包括免疫球蛋白或其变体或片段的至少一个区域。在一个实施例中,所述肽包括免疫球蛋白的Fc结构域。在一个实施例中,融合肽包括人IgG1的Fc结构域。在一个实施例中,融合肽包括免疫球蛋白的Fc结构域,所述免疫球蛋白包括一个或多个突变以通过Fc受体或补体去除Fc效应子功能。在一个实施例中,融合肽包括人IgG1的Fc结构域,相对于野生型人IgG1,所述人IgG1包括残基N297处的突变,使得所述Fc结构域去糖基化。

[0093] 异源二聚体Fc融合构建体是基于抗体的重链的两个Fc结构域的自组装性质,例如,组装成“二聚体”的两个“单体”。如WO 2018071919A1中所述通过改变每个单体的氨基酸序列来制备异源二聚体Fc融合体,所述文献通过引用整体并入本文。异源二聚体Fc的产生依赖于恒定区中的在每条链上不同的氨基酸变体,以促进异源二聚体形成和/或允许异源二聚体比同源二聚体更容易纯化。因此,在一些实施例中,本公开涉及使用与异源二聚体Fc融合的如本文所述的IL-12变体多肽,由此延长IL-12变体多肽的半衰期的组合物和方法。

[0094] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二价同源二聚体Fc。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc包括至少两个IgG Fc结构域。在一个实施例中,IgG是人IgG。在一个实施例中,人IgG是人IgG1。在一个实施例中,人IgG1 Fc结构域包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0095] 在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0096] 在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0097] 在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p35通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0098] 在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p35

包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0099] 在一个实施例中,包括二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40;以及(ii)二价同源二聚体Fc的IL-12p35。在一个实施例中,包括二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p35;以及(ii)二价同源二聚体Fc的IL-12p40。

[0100] 在一个实施例中,包括二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列;以及(ii)IL-12p35,所述IL-12p35包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。在一个实施例中,包括二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变;以及(ii)IL-12p35,所述IL-12p35包括选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。在一个实施例中,包括二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(ii)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。在一个实施例中,包括二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(ii)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。

[0101] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列;以及(ii)二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0102] 在一个实施例中,二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSVLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0103] 本领域的技术人员将认识到,通过接头与IgG Fc融合的IL-12p40或IL-12p35和对应亚基(分别为IL-12p35或IL-12p40)的共表达将产生二聚体IL-12(即,包括由二价IgG Fc结构域稳定的异源二聚体的同源二聚体的四聚体结构;参见实例1和图5A)。

[0104] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括双特异性异源二聚体Fc。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括IgG Fc“杆”和IgG Fc“臼”。在一个实施例中,IgG Fc“杆”和IgG Fc“臼”是IgG Fc的变体。在一个实施例中,IgG Fc包括人IgG Fc。在一个实施例中,人IgG Fc包括人IgG1 Fc。在一个实施例中,IgG Fc“杆”包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在一个实施例中,IgG Fc“臼”包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列。

[0105] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0106] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0107] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0108] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0109] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与IgG Fc“杵”融合。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与IgG Fc“臼”融合。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35通过接头与IgG Fc“杵”融合。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35通过接头与IgG Fc“臼”融合。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0110] 在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0111] 在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0112] 在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40

的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0113] 在一个实施例中,包括通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35的双特异性异源二聚体Fc包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0114] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40。

[0115] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0116] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列但具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列但具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0117] 本领域的技术人员将认识到,IL-12p40“杵”或IL-12p35“臼”与对应亚基(分别为

IL-12p40“臼”或IL-12p35“杵”)的共表达将产生经修饰的二聚体IL-12,所述经修饰的二聚体IL-12通过“臼”与“杵”IgG Fc结构域之间的相互作用稳定(参见实例1、图4A和图5B)。

[0118] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc。在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc包括至少两个IgG Fc结构域。在一个实施例中,IgG是人IgG。在一个实施例中,人IgG是人IgG1。在一个实施例中,人IgG1 Fc结构域包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0119] 在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0120] 在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0121] 在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0122] 在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0123] 在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35融合。

[0124] 在一个实施例中,(i)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35融合,并且(ii)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,(i)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35融合,并且(ii)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,接头包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0125] 在一个实施例中,包括单链二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一个实施例中,包括单链二价同源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列,但在单

链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0126] 本领域的技术人员将认识到,单链二价同源二聚体Fc的任一构型的表达将产生二聚体IL-12(即,由二价IgG Fc结构域稳定的融合二聚体的二聚体;参见实例1和图5B)。

[0127] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体Fc。

[0128] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”。在一个实施例中,IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”是IgG Fc的变体。在一个实施例中,IgG Fc包括人IgG Fc。在一个实施例中,人IgG Fc包括人IgG1 Fc。在一个实施例中,IgG Fc“臼”通过接头与信号肽融合。在一个实施例中,IgG Fc“杵”通过接头与信号肽融合。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0129] 在一个实施例中,单链单体IL-12的IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,单链单体IL-12的IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,单链单体IL-12的IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,单链单体IL-12的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,单链单体IL-12的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0130] 在一个实施例中,单链单体IL-12的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0131] 在一个实施例中,单链单体IL-12的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0132] 在一个实施例中,单链单体IL-12的IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实

施例中,单链单体IL-12的IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,单链单体IL-12的IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0133] 在一个实施例中,单链单体IL-12包括通过接头与IL-12p35融合的IL-12p40。在一个实施例中,单链单体IL-12包括(i)通过接头与IL-12p35融合的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35。在一个实施例中,单链单体IL-12包括(i)通过接头与IL-12p40融合的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40。在一个实施例中,单链单体IL-12包括(i)通过接头与IL-12p35融合的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35。在一个实施例中,单链单体IL-12包括(i)通过接头与IL-12p40融合的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40。在一个实施例中,接头包括一个或多个选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0134] 在一个实施例中,单链单体IL-12包括选自以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29。

[0135] 在一个实施例中,单链单体IL-12包括与选自以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29。在一个实施例中,单链单体IL-12包括选自以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29,但在单链单体IL-12的IL-12p40部分具有一个或多个突变。在一个实施例中,单链单体IL-12包括选自以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29,但在单链单体IL-12的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,单链单体IL-12包括选自以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29,但在单链单体IL-12的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0136] 在一个实施例中,包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括SEQ ID NO:26的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0137] 在一个实施例中,包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0138] 在一个实施例中,包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括SEQ ID NO:28的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0139] 在一个实施例中,包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0140] 本领域的技术人员将认识到,IgG Fc“杵”或“臼”与分别与对应的IgG Fc“臼”或

“杵”融合的单链IL-12的共表达将产生由异源二聚体Fc稳定的单体IL-12(参见实例1和图5C)。

[0141] 在一个实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc。

[0142] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”。在一个实施例中,IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”是IgG Fc的变体。在一个实施例中,IgG Fc包括人IgG Fc。在一个实施例中,人IgG Fc包括人IgG1 Fc。在一个实施例中,IgG Fc“臼”通过接头与信号肽融合。在一个实施例中,IgG Fc“杵”通过接头与信号肽融合。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0143] 在一个实施例中,二聚体IL-12的IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,二聚体IL-12的IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,二聚体IL-12的IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,二聚体IL-12的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,相对于SEQ ID NO:1,二聚体IL-12的IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0144] 在一个实施例中,二聚体IL-12的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0145] 在一个实施例中,二聚体IL-12的IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSVLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0146] 在一个实施例中,二聚体IL-12的IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实施例中,二聚体IL-12的IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,二聚体IL-12的IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0147] 在一个实施例中,二聚体IL-12包括(i)二聚体IL-12的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35。在一个实施例中,二聚体IL-12包括(i)二聚体IL-12的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35。在一个实施例中,二聚体IL-12包括(i)二聚体IL-12的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40。在一个实施例中,二聚体IL-12包括(i)二聚体IL-12的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40。

[0148] 在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)二聚体IL-12的IL-12p40;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35;以及(iii)IgG Fc“臼”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)二聚体IL-12的IL-12p35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40;以及(iii)IgG Fc“臼”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)二聚体IL-12的IL-12p40;

(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35;以及(iii)IgG Fc“杵”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)二聚体IL-12的IL-12p35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40;以及(iii)IgG Fc“杵”。

[0149] 在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0150] 在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被选自由以下组成的组的一种或多种不同的信号肽替换:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0151] 在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0152] 在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述

IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0153] 在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被选自由以下组成的组的一种或多种不同的信号肽替换:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0154] 在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有至少一个突变;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,包括二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc的所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0155] 本领域的技术人员将认识到,IL-12p40或IL-12p35与(i)与IgG Fc“臼”或“杵”融合的对亚基以及(ii)对应的IgG Fc“杵”或“臼”的共表达将产生由异源二聚体IgG Fc稳定的二聚体IL-12(参见实例1和图5D)。

[0156] 人血清白蛋白(HSA)已经与治疗上有益的肽(WO 2001079271A和WO 2003059934A,所述文献通过引用整体并入本文)遗传融合,其中典型的结果是,所述融合具有治疗上有益的肽的活性并且相较于单独的治疗上有益的肽的血浆半衰期具有显著更长的血浆半衰期。因此,在一些实施例中,本公开涉及使用与HSA融合的如本文所述的IL-12变体多肽,由此延长IL-12变体多肽的半衰期的组合物和方法。

[0157] 用于改善蛋白质稳定性的最广泛使用的方法之一是用高度可溶性大分子如聚乙二醇(“PEG”)对多肽进行化学修饰,这防止多肽与蛋白酶接触。PEG是高度柔性的、不带电荷的、大部分是非免疫原性的、亲水的、不可生物降解的分子,其产生比同等大小的蛋白质的

流体动力学半径更大的流体动力学半径。还熟知的是,当与多肽药物特异性或非特异性连接时,PEG增加了多肽药物的溶解度并防止其水解,由此增加多肽药物的血清稳定性,而不会由于其低抗原性而引起任何免疫应答(Sada等人,《发酵生物工程杂志(J.Fermentation Bioengineering)》,1991,71:137-139)。因此,在一些实施例中,本公开涉及使用与PEG融合的如本文所述的IL-12变体多肽,由此延长IL-12变体多肽的半衰期的组合物和方法。

[0158] 用于改善蛋白质的体内半衰期的另一种方法包括如WO 2004041865中所述与单结构域抗体融合,所述文献通过引用整体并入本文。单结构域抗体是其互补决定区是单结构域多肽的一部分的抗体。实例包含但不限于重链抗体、天然缺乏轻链的抗体、衍生自常规4链抗体的单结构域抗体、经工程化的抗体和除衍生自抗体的那些之外的单结构域支架。单结构域抗体可以是本领域的任何抗体或任何未来的单结构域抗体。单结构域抗体可以源自任何物种,包含但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼、山羊、兔、牛。根据本公开的一个方面,如本文所使用的单结构域抗体是天然存在的单结构域抗体,被称为缺乏轻链的重链抗体。为了清楚起见,源自天然缺乏轻链的重链抗体的此可变结构域在本文中被称作VHH或纳米抗体,以将其与四链免疫球蛋白的常规VH区分开来。此类VHH分子或纳米抗体可以源自骆驼科物种(例如,骆驼、单峰骆驼、羊驼和原驼(guanaco))中产生的抗体。因此,在一些实施例中,本公开涉及使用与纳米抗体融合的如本文所述的IL-12变体多肽,由此延长IL-12变体多肽的半衰期的组合物和方法。在一个实施例中,纳米抗体包括抗HSA纳米抗体。

[0159] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽进一步包括一种或多种信号肽。在一个实施例中,所述一种或多种信号肽促进所述一种或多种IL-12变体多肽的细胞外分泌。在一个实施例中,所述一种或多种信号肽包括一个或多个选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0160] 本领域的技术人员将认识到,任何已知的产生多肽的方法可以用于产生本公开的多肽。本公开的多肽可以使用化学方法来制备。例如,多肽可以通过固相技术(Roberge JY等人(1995)《科学》269:202-204)来合成,从树脂上切割,并且通过制备型高效液相色谱法来纯化。自动化合成可以根据制造商提供的说明书例如使用ABI 431A肽合成仪(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))来实现。

[0161] 本公开的多肽可以通过常规技术来合成。例如,肽或嵌合蛋白可以使用固相肽合成通过化学合成来合成。这些方法采用固相或液相合成方法(参见例如,J.M.Stewart和J.D.Young,《固相肽合成(Solid Phase Peptide Synthesis)》,第2版,伊利诺伊州罗克福德市的皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.,Rockford Ill.) (1984);以及G.Barany和R.B.Merrifield,《肽:分析、合成、生物学(The Peptides:Analysis Synthesis,Biology)》编辑E.Gross和J.Meienhofer第2卷纽约学术出版社(Academic Press,New York),1980,第3-254页,用于固相合成技术;以及M Bodansky,《肽合成原理(Principles of Peptide Synthesis)》,柏林的施普林格出版社(Springer-Verlag,Berlin)1984;以及E.Gross和J.Meienhofer编辑,《肽:分析、合成、生物学》,同上,第1卷,用于经典溶液合成)。举例来说,本公开的肽可以使用9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)固相化学通过直接掺入磷酸苏氨酸作为N-苄基甲氧基-羰基-O-苄基-L-磷酸苏氨酸衍生物来合成。

[0162] 可替代地,多肽可以通过重组手段或通过从一个或多个较长多肽上切割来制备。多肽的组成可以通过氨基酸分析或测序来确认。

[0163] 根据本公开的多肽的变体可以是 (i) 其中氨基酸残基中的一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸残基取代并且此类经取代的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码编码的氨基酸残基的变体; (ii) 其中存在一个或多个经修饰的氨基酸残基 (例如, 通过连接取代基而修饰的残基) 的变体; (iii) 其中肽是本公开的多肽的替代性剪接变体的变体; (iv) 多肽的片段和/或 (v) 其中多肽与另一种肽 (如前导序列或分泌序列或用于纯化 (例如, His-标签) 或用于检测 (例如, Sv5表位标签) 的序列) 融合的变体。片段包含通过原始序列的蛋白水解切割 (包含多位点蛋白水解) 产生的多肽。变体可以被翻译后修饰或化学修饰。根据本文的教导, 此类变体被认为在本领域的技术人员的范围内。

[0164] 本公开的多肽可以被翻译后修饰。例如, 落入本公开的范围内的翻译后修饰包含信号肽切割、糖基化、乙酰化、异戊二烯化、蛋白水解、肉豆蔻酰化、蛋白质折叠和蛋白水解加工等。一些修饰或加工事件需要引入另外的生物机器。例如, 通过向标准翻译反应中添加犬微粒体膜或非爪蟾卵提取物 (美国专利第6,103,489号) 来检查加工事件, 如信号肽切割和核心糖基化。

[0165] 本公开的多肽可以包含通过翻译后修饰或通过翻译期间引入非天然氨基酸而形成的非天然氨基酸。多种方法可用于在蛋白质翻译期间引入非天然氨基酸。

[0166] 本公开的多肽可以使用如Reedijk等人 (《欧洲分子生物学学会杂志 (The EMBO Journal)》11(4):1365, 1992) 描述的方法等常规方法来磷酸化。

[0167] 本公开的多肽可以通过与无机酸 (如盐酸、硫酸、氢溴酸、磷酸等) 或有机酸 (如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、琥珀酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、水杨酸、苯磺酸和甲苯磺酸) 反应而转化成药用盐。

[0168] 在一些其它实施例中, 本公开的IL-12变体多肽包含进一步修饰以改善其对蛋白水解降解的抗性 or 优化溶解度性质或使其更适合作为治疗剂的试剂。例如, 本公开的变体进一步包含含有除天然存在的L-氨基酸之外的残基的类似物, 例如D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸。D-氨基酸可以取代一些或全部氨基酸残基。

