(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120209157 A
(43)申请公布日 2025.06.27

(21)申请号 202510109583.X

(22)申请日 2019.10.23

(30)优先权数据
62/749,489 2018.10.23 US
62/781,898 2018.12.19 US
62/788,499 2019.01.04 US
62/827,347 2019.04.01 US
62/895,889 2019.09.04 US

(62)分案原申请数据
201980083496.4 2019.10.23

(71)申请人 蜻蜓疗法股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·F·张 J-M·科洛特
A·格林伯格 E·古蒂埃雷斯
W·哈尼 N·瓦格曼

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)

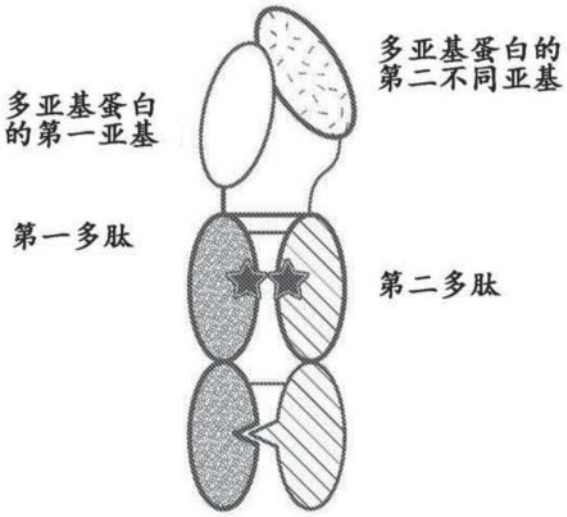
权利要求书1页 说明书180页
序列表（电子公布） 附图48页

(54)发明名称

异二聚体Fc融合蛋白

(57)摘要

本发明提供了Fc融合蛋白构建体,其作为单价二聚体与原生/天然分子相比具有更高的血清半衰期,因此有利于在生产期间获得更高的蛋白质滴度,在储存期间获得更高的稳定性,以及当用作治疗剂时获得改进的功效。还提供了在Fc区中具有降低效应子功能的突变的Fc融合蛋白构建体,其具有增加的抑制肿瘤生长的活性,因此当用作癌症疗法时是有利的。



CN 120209157 A

1.一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和多亚基蛋白的第一亚基;以及

(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和所述多亚基蛋白的第二不同亚基,

其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含降低Fc的效应子功能的一个或多个突变,并且

其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基彼此结合。

2.根据权利要求1所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述效应子功能包含Fc诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。

3.根据权利要求1或2所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述异二聚体Fc融合蛋白是岩藻糖基化的。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人抗体Fc结构域多肽。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE Fc结构域多肽。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在一个或多个位置233、234、235、236、237、297、318、320、322、329、330和/或331处的一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1 Fc结构域多肽。

8.根据权利要求7所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在一个或多个位置234、235、237、329、330和/或331处的一个或多个突变,根据EU编号系统。

9.根据权利要求8所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自L234A、L235A、L235E、G237A、P329A、A330S和P331S的一个或多个突变。

10.根据权利要求9所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235A和P329A。

异二聚体Fc融合蛋白

本申请是申请日为2019年10月23日、中国申请号为201980083496.4、发明名称为“异二聚体Fc融合蛋白”的发明申请的分案申请。

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2018年10月23日提交的美国临时专利申请号62/749,489、2018年12月19日提交的美国临时专利申请号62/781,898、2019年1月4日提交的美国临时专利申请号62/788,499、2019年4月1日提交的美国临时专利申请号62/827,347以及2019年9月4日提交的美国临时专利申请号62/895,889的权益和优先权,将其公开内容出于所有目的通过引用以其整体特此并入。

序列表

[0002] 本申请含有已以ASCII格式电子提交并通过引用以其整体特此并入的序列表。在2019年10月22日创建的所述ASCII副本被命名为DFY-063WO_SL.txt,并且大小为946,355字节。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及异二聚体Fc融合蛋白和包含此类蛋白质的药物组合物、以及在治疗人类患者的疾病或障碍中的使用方法。

背景技术

[0004] 生理活性蛋白大多具有体内半衰期短的缺点。为了解决该缺点,已经尝试将它们与PEG(聚乙二醇)等缀合,或者将它们与抗体Fc(可结晶片段)区域融合。由两个或更多个不同亚基构成的蛋白质(其中所述两个或更多个不同亚基形成蛋白质复合物以表现出生理活性)可以与野生型Fc结构域融合以制备Fc融合蛋白形式,由于Fc的同二聚体性质,从而形成同二聚体。由两个或更多个不同亚基构成的蛋白质(其中所述两个或更多个不同亚基形成蛋白质复合物以表现出生理活性)也可以与不仅源自IgG1而且源自其他同种型抗体(如IgG2、IgG3和IgG4)的异二聚体Fc区融合,以形成异二聚体Fc融合蛋白。因此,由两个或更多个不同亚基构成并且其中两个或更多个亚基通过形成蛋白质复合物而表现出生理活性的蛋白质的一个或更多个亚基可以与异二聚体Fc变体区域的末端融合,以形成改进的Fc融合蛋白形式。

[0005] Fc异二聚化是这样一种技术,其通过基因工程在Fc的两个不同CH3结构域中诱导突变,使得这两个Fc片段形成具有最小序列变异的异二聚体,同时它们具有与天然存在的抗体的三级结构非常类似的三级结构(参见例如,美国专利号7,695,936)。

[0006] 在本公开文本中描述的发明提供了用于改进Fc融合蛋白形式的设计,其中通过在Fc的CH2和CH3结构域中引入不同长度的接头或突变,异二聚体蛋白的两个亚基与具有不同异二聚化结构域的两个Fc结构域连接。

发明内容

[0007] 本发明总体上涉及异二聚体Fc融合蛋白和包含此类蛋白质的药物组合物。

[0008] 在一个方面,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和多亚基蛋白的第一亚基;以及第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和所述多亚基蛋白的第二不同亚基,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含降低Fc的效应子功能的一个或多个突变,并且其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基彼此结合。

[0009] 在一些实施方案中,所述效应子功能包括Fc结构域多肽诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人抗体Fc结构域多肽。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE Fc结构域多肽(例如,人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE Fc结构域多肽)。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在根据EU编号的一个或多个位置233、234、235、236、237、297、318、320、322、329、330和/或331处的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白是岩藻糖基化的。

[0010] 在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1 Fc结构域多肽。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在根据EU编号的一个或多个位置234、235、237、329、330和/或331处的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自234A、L235A、L235E、G237A、P329A、A330S和P331S的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A和L235A。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235A和P329A。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变C220S。

[0011] 在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG4 Fc结构域多肽。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在根据EU编号的一个或多个位置235和/或329处的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自L235E和P329A的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E和P329A。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变S228P。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含第一多肽,其包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列;以及第二多肽,其包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

[0013] 在又另一个方面,本发明提供了一种多肽,其包含多亚基细胞因子的亚基和免疫

球蛋白Fc结构域多肽;所述Fc结构域多肽包含用于促进与不同免疫球蛋白Fc结构域多肽的异二聚化的突变和降低Fc的效应子功能的一个或多个突变。例如,包含所述突变的Fc结构域多肽可以是人IgG1抗体Fc结构域多肽。