[0169] 在一些实施例中, 所述一种或多种IL-12变体多肽可以与另一种蛋白质 (即, “第二多肽”) 融合。在一些实施例中, 第二多肽与不同于通过所述一种或多种IL-12变体多肽结合的靶分子 (例如, 不同于IL-12R $\beta$ 1和/或IL-12R $\beta$ 2) 的靶分子特异性结合。因此, 在一些实施例中, 所述一种或多种IL-12变体多肽是多特异性的 (例如, 双特异性的), 使得多肽的第一区域包含IL-12变体多肽序列 (即, 所述第一区域包含IL-12变体多肽), 以及与另一种靶分子 (例如, 抗原) 特异性结合的第二区域。例如, 在一些情况下, IL-12变体多肽与第二多肽融合, 所述第二多肽与除由IL-12变体多肽结合的靶分子之外的靶分子特异性结合。

[0170] 在一些实施例中, 所述一种或多种IL-12变体多肽包含接头 (例如, 接头多肽)。例如, 在一些实施例中, 一种或多种IL-12变体多肽和融合配偶体 (即, 第二多肽) 被接头 (例如, 接头多肽) 分离。接头多肽可以具有各种氨基酸序列中的任一种。蛋白质可以通过接头多肽连接, 可以具有柔性性质 (例如, 柔性接头多肽), 但是不排除其它化学键。合适的接头包含长度介于约6个氨基酸与约40个氨基酸之间或长度介于约6个氨基酸与约25个氨基酸之间的多肽。这些接头可以通过使用合成的编码接头的寡核苷酸偶联蛋白质来产生。可以使用具有一定程度柔性的肽接头。连接肽可以实际上具有任何氨基酸序列, 记住, 在一些情况下, 接头将具有产生一般柔性肽的序列。使用如甘氨酸和丙氨酸等小型氨基酸在产生柔

性肽方面是有用的。此类序列的产生对于本领域的技术人员来说是常规的。各种不同的接头是可商购获得的并且被认为是适合使用的。在一些实施例中,接头包括一个或多个选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0171] 核酸

[0172] 在一些实施例中,如上所述,本公开包括编码本公开的一种或多种IL-12变体多肽的一个或多个核酸分子。在一些实施例中,本公开包括编码如上所述的一种或多种IL-12变体多肽的至少两个核酸分子。

[0173] 在一些实施例中,如上所述,本公开包括编码本公开的所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40的一个或多个核酸分子。在一些实施例中,如上所述,本公开包括编码本公开的所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p35的一个或多个核酸分子。

[0174] 在一些实施例中,如上所述,本公开包括编码本公开的所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40和IL-12p35的一个或多个核酸分子。在一些实施例中,如上所述,本公开包括编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40和IL-12p35的至少两个核酸分子。

[0175] 在一个实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40,其中IL-12p40包括具有或不具有信号肽的WT IL-12p40的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40,其中IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40,其中相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40,其中相对于SEQ ID NO:1,IL-12p40包括至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40,其中相对于SEQ ID NO:1,IL-12p40包括至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。在一个实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40,其中IL-12p40包括选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,具有或不具有信号肽。在一个实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽的IL-12p40,其中IL-12p40包括选自自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0176] 在一些实施例中,核酸分子编码包括具有以下性质的氨基酸序列的一种或多种IL-12变体多肽或其片段:与WT IL-12具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性。在一些实施例中,核酸分子编码包括具有以下性质的氨基酸序列的一种或多种IL-12变体多肽或其片段:(i)与WT IL-12具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于WT IL-12包含至少一个、至

少两个或至少三个突变。

[0177] 在一些实施例中,核酸分子编码包括所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的与WT IL-12p35具有100%序列同一性的氨基酸序列的IL-12p35。在一些实施例中,核酸分子编码包括所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的具有以下性质的氨基酸序列的IL-12p35: (i) 与WT IL-12p35具有100%序列同一性;并且(ii) 相对于WT IL-12p35不包含突变。

[0178] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,其中IL-12p40包括与WT IL-12p40具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,其中IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列: (i) 与WT IL-12p40具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii) 相对于WT IL-12p40包含至少一个、至少两个或至少三个突变。

[0179] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i) IL-12p40,其包括与WT IL-12p40具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性并且相对于WT IL-12p40包含至少一个、至少两个或至少三个突变的氨基酸序列;以及(ii) IL-12p35,其包括与WT IL-12p35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0180] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列的IL-12p35。在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的包括具有以下性质的氨基酸序列的IL-12p35: (i) 与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性;并且(ii) 相对于SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35不包含突变。

[0181] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,所述IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列: (i) 与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii) 相对于SEQ ID NO:1包含至少一个、至少两个或至少三个突变。

[0182] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在一些

实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,所述IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:34包含至少一个、至少两个或至少三个突变。

[0183] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i)IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个、至少两个或至少三个突变的氨基酸序列;以及(ii)IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0184] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i)IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性并且相对于SEQ ID NO:34包含至少一个、至少两个或至少三个突变的氨基酸序列;以及(ii)IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0185] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,所述IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。

[0186] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,所述IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。

[0187] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i)IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(ii)IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0188] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i)IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对

于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0189] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,所述IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0190] 在一些实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40包括具有以下性质的氨基酸序列:(i)与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性;并且(ii)相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0191] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i) IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:1具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0192] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i) IL-12p40,其包括与SEQ ID NO:34具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列并且相对于SEQ ID NO:1包含至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0193] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,其包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,具有或不具有信号肽。

[0194] 在一些实施例中,核酸分子编码所述一种或多种IL-12变体多肽或其片段的IL-12p40,其包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0195] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i) IL-12p40,其包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,具有或不具有信号肽;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0196] 在一些实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽或其片段,其包括(i) IL-12p40,其包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA (SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被选自由以下组成的组的一种或多种不同的信号肽替换:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;以及(ii) IL-12p35,其包括与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:35具有100%序列同一性的氨基酸序列。

[0197] 在一个实施例中,核酸分子编码与增强融合蛋白的稳定性或半衰期的肽融合的如本文所述的IL-12变体多肽。在一个实施例中,核酸分子编码包括免疫球蛋白或其变体或片段的至少一个区域的融合肽。在一个实施例中,核酸分子编码包括免疫球蛋白的Fc结构域的肽。在一个实施例中,核酸分子编码包括人IgG1的Fc结构域的融合肽。在一个实施例中,核酸分子编码包括免疫球蛋白的Fc结构域的融合肽,所述免疫球蛋白包括一个或多个突变以通过Fc受体或补体去除Fc效应子功能。在一个实施例中,核酸分子编码包括人IgG1的Fc结构域的融合肽,相对于野生型人IgG1,所述人IgG1包括残基N297处的突变,使得所述Fc结构域去糖基化。

[0198] 在一些实施例中,核酸分子编码与异源二聚体Fc融合的如本文所述的IL-12变体多肽,由此延长IL-12变体多肽的半衰期。

[0199] 在一个实施例中,核酸分子编码包括二价同源二聚体Fc的一种或多种IL-12变体多肽。在一个实施例中,核酸分子编码包括至少两个IgG Fc结构域的二价同源二聚体Fc。在一个实施例中,核酸分子编码IgG,其中IgG是人IgG。在一个实施例中,核酸分子编码人IgG,其中人IgG是人IgG1。在一个实施例中,核酸分子编码包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列的人IgG1 Fc结构域。

[0200] 在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、

K217A和K219A。

[0201] 在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0202] 在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc,其中IL-12p40通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc,其中IL-12p35通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0203] 在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0204] 在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二价同源二聚体Fc,其包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40;以及(ii)二价同源二聚体Fc的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二价同源二聚体Fc,其包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p35;以及(ii)二价同源二聚体Fc的IL-12p40。

[0205] 在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二价同源二聚体Fc,其包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列;以及(ii)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二价同源二聚体Fc,其包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变;以及(ii)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二价同源二聚体Fc,其包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(ii)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括二价同源二聚体

Fc,其包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(ii)包括选自以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35。

[0206] 在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括(i)通过接头与IgG Fc结构域融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列;以及(ii)二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括一个或多个选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0207] 在一个实施例中,核酸分子编码二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括一个或多个选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0208] 本领域的技术人员将认识到,通过接头与IgG Fc融合的IL-12p40或IL-12p35和对应亚基(分别为IL-12p35或IL-12p40)的共表达将产生二聚体IL-12(即,包括由二价IgG Fc结构域稳定的异源二聚体的同源二聚体的四聚体结构;参见实例1和图5A)。

[0209] 在一个实施例中,核酸分子编码IgG Fc“杵”或IgG Fc“臼”。在一个实施例中,IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”是IgG Fc的变体。在一个实施例中,核酸分子编码IgG Fc,其中IgG Fc包括人IgG Fc。在一个实施例中,核酸分子编码人IgG Fc,其中人IgG Fc包括人IgG1 Fc。在一个实施例中,核酸分子编码包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,核酸分子编码包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0210] 在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0211] 在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括一个或多个选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0212] 在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括一个或多个选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列

MCHQQLVISWFLVFLASPLVA (SEQ ID NO:31) 的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0213] 在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0214] 在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40通过接头与IgG Fc“杵”融合。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40通过接头与IgG Fc“臼”融合。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35通过接头与IgG Fc“杵”融合。在一个实施例中,核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35通过接头与IgG Fc“臼”融合。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0215] 在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0216] 在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0217] 在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0218] 在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0219] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性

异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40。

[0220] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

[0221] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列但具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码双特异性异源二聚体Fc,所述双特异性异源二聚体Fc包括(i)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列但具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0222] 本领域的技术人员将认识到,IL-12p40“杵”或IL-12p35“臼”与对应亚基(分别为IL-12p40“臼”或IL-12p35“杵”)的共表达将产生经修饰的二聚体IL-12,所述经修饰的二聚体IL-12通过“臼”与“杵”IgG Fc结构域之间的相互作用稳定(参见实例1、图4A和图5B)。

[0223] 在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc。在一个实施例中,核酸分

子编码包括至少两个IgG Fc结构域的单链二价同源二聚体Fc。在一个实施例中,IgG是人IgG。在一个实施例中,人IgG是人IgG1。在一个实施例中,核酸分子编码包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列的人IgG1 Fc结构域。

[0224] 在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括WT IL-12的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,所述IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0225] 在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0226] 在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0227] 在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括WT IL-12的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括纯化标签。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0228] 在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35,所述IL-12p35通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40,所述IL-12p40通过接头与单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35融合。

[0229] 在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc,其中(i)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35融合,并且(ii)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,核酸分子编码单链二价同源二聚体Fc,其中(i)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与单链二价同源二聚体Fc的IL-12p35融合,并且(ii)单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40通过接头与IgG Fc结构域融合。在一个实施例中,接头包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0230] 在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中具有一个或多个突变。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码一种或多种IL-12变体多肽,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链二价同源二聚体Fc,其包括SEQ ID NO:23的氨基酸序列,但在单链二价同源二聚体Fc的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0231] 本领域的技术人员将认识到,单链二价同源二聚体Fc的任一构型的表达将产生二聚体IL-12(即,由二价IgG Fc结构域稳定的融合二聚体的二聚体;参见实例1和图5B)。

[0232] 在一个实施例中,本公开提供了编码一种或多种IL-12变体多肽的一个或多个核酸分子,所述一种或多种IL-12变体多肽包括单链单体IL-12和双特异性异源二聚体Fc。

[0233] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”。在一个实施例中,IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”是IgG Fc的变体。在一个实施例中,IgG Fc包括人IgG Fc。在一个实施例中,人IgG Fc包括人IgG1 Fc。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与信号肽融合的IgG Fc“臼”。在一个实施例中,核酸分子编码通过接头与信号肽融合的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0234] 在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的包括WT IL-12的IL-12p40的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0235] 在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0236] 在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0237] 在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的包括WT IL-12的IL-12p35的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的包括纯化标签的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12的包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列的IL-12p35。

[0238] 在一个实施例中,核酸分子编码包括通过接头与IL-12p35融合的IL-12p40的单链单体IL-12。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12,其包括(i)通过接头与IL-12p35融合的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12,其包括(i)通过接头与IL-12p40融合的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12,其包括(i)通过接头与IL-12p35融合的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12,其包括(i)通过接头与IL-12p40融合的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40。在一个实施例中,接头包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0239] 在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12,其包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29。在一个实施例中,核酸分子编码一个或多个单链单体IL-12,其包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29,但在单链单体IL-12的IL-12p40部分具有一个或多个突变。在一个实施例中,核酸分子编码一个或多个单链单体IL-12,其包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29,但在单链单体IL-12的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码一个或多个单链单体IL-12,其包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29,但在单链单体IL-12的IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0240] 在一个实施例中,核酸分子编码单链单体IL-12,其包括与选自由以下组成的组的至少一个具有85%或更高、86%或更高、87%或更高、88%或更高、89%或更高、90%或更高、91%或更高、92%或更高、93%或更高、94%或更高、95%或更高、96%或更高、97%或更高、98%或更高、或99%或更高的序列同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29。

[0241] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括SEQ ID NO:26的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0242] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0243] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括SEQ ID NO:28的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0244] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列的单链单体IL-12;以及(ii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0245] 本领域的技术人员将认识到,IgG Fc“杵”或“臼”与分别与对应的IgG Fc“臼”或“杵”融合的单链IL-12的共表达将产生由异源二聚体Fc稳定的单体IL-12(参见实例1和图5C)。

[0246] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码二聚体IL-12和双特异性异源二聚体Fc。

[0247] 在一个实施例中,双特异性异源二聚体Fc包括IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”。在一个实施例中,IgG Fc“杵”和IgG Fc“臼”是IgG Fc的变体。在一个实施例中,IgG Fc包括人IgG Fc。在一个实施例中,人IgG Fc包括人IgG1 Fc。在一个实施例中,IgG Fc“臼”通过接头与信号肽融合。在一个实施例中,IgG Fc“杵”通过接头与信号肽融合。在一个实施例中,接头包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0248] 在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的包括WT IL-12的IL-12p40的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的氨基酸序列。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:34的WT IL-12p40,所述IL-12p40包括至少一个、至少两个或至少三个突变。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的IL-12p40,相对于SEQ ID NO:1,所述IL-12p40包括至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A。

[0249] 在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34。

[0250] 在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的包括一个或多个选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA(SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被一种或多种不同的信号肽替换。在一个实施例中,所述一种或多种不同的信号肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33。

[0251] 在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的包括WT IL-12的IL-12p35的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的包括纯化标签的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12的包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:35的氨基酸序列的IL-12p35。

[0252] 在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12,其包括(i)二聚体IL-12的IL-

12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12,其包括(i)二聚体IL-12的IL-12p40;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12,其包括(i)二聚体IL-12的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40。在一个实施例中,核酸分子编码二聚体IL-12,其包括(i)二聚体IL-12的IL-12p35;以及(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40。

[0253] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)二聚体IL-12的IL-12p40;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35;以及(iii)IgG Fc“臼”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)二聚体IL-12的IL-12p35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40;以及(iii)IgG Fc“臼”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)二聚体IL-12的IL-12p40;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35;以及(iii)IgG Fc“杵”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)二聚体IL-12的IL-12p35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40;以及(iii)IgG Fc“杵”。

[0254] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0255] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA (SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被选自由以下组成的组的一种或多种不同的信号肽替换:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0256] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有一个或多个突变;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“杵”融

合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(iii)包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列的IgG Fc“臼”。

[0257] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:34;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0258] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的一个或多个的氨基酸序列的IL-12p40:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9,其中包括序列MCHQQLVISWFLVFLASPLVA (SEQ ID NO:31)的氨基酸残基1-22被选自由以下组成的组的一种或多种不同的信号肽替换:SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p35,所述IL-12p35包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0259] 在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中具有至少一个突变;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216X、K217X和K219X;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。在一个实施例中,所述一个或多个核酸分子编码(i)包括选自由以下组成的组的氨基酸序列的IL-12p35:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:35;(ii)通过接头与IgG Fc“臼”融合的IL-12p40,所述IL-12p40包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,但在IL-12p40部分中相对于SEQ ID NO:1具有至少一个选自由以下组成的组的突变:H216A、K217A和K219A;以及(iii)包括SEQ ID NO:24的氨基酸序列的IgG Fc“杵”。