[0014] 在一些实施方案中,降低Fc的效应子功能的所述一个或多个突变选自L234A、L235A或L235E、G237A、P329A、A330S和P331S,根据EU编号系统进行编号。例如,在一些实施方案中,降低Fc的效应子功能的所述突变是L234A、L235A和P329A,根据EU编号系统进行编号。

[0015] 在一些实施方案中,用于促进异二聚化的所述突变是K360E和K409W,根据EU编号系统进行编号。在一些其他实施方案中,用于促进异二聚化的所述突变是Q347R、D399V和F405T,根据EU编号系统进行编号。

[0016] 在一些实施方案中,所述Fc结构域多肽还包含用于促进与不同免疫球蛋白Fc结构域多肽形成二硫键的突变。例如,当所述异二聚化突变是K360E和K409W时,在一些实施方案中,用于促进二硫键形成的所述突变是Y349C,根据EU编号系统进行编号。当所述异二聚化突变是Q347R、D399V和F405T时,在一些实施方案中,用于促进二硫键形成的所述突变是S354C,根据EU编号系统进行编号。

[0017] 例如,在一些实施方案中,包含多亚基细胞因子的亚基和免疫球蛋白Fc结构域多肽的多肽包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列或SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

[0018] 在另一个方面,本发明提供了一种核酸,其编码包含SEQ ID NO:290或SEQ ID NO:291的氨基酸序列的多肽。在又另一个方面,本发明提供了一种表达载体,其包含核酸,所述核酸包含编码包含SEQ ID NO:290或SEQ ID NO:291的氨基酸序列的多肽的序列。在一个方面,本发明提供了一种细胞,其包含核酸,所述核酸编码包含SEQ ID NO:290或SEQ ID NO:291的氨基酸序列的多肽;或表达载体,所述表达载体包含核酸,所述核酸包含编码包含SEQ ID NO:290或SEQ ID NO:291的氨基酸序列的多肽的序列。

[0019] 在另一个方面,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,其包含免疫球蛋白Fc的第一Fc结构域多肽和第二不同Fc结构域多肽、以及多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基,其中所述第一亚基和所述第二不同亚基彼此结合并连接至所述第一Fc结构域多肽和/或所述第二不同Fc结构域多肽的N末端或C末端的一个或多个末端;其中所述第一Fc结构域多肽和所述第二Fc结构域多肽被突变以便促进异二聚体Fc形成并降低Fc的效应子功能。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白是IL-12(例如,人IL-12),使得在异二聚体Fc融合蛋白中,IL-12的p35和p40亚基彼此结合并连接至所述第一Fc结构域多肽和/或所述第二Fc结构域多肽的N末端或C末端的一个或多个末端;其中所述第一Fc结构域多肽和所述第二Fc结构域多肽被突变以便促进异二聚体Fc形成并降低Fc的效应子功能。

[0020] 在一个方面,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含与所述第一抗体Fc结构域多肽结合的第二抗体Fc结构域多肽,其中所述第一多肽还包含多亚基蛋白的第一亚基,所述第一亚基通过包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:237)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:6)的接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,其中X$_1$表示L或A,X$_2$表示L、E或A,并且X$_3$表示A或G;所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且所述多亚基蛋白的亚基彼此结合;当X$_1$表示L和/或X$_2$表示L

时,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽中的至少一种包含用于促进异二聚化的Q347R突变。

[0021] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:9)组成。

[0022] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:244)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:244)组成。

[0023] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)或EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEKKGG(SEQ ID NO:238)或EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:7)组成。

[0024] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:241)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSKDTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:241)组成。

[0025] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSEPKSSKDTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:242)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ IDNO:15)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:242)组成。

[0026] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:243)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:243)组成。

[0027] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:64)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:245)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:65)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:245)组成。

[0028] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:246)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:246)组成。

[0029] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:246)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)。在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:11)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)组成。

[0030] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:247)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:247)组成。

[0031] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:248)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:248)组成。

[0032] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:249)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:249)组成。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含多亚基细胞因子的亚基,所述亚基通过接头与免疫球蛋白Fc结构域多肽连接,所述接头包含氨

基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239);所述Fc结构域多肽包含用于促进与不同免疫球蛋白Fc结构域多肽的异二聚化的突变、以及用于降低Fc的效应子功能的L234A、L235A和P329A取代。

[0034] 在一些实施方案中,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含人IL-12的p40亚基,所述亚基通过接头与第一人IgG1(hIgG1)Fc结构域多肽连接,所述接头包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)或由其组成;以及人IL-12的p35亚基,所述亚基通过接头与第二hIgG1 Fc结构域多肽连接,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)或由其组成;所述第一Fc结构域多肽和所述第二Fc结构域多肽包含促进异二聚化的突变、以及用于降低hIgG1 Fc的效应子功能的L234A、L235A和P329A取代。

[0035] 在一个方面,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽,其中所述第一多肽还包含多亚基蛋白的第一亚基,其中所述蛋白质序列通过接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(SEQ ID NO:1),其中X表示L或E;所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且所述多亚基蛋白的亚基彼此结合,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变,并且所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽彼此结合。

[0036] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽,其中所述第一多肽还包含多亚基蛋白的第一亚基,其中所述蛋白质序列通过接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合;并且所述第二多肽还包含多亚基蛋白的第二不同亚基,其中所述蛋白质序列通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合。连接多亚基蛋白的所述第二不同亚基的蛋白质序列与所述第二抗体Fc结构域多肽的接头可以包括G4S(SEQ ID NO:110)、$(G4S)_2$(SEQ ID NO:109)或$(G4S)_3$(SEQ ID NO:108)。

[0037] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFKGG(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)组成。

[0038] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)组成。

[0039] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)组成。

[0040] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc

结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)组成。

[0041] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)组成。

[0042] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)..在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)组成。

[0043] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCAPEFEGG(SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)组成。

[0044] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)组成。

[0045] 本文所述的一些异二聚体Fc融合蛋白包括第一IgG4抗体Fc结构域多肽和第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽,其各自被突变以促进与彼此的异二聚化。在一些实施方案中,所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽包括选自K370E和R409W的一个或多个突变,并且所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽包括选自E357N、D399V和F405T的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽包括选自E357N、D399V和F405T的一个或多个突变,并且所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽包括选自K370E和R409W的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽包括突变K370E和R409W,并且所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽包括突变E357N、D399V和F405T。在一些实施方案中,所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽包括突变E357N、D399V和F405T,并且所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽包括突变K370E和R409W。在一些实施方案中,所述第一IgG4Fc结构域多肽包括选自K360E和R409W的一个或多个突变,并且所述第二不同IgG4 Fc结构域多肽包括选自Q347R、D399V和F405T的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一IgG4 Fc结构域多肽包括选自Q347R、D399V和F405T的一个或多个突变,并且所述第二不同IgG4 Fc结构域多肽包括选自K360E和R409W的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一IgG4 Fc结构域多肽包括突变K360E和R409W,并且所述第二不同IgG4 Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T。在一些实施方案中,所述第一IgG4 Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二不同IgG4 Fc结构域多肽包括突变K360E和R409W。