[0260] 本领域的技术人员将认识到,IL-12p40或IL-12p35与(i)与IgG Fc“臼”或“杵”融合的对亚基以及(ii)对应的IgG Fc“杵”或“臼”的共表达将产生由异源二聚体IgG Fc稳定的二聚体IL-12(参见实例1和图5D)。

[0261] 可以使用本领域中已知的许多重组方法中的任何重组方法来获得编码本公开的多肽的核酸分子,例如通过从表达基因的细胞中筛选文库,通过从已知包含所述基因的载体中衍生基因或通过标准技术直接从含有所述基因的细胞和组织中分离。可替代地,所关注基因可以合成产生,而不是克隆。

[0262] 核酸分子可以包括任何类型的核酸,包含但不限于DNA和RNA。例如,在一个实施例中,组合物包括编码本公开的多肽的经分离的DNA分子,包含例如经分离的cDNA分子。在一个实施例中,组合物包括编码本公开的多肽的经分离的RNA分子或其功能片段。

[0263] 可以修饰本公开的核酸分子以改善血清或细胞培养物的生长培养基中的稳定性。可以添加修饰以增强本公开的核酸分子的稳定性、功能性和/或特异性并且使其免疫刺激性最小化。例如,为了增强稳定性,可以稳定3'-残基以防降解,例如,可以选择所述残基使其由嘌呤核苷酸,特别是腺苷或鸟苷核苷酸组成。可替代地,用经修饰的类似物取代嘧啶核苷酸,例如用2'-脱氧胸苷取代尿苷是耐受的并且不影响分子的功能。

[0264] 在本公开的一个实施例中,核酸分子可以含有至少一种经修饰的核苷酸类似物。例如,末端可以通过掺入经修饰的核苷酸类似物来稳定。

[0265] 核苷酸类似物的非限制性实例包含糖修饰和/或主链修饰的核糖核苷酸(即,包含对磷酸-糖主链的修饰)。例如,可以修饰天然RNA的磷酸二酯键以包含氮或硫杂原子中的至少一种。在示例性主链修饰的核糖核苷酸中,与邻近核糖核苷酸连接的磷酸酯基团被经修饰的基团(例如,硫代磷酸酯基团)取代。在示例性糖修饰的核糖核苷酸中,2'-OH-基团被选自以下的基团替换:H、OR、R、卤代、SH、SR、NH<sub>2</sub>、NHR、NR<sub>2</sub>或ON,其中R是C1-C6烷基、烯基或炔基,并且卤代是F、Cl、Br或I。

[0266] 修饰的其它实例是核碱基修饰的核糖核苷酸,即含有至少一个非天然存在的核碱基而不是天然存在的核碱基的核糖核苷酸。可以修饰碱基以阻断腺苷脱氨酶的活性。示例性经修饰的核碱基包含但不限于在5位处修饰的尿苷和/或胞苷,例如5-(2-氨基)丙基尿苷、5-溴尿苷;在8位处修饰的腺苷和/或鸟苷,例如8-溴鸟苷;脱氮核苷酸,例如7-脱氮-腺苷;O-和N-烷基化核苷酸,例如N6-甲基腺苷是合适的。应当注意,可以组合上述修饰。

[0267] 在一些情况下,核酸分子包括以下化学修饰中的至少一种:一个或多个核苷酸的2'-H、2'-O-甲基或2'-OH修饰。在某些实施例中,本公开的核酸分子可以具有增强的核酸酶抗性。为了增加核酸酶抗性,核酸分子可以包含例如2'-修饰的核糖单位和/或硫代磷酸酯键。例如,2'-羟基(OH)可以被许多不同的“氧”或“脱氧”取代基修饰或替换。为了增加核酸酶抗性,本公开的核酸分子可以包含2'-O-甲基、2'-氟、2'-O-甲氧基乙基、2'-O-氨基丙基、2'-氨基和/或硫代磷酸酯键。包含锁核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)(例如,2'-4'-乙烯桥接的核酸)和某些核碱基修饰(如2-氨基-A、2-硫代(例如,2-硫代-U)、G-钳修饰)也可以增加对靶标的结合亲和力。

[0268] 在一个实施例中,核酸分子包含2'-修饰的核苷酸,例如2'-脱氧、2'-脱氧-2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-氨基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基氨基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基氨基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基氨基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)或2'-O-N-甲基乙酰氨基(2'-O-NMA)。在一个实施例中,核酸分子包含至少一个2'-O-甲基修饰的核苷酸,并且在一些实施例中,核酸分子的所有核苷酸包含2'-O-甲基修饰。

[0269] 在某些实施例中,本公开的核酸分子具有以下性质中的一种或多种性质:

[0270] 本文讨论的核酸药剂包含在其它方面未经修饰的RNA和DNA以及已经被修饰(例如,以改善功效)的RNA和DNA以及核苷替代物的聚合物。未经修饰的RNA是指核酸的组分(即,糖、碱基和磷酸酯部分)与在自然界中存在的或在人体中天然存在的组分相同或基本上相同的分子。本领域将罕见或不寻常但天然存在的RNA称为经修饰的RNA,参见例如

Limbach等人(《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,1994,22:2183-2196)。此类罕见或不寻常的RNA(通常被称为经修饰的RNA)通常是转录后修饰的结果并且在如本文所使用的术语未经修饰的RNA内。如本文所使用的,经修饰的RNA是指核酸的组分(即,糖、碱基和磷酸酯部分)中的一种或多种组分不同于在自然界中存在的组分或不同于在人体中存在的组分的分子。虽然其被称为“经修饰的RNA”,但是由于修饰,其当然将包含严格来说不是RNA的分子。核苷替代物是核糖磷酸酯主链被非核糖磷酸酯构建体替换的分子,所述非核糖磷酸酯构建体允许碱基以正确的空间关系呈现,使得杂交基本上类似于用核糖磷酸酯主链所见的杂交,例如,核糖磷酸酯主链的非带电模拟物。

[0271] 本公开的核酸的修饰可以存在于以下中的一种或多种处:磷酸基团、糖基团、主链、N-末端、C-末端或核碱基。

[0272] 本公开还包含本公开的核酸分子被插入在其中的载体。本领域充满了可用于本公开的合适的载体。

[0273] 简言之,编码本公开的融合蛋白的天然或合成核酸的表达通常是通过将编码本公开的融合蛋白的核酸或其部分与启动子可操作地连接,并且将构建体掺入到表达载体中来实现的。要使用的载体适用于在真核细胞中复制和任选地整合。典型的载体含有可用于调节期望的核酸序列的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。

[0274] 使用标准基因递送方案,本公开的载体还可以用于核酸免疫和基因疗法。用于基因递送的方法在本领域中是已知的。参见例如,美国专利第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号,所述美国专利通过引用整体并入本文。在另一个实施例中,本公开提供了一种基因疗法载体。

[0275] 可以将本公开的经分离的核酸克隆到多种类型的载体中。例如,可以将核酸克隆到载体中,所述载体包含但不限于质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。特别关注的载体包含表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体。

[0276] 另外,载体可以以病毒载体的形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是熟知的,并且例如在Sambrook等人(2012,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)》,纽约冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory, New York))以及其它病毒学和分子生物学手册中描述。可用作载体的病毒包含但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、疱疹病毒和慢病毒。通常,合适的载体含有在至少一种生物体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和一种或多种可选择标志物(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;以及美国专利第6,326,193号)。

[0277] 方法

[0278] 在各个实施例中,如上所述,本公开涉及向受试者施用本公开的一种或多种IL-12变体多肽或编码本公开的一种或多种IL-12变体多肽的一种或多种核酸分子的方法。在一些实施例中,如上所述,本公开涉及治疗或预防受试者的一种或多种疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用本公开的一种或多种IL-12变体多肽或编码本公开的一种或多种IL-12变体多肽的一种或多种核酸分子。

[0279] 施用方法

[0280] 在一个实施例中,如上所述,本公开包括向受试者施用本公开的一种或多种组合物的方法。在一个实施例中,组合物包括一种或多种IL-12变体多肽,其中所述一种或多种

IL-12变体多肽与IL-12受体 $\beta 2$  (IL-12R $\beta 2$ ) 特异性结合,并且其中所述一种或多种IL-12变体多肽表现出与IL-12受体 $\beta 1$  (IL-12R $\beta 1$ ) 的结合显著减少。在一个实施例中,组合物包括编码一种或多种IL-12变体多肽的一个或多个核酸分子,其中所述一种或多种IL-12变体多肽与IL-12受体 $\beta 2$  (IL-12R $\beta 2$ ) 特异性结合,并且其中所述一种或多种IL-12变体多肽表现出与IL-12受体 $\beta 1$  (IL-12R $\beta 1$ ) 的结合显著减少。

[0281] 在一些实施例中,受试者患有可以通过降低通过IL-12受体激动作用的最大水平来治疗的疾病或病症。在一些实施例中,受试者具有罹患疾病或病症的风险,所述疾病或病症可以通过降低通过IL-12受体激动作用的最大水平来预防。在一些实施例中,疾病或病症是癌症。本文其它地方公开了可以受益于本公开的一种或多种组合物的施用的癌症类型的非限制性实例。

[0282] 本公开涵盖供使用的药物组合物的制备和用途,所述药物组合物包括本文公开的本公开的组合物作为活性成分。此类药物组合物可以由呈适于施用于受试者的形式的单独活性成分组成,或者药物组合物可以包括活性成分和一种或多种药学上可接受的载剂、一种或多种另外的成分或这些的某种组合。活性成分可以以生理学上可接受的酯或盐的形式,如与生理学上可接受的阳离子或阴离子的组合,存在于药物组合物中,如本领域中熟知的。在各个实施例中,活性成分是本公开其它地方所述的一个或多个核酸分子、一种或多种多肽或其组合。本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的载剂和任何另外的成分的相对量将根据所治疗的受试者的同一性、大小和状况并且进一步根据组合物所施用的途径而变化。举例来说,组合物可以包括介于0.1%与100% (w/w) 之间的活性成分。

[0283] 在一些实施例中,药物组合物可以包含大的代谢缓慢的大分子(如蛋白质)、多糖(如壳聚糖)、聚乳酸、聚乙醇酸和共聚物(如乳胶官能化Sephacrose™、琼脂糖、纤维素等)、聚合物氨基酸、氨基酸共聚物以及脂质聚集体(如油滴或脂质体)。

[0284] 可用于实践本公开的药物组合物可以被施用以递送介于约0.1ng/kg/天与100mg/kg/天之间或更大的剂量。

[0285] 在各个实施例中,可用于本公开的方法的药物组合物可以举例来说全身施用、肠胃外施用或局部施用,如以口服调配物、吸入调配物(包含固体或气溶胶)以及通过局部或其它类似调配物的形式施用。除了适当的治疗组合物之外,此类药物组合物可以含有药学上可接受的载剂以及已知增强和促进药物施用的其它成分。根据本公开的方法,还可以使用其它可能的调配物(如纳米颗粒、脂质体、含有活性成分的其它制剂和基于免疫学的系统)来施用其适当的调节剂。

[0286] 载剂可以以多种方式携带主题药剂(例如,一种或多种IL-12变体多肽),包含直接或通过接头基团形成共价键以及非共价缔合。合适的共价键载体包含蛋白质(如白蛋白)、肽和多糖(如氨基葡聚糖),其各自具有用于连接部分的多个位点。载剂也可以通过非共价缔合(如非共价键合)或通过包封来携带一种或多种IL-12变体多肽。为了本公开的目的,载剂的性质可以是可溶的或不可溶的。

[0287] 可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包含缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包含抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;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,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;以及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,如钠;金属络合物(例如,Zn蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。用于体内施用的调配物必须是无菌的。这通过无菌过滤膜过滤容易地实现。

[0288] 活性成分还可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,所述微胶囊例如分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊以及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。此类技术公开于《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第16版,Osol, A. 编辑(1980)中。

[0289] 组合物可以被制备为液体溶液或悬浮液形式的可注射物;还可以制备适于在注射前溶解或悬浮于液体媒剂中的固体形式。制剂还可以被乳化或包封在脂质体或微粒(如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物)中以增强佐剂效应,如以上所讨论的。Langer,《科学》249:1527,1990以及Hanes,《高级药物递送综述(Advanced Drug Delivery Reviews)》28:97-119,1997。本公开的药剂可以以贮库型注射剂或植入物制剂的形式施用,其可以以允许活性成分持续或脉冲释放的方式调配。药物组合物通常被调配为无菌的、基本上等渗的并且完全符合美国食品和药物管理局(U.S.Food and Drug Administration)的所有良好生产规范(GMP)规定。

[0290] 如本文所使用的,术语“生理学上可接受的”酯或盐是指活性成分的酯或盐形式,所述活性成分与药物组合物的任何其它成分相容,对于施用组合物的受试者是无害的。

[0291] 本文所述的药物组合物的调配物可以通过药理学领域中已知的或今后开发的任何方法来制备。通常,此类制备方法包含以下步骤:使活性成分与载剂或一种或多种其它辅助成分缔合,并且然后如果需要或期望,则将产物成形或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0292] 即使本文提供的药物组合物的描述主要涉及适于处方施用于人的药物组合物,但是本领域的技术人员将理解,此类组合物通常适于施用于各种种类的动物。为了使组合物适于施用于各种动物而对适于施用于人的药物组合物进行修饰是容易理解的,并且普通的技术性兽医药理学家可以利用仅普通的(如果有的话)实验来设计并执行此修饰。

[0293] 可用于本公开的方法的药物组合物可以以适于口服、直肠、阴道、肠胃外、局部、肺部、鼻内、口腔、静脉内、经皮、病灶内、皮下、肌内、眼部、鞘内和其它已知施用途径的调配物的形式制备、包装或销售。其它考虑的调配物包含投射的纳米颗粒、脂质体制剂、含有活性成分的其它制剂以及基于免疫学的调配物。

[0294] 本公开的药物组合物可以以单个单位剂量或多个单个单位剂量的形式大量制备、包装或销售。如本文所使用的,“单位剂量”是包括预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将施用于受试者的活性成分的剂量或此剂量的方便分数,例如如此剂量的一半或三分之一。

[0295] 本公开的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的载剂和任何另外的成分的相对量将根据所治疗的受试者的同一性、大小和状况并且进一步根据组合物所施用的途径而

变化。举例来说,组合物可以包括介于0.1%与100% (w/w) 之间的活性成分。

[0296] 除了活性成分之外,本公开的药物组合物可以进一步包括一种或多种另外的药物活性剂。

[0297] 可以使用常规技术制备本公开的药物组合物的控释或缓释调配物。

[0298] 适于口服施用的本公开的药物组合物的调配物可以以离散固体剂量单位的形式制备、包装或销售,所述离散固体剂量单位包含但不限于片剂、硬或软胶囊、扁囊剂、糖锭或锭剂,各自含有预定量的活性成分。适于口服施用的其它调配物包含但不限于粉末状或颗粒状调配物、水性或油性悬浮液、水性或油性溶液、或乳液。

[0299] 在药物组合物的制造中使用的药学上可接受的赋形剂包含但不限于惰性稀释剂、成粒剂和崩解剂、粘合剂和润滑剂。已知的分散剂包含但不限于马铃薯淀粉和淀粉乙醇酸钠。已知的表面活性剂包含但不限于十二烷基硫酸钠。已知的稀释剂包含但不限于碳酸钙、碳酸钠、乳糖、微晶纤维素、磷酸钙、磷酸氢钙和磷酸钠。已知的成粒剂和崩解剂包含但不限于玉米淀粉和海藻酸。已知的粘合剂包含但不限于明胶、阿拉伯胶、预胶凝化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮和羟丙基甲基纤维素。已知的润滑剂包含但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、二氧化硅和滑石。

[0300] 本公开的药物组合物的液体调配物可以以液体形式或以旨在用于在使用前用水或另一种合适的媒剂来重构的干燥产物的形式来制备、包装和销售。

[0301] 可以使用常规方法制备液体悬浮液,以实现活性成分在水性或油性媒剂中的悬浮。水性媒剂包含例如水和等渗盐水。油性媒剂包含例如杏仁油、油性酯、乙醇、植物油(如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)、分馏植物油和矿物油(如液体石蜡)。液体悬浮液可以进一步包括一种或多种另外的成分,包含但不限于悬浮剂、分散剂或润湿剂、乳化剂、缓和剂、防腐剂、缓冲液、盐、调味剂、着色剂和甜味剂。油性悬浮液可以进一步包括增稠剂。

[0302] 已知的悬浮剂包含但不限于山梨糖醇糖浆、氢化可食用脂肪、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶、阿拉伯树胶和纤维素衍生物,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素。已知的分散剂或润湿剂包含但不限于天然存在的磷脂(如卵磷脂)、烯化氧与脂肪酸的缩合产物、烯化氧与长链脂肪醇的缩合产物、烯化氧与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物或烯化氧与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如,分别为聚氧乙烯硬脂酸酯、十七亚乙基氧基鲸蜡醇、聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯和聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯)。已知的乳化剂包含但不限于卵磷脂和阿拉伯胶。已知的防腐剂包含但不限于对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸正丙酯、抗坏血酸和山梨酸。已知的甜味剂包含例如甘油、丙二醇、山梨糖醇、蔗糖和糖精。油性悬浮液的已知增稠剂包含例如蜂蜡、硬石蜡和鲸蜡醇。

[0303] 活性成分于水性或油性溶剂中的液体溶液可以以与液体悬浮液基本上相同的方式制备,主要区别在于活性成分溶解而不是悬浮在溶剂中。本公开的药物组合物的液体溶液可以包括关于液体悬浮液描述的组分中的每种组分,应当理解,悬浮剂不一定有助于活性成分溶解在溶剂中。水性溶剂包含例如水和等渗盐水。油性溶剂包含例如杏仁油、油性酯、乙醇、植物油(如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)、分馏植物油和矿物油(液体石蜡)。

[0304] 可以使用已知方法制备本公开的药物制剂的粉末状和颗粒状调配物。此类调配物可以直接施用于受试者,可以用于例如形成片剂、用于填充胶囊或用于通过向其添加水性

或油性媒剂来制备水性或油性悬浮液或溶液。这些调配物中的每种调配物可以进一步包括分散剂或润湿剂、悬浮剂和防腐剂中的一种或多种。这些调配物中还可以包含另外的赋形剂,如填充剂以及甜味剂、调味剂或着色剂。

[0305] 本公开的药物组合物也可以以水包油乳液或油包水乳液的形式制备、包装或销售。油相可以是植物油(如橄榄油或花生油)、矿物油(如液体石蜡)或这些的组合。此类组合物可以进一步包括一种或多种乳化剂,如天然存在的树胶(如阿拉伯树胶或黄蓍树胶)、天然存在的磷脂(如大豆或卵磷脂磷脂)、衍生自脂肪酸与己糖醇酐的酯或偏酯(如山梨糖醇酐单油酸酯)以及此类偏酯与环氧乙烷的缩合产物(如聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯)。这些乳液也可以含有另外的成分,包含例如甜味剂或调味剂。

[0306] 用于用化学组合物浸渍或涂覆材料的方法在本领域中是已知的,并且包含但不限于将化学组合物沉积表面上或将化学组合物与表面结合的方法、在材料的合成(即,如用生理上可降解的材料进行的合成)期间将化学组合物掺入到材料的结构中的方法以及将水性或油性溶液或悬浮液吸收到吸收性材料中,随后进行或不进行干燥的方法。

[0307] 如本文所使用的,药物组合物的“肠胃外施用”包含特征在于对受试者的组织进行物理破坏和通过组织的破坏进行药物组合物的施用的任何施用途径。肠胃外施用因此包含但不限于通过注射组合物、通过外科手术切口施涂组合物、通过穿透组织的非外科手术伤口施涂组合物等来施用药物组合物。具体地,考虑到肠胃外施用包含但不限于皮肤、皮下、腹膜内、静脉内、肌内、脑池内注射和肾透析输注技术。

[0308] 适于肠胃外施用的药物组合物的调配物包括与药学上可接受的载剂(如无菌水或无菌等渗盐水)组合的活性成分。此类调配物可以以适于团注施用或连续施用的形式制备、包装或销售。可注射调配物可以以单位剂型,如以安瓿或含有防腐剂的多剂量容器形式制备、包装或销售。用于肠胃外施用的调配物包含但不限于悬浮液、溶液、油性或水性媒剂中的乳液、糊剂以及可植入的缓释或生物可降解的调配物。此类调配物可以进一步包括一种或多种另外的成分,包含但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的调配物的一些实施例中,以干燥(即,粉末状或颗粒状)形式提供活性成分,以用于在肠胃外施用经重构的组合物之前,用合适的媒剂(例如,无菌无热原水)进行重构。

[0309] 药物组合物可以以无菌可注射水性或油性悬浮液或溶液的形式制备、包装或销售。这种悬浮液或溶液可以根据已知技术来调配,并且除了活性成分之外还可以包括另外的成分,如本文所述的分散剂、润湿剂或悬浮剂。此类无菌可注射调配物可以使用无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(如水或1,3-丁二醇)来制备。其它可接受的稀释剂和溶剂包含但不限于林格氏溶液(Ringer's solution)、等渗氯化钠溶液和固定油(如合成甘油单酯或甘油二酯)。可用的其它可肠胃外施用的调配物包含包括呈微晶形式、呈脂质体制剂形式或作为生物可降解的聚合物系统的组分的活性成分的调配物。用于缓释或植入的组合物可以包括药学上可接受的聚合物材料或疏水材料,如乳液、离子交换树脂、微溶聚合物或微溶盐。

[0310] 适于局部施用的调配物包含但不限于液体或半液体制剂,如搽剂、洗剂、水包油或油包水乳剂(如乳膏、软膏或糊剂),以及溶液或悬浮液。可局部施用的调配物可以例如包括约1%至约10%(w/w)的活性成分,但是活性成分的浓度可以高达活性成分在用于局部施用的溶剂调配物中的溶解度限度,所述可局部施用的调配物可以进一步包括本文所述的另外

的成分中的一种或多种另外的成分。

[0311] 本公开的药物组合物可以以适于通过口腔进行的肺部施用的调配物形式制备、包装或销售。此类调配物可以包括干燥颗粒,所述干燥颗粒包括活性成分并且直径在约0.5纳米至约7纳米或在某些实施例中在约1纳米至约6纳米的范围内。此类组合物方便地呈干粉形式,以用于使用包括干粉储器(推进剂流可以被引导到所述干粉储器以分散粉末)的装置或使用自推进溶剂/粉末分配容器(如包括溶解或悬浮在密封容器中的低沸点推进剂中的活性成分的装置)来施用。在某些实施例中,此类粉末包括颗粒,其中按重量计至少98%的颗粒的直径大于0.5纳米并且按数量计至少95%的颗粒的直径小于7纳米。在某些实施例中,按重量计至少95%的颗粒的直径大于1纳米并且按数量计至少90%的颗粒的直径小于6纳米。在某些实施例中,干粉组合物包含固体细粉稀释剂如糖,并且方便地以单位剂量形式提供。

[0312] 低沸点推进剂通常包含在大气压下沸点低于65°F的液体推进剂。通常,推进剂可以占组合物的50%至99.9% (w/w),并且活性成分可以占组合物的0.1%至20% (w/w)。推进剂可以进一步包括另外的成分,如液体非离子或固体阴离子表面活性剂或固体稀释剂(在一些情况下,具有与包括活性成分的颗粒相同数量级的粒径)。

[0313] 被调配成用于肺部递送的本公开的药物组合物还可以以溶液或悬浮液的液滴形式提供活性成分。此类调配物可以以任选地无菌的、包括活性成分的水性或稀释的醇溶液或悬浮液形式制备、包装或销售,并且可以使用任何雾化或喷雾装置方便地施用。此类调配物可以进一步包括一种或多种另外的成分,包含但不限于调味剂(如糖精钠)、挥发油、缓冲剂、表面活性剂或防腐剂(如羟基苯甲酸甲酯)。在某些实施例中,由这种施用途径提供的液滴的平均直径在约0.1微米至约200微米的范围内。本文所述的可用于肺部递送的调配物也可用于鼻内递送本公开的药物组合物。适于鼻内施用的另一种调配物是包括活性成分并且平均粒径为约0.2微米至500微米的粗粉末。

[0314] 此类调配物以吸用鼻烟的方式施用,即通过从保持靠近鼻孔的粉末容器通过鼻通道快速吸入。适于鼻施用的调配物可以例如包括约少至0.1% (w/w)且多至100% (w/w)的活性成分,并且可以进一步包括本文所述的另外的成分中的一种或多种另外的成分。

[0315] 本公开的药物组合物可以以适于口腔施用的调配物形式制备、包装或销售。此类调配物可以例如呈使用常规方法制备的片剂或锭剂的形式,并且可以例如含有0.1%至20% (w/w)的活性成分,余量包括口服可溶解或可降解的组合物以及任选地本文所述的另外的成分中的一种或多种另外的成分。交替地,适于口腔施用的调配物可以包括包含活性成分的粉末或气雾化或雾化溶液或悬浮液。在某些实施例中,此类粉末状、气雾化或气雾化调配物当分散时的平均粒径或液滴大小在约0.1微米至约200微米的范围内,并且可以进一步包括本文所述的另外的成分中的一种或多种另外的成分。

[0316] 本公开的药物组合物可以以适于眼部施用的调配物形式制备、包装或销售。此类调配物可以例如呈滴眼剂的形式,包含例如活性成分在水性或油性液体载剂中的0.1-1.0% (w/w)溶液或悬浮液。此类滴剂可以进一步包括缓冲剂、盐或本文所述的另外的成分中的一种或多种其它另外的成分。可用的其它眼科可施用调配物包含包括呈微晶形式或呈脂质体制剂形式的活性成分的调配物。

[0317] 如本文所使用的,“另外的成分”包含但不限于以下中的一种或多种:赋形剂;表面

活性剂;分散剂;惰性稀释剂;成粒剂和崩解剂;粘合剂;润滑剂;甜味剂;调味剂;着色剂;防腐剂;生理可降解组合物,如明胶;水性媒剂和溶剂;油性媒剂和溶剂;悬浮剂;分散剂或润湿剂;乳化剂;缓和剂;缓冲液;盐;增稠剂;填料;乳化剂;抗氧化剂;抗生素;抗真菌剂;稳定剂;以及药学上可接受的聚合物材料或疏水材料。可以包含在本公开的药物组合物中的其它“另外的成分”在本领域中是已知的并且描述于例如Genaro编辑,1985,《雷明顿氏药理学》,宾夕法尼亚州伊斯顿的马克出版公司(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.)中,所述文献通过引用并入本文。

[0318] 可以施用于动物(例如,人)的本公开的化合物的典型剂量在约0.001mg至约1000mg/千克动物体重的量的范围内。所施用的精确剂量将根据许多因素而变化,包括但不限于动物的类型以及所治疗的疾病或病症的类型、动物的年龄和施用途径。在一些实施例中,化合物的剂量将在约0.1mg至约10mg/千克动物体重之间变化。化合物可以以每天数次频繁地施用于动物,或者其可以不太频繁地施用,如一天一次、一周一次、每两周一次、一月一次或甚至不太频繁地施用,如每几个月一次或甚至一年一次或更少。剂量的频率对于本领域的技术人员将是显而易见的,并且将取决于任何数量的因素,如但不限于所治疗的疾病或病症的类型和严重程度、动物的类型和年龄等。

#### [0319] 治疗/预防方法

[0320] 在一个实施例中,如上所述,本公开包括治疗或预防有需要的受试者的一种或多种疾病或病症的方法,所述方法包括施用本公开的一种或多种组合物。在一个实施例中,如上所述,所述方法包括向受试者施用包括一种或多种IL-12变体多肽的组合物,其中所述一种或多种IL-12变体多肽与IL-12受体 $\beta 2$ (IL-12R $\beta 2$ )特异性结合,并且其中所述一种或多种IL-12变体多肽表现出与IL-12受体 $\beta 1$ (IL-12R $\beta 1$ )的结合显著减少。在一个实施例中,如上所述,所述方法包括向受试者施用包括编码一种或多种IL-12变体多肽的一个或多个核酸分子的组合物,其中所述一种或多种IL-12变体多肽与IL-12受体 $\beta 2$ (IL-12R $\beta 2$ )特异性结合,并且其中所述一种或多种IL-12变体多肽表现出与IL-12受体 $\beta 1$ (IL-12R $\beta 1$ )的结合显著减少。

[0321] 在一些实施例中,将如上所述的本公开的组合物施用于细胞、组织、器官、系统或受试者以治疗或预防疾病或病症。基于本文提供的公开内容,本领域的技术人员将理解,本公开可用于正在或将要整体地(例如,全身地)或部分地(例如,局部地、细胞、组织、器官)治疗最大IL-12信号传导活性的降低将有益的疾病或病症的受试者。基于本文提供的教导,技术人员将理解,可通过本文所述的组合物和方法治疗的疾病和病症涵盖最大IL-12信号传导活性的降低将促进积极的生物学、生理学、临床或治疗结果的任何疾病或病症。本领域的技术人员还将理解,施用可以是急性的(例如,在短时间段内,如一天、一周或一月)或慢性的(例如,在长时间段内,如数月或一年或更长时间)。

[0322] 本领域的技术人员将理解,当掌握了包含本文详述的方法的本公开时,一旦确立疾病或病症,本公开就不限于对所述疾病或病症的治疗。特别地,疾病或病症的症状不必表现到对受试者有害的程度;实际上,在施用治疗之前,不需要在受试者中检测疾病或病症。也就是说,在本公开可以提供益处之前,来自疾病或病症的显著病理学不必发生。因此,如本文更全面描述的,本公开包含用于预防受试者的疾病和病症的方法,其中一种或多种IL-12变体多肽(其中所述一种或多种IL-12变体多肽与IL-12R $\beta 2$ 特异性结合,但表现出与IL-

12Rβ1的结合显著减少)可以在疾病或病症发作之前施用于受试者,如本文其它地方讨论的,由此预防疾病或病症的发展。

[0323] 在一个实施例中,所述一种或多种疾病或病症包括癌症。本领域的技术人员将认识到,可以将本公开的组合物施用于患有癌症的受试者以治疗癌症或施用于有发展为癌症的风险的受试者以预防癌症。可以通过本公开的方法和组合物治疗或预防的癌症类型的非限制性实例包含实体瘤癌症、液体癌症、血液癌症、畸胎瘤、肉瘤和癌。以下内容是可以通过本公开的方法和组合物治疗或预防的癌症的非限制性实例:急性淋巴母细胞性白血病、急性髓系白血病、肾上腺皮质癌、阑尾癌、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑和脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤、乳腺癌、支气管肿瘤、伯基特淋巴瘤、类癌肿瘤、中枢神经系统非典型畸胎样/横纹样肿瘤、中枢神经系统胚胎性肿瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、宫颈癌、儿童视觉通路肿瘤、脊索瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓增生性病症、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、皮肤癌、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、室管膜母细胞瘤、室管膜瘤、食管癌、尤文氏家族肿瘤(ewing family of tumors)、颅外癌、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、肝外癌、眼癌、真菌病、胆囊癌、胃(gastric/stomach)癌、胃肠道癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道基质瘤(gist)、生殖细胞肿瘤、妊娠癌、妊娠滋养层肿瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞(肝)癌、组织细胞增多症、霍奇金淋巴瘤(hodgkin lymphoma)、下咽喉癌、下丘脑和视觉通路神经胶质瘤、下丘脑肿瘤、眼内(眼)癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤、肾(肾细胞)癌、朗格汉斯细胞癌(langerhans cell cancer)、朗格汉斯细胞组织细胞增多症(langerhans cell histiocytosis)、喉癌、白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、巨球蛋白血症、骨和骨肉瘤的恶性纤维组织细胞瘤、髓母细胞瘤、髓质上皮瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌(merkel cell carcinoma)、间皮瘤、具有隐原发性的转移性鳞状颈癌、口癌、多发性内分泌瘤形成综合征、多发性骨髓瘤、真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、骨髓性白血病、髓系白血病、骨髓瘤、骨髓增生性病症、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin lymphoma)、非小细胞肺癌、口腔癌(oral cancer)、口腔癌(oral cavity cancer)、口咽癌、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、骨肉瘤和恶性骨纤维组织细胞瘤、卵巢、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性潜在肿瘤、胰腺癌、乳头状瘤病、副神经节瘤、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、中间分化的松果体实质肿瘤、松果母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体肿瘤、浆细胞瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、肾盂和输尿管癌、涉及15号染色体上的nut基因的呼吸道癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、塞泽里综合征(sezary syndrome)、皮肤癌(黑色素瘤)、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状颈癌、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤和松果母细胞瘤、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、移行细胞癌、肾盂输尿管移行细胞癌、滋养层肿瘤、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤、外阴癌、瓦尔登斯特隆巨球蛋白血症(waldenstrom macroglobulinemia)和威尔姆斯肿瘤(Wilms Tumor)。