[0046] 本文公开的一些异二聚体Fc融合蛋白包括第一IgG1抗体Fc结构域多肽和第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽,其各自被突变以促进与彼此的异二聚化。在一些实施方案中,所述第一IgG1 Fc结构域多肽包括选自K360E和K409W的一个或多个突变,并且所述第二不同IgG1 Fc结构域多肽包括选自Q347R、D399V和F405T的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一IgG1 Fc结构域多肽包括选自Q347R、D399V和F405T的一个或多个突变,并且所述第二不同IgG1 Fc结构域多肽包括选自K360E和K409W的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一IgG1抗体Fc结构域多肽包括突变K360E和K409W,并且所述第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T。在一些实施方案中,所述第一IgG1抗体Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽包括突变K360E和K409W。

[0047] 在一些实施方案中,本文所述的异二聚体Fc融合蛋白包含进一步突变以降低效应子功能的IgG4或IgG1 Fc结构域多肽。在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自含有突变P329G或P329A。在一些实施方案中,所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽和所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽各自含有突变P329G或P329A。在一些实施方案中,所述第一IgG1抗体Fc结构域多肽和所述第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽各自含有突变P329G或P329A。在一些实施方案中,所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽和所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽各自含有突变P329A。在一些实施方案中,所述第一IgG1抗体Fc结构域多肽和所述第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽各自含有突变P329A。

[0048] 在一些实施方案中,本文所述的基于Fc的异二聚体融合体掺入了第一IgG1抗体Fc结构域多肽和第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽,其各自含有选自A330S和P331S的突变。在一些实施方案中,本文所述的基于Fc的异二聚体融合体掺入了第一IgG1抗体Fc结构域多肽和第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽,其各自含有突变A330S和P331S。

[0049] 在一些实施方案中,本文所述的基于Fc的异二聚体蛋白掺入了IgG4或IgG1 Fc结构域多肽,其被进一步突变以引入链间二硫键。在一些实施方案中,所述第一IgG4或IgG1 Fc结构域多肽包括突变Y349C,并且所述第二不同IgG4或IgG1 Fc结构域多肽包括突变S354C。在一些实施方案中,所述第一IgG4或IgG1 Fc结构域多肽包括突变S354C,并且所述第二不同IgG4或IgG1 Fc结构域多肽包括突变Y349C。

[0050] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包括多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的天然二硫键。例如,在一个示例性实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括IL-12的p35与p40亚基之间的天然异二聚体二硫键。这种蛋白质包括p35的C74与p40的C177之间的天然二硫键。

[0051] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包括多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。例如,在一个示例性实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括IL-12的p35与p40亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。这种蛋白质包括p35的V185C与p40的Y292C之间的人工或工程化的二硫键。

[0052] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包括多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的天然二硫键、以及多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。例如,在一个示例性实施方案中,IL-

12的p35与p40亚基之间的天然异二聚体二硫键,并且包括IL-12的p35与p40亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。这种蛋白质包括p35的C74与p40的C177之间的天然二硫键、以及p35的V185C与p40的Y292C之间的人工或工程化的二硫键。

[0053] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白被工程化以去除天然二硫键,然后被非天然的人工或工程化的二硫键取代。例如,在一个示例性实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括IL-12的其中天然C74被突变为丝氨酸的p35、以及I1-12的其中天然C177被突变为丝氨酸的p40,从而去除IL-12的p35与p40亚基之间的天然二硫键。向该突变的IL-12中引入两个新的突变,即p35上的V185C和p40上的Y292C,从而引入非天然的人工或工程化的二硫键。

[0054] 在本发明的异二聚体Fc融合蛋白内,第一多肽和第二不同多肽分别包含多亚基细胞因子的第一亚基和第二不同亚基。在本发明的异二聚体Fc融合蛋白内,第一多肽和第二不同多肽分别包含多亚基细胞因子的第二不同亚基和第一亚基。在一个示例性实施方案中,所述细胞因子是IL-12(例如,人IL-12)。还提供了含有本文所述的异二聚体Fc融合蛋白中的任一种的配制品、含有表达所述异二聚体Fc融合蛋白的一种或多种核酸或表达所述异二聚体Fc融合蛋白的一种或多种载体的细胞、以及使用所述异二聚体Fc融合蛋白增强肿瘤细胞死亡的方法。在一些实施方案中,本发明提供了一种配制品,其包括本文所述的异二聚体Fc融合蛋白和药学上可接受的载体。

[0055] 在另一个方面,本发明的异二聚体Fc融合蛋白还包含至少一个抗体可变结构域(例如,抗体重链可变结构域)。在某些实施方案中,所述至少一个抗体重链可变结构域与抗体轻链可变区结合以形成Fab,并且所述Fab的重链可变结构域或轻链可变结构域在所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽的N末端融合。

[0056] 在某些实施方案中,本发明的包含至少一个抗体可变结构域的异二聚体Fc融合蛋白具有分别与所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端连接的多亚基蛋白的第一亚基和所述多亚基蛋白的第二不同亚基。

[0057] 在某些实施方案中,本发明的包含至少一个抗体可变结构域的异二聚体Fc融合蛋白具有分别与所述第二抗体Fc结构域多肽和所述第一抗体Fc结构域多肽的C末端连接的多亚基蛋白的第一亚基和所述多亚基蛋白的第二不同亚基。

[0058] 在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包含相对于所述第一多肽的第一抗体Fc结构域多肽位于C末端的抗体重链可变结构域。在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包含相对于所述第二多肽的第二抗体Fc结构域多肽C末端定位的抗体重链可变结构域。在某些实施方案中,所述抗体重链可变区与抗体轻链可变区结合以形成scFv。在某些实施方案中,多亚基蛋白的第一亚基和所述多亚基蛋白的第二不同亚基分别与所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽的N末端连接。在某些实施方案中,多亚基蛋白的第一亚基和所述多亚基蛋白的第二不同亚基分别与所述第二抗体Fc结构域多肽和所述第一抗体Fc结构域多肽的N末端连接。

[0059] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白不包含抗体可变结构域。例如,在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白由以下组成或基本上由以下组成:多亚基蛋白(例如,IL-12蛋白)的第一亚基、任选地包含间隔肽的接头和第一抗体Fc结构域多肽;以及所述多亚基蛋白(例如,IL-12蛋白)的第二不同亚基、任选地包含间隔肽的接头和第二抗

体Fc结构域多肽。

[0060] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白还包含蛋白聚糖结合结构域。在一些实施方案中,所述蛋白聚糖结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种蛋白聚糖。在一些实施方案中,所述蛋白聚糖结合结构域结合选自以下的一种或多种蛋白聚糖:黏结蛋白聚糖、丝甘蛋白聚糖、CSPG4、β蛋白聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、短蛋白聚糖和小富亮氨酸蛋白聚糖(SLRP)。在一些实施方案中,所述SLRP选自饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、无孢蛋白、纤调蛋白聚糖(fibrodulin)和光蛋白聚糖。在一些实施方案中,所述蛋白聚糖结合结构域连接至所述第一抗体Fc结构域多肽的C末端。在一些实施方案中,所述蛋白聚糖结合结构域连接至所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端。