[0324] 在一些实施例中,本公开的方法可用于治疗或预防对免疫检查点抑制剂(ICI)具

有抗性的肿瘤或癌症。示例性免疫检查点抑制剂包含但不限于抗PD1 (例如, 纳武单抗 (nivolumab))、抗CTLA4 (例如, 伊匹单抗 (ipilimumab))、抗TIM3、抗TIGIT、抗LAG3、抗B7H3、抗B7H4、抗VISTA、抗ICOS、抗GITR、抗41BB、抗OX40和抗CD40。免疫检查点抑制剂的靶标的实例包含但不限于: PD-L1、PD1、CTLA4、TIM3、TIGIT、LAG3、B7H3、B7H4、VISTA、ICOS、GITR、41BB、OX40和CD40。因此, 免疫检查点抑制剂的实例包含抑制蛋白质的药剂, 所述蛋白质如: PD-L1、PD1、CTLA4、TIM3、TIGIT、LAG3、B7H3、B7H4、VISTA、ICOS、GITR、41BB、OX40或CD40。在一些情况下, 将一种或多种IL-12变体多肽与免疫检查点抑制剂 (例如, 抑制PD-L1、PD1、CTLA4、TIM3、TIGIT、LAG3、B7H3、B7H4、VISTA、ICOS、GITR、41BB、OX40或CD40或其任何组合的药剂) 共同施用。

[0325] 在一些实施例中, 所述方法包括将本公开的一种或多种组合物与一种或多种另外的药剂共同施用。在一些实施例中, 药剂同时存在于细胞或受试者的身体中, 或同时发挥其生物或治疗效果。在一些实施例中, 治疗剂呈相同的组合物或单位剂型。在其它实施例中, 治疗剂呈单独的组合物或单位剂型。在某些实施例中, 可以在施用第二治疗剂之前 (例如, 之前数分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周)、同时或之后 (例如, 之后5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周) 施用第一药剂。

[0326] 在一些实施例中, 所述一种或多种另外的药剂包括选自以下组成的组的一种或多种: 化合物、多肽、肽、肽模拟物、抗体、细胞因子、核酸分子、核酶、小分子化合物和反义核酸分子。在一些实施例中, 所述一种或多种另外的药剂包括一种或多种癌症治疗剂 (例如, 化疗剂) 或癌症免疫治疗剂 (例如, 癌症定向抗体)。相对于本公开的一种或多种药剂的施用, 此施用可以涉及药物/抗体的并发 (即, 同时)、先前或随后的施用。本领域的普通技术人员不难确定本公开的具体药物和组合物的适当的施用时间、顺序和剂量。

[0327] 在一些实施例中, 癌症治疗剂包括化疗剂。可以与本公开的组合物结合施用以治疗或预防癌症的示例性化疗剂包含但不限于阿地白介素 (aldesleukin)、六甲蜜胺 (altretamine)、氨磷汀 (amifostine)、天冬酰胺酶 (asparaginase)、博来霉素 (bleomycin)、卡培他滨 (capecitabine)、卡铂、卡莫司汀 (carmustine)、克拉屈滨 (cladribine)、西沙必利 (cisapride)、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪 (DTIC)、更生霉素 (dactinomycin)、多西他赛 (docetaxel)、多柔比星 (doxorubicin)、屈大麻酚 (dronabinol)、倍癌霉素 (duocarmycin)、依托泊苷 (etoposide)、非格司亭 (filgrastim)、氟达拉滨 (fludarabine)、氟尿嘧啶、吉西他滨 (gemcitabine)、格拉司琼 (granisetron)、羟基脲、伊达比星 (idarubicin)、异环磷酰胺、干扰素 $\alpha$ 、伊立替康 (irinotecan)、兰索拉唑 (lansoprazole)、左旋咪唑 (levamisole)、甲酰四氢叶酸 (leucovorin)、甲地孕酮 (megestrol)、美司钠 (mesna)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、甲氧氯普胺 (metoclopramide)、丝裂霉素 (mitomycin)、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、奥美拉唑 (mitoxantrone)、昂丹司琼 (ondansetron)、紫杉醇 (paclitaxel) (Taxol<sup>TM</sup>)、匹鲁卡品 (pilocarpine)、丙氯拉嗪 (prochloroperazine)、利妥昔单抗 (rituximab)、皂草素 (saporin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、紫杉酚 (taxol)、盐酸托泊替康 (topotecan hydrochloride)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、长春碱、长春新碱和酒石酸长春瑞滨

(vinorelbine tartrate)。

[0328] 在一些实施例中,癌症免疫治疗剂包括调理靶细胞的药剂。调理靶细胞的药剂(“调理剂”)是可以与靶细胞(例如,癌细胞)结合并调理靶细胞(例如,标记靶细胞的吞噬作用和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC))的任何药剂。例如,可以与靶细胞(例如,癌细胞,如肿瘤细胞)结合的任何抗体(其中抗体具有FC区)被认为是调理靶细胞的药剂。在一些情况下,调理靶细胞的药剂是与靶细胞结合的抗体(例如,抗肿瘤抗体、抗癌抗体等)。在一个实施例中,调理靶细胞的所述药剂是利妥昔单抗。利妥昔单抗是针对CD20抗原的嵌合未缀合的单克隆抗体。CD20在B细胞激活、增殖和分化中具有重要的功能作用。在一个实施例中,调理靶细胞的所述药剂是西妥昔单抗(Cetuximab)。西妥昔单抗与EGF受体(EGFR)结合,并且已经用于治疗实体瘤,包含结肠癌和头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)。

[0329] 在一些实施例中,癌症免疫治疗剂包括特异性抗体。对肿瘤细胞标志物、辐射、外科手术和/或激素剥夺具有选择性的示例性抗体,参见Kwon等人,《美国国家科学院院刊》,96:15074-9,1999。血管生成抑制剂也可以与本公开的方法组合。许多抗体目前在临床上用于治疗癌症,并且其它抗体处于临床开发的不同阶段。例如,存在用于治疗B细胞恶性肿瘤的许多抗原和对应单克隆抗体。CD52抗原被单克隆抗体阿仑单抗(alemtuzumab)靶向,所述单克隆抗体阿仑单抗被指示用于治疗慢性淋巴细胞性白血病。CD22被许多抗体靶向,并且最近已经证明在化疗耐药的毛细胞白血病中与毒素组合的功效。靶向CD20的两种新的单克隆抗体,托西莫单抗(tositumomab)和替伊莫单抗(ibritumomab),已经提交给食品和药物管理局(FDA)。这些抗体与放射性同位素缀合。阿仑单抗(坎帕斯(Campath))用于治疗慢性淋巴细胞性白血病;吉妥珠单抗(Gemtuzumab)(麦罗塔(Mylotarg))用于治疗急性骨髓性白血病;替伊莫单抗(泽娃灵(Zevalin))用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤;帕尼单抗(Panitumumab)(维克替比(Vectibix))可用于治疗结肠癌。

[0330] 可用于本公开的方法中的已经用于实体瘤中的单克隆抗体包含但不限于依地洛单抗(edrecolomab)和曲妥珠单抗(赫赛汀(herceptin))。依地洛单抗靶向结肠癌和直肠癌中看到的17-1A抗原,并且已经被批准在欧洲用于这些适应症。曲妥珠单抗靶向HER-2/neu抗原。

[0331] 在一个实施例中,癌症免疫治疗剂是选自由以下组成的组的一种或多种:西妥昔单抗(与EGFR结合)、帕尼单抗(与EGFR结合)、利妥昔单抗(与CD20结合)、曲妥珠单抗(与HER2结合)、帕妥珠单抗(pertuzumab)(与HER2结合)、阿仑单抗(与CD52结合)、本妥昔单抗(brentuximab)(与CD30结合)、托西莫单抗、替伊莫单抗、吉妥珠单抗、替伊莫单抗和依地洛单抗(与17-1A结合)以及其组合。

[0332] 在一个实施例中,癌症免疫治疗剂包括靶向选自由以下组成的组的一种或多种的抗原结合区:CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD44、CD45、CD47、CD51、CD52、CD56、CD62L、CD70、CD74、CD79、CD80、CD96、CD97、CD99、CD123、CD134、CD138、CD152(CTLA-4)、CD200、CD213A2、CD221、CD248、CD276(B7-H3)、B7-H4、CD279(PD-1)、CD274(PD-L1)、CD319、EGFR、EPCAM、17-1A、HER1、HER2、HER3、CD117、C-Met、HGFR、PDGFRA、AXL、TWEAKR、PTHR2、HAVCR2(TIM3)、GD2神经节苷脂、MUC1、粘蛋白CanAg、间皮素、内皮蛋白、Lewis-Y抗原、CEA、CEACAM1、CEACAM5、CA-125、PSMA、BAFF、FGFR2、TAG-72、明胶酶B、磷脂酰肌醇聚糖3、粘连蛋白-4、BCMA、CSF1R、SLAMF7、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 、TYRP1、GPNMB、CLDN18.2、FOLR1、CCR4、CXCR4、

MICA、C242抗原、DLL3、DLL4、EGFL7、波形蛋白、纤连蛋白额外结构域-B、TROP-2、LRRC15、FAP、SLITRK6、NOTCH2、NOTCH3、腱生蛋白-3、STEAP1和NRP1。

[0333] 在一个实施例中,癌症免疫治疗剂包括靶向选自自由以下组成的组的一种或多种的抗原结合区:CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD30、CD33、CD38、CD44、CD47、SIRPA、CD52、CD56、CD70、CD96、CD97、CD99、CD123、CD279 (PD-1)、CD274 (PD-L1)、EGFR、17-1A、HER2、CD117、C-Met、PTHR2和HAVCR2 (TIM3)。

[0334] 在一些实施例中,癌症免疫治疗剂包括免疫调节剂。在一些实施例中,免疫调节剂包含但不限于抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、TIGIT抗体、TIM3抗体、LAG3抗体、VISTA抗体、B7H3抗体、B7H4抗体、CD40激动剂、4-1BB调节剂(例如,41BB激动剂)、OX-40调节剂(例如,OX-40激动剂)、GITR调节剂(例如,GITR激动剂)、CD47结合剂(如抗CD47抗体)或高亲和力CD47结合剂、SIRPA结合剂(如抗SIRPA抗体)或高亲和力SIRPA结合剂等、TGF $\beta$ 拮抗剂(如抗TGF $\beta$ 抗体)、细胞因子或细胞因子变体(包含IL-1、IL-2、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、IL-33、干扰素 $\alpha$ 、干扰素 $\beta$ 、干扰素 $\gamma$ 、TNF、TRAIL、淋巴毒素、LIGHT/TNSF14或To11样受体的激动剂(包含TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、TLR9)、炎性体的激动剂、STING/cGAS途径的激动剂或RIG-I途径的激动剂、腺苷受体A2aR/A2bR的拮抗剂、芳烃受体的拮抗剂、IDO和/或TDO的拮抗剂或溶瘤病毒。

[0335] IL-12变体多肽可以与免疫检查点抑制剂和/或肿瘤调理抗体组合施用,或作为与免疫检查点抑制剂和/或肿瘤调理抗体的融合施用。主题多肽可以与细胞疗法(如嵌合抗原受体T细胞(CAR-T细胞)、TCR-T细胞、嵌合抗原受体NK细胞(CAR-NK细胞)和肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法组合施用。主题多肽也可以作为细胞疗法的一部分来施用,例如可以是由细胞分泌的蛋白质,所述细胞例如TRUCK细胞(“非抗原限制的细胞因子启动的T细胞杀伤”),其是用经工程化的T细胞受体转导的CAR-T细胞、CAR-NK细胞、TIL细胞或T或NK细胞等的版本。在其它实施例中,所述一种或多种IL-12变体多肽与溶瘤病毒共同施用。

[0336] 在一些实施例中,编码一种或多种IL-12变体多肽的一种或多种核酸包含在经工程化的(“改变的”)免疫细胞内,如用经工程化的T细胞受体转导的CAR-T或CAR-NK细胞或T或NK细胞。在这种情况下,经工程化的细胞(例如,改变的T细胞、改变的NK细胞)将分泌一种或多种IL-12变体多肽。分泌所述一种或多种IL-12变体肽的能力可以通过上下文方式调节(例如,在肿瘤微环境中开启),例如通过合成的NOTCH受体。

[0337] 在一些实施例中,编码一种或多种IL-12变体多肽的一种或多种核酸包含在溶瘤病毒内。在这种情况下,被溶瘤病毒感染的细胞将分泌一种或多种IL-12变体多肽。

[0338] 在一些实施例中,将编码一种或多种IL-12变体多肽的一种或多种核酸全身地或局部地(例如,瘤内)施用,调配成脂质纳米颗粒。在其它实施例中,将编码一种或多种IL-12变体多肽的一种或多种核酸瘤内电穿孔。在这些情况下,IL-12变体多肽由患者自身的细胞内源性产生。

[0339] 在一些实施例中,本公开的方法可用于治疗或预防已失去MHC I类表面表达的肿瘤或癌症肿瘤;如已失去B2m、MHC基因座或在抗原呈递和/或抗原负载复合物的其它成员(如tap相关蛋白)中具有突变的肿瘤。

[0340] 实验实例

[0341] 通过参考以下实验实例进一步详细描述本公开。提供这些实例仅仅是为了说明的

目的,并且不旨在进行限制,除非另外指明。因此,本公开决不应被解释为限于以下实例,而是应被解释为涵盖由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0342] 在不进行另外描述的情况下,据信本领域的普通技术人员可以使用前面的描述和以下说明性实例来制造和利用本公开并实践所要求保护的方法。因此,以下工作实例不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0343] 实例1:IL-12部分激动剂

[0344] 细胞因子部分激动剂能够选择性偏置具有差异激活阈值的细胞群体和信号传导通路的激活。通过使细胞因子突变以降低对其信号传导受体的亲和力来产生人IL-12的部分激动剂。相对于野生型分子,这些IL-12变体产生一系列次最大信号传导振幅。虽然不受科学理论的约束,但据信这些部分激动剂可以具有选择性激活期望的细胞群体的作用,所述细胞群体促进抗肿瘤免疫同时避免引起毒性的细胞群体。