[0061] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白还包含胶原蛋白结合结构域。在一些实施方案中,所述胶原蛋白结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种胶原蛋白。在一些实施方案中,所述胶原蛋白结合结构域连接至所述第一抗体Fc结构域多肽的C末端。在一些实施方案中,所述胶原蛋白结合结构域连接至所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端。

[0062] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白还包含透明质酸结合结构域。在一些实施方案中,所述透明质酸结合结构域连接至所述第一抗体Fc结构域多肽的C末端。在一些实施方案中,所述透明质酸结合结构域连接至所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端。

[0063] 本发明的另一个方面提供了一种治疗患者的癌症的方法。所述方法包括向患者(例如,有需要的患者)施用有效量的本文所述的异二聚体Fc融合蛋白或包含有效量的本文所述的多特异性结合蛋白的配制品。例如,在一些实施方案中,治疗癌症的所述方法包括向患者(例如,需要治疗的患者)施用包含有效量的本文所述的异二聚体Fc融合蛋白和药学上可接受的载体的配制品。

[0064] 在某些实施方案中,本公开文本提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患者仅施用单剂量的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白。在某些实施方案中,所述单剂量的量足以诱导对所述癌症的完全反应。在某些实施方案中,所述单剂量的量足以延迟或防止所述癌症的复发。

[0065] 在某些实施方案中,本公开文本提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患者仅施用单剂量的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二多肽;或包含所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白和药学上可接受的载体的配制品。在某些实施方案中,包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二多肽的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白或包含所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白和药学上可接受的载体的配制品的单剂量的量足以诱导对所述癌症的完全反应。在某些实施方案中,所述单剂量的量足以延迟或防止所述癌症的复发。

[0066] 本发明的另一个方面提供了一种治疗急性放射综合征的方法,其中所述方法包括向患者施用本文公开的异二聚体Fc融合蛋白或配制品。在一些实施方案中,所述急性放射综合征包括选自以下的一种或多种综合征:造血放射综合征、胃肠放射综合征、神经血管放射综合征和皮肤放射综合征。在一些实施方案中,所述急性放射综合征包括选自以下的综合征:造血放射综合征、胃肠放射综合征、神经血管放射综合征和皮肤放射综合征。

[0067] 总之,本发明提供了多亚基蛋白的异二聚体Fc融合蛋白构建体。这些融合蛋白构建体可以表现出与原生/天然(native/natural)多亚基蛋白相比更高的血清半衰期、生产期间改进的产量、储存期间增强的稳定性和/或当用作治疗剂时改进的功效。

附图说明

[0068] 图1A展示了示例性异二聚体Fc融合蛋白,其包含多亚基蛋白的第一亚基,所述亚基通过接头与第一抗体Fc结构域多肽连接;以及多亚基蛋白的第二不同亚基,所述亚基通过接头与第二抗体Fc结构域多肽连接。第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变,并且Fc结构域多肽之间的二硫键稳定异二聚体。连接所述另外的亚基与第二抗体Fc结构域多肽的接头可以包括$(G4S)_3$序列(SEQ ID NO:108)。

[0069] 图1B展示了示例性异二聚体Fc融合蛋白,其类似于图1A所展示的蛋白质,但是还包括Fc结构域多肽中的突变以减少Fcγ R结合。

[0070] 图1C展示了示例性蛋白质,其中多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与第一抗体Fc结构域多肽连接,并且多亚基蛋白的另一亚基通过另一个接头与第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0071] 图1D展示了示例性异二聚体Fc融合蛋白,其类似于图1C所展示的蛋白质,但是还包括Fc结构域多肽中的突变以减少Fcγ R结合。

[0072] 图1E展示了与图1B所展示的蛋白质类似的示例性异二聚体Fc融合蛋白,除了多亚基蛋白的第二不同亚基位于第二多肽中的第二抗体Fc结构域多肽的C末端。

[0073] 图1F展示了与图1E所展示的蛋白质类似的示例性异二聚体Fc融合蛋白,除了多亚基蛋白的第二不同亚基位于第一多肽中的第一抗体Fc结构域多肽的C末端。

[0074] 图2A展示了示例性异二聚体Fc融合蛋白,其包含多亚基蛋白的第一亚基,所述亚基通过接头与第一抗体Fc结构域多肽连接;以及多亚基蛋白的第二不同亚基,所述亚基通过另一个接头与第二抗体Fc结构域多肽连接,其中亚基通过两个二硫键连接。第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变,并且Fc结构域多肽之间的二硫键稳定异二聚体。所展示的蛋白质还包括Fc结构域多肽中的突变以减少Fcγ R结合。

[0075] 图2B展示了示例性异二聚体Fc融合蛋白,其包含多亚基蛋白的第一亚基,所述亚基通过接头与第一抗体Fc结构域多肽连接;以及多亚基蛋白的第二不同亚基,所述亚基通过另一个接头与第二抗体Fc结构域多肽连接,其中亚基通过一个非天然二硫键连接。在所示的示例性蛋白质中,天然二硫键已经被去除并用人工二硫键替换。例如,IL-12构建体可以掺入突变p35-V185C/C74S和p40-Y292C/C177S。第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变,并且Fc结构域多肽之间的二硫键稳定异二聚体。蛋白质还包括Fc结构域多肽中的突变以减少Fcγ R结合。

[0076] 图3A展示了示例性异二聚体Fc融合蛋白,其包含多亚基蛋白的第一亚基,所述亚基通过接头与第一抗体Fc结构域多肽连接;以及多亚基蛋白的第二不同亚基,所述亚基通过具有相同氨基酸序列的另一个接头与第二抗体Fc结构域多肽连接。第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变,并且Fc结构域多肽之间的二硫键稳定异二聚体。

[0077] 图3B展示了示例性异二聚体Fc融合蛋白,其包含多亚基蛋白的第一亚基,所述亚基通过接头与第一抗体Fc结构域多肽连接;以及多亚基蛋白的第二不同亚基,所述亚基通过另一个接头与第二抗体Fc结构域多肽连接。第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变,并且Fc结构域多肽之间的二硫键稳定异二聚体。连接多亚基蛋白的第二不同亚基与第二抗体Fc结构域多肽的接头可以包括$(G4S)_2$(SEQ IDNO:109)或G4S(SEQ ID NO:110)。

[0078] 图4A-图4L展示了示例性scFv融合异二聚体Fc融合蛋白构建体(图4A-4H)和mAb融合异二聚体Fc融合蛋白构建体(图4I-4L),其中多亚基蛋白的第一亚基通过接头与第一抗体Fc结构域多肽连接,并且多亚基蛋白的第二不同亚基通过另一个接头与第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0079] 图4A-图4D展示了示例性Fc融合蛋白,其包括连接至第一抗体Fc结构域多肽的C末端的第一scFv和连接至第二抗体Fc结构域多肽的C末端的第二scFv。第一scFv和第二scFv可以相同或不同(例如,与不同抗原结合或与单个抗原上的不同表位结合)。图4A和图4C所展示的示例性Fc融合蛋白包含不同的异二聚化Fc变体对。图4B和图4D所展示的示例性Fc融合蛋白包含不同的异二聚化Fc变体对。例如,在异二聚化突变包括“杵臼结构(knobs-into-holes)”突变的情况下,图4A和图4D展示了示例性Fc融合蛋白,其中第一多肽包含一个或多个“臼(hole)”突变,而第二多肽包含一个或多个“杵(knob)”突变;图4B和图4C展示了示例性Fc融合蛋白,其中第一多肽包含一个或多个“杵”突变,而第二多肽包含一个或多个“臼”突变。图4A和图4B展示了示例性Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的第一亚基的蛋白序列与第一多肽连接;图4C和图4D展示了示例性Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的第二不同亚基与第一多肽连接。类似地考虑了具有其他类型的异二聚化突变的异二聚体Fc融合蛋白。

[0080] 图4E和图4G展示了示例性Fc融合蛋白,其包括连接至第一抗体Fc结构域多肽的C末端的scFv。

[0081] 图4F和图4H展示了示例性Fc融合蛋白,其包括连接至第二抗体Fc结构域多肽的C末端的scFv。

[0082] 图4I-图4L展示了示例性Fc融合蛋白,其包括连接至第一抗体Fc结构域多肽的N末端的第一Fab和连接至第二抗体Fc结构域多肽的N末端的第二Fab。图4I和图4K展示了示例性Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的第一亚基与第一多肽连接;图4J和图4L展示了示例性Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的第二不同亚基与第一多肽连接。图4K与图4I的不同之处在于具有更长的氨基酸序列(例如,本文公开的间隔肽),其连接抗体Fc结构域多肽与多亚基蛋白的第一亚基;图4J与图4L的不同之处在于具有更长的氨基酸序列(例如,本文公开的间隔肽),其连接抗体Fc结构域多肽与多亚基蛋白的第一亚基。

[0083] 图5A-图5C是示出接种CT26肿瘤细胞并用重组小鼠IL-12(rmIL-12)(图5A)、DF-mIL-12-Fc wt(图5B)、DF-mIL-12-Fc si(图5C)或mIgG2a同种型对照每周处理一次的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0084] 图6是示出接种CT26肿瘤细胞并用rmIL-12、DF-mIL-12-Fc wt、DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型对照每周处理一次的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线的图。

[0085] 图7A-图7D是示出接种CT26肿瘤细胞并用DF-mIL-12-Fc wt以1μg rmIL-12的摩尔当量(图7A)、DF-mIL-12-Fc si以1μg rmIL-12的摩尔当量(图7B)、DF-mIL-12-Fc wt以0.1μ

g rmIL-12的摩尔当量(图7C)、DF-mIL-12-Fc si以0.1μg rmIL-12的摩尔当量(图7D)或mIgG2a同种型对照每周处理一次的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0086] 图8是示出接种CT26肿瘤细胞并用DF-mIL-12-Fc wt以1μgrmIL-12的摩尔当量、DF-mIL-12-Fc si以1μg rmIL-12的摩尔当量、DF-mIL-12-Fc wt以0.1μg rmIL-12的摩尔当量、DF-mIL-12-Fc si以0.1μgrmIL-12的摩尔当量或mIgG2a同种型对照每周处理一次的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线的图。

[0087] 图9A-图9C是示出接种B16F10黑色素瘤细胞并用rmIL-12(图9A)、DF-mIL-12-Fc wt(图9B)、DF-mIL-12-Fc si(图9C)或mIgG2a同种型对照每周处理一次的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0088] 图10是示出接种B16F10黑色素瘤细胞并用rmIL-12、DF-mIL-12-Fc wt、DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型对照每周处理一次的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线的图。

[0089] 图11A-图11D是示出接种B16F10黑色素瘤细胞并用DF-mIL-12-Fc wt以0.5μg rmIL-12的摩尔当量(图11A)、DF-mIL-12-Fc si以0.5μg rmIL-12的摩尔当量(图11B)、DF-mIL-12-Fc wt以0.1μg rmIL-12的摩尔当量(图11C)、DF-mIL-12-Fc si以0.1μg rmIL-12的摩尔当量(图11D)或mIgG2a同种型对照每周处理一次的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0090] 图12是示出接种B16F10黑色素瘤细胞并用DF-mIL-12-Fc wt以0.5μg rmIL-12的摩尔当量、DF-mIL-12-Fc si以0.5μg rmIL-12的摩尔当量、DF-mIL-12-Fc wt以0.1μg rmIL-12的摩尔当量、DF-mIL-12-Fc si以0.1μgrmIL-12的摩尔当量或mIgG2a同种型对照每周处理一次的小鼠的Kaplan-Meier存活曲线的图。

[0091] 图13A是示出使用HEK-Blue IL-12报告物测定得到的对用DF-hIL-12-Fc si(DF IL-12-Fc)或重组人IL-12(rhIL-12)处理的IL-12反应的图。

[0092] 图13B是示出响应于用DF-hIL-12-Fc si(DF IL-12-Fc)和rhIL-12处理的外周血单核细胞(PBMC)的IFNγ产生的图。

[0093] 图14是示出在10μg/kg的等摩尔量的DF-hIL-12-Fc si或野生型rhIL-12的单次静脉内剂量后食蟹猴K2 EDTA血浆中DF-hIL-12-Fc si、rhIL-12和IFNγ的相对血浆浓度的图。

[0094] 图15A-图15B是示出幼稚(naïve)Balb/c小鼠中rmIL-12(图15A)和DF-mIL-12-Fc si(图15B)的PK/PD谱的图。图15A示出了幼稚Balb/c小鼠中rmIL-12的PK/PD谱,并且图15B示出了幼稚Balb/c小鼠IL-12中DF-mIL-12-Fc si的PK/PD谱。通过ELISA分析血清中的IL-12和IFNγ水平。图15C是示出幼稚Balb/c小鼠中静脉内施用的DF-mIL-12-Fc si的PK/PD谱的图。图15D是示出幼稚Balb/c小鼠中腹膜内施用的DF-mIL-12-Fc si的PK/PD谱的图。图15E是示出幼稚Balb/c小鼠中皮下施用的DF-mIL-12-Fc si的PK/PD谱的图。平均血清水平表示平均值±SEM。

[0095] 图16A-图16C是示出用DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1或其组合处理的携带B16F10肿瘤的小鼠的肿瘤生长曲线的图。用0.5μg同种型对照或0.5μgDF-mIL-12-Fc si(图16A)、同种型对照或抗PD-1(图16B)和同种型对照或DF-mIL-12-Fc si/抗PD-1(图16C)腹膜内处理小鼠。如上文所指示,每周给动物注射一次DF-mIL-12-Fc si,并且每周给动物注射两次抗PD-1。评估肿瘤生长持续60天。图示出了单独小鼠的肿瘤生长曲线。

[0096] 图17A-图17B是示出用DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1或其组合处理的携带B16F10肿瘤

的小鼠的存活和体重的图。用同种型、DF-mIL-12-Fc si、抗PD-1或DF-mIL-12-Fc si和抗PD-1的组合处理小鼠。每周给动物注射一次0.5μg DF-mIL-12-Fc si,并且每周给动物注射两次200μg抗PD-1或同种型。图17A示出了Kaplan-Meier存活曲线。图17B示出了小鼠的作为平均值±标准差的体重。