[0345] 图1A和图1B描绘了预测IL-12Rβ1:IL-12p40界面处的残基的模型。图1A描绘了IL-12p40与中和纳米抗体复合物的放大模型。预测介导与纳米抗体相互作用并且因此也可能与IL-12Rβ1相互作用的残基用蓝色描绘(颜色参见书面标签),IL-12p40用绿色描绘,并且纳米抗体用淡黄色描绘。图1B描绘了包括IL-12p40和IL-12p35亚基的IL-12与IL-12Rβ2和IL-12Rβ1之间的预测相互作用的示意图。灰色“X”指示IL-12Rβ1与IL-12p40之间的界面,所述界面如果被选择性破坏,则可能会减少IL-12Rβ1向IL-12:IL-12Rβ2复合物的募集并且减弱下游STAT4信号传导。图2A和图2B提供了指示野生型(WT)IL-12和突变变体的蛋白质表达和纯化的结果。图2A描绘了展示了WT和突变IL-12蛋白的表达和迁移率相当的示例性结果。将蛋白质在SDS-PAGE凝胶上分离并且用考马斯亮蓝染色。图2B描绘了展示了IL-12和突变变体的纯化的示例性结果。将蛋白质通过镍-NTA亲和色谱法分离,并且然后通过尺寸排阻色谱法进一步纯化。

[0346] 基于与中和纳米抗体结合的IL-12p40亚基的现有蛋白质结构(PDB:5MZV;图1A),检查了IL-12p40的表面暴露的氨基酸His216、Lys217和Lys219是否介导与IL-12Rβ1的相互作用(图1B)。为了测试这一假设,在每个可能的独特组合(即,三个单突变体、三个双重突变体和一个三重突变体)中,将每个残基突变为丙氨酸,在Expi293细胞中表达(图2A),并且使用镍-NTA亲和色谱法随后使用尺寸排阻色谱法进行纯化(图2B)。然后,为了测试IL-12Rβ1的激动作用,在存在增加浓度的WT IL-12或各种突变体的情况下,通过流式细胞术测量人NK细胞中信号转导因子和转录激活子4(STAT4)的磷酸化。图3A至图3D描绘了展示了相对于WT的分级应答的示例性结果,这取决于突变成丙氨酸残基的界面残基的数量和性质。图3A提供了指示与WT IL-12相比H216A/K217A/K219A三重突变体(HKK)的激动作用降低的示例性结果。图3B提供了指示与WT相比H216A/K219A双重突变体中的激动作用降低至较小程度的示例性结果。图3C描绘了与WT IL-12和未经刺激的细胞相比对所有变体的单点应答的示例性结果。这表明,可以被定制成期望的特定激动作用水平的分级应答。图3D描绘了3C作为激动作用相对于WT的百分比的结果。在所有情况下,将人NK细胞用IL-12(一种突变变体)刺激或保持未刺激,并且通过流式细胞术测量磷酸化STAT4作为IL-12激动作用的量度。

[0347] 如图3A所示,与野生型( $EC_{50} = 40.8 \text{ ng/mL}$ ,  $E_{\text{max}} \approx 406$ )相比,所有三个残基(HKK)的突变导致达到50%的最大激动作用( $E_{\text{max}} \approx 192$ )所需的IL-12的有效浓度( $EC_{50} = 839 \text{ ng/mL}$ )急剧增加,其中最大激动作用降低约40%-50%。有趣的是,可以根据突变的数量和性质对

应答进行分级。如图3B所示,与野生型( $EC_{50}=57.4\text{ng/mL}$ ,  $E_{\text{max}}\approx 267$ )相比,H216A/K219A IL-12的最大激动作用降低了约70%-75% ( $EC_{50}=290\text{ng/mL}$ ,  $E_{\text{max}}\approx 191$ )。类似地,在所有变体的单点筛选中,分级应答的趋势在很大程度上保持一致,其中三重突变体具有最受抑制的应答,双重突变体具有略大的应答,并且单突变体具有类似于野生型的应答(图3C-D)。一个例外似乎是H216A/K217A,其应答(如果不大于K219A的话)类似于K219A的应答。由于K219A与H216A和K217A单独相比还具有更小的应答,这表明相较于H216和K217,K219可以在介导IL-12R $\beta$ 1:IL-12p40相互作用方面起到更关键性的作用。

[0348] 现有的递送IL-12的方法(如瘤内注射、抗体融合和IL-12表达细胞的过继性转移)使用野生型蛋白,并且因此仍然可能是有毒的。本发明方法的独特之处在于其利用了减弱形式的IL-12,由于可以激活的细胞类型的内在差异,当以肿瘤靶向或全身递送方法施用,所述减弱形式的IL-12可能比野生型更安全。另外,为了延长这些变体的半衰期并提高功效,可以采用与一系列稳定蛋白的融合,包含异源二聚体Fc融合。

[0349] 图4A至图4B描绘了作为双特异性异源二聚体Fc融合蛋白表达的IL-12的示例性结果,这是一种延长体内半衰期的方法。图4A描绘了针对IL-12激动作用测试的IL-12的双特异性异源二聚体Fc融合蛋白的示意图。有趣的是,与WT IL-12相比,IL-12的双特异性异源二聚体Fc融合蛋白出乎意料地具有减弱的激动作用,但是不如HKK三重突变体减弱得那么严重(图4A和4B)。图4B描绘了示例性结果,所述示例性结果表明,与WT IL-12相比,IL-12的双特异性异源二聚体Fc融合蛋白出乎意料地具有减弱的激动作用,但是不如图3A至3D中描述的HKK三重突变体减弱得那么严重。如图3A至3D中通过流式细胞术测量磷酸化STAT4。

[0350] 图5A描绘了与p40或p35融合并与对应亚基共表达以产生二聚体IL-12的二价Fc的示意图。图5B描绘了与p35融合的二价Fc的示意图,所述p35又与p40融合并表达为单链构建体以形成二聚体IL-12。图5C描绘了与p35融合的双特异性Fc“杵”的示意图,所述p35又与p40融合,表达为单链构建体,并且与对应双特异性Fc“臼”共表达以形成单体IL-12。图5D描绘了与p40或p35融合并且与对应亚基和对应双特异性Fc“臼”共表达以形成单体IL-12的双特异性Fc“杵”的示意图。

[0351] 图6A描绘了与WT IL-12和IL-12H216A/K217A/K219A三重突变体(HKK)相比,对Fc融合变体的单点应答的示例性结果,表明如图3A至3D中示出的分级应答可以通过Fc融合进一步调整。图6B描绘了WT IL-12、IL-12HKK和Fc融合变体响应于滴定量的上清液对人NK细胞中的STAT4磷酸化的影响。在Expi293细胞中表达蛋白质,并且使用含有分泌蛋白的细胞培养物上清液刺激NK细胞。x轴描绘了细胞培养物上清液的滴定,显示为用于刺激NK细胞的总体积的百分比。

[0352] 如上所述,与WT IL-12相比,IL-12的双特异性异源二聚体Fc融合蛋白出乎意料地具有减弱的激动作用,但是不如HKK三重突变体减弱得那么严重(图4A和4B)。因此,据信在IL-12R $\beta$ 1:IL-12p40界面处将突变掺入到IL-12的双特异性异源二聚体Fc融合蛋白(图4A-4B)和/或任何数量的另外的Fc融合IL-12变体(图5A-5D)中将导致激动作用的进一步减弱。实际上,图6A和图6B表明,与WT双特异性异源二聚体Fc融合IL-12或IL-12HKK相比,HKK双特异性异源二聚体Fc融合IL-12进一步减弱。

[0353] 与WT IL-12和WT双特异性异源二聚体Fc融合IL-12相比,如图5A至图5D中示意性示出的另外的Fc变体也被减弱。因此,据信将突变掺入到这些另外的Fc融合变体中将进一

步减弱激动作用。最后,据信可以采用另外的策略来延长这些变体的体内半衰期并提高功效,包含但不限于与人血清白蛋白(HSA)融合、与聚乙二醇(PEG)融合或与抗HSA纳米抗体融合(图7)。例如,图7提供了延长本公开的部分IL-12激动剂的体内半衰期的另外的示例性方法的示意图。因此,这些IL-12部分激动剂可以表示一种用于单独地或与其它免疫疗法组合地治疗一系列癌症类型的新颖且安全的方法。

表 1. IL-12 部分激动剂氨基酸序列。

SEQ ID NO:	序列名称	氨基酸序列
1	WT IL-12p40	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT IstdlTfsvkssrgssdpqgvTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
2	WT IL-12p35	MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLC ILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
3	IL-12p40 H216A	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT IstdlTfsvkssrgssdpqgvTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVAKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
4	IL-12p40 K217A	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT IstdlTfsvkssrgssdpqgvTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHALKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
5	IL-12p40 K219A	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT IstdlTfsvkssrgssdpqgvTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHKLAYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
6	IL-12p40	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT

[0354]

[0355]

	HK217	CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVAALKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
7	IL-12p40 HK219	MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVAKLAYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
8	IL-12p40 KK	MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVHALAYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
9	IL-12p40 HKK	MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS HLLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTT ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQED SACPAAEESLPIEVMVDAVAALAYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT SATVICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCS
10	人 IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	接头	GGGGGSGGGGSGGGGS
12	IL-12p40 人 IgG1 Fc 融合 体	MEFGLSWVFLVALFRGVQSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYSSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	IL-12p35 人 IgG1 Fc 融合 体	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSMFMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILL

[0356]

		HAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
14	人 IgG1 Fc “杵”	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	人 IgG1 Fc “白”	DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	IL-12p40 人 IgG1 Fc “杵”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYSSFFIRDI IKPDPPKNLQKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGGSGGGGSGGGGSDK THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	IL-12p35 人 IgG1 Fc “白”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
18	IL-12p40 人 IgG1 Fc “白”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTIST DLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYSSFFIRDI IKPDPPKNLQKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGGSGGGGSGGGGSDK THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0357]

19	IL-12p35 人 IgG1 Fc “杵”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCSTSEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVFPQKSSLEEDPFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	接头 2	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
21	接头 3	GGGGSGGGSGGGGS
22	Sc IL-12p40:IL-12p35:Fc	MEFGLSWVFLVALFRGVQSIWELKKDVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDEEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSVERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCSTSEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVFPQKSSLEEDPFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	Sc IL-12p35:IL-12p40:Fc	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCSTSEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVFPQKSSLEEDPFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGSGGGGSIWELKKDQVYVVELDWYDPDAPGEMVVLTCDEEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAEVVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPPKNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	单独的人 IgG1 “杵”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCSTSEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVFPQKSSLEEDPFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0358]

25	单独的人 IgG1 “白”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRTGGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
26	Sc IL- 12p40:IL- 12p35:Fc “杵”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSVERVRGDNKEYEYSVEQCEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDI IKPDPKPNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEI DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELM QALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYL NASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	Sc IL- 12p35:IL- 12p40:Fc “杵”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNML QKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVI DELMQALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILL HAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIWELKKDVY VVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVK EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFL RCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFF FIRDI IKPDPKPNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQ VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASV PCSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	Sc IL- 12p40:IL- 12p35:Fc “白”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDT PEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL LLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTIST DLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSVERVRGDNKEYEYSVEQCEDSAC PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDI IKPDPKPNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEI DHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSF MMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELM QALNFNSETVPQKSSLEEDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYL NASGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY

[0359]

		RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	Sc IL-12p35:IL-12p40:Fc “白”	MEFGLSWVFLVALFRGVQSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKT SFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPK RQIFLDQNMLAVI DELMQALNFNSETV P Q K S S L E E P D F Y K T K I K L C I L L HAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSIWELKKDVY VVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTLDQSSEVLGSGKTLTIQVK EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF RCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVECEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SF F I R D I I K P D P P K N L Q L K P L K N S R Q V E V S W E Y P D T W S T P H S Y F S L T F C V Q VQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASV PCSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPELPGPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	IL-12p35 8xHis	MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLN SRETSFITNGSCLASRKT SFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVI DELMQALNFNSETV P Q K S S L E E P D F Y K T K I K L C I L L H A F R I R A V T I D R V M S Y L N A S G G S H H H H H H H H H
31	信号肽 1	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVA
32	信号肽 2	MCPARSLLLVATLVLLDHLNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVS
33	信号肽 3	MEFGLSWVFLVALFRGVQS
34	WT IL-12p40 无信号肽	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLTLDQSSEVLGS GKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQ KEPKNKTFRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECEQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSFFIRDI IKPDPKPNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHS YFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSS SSWSEWASVPCS
35	WT IL-12p35 无信号肽	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKT SFMM ALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELMQA LNFNSETV P Q K S S L E E P D F Y K T K I K L C I L L H A F R I R A V T I D R V M S Y L N A S

[0360] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容特此通过引用整体并入本文。虽然已经参考特定实施例公开了本公开,但是显而易见的是,在不脱离本公开的真实精神和范围的情况下,本领域的其它技术人员可以设计出其它实施例和本公开的变体。所附权利要求旨在被解释为包含所有此类实施例和等效变体。

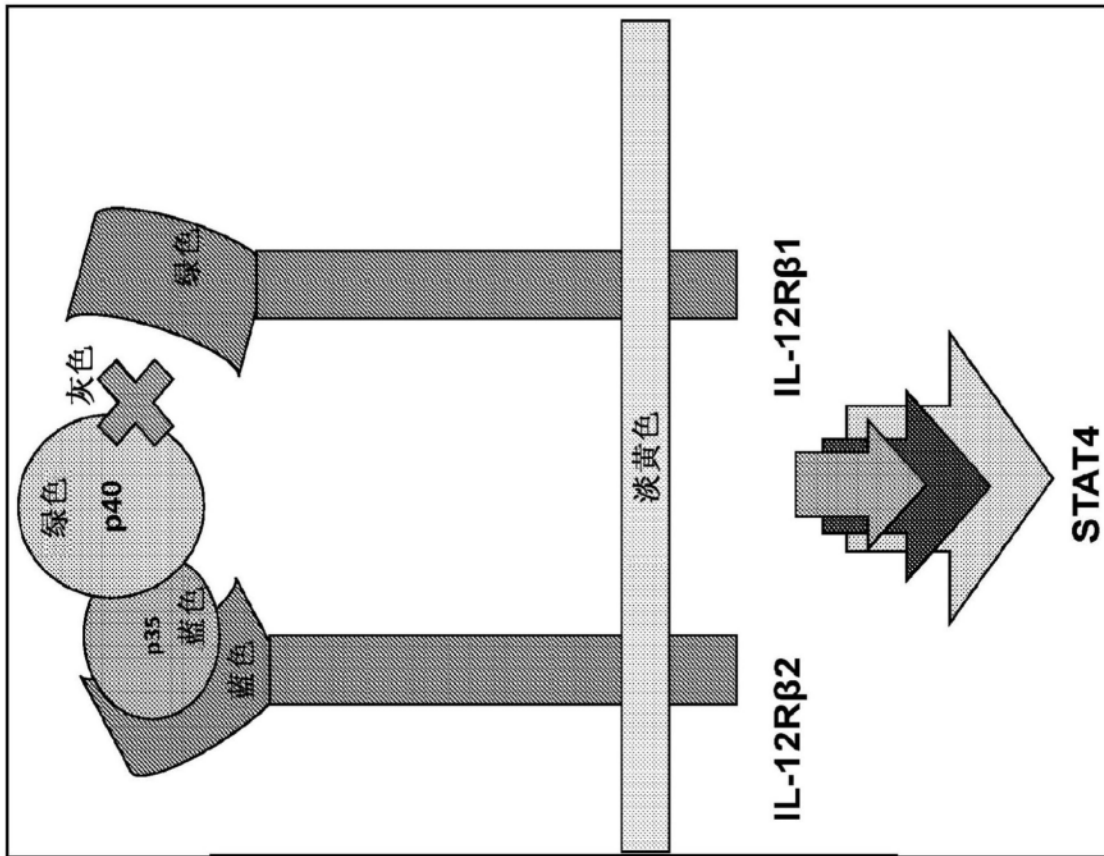


图1B

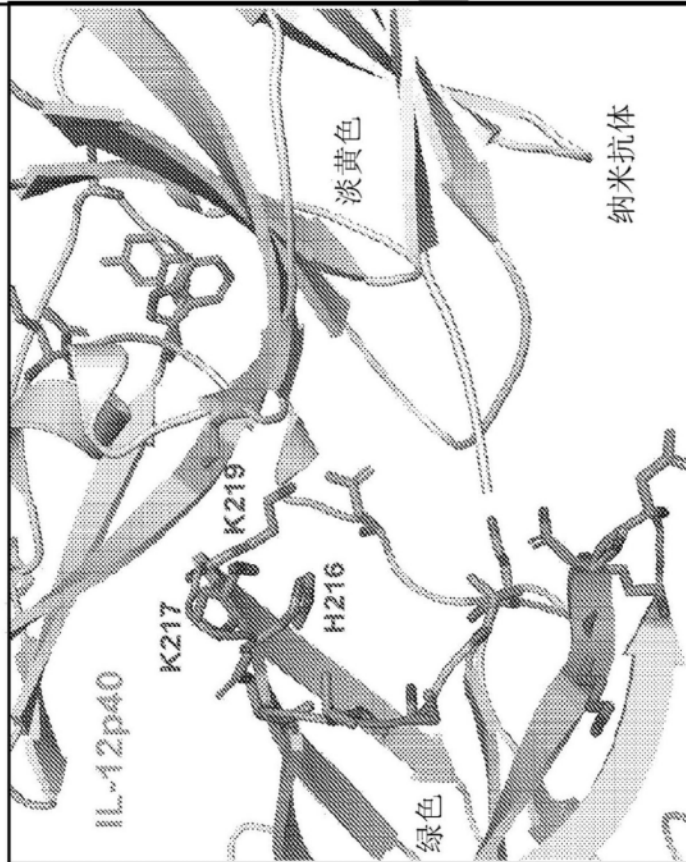
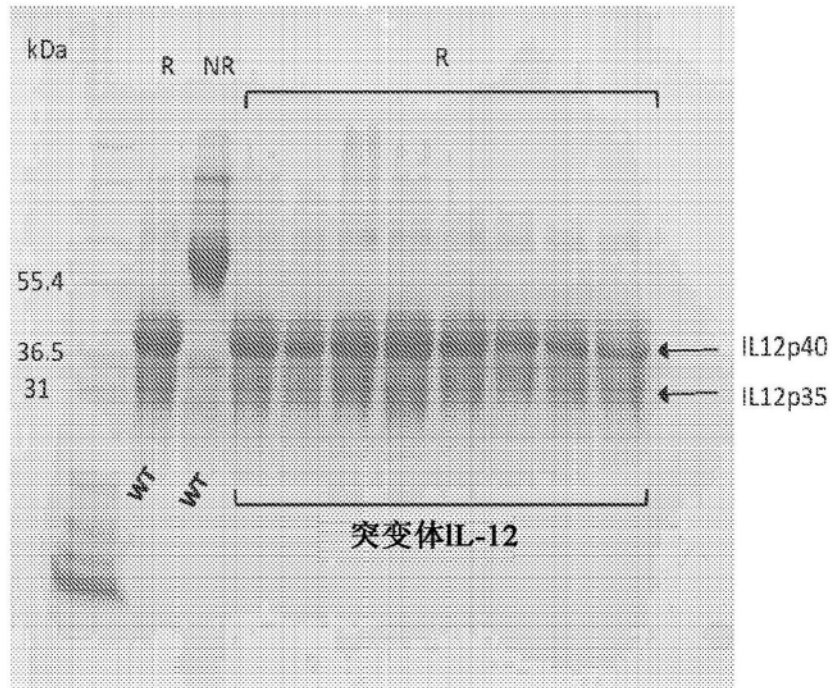