[0097] 图18A-图18C是示出用DF-mIL-12-Fc si、mcFAE-C26.99TriNKET或其组合处理的携带B16F10肿瘤的小鼠的肿瘤生长曲线的图。用150μg同种型对照或0.5μg DF-mIL-12-Fc si(图18A)、同种型对照或150μgTriNKET(图18B)和同种型对照或DF-mIL-12-Fc si/TriNKET(图18C)腹膜内处理小鼠。如上文所指示,每周给动物注射一次DF-mIL-12-Fc si,并且每周给动物注射三次TriNKET。评估肿瘤生长持续72天。图示出了单独小鼠的肿瘤生长曲线。

[0098] 图19A-图19B是示出用DF-mIL-12-Fc si、mcFAE-C26.99TriNKET或其组合处理的携带B16F10肿瘤的小鼠的存活和体重的图。用同种型、DF-mIL-12-Fc si、TriNKET或DF-mIL-12-Fc si和TriNKET的组合处理小鼠。每周给动物注射一次0.5μg DF-mIL-12-Fc si,并且每周给动物注射三次150μg TriNKET或同种型。图19A示出了Kaplan-Meier存活曲线。图19B示出了小鼠的作为平均值+标准差的体重。

[0099] 图20是示出来自图18的B16F10肿瘤模型实验的完全反应者(CR)小鼠的肿瘤生长曲线的图,所述小鼠用DF-mIL-12-Fc si/TriNKET组合疗法处理(n=3),通过植入2x 10^5个B16F10黑色素瘤细胞再激发。

[0100] 图21A是示出接种CT26肿瘤细胞并施用单剂量的DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0101] 图21B是示出接种CT26肿瘤细胞并施用每周剂量的DF-mIL-12-Fc si、mIgG2a同种型或rmIL-12的小鼠的体重±标准差的图。

[0102] 图21C是示出当在CT26肿瘤模型中先前施用单剂量的DF-mIL-12-Fc si时作为幼稚或完全反应者(CR)的再激发的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0103] 图22A-图22B是示出接种CT26肿瘤细胞并腹膜内(IP)(图22A)或皮下(SC)(图22B)施用每周剂量的DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0104] 图23是示出接种B16F10黑色素瘤细胞并施用单剂量的DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0105] 图24A-图24B是示出接种B16F10黑色素瘤细胞并腹膜内(IP)(图24A)或皮下(SC)(图24B)施用每周剂量的DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0106] 图25A-图25B是示出接种CT26肿瘤细胞并以1μg rmIL-12的摩尔当量腹膜内施用单剂量(图25A)或每周一次剂量(图25B)的DF-mIL-12-Fc si或mIgG2A同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0107] 图26A-图26B是示出接种CT26肿瘤细胞并皮下施用每周一次剂量的DF-mIL-12-Fc si的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图26A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μg mIgG2a同种型对照或1μg DF-mIL-12-Fc si处理一次(每周)的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图26B是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μg mIgG2a同种型对照或2μg DF-mIL-12-Fc si处理一次(每周)的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0108] 图27A-图27C是示出携带B16F10肿瘤的C57BL/6小鼠中在单剂量的DF-mIL-12-Fc si后72小时血液(左)和肿瘤(右)样品中IFNγ(图27A)、CXCL9(图27B)和CXCL10(图27C)水平的图。

[0109] 图28A-图28C是示出用单次皮下剂量的1μg/kg(图28A)、2μg/kg(图28B)或4μg/kg(图28C)的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中DF-hIL-12-Fc si的药代动力学的线形图。2240、2241、2740、2741表示单独食蟹猴受试者。

[0110] 图29A-图29F是示出用单次皮下剂量的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中IFNγ和IP10/CXCL10的浓度的线形图。图29A、29C和29E分别示出了用1μg/kg、2μg/kg和4μg/kg的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中IFNγ浓度/表达水平。图29B、图29D和图29F分别示出了用1μg/kg、2μg/kg和4μg/kg的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中IP10/CXCL10浓度/表达水平。3240、3241、3740、3741表示单独食蟹猴受试者。

[0111] 图30是示出接种乳腺癌细胞并施用每周剂量的单一疗法(同种型对照、DF-mIL-12-Fc si、Doxil®(化疗)或用10Gy辐照)或组合疗法(DF-mIL-12-Fc si与Doxil®或辐射组合)的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0112] 图31A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用同种型对照或抗PD-1抗体处理(每两周)的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图31B是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用同种型对照或抗PD-1抗体处理(每两周)的Balb/c小鼠的肿瘤生长曲线的图。图31B还示出了先前用抗PD-1抗体处理的单独小鼠的肿瘤生长曲线,向所述小鼠施用抗PD-1抗体(每两周)以及1μgDF-mIL-12-Fc si的每周处理。

[0113] 图32A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用同种型对照或DF-mIL-12-Fc si瘤内处理一次(每周)的单独小鼠的处理(Tr)肿瘤的肿瘤生长曲线的图。图32B是示出图32A中所述的单独小鼠中未处理(NT)CT26-Tyrp1肿瘤的肿瘤生长曲线的图。

[0114] 图33A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μg mIgG2a同种型对照或2μg DF-mIL-12-Fc si处理一次的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图33B是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μg mIgG2a同种型对照、1μgDF-mIL-12-Fc si(每周施用)、2μg DF-mIL-12-Fc si(每周施用)或2μgDF-mIL-12-Fc si(一次)处理的单独小鼠的平均肿瘤生长曲线的图。

[0115] 图34A是示出用具有L234A、L235A和P329A突变(LALAPA)或L234A、L235A、P329G突变(LALAPG)的DF hIL-12-Fc-si处理的PHA刺激的PBMC的IFNγ产生的图。图34B示出了在存在或不存在具有LALAPA突变或LALAPG突变的DF hIL-12-Fc-si的情况下荧光团缀合的hIgG1与THP-1细胞结合的流式细胞术直方图。

具体实施方式

[0116] 本发明提供了对异二聚体Fc融合蛋白、包含此类蛋白质的药物组合物以及使用此类蛋白质和药物组合物(包括用于治疗癌症)的治疗方法的改进。

[0117] 为了便于理解本发明,下文定义了许多术语和短语。

[0118] 除非上下文不恰当,否则如本文所用的术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”意指“一个或多个/一种或多种(one or more)”并且包括复数。

[0119] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”是指待通过本文所述的方法和组合物治疗的生物体。此类生物体优选地包括但不限于哺乳动物(例如,鼠、猿、马、牛、猪、犬、猫等),并且

更优选地包括人。

[0120] 如本文所用,术语“有效量”是指足以产生有益或期望的结果(例如,期望的预防或治疗效果)的化合物(例如,本发明的化合物)的量。有效量可以在一次或多次施用、一次或多次应用或一个或多个剂量中施用,并且不旨在限于特定的配制品或施用途径。如本文所用,术语“治疗”包括导致病症、疾病、障碍等的改善或减轻其症状的任何作用,例如减少、降低、调节、减轻或消除。

[0121] 如本文所用,术语“药物组合物”是指活性剂与惰性或活性载体的组合,使得所述组合物特别适合于体内或离体的诊断或治疗用途。

[0122] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指任何标准药物载体,如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳剂(例如像油/水或水/油乳剂)和各种类型的润湿剂。所述组合物还可以包括稳定剂和防腐剂。对于载体、稳定剂和佐剂的例子,参见例如Martin,Remington's Pharmaceutical Sciences,第15版,Mack Publ.Co.,Easton,PA[1975]。