图1A

图2A



R = 还原条件  
NR = 非还原条件

图2B

色谱图

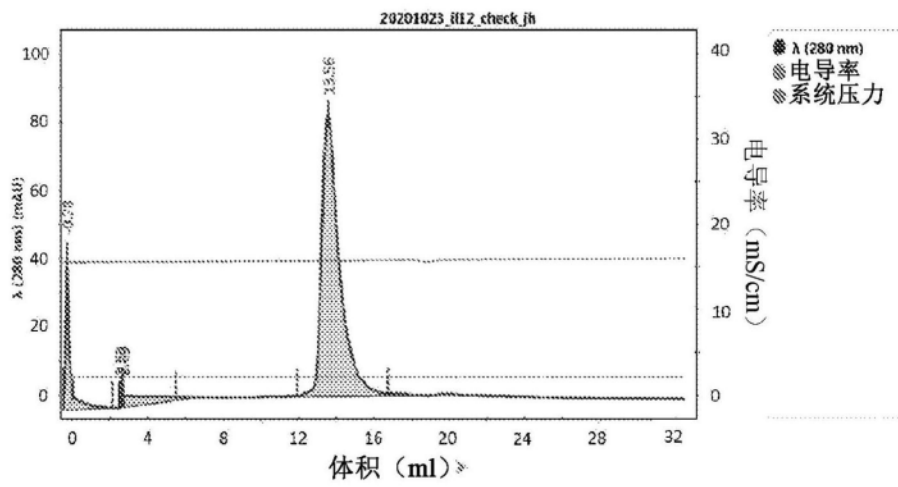


图2

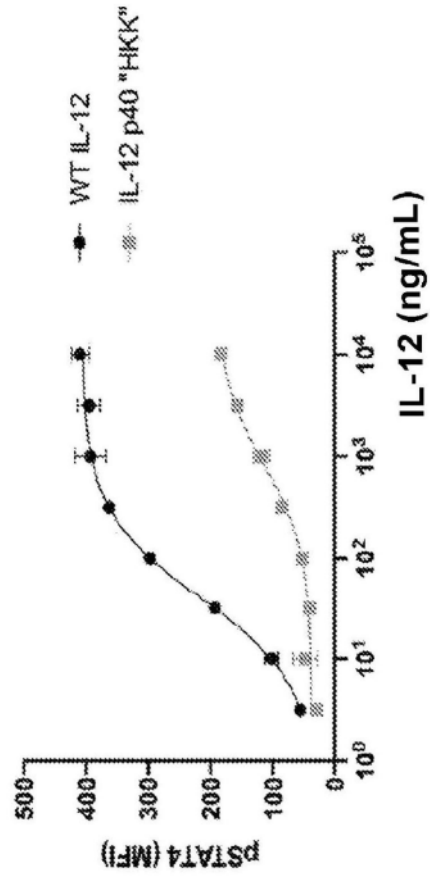


图3A

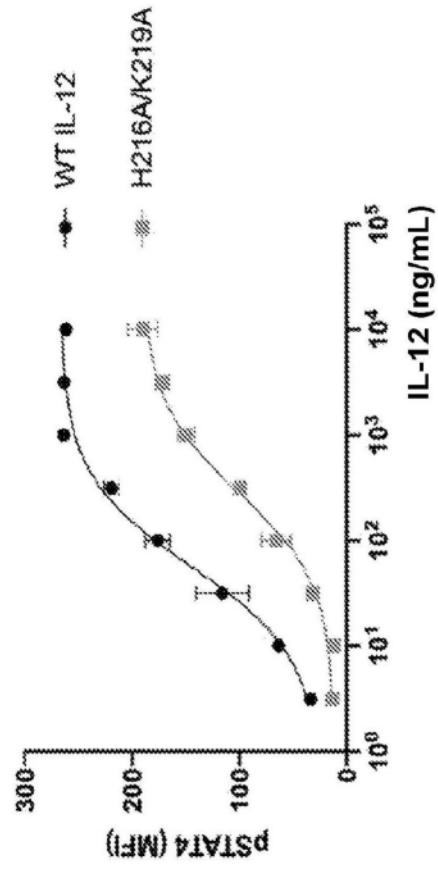


图3B

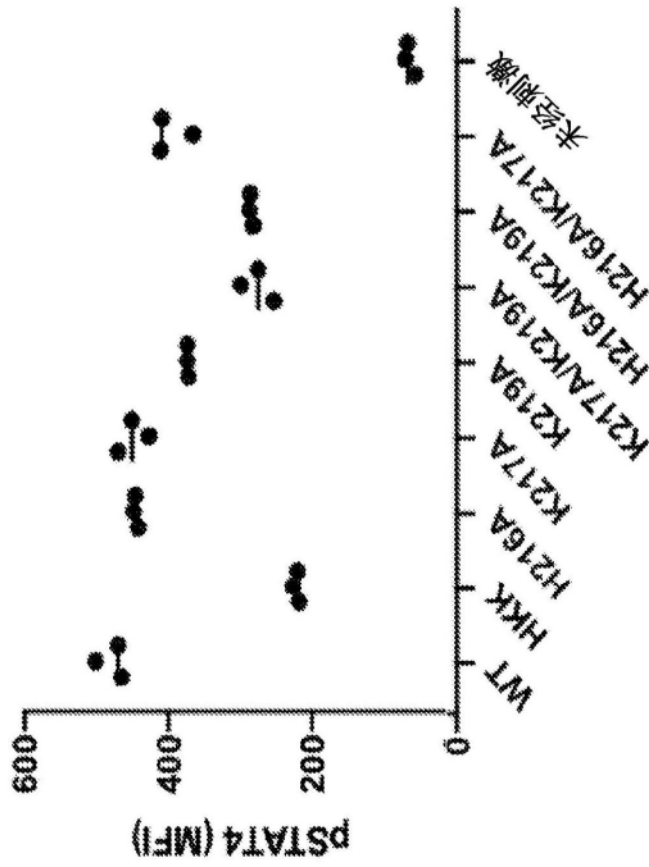


图3C

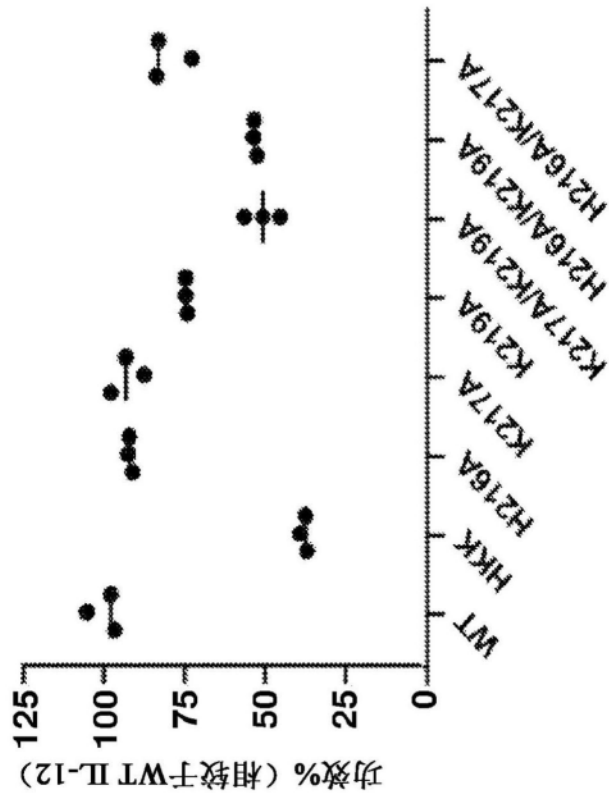


图3D

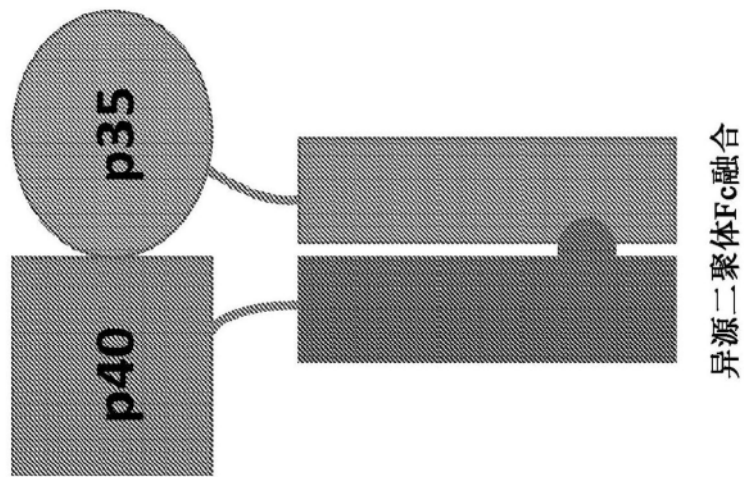


图4A

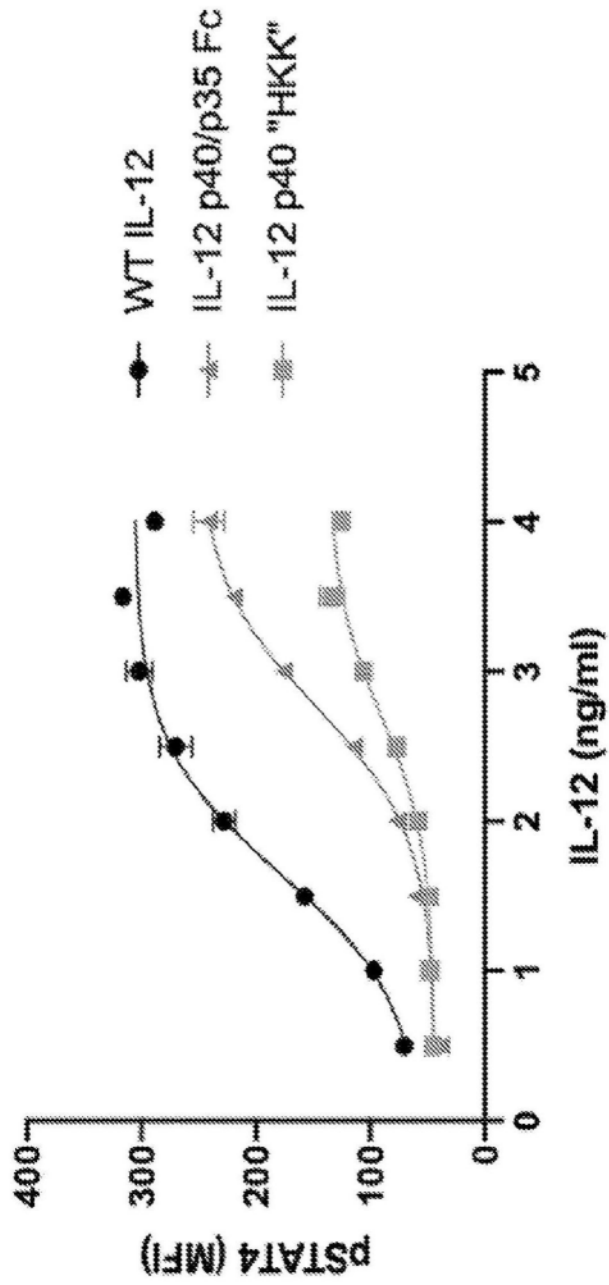


图4B

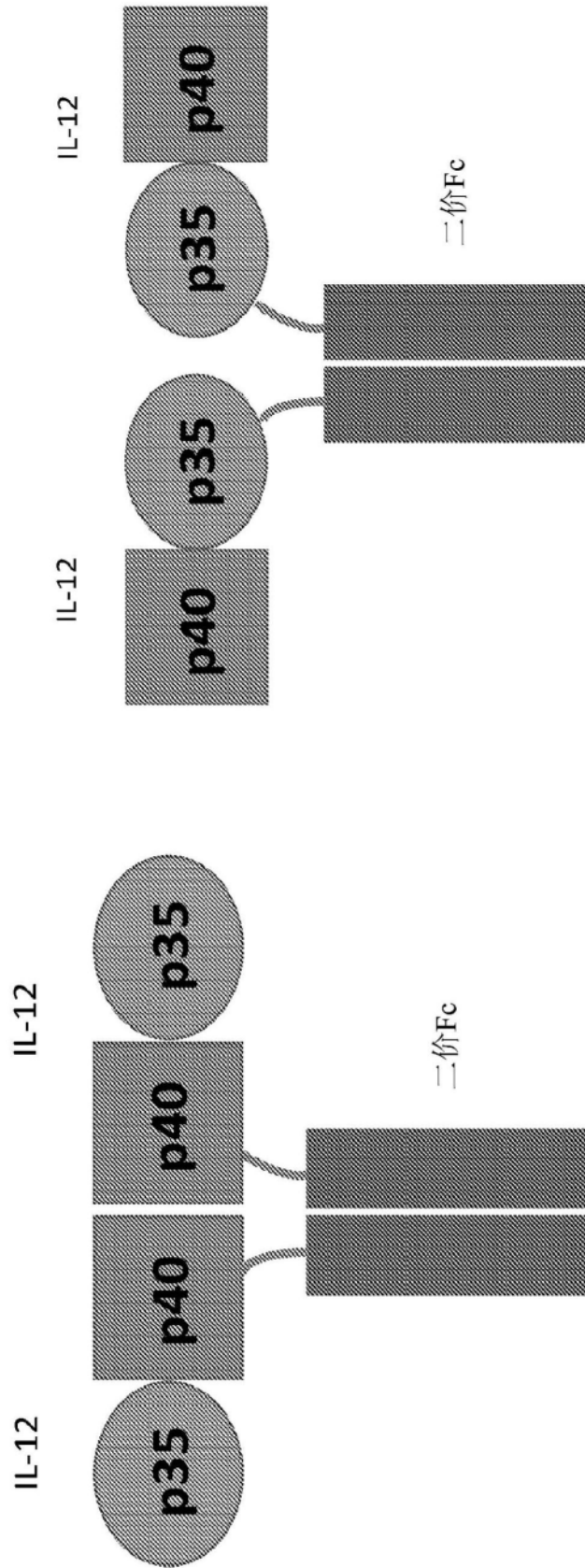


图5A

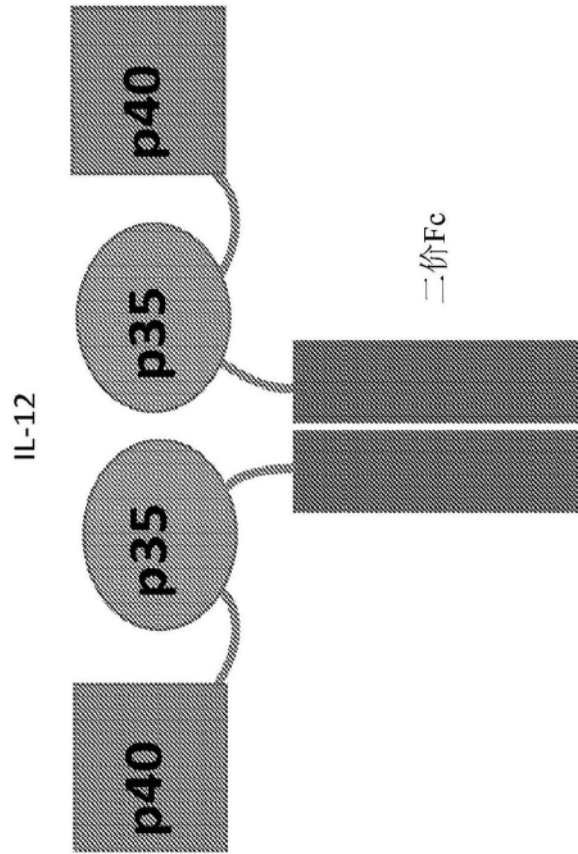


图5B

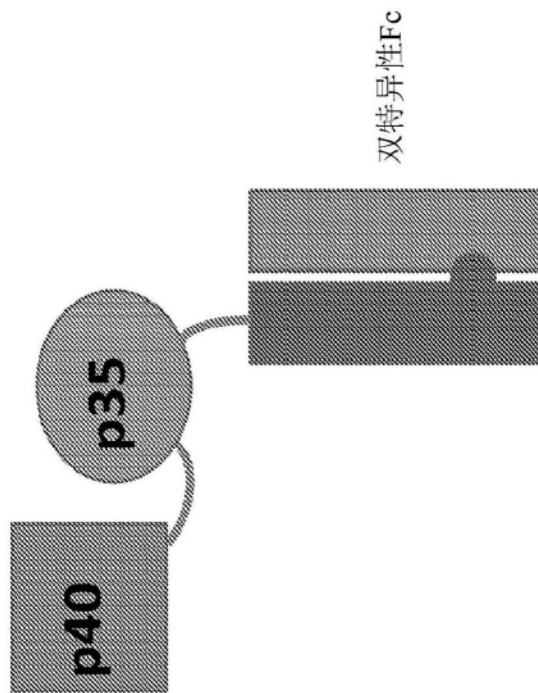


图5C

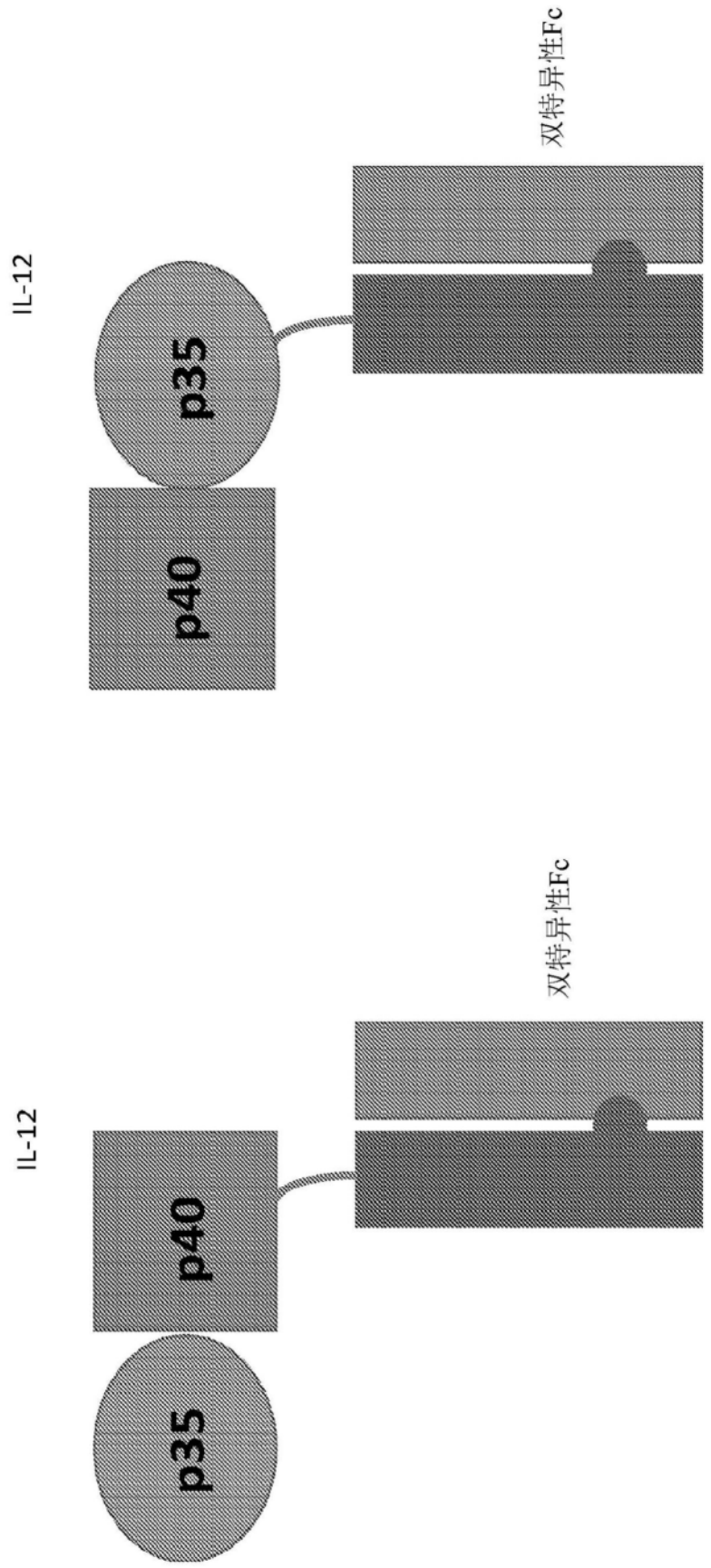


图5D

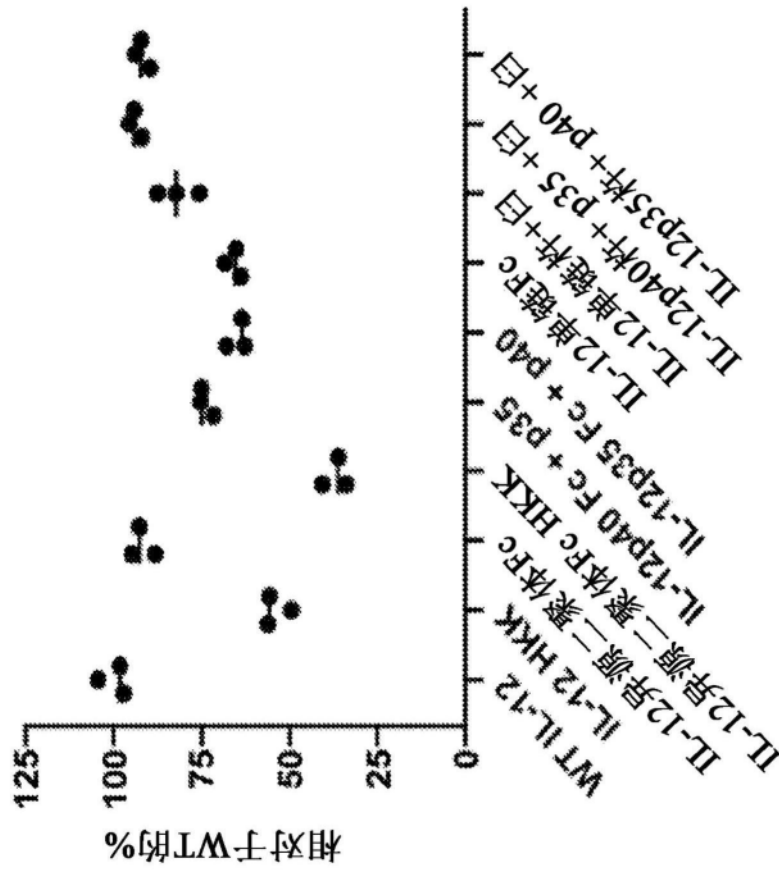


图6A

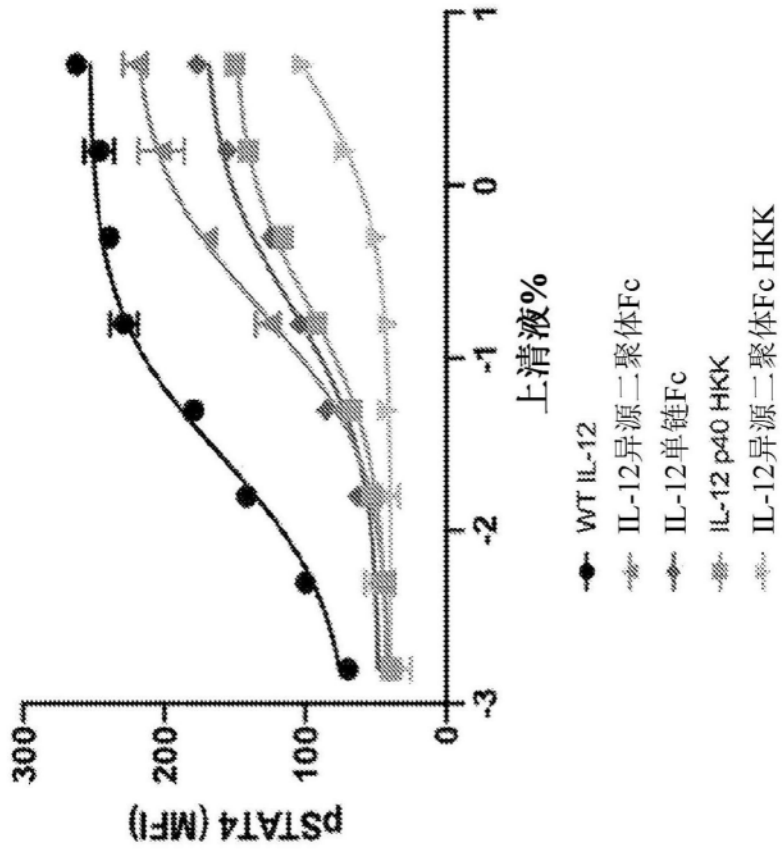


图6B

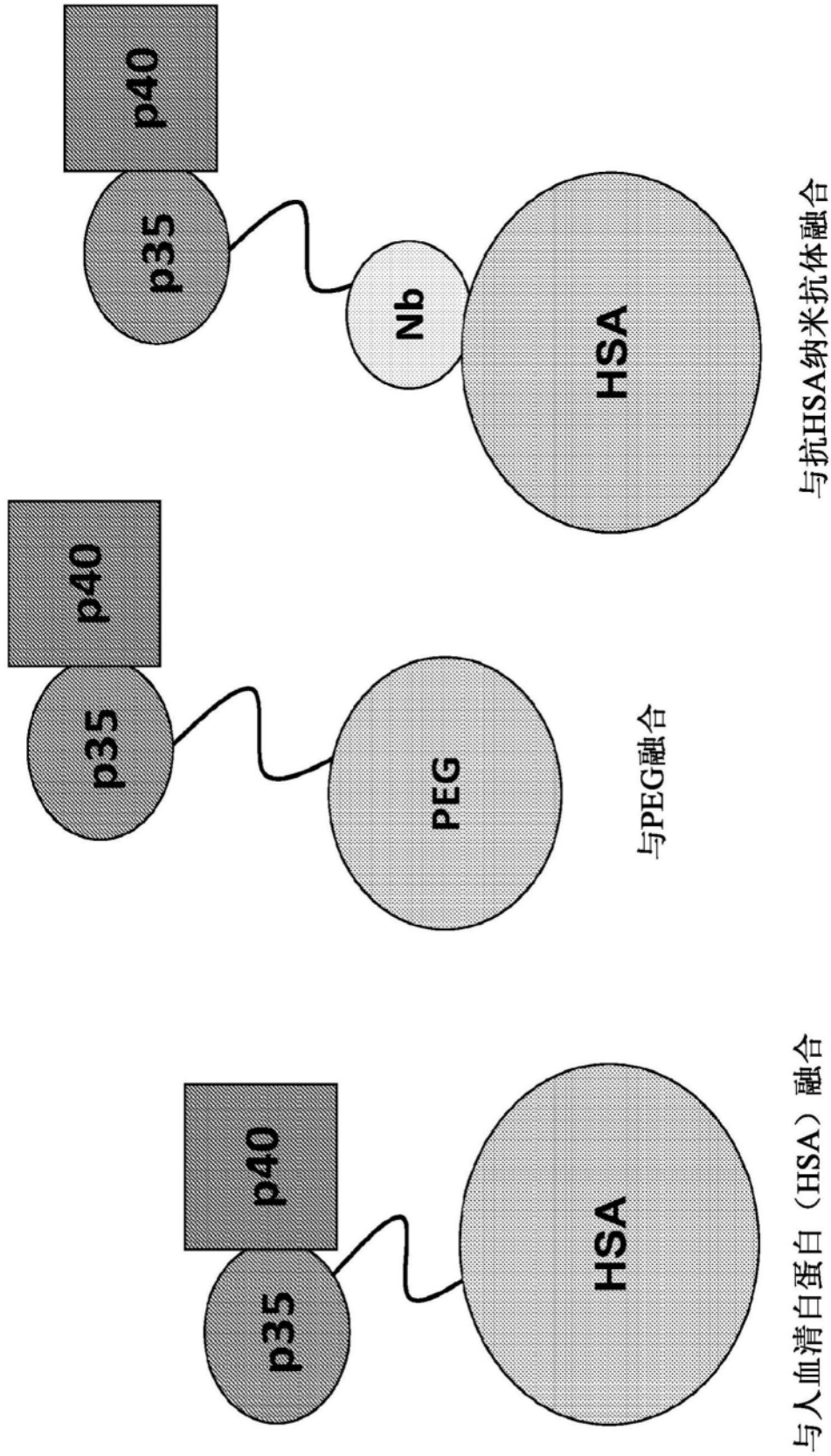


图7