[0123] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指本发明的化合物的任何药学上可接受的盐(例如,酸或碱),其在施用给受试者时能够提供本发明的化合物或其活性代谢物或残余物。如本领域技术人员已知的,本发明的化合物的“盐”可以源自无机酸或有机酸和无机碱或有机碱。示例性酸包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、高氯酸、富马酸、马来酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水杨酸、琥珀酸、对甲苯磺酸、酒石酸、乙酸、柠檬酸、甲磺酸、乙磺酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、萘-2-磺酸、苯磺酸等。其他酸(如草酸)虽然本身不是药学上可接受的,但可以用于制备盐,所述盐可用作在获得本发明的化合物及其药学上可接受的酸加成盐时的中间体。

[0124] 示例性碱包括但不限于碱金属(例如,钠)氢氧化物、碱土金属(例如,镁)氢氧化物、氨和式NW_4^+的化合物(其中W是C_{1-4}烷基)等。

[0125] 示例性盐包括但不限于:乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、氟庚酸盐(flucoheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、苯丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐等。盐的其他例子包括与合适的阳离子如Na^+、NH_4^+和NW_4^+(其中W是C_{1-4}烷基)等复合的本发明的化合物的阴离子。

[0126] 对于治疗用途,本发明的化合物的盐被认为是药学上可接受的。然而,非药学上可接受的酸和碱的盐也可以用于例如制备或纯化药学上可接受的化合物。

[0127] 在整个说明书中,在组合物被描述为具有、包括或包含特定组分的情况下,或者在过程和方法被描述为具有、包括或包含特定步骤的情况下,考虑了另外存在基本上由所列举的组分组成或由所列举的组分组成的本发明的组合物,以及存在基本上由所列举的处理步骤组成或由所列举的处理步骤组成的根据本发明的过程和方法。

[0128] 一般而言,除非另外规定,否则指定百分比的组合物是按重量计的。此外,如果变量没有伴随定义,则以所述变量的先前定义为准。

I.蛋白质

[0129] 本发明提供了Fc融合蛋白构建体,其包含多亚基蛋白的氨基酸序列。这些融合蛋

白构建体可以表现出与原生/天然多亚基蛋白相比更高的血清半衰期、生产期间改进的产量、储存期间增强的稳定性和/或当用作治疗剂时改进的功效。

IgG1 Fc融合蛋白

[0130] 在一个方面,本发明提供了异二聚体IgG1 Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:第一多肽,其包含第一抗体IgG1 Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含与所述第一抗体Fc结构域结合的第二抗体IgG1 Fc结构域多肽,其中所述第一多肽还包含多亚基蛋白的第一亚基,所述第一亚基通过包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:237)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:6)的接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,其中X$_1$表示L或A,X$_2$表示L、E或A,并且X$_3$表示A或G;所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且所述多亚基蛋白的亚基彼此结合;当X$_1$表示L和/或X$_2$表示L时,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽中的至少一种包含用于促进异二聚化的Q347R突变。

[0131] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:237)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:6)组成,其中X$_1$表示L或A,X$_2$表示L、E或A,并且X$_3$表示A或G。

[0132] 在某些实施方案中,连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头还包含间隔肽。在某些实施方案中,所述接头包含SEQ ID NO:237或SEQ ID NO:6的序列和间隔肽。

[0133] 在某些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含序列PKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:237)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:6)(其中X$_1$表示L或A,X$_2$表示L、E或A,并且X$_3$表示A或G)和间隔肽。在某些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:237)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:6)(其中X$_1$表示L或A,X$_2$表示L、E或A,并且X$_3$表示A或G)组成。在某些实施方案中,连接所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽的接头的氨基酸序列和连接所述多亚基蛋白的亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头的氨基酸序列相同。

[0134] 可以采用在标题“间隔肽”下描述的任何间隔肽。例如,在某些实施方案中,所述间隔肽包含SEQ ID NO:107-120中任一个所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述间隔肽由SEQ ID NO:107-120中任一个所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,连接多亚基蛋白的所述亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头由本文公开的间隔肽和具有SEQ ID NO:237或SEQ ID NO:6的序列的肽组成,或者基本上由其组成。在某些实施方案中,连接所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽的接头由本文公开的间隔肽和具有SEQ ID NO:237或SEQ ID NO:6的序列的肽组成,或者基本上由其组成。在某些实施方案中,所述间隔肽在所述接头中的任一个或两个的N末端。

[0135] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,在所述异二聚

体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)或EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:9)组成。

[0136] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)。在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)组成。

[0137] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:244)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:244)组成。

[0138] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)组成。

[0139] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)或EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:7)。在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)或EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:7)组成。

[0140] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:241)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:241)组成。

[0141] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)或GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:242)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:242)组成。

[0142] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同

亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:243)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:243)组成。

[0143] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:65)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:245)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:65)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:245)组成。

[0144] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)或GGGGSGGGGSPLSSDLTJTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:246)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:246)组成。

[0145] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:11)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)。在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:11)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)组成。

[0146] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:247)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:247)组成。

[0147] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:248)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:248)组成。

[0148] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:249)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc

结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:249)组成。

[0149] 在某些实施方案中,所述Fc结构域多肽是IgG1 Fc的Fc结构域多肽。在一些实施方案中,本发明的蛋白质包括第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽,其都是促进与彼此的异二聚化的突变的IgG1 Fc结构域多肽。例如,如果所述Fc结构域源自人IgG1的Fc,则所述Fc结构域可以包含如下氨基酸序列,其与人IgG1抗体的氨基酸234-332至少90%相同且在选自以下的一个或多个位置处不同:Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和K439。

[0150] 在一些实施方案中,所述抗体恒定结构域可以包含如下氨基酸序列,其与人IgG1抗体的氨基酸234-332至少90%相同且不同之处在于选自以下的一个或多个取代:Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。本文公开的Fc结构域或铰链区中的所有氨基酸位置都根据EU编号进行编号。

[0151] 在一些实施方案中,所述第一抗体IgG1 Fc结构域多肽包括选自K360E和K409W的一个或多个突变,并且所述第二抗体IgG1 Fc结构域多肽包括选自Q347R、D399V和F405T的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一抗体IgG1 Fc结构域多肽包括选自Q347R、D399V和F405T的一个或多个突变,并且所述第二抗体IgG1 Fc结构域多肽包括选自K360E和K409W的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一抗体IgG1 Fc结构域多肽包括突变K360E和K409W,并且所述第二抗体IgG1 Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T。在一些实施方案中,所述第一抗体IgG1 Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二抗体IgG1 Fc结构域多肽包括突变K360E和K409W。

[0152] 在一些实施方案中,本发明的具有IgG1 Fc的异二聚体Fc融合蛋白包括在所述第一多肽和/或所述第二多肽中的一个或多个突变以减少与Fcγ R(例如,FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA或FcγRIIIB)或补体组分(例如,C1q)的结合。此类突变可用于降低效应子功能。例如,本公开文本的蛋白质包括LALA(L234A和L235A)突变、LALAPA(L234A、L235A和P329A)突变、LALAPG(L234A、L235A和P329G)突变或LALEGAASPS(L234A、L235E、G237A、A330S和P331S)突变。

[0153] 在一些实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括第一抗体IgG4或IgG1 Fc结构域多肽和第二抗体IgG4或IgG1 Fc结构域多肽,其各自含有突变P329G或P329A。在具体的实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包含第一抗体IgG4或IgG1 Fc结构域多肽和第二抗体IgG4或IgG1 Fc结构域多肽,其各自包含突变P329A。

[0154] 在一些实施方案中,所述第一IgG1抗体Fc结构域多肽和所述第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽各自含有选自A330S和P331S的突变。在一些实施方案中,所述第一IgG1抗体Fc结构域多肽和所述第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽各自含有突变A330S和P331S。

[0155] 在某些实施方案中,在IgG1 Fc单体之间引入另外的二硫键,这改进了所述异二聚

体的稳定性。在一个示例性实施方案中,与多亚基蛋白的所述第一亚基融合的第一抗体Fc结构域多肽包括在CH3结构域中的Y349C取代,其和与多亚基蛋白的所述第二不同亚基融合的第二抗体Fc结构域多肽上的S354C取代形成二硫键。可替代地,与多亚基蛋白的所述第一亚基融合的第一抗体Fc结构域多肽包括在CH3结构域中的S354C取代,其和与多亚基蛋白的所述第二不同亚基融合的第二抗体Fc结构域多肽上的Y349C取代形成二硫键。

[0156] 下表2中提供的任何IgG1抗体Fc结构域多肽可以与下表1中提供的任何IgG1铰链序列(其在本发明中是连接所述多亚基蛋白的第一亚基的蛋白质序列与所述第一IgG1抗体Fc结构域多肽的接头或连接所述另外的亚基与所述第二不同IgG1抗体Fc结构域多肽的接头的部分或全部)组合使用。示例性IgG1铰链-Fc结构域多肽提供于下表3中。在某些实施方案中,所述Fc融合蛋白的第一多肽和第二多肽分别包含SEQ ID NO:212和212;213和214;215和216;217和218;214和213;216和215;或218和217的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述Fc融合蛋白的第一多肽和第二多肽分别包含SEQ ID NO:228和228;229和230;231和232;233和234;235和236;230和229;232和231;234和233;236和235;228和250;250和228;250和250;229和252;252和229;251和230;230和251;253和232;232和253;231和254;254和231;255和234;234和255;233和256;256和233;257和236;236和257;258和235;或235和258的氨基酸序列。

IgG4 Fc融合蛋白

[0157] 在一个方面,本发明提供了对多亚基蛋白的改进。在一个方面,本发明提供了异二聚体IgG4 Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:第一多肽,其包含第一抗体IgG4 Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含与所述第一抗体Fc结构域多肽结合的第二不同抗体IgG4 Fc结构域多肽,其中所述第一多肽还包含多亚基蛋白的第一亚基,所述第一亚基通过包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(SEQ ID NO:1)的接头与所述第一抗体IgG4 Fc结构域多肽融合,其中X表示L或E;所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二抗体IgG4 Fc结构域多肽融合,并且所述多亚基蛋白的亚基彼此结合;所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体IgG4 Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变。

[0158] 在一些实施方案中,在所述异二聚体IgG4 Fc融合蛋白内,连接多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(其中X表示L或E)(SEQ ID NO:1)组成。

[0159] 在某些实施方案中,连接多亚基蛋白的第一亚基的蛋白质序列与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头还包含间隔肽。在某些实施方案中,所述接头包含SEQ ID NO:1的序列和间隔肽。

[0160] 在某些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(其中X表示L或E)(SEQ ID NO:1)和间隔肽。在某些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(其中X表示L或E)(SEQ ID NO:1)组成。在某些实施方案中,连接所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽的接头的氨基酸序列和连接所述多亚基蛋白的亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头的氨基酸序列相同。

[0161] 可以采用在标题“间隔肽”下描述的任何间隔肽。例如,在某些实施方案中,所述间

隔肽包含SEQ ID NO:107-120中任一个所示的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述间隔肽由SEQ ID NO:107-120中任一个所示的氨基酸序列组成。在某些实施方案中,连接所述多亚基蛋白的亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头由本文公开的间隔肽和SEQ ID NO:1组成,或者基本上由其组成。在某些实施方案中,所述接头由本文公开的间隔肽和SEQ ID NO:1组成,或者基本上由其组成。在某些实施方案中,所述间隔肽在所述第一接头和/或所述第二接头的N末端。

[0162] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)。在一些实施方案中,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)组成。

[0163] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)组成。

[0164] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)组成。

[0165] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)组成。

[0166] 在一些实施方案中,在所述异二聚体Fc融合蛋白内,连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽的接头包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,将所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)组成。

[0167] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)组成。

[0168] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)组成。

[0169] 在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID

NO:64)。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,所述接头由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)组成。

[0170] 在某些实施方案中,所述Fc结构域多肽是IgG4 Fc的Fc结构域多肽。IgG4是不稳定的二聚体,其可以与体内的其他IgG4抗体进行Fab臂交换和配对。在某些实施方案中,将S228P突变引入铰链(其在本发明中是连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽的接头或连接所述另外的亚基与所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽的接头的部分或全部)内,这增加了铰链区的稳定性并减少了Fab臂交换的机会。在某些实施方案中,在Fc结构域多肽单体之间引入另外的二硫键,这改进了所述异二聚体的稳定性。在一个示例性实施方案中,连接至所述多亚基蛋白的第一亚基的第一抗体Fc结构域多肽包括在CH3结构域中的Y349C取代,其与连接至所述多亚基蛋白第二抗体Fc结构域多肽的第二不同亚基的第二抗体Fc结构域多肽上的S354C取代形成二硫键。可替代地,连接至所述多亚基蛋白的第一亚基的第一抗体Fc结构域多肽包括在CH3结构域中的S354C取代,其与连接至所述多亚基蛋白的第二不同亚基的第二抗体Fc结构域多肽上的Y349C取代形成二硫键。

[0171] 在一些实施方案中,本发明的蛋白质包括第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽,其都是促进与彼此的异二聚化的突变的IgG4 Fc结构域多肽。

[0172] 在一些实施方案中,所述第一抗体IgG4 Fc结构域多肽包括选自K360E、K370E和R409W的一个或多个突变,并且所述第二抗体IgG4 Fc结构域多肽包括选自E357N、Q347R、D399V和F405T的一个或多个突变。在一些实施方案中,所述第一抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变K370E和R409W,并且所述第二抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变E357N、D399V和F405T。在一些实施方案中,所述第一抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变E357N、D399V和F405T,并且所述第二抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变K370E和R409W。在一些实施方案中,所述第一抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变K360E和R409W,并且所述第二抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T。在一些实施方案中,所述第一抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二抗体IgG4 Fc结构域多肽包括突变K360E和R409W。

[0173] 在一些实施方案中,本发明的具有IgG4 Fc的异二聚体Fc融合蛋白包括在所述第一多肽和/或所述第二多肽中的一个或多个突变以减少与Fcγ R(例如,FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA或FcγRIIIB)或补体组分(例如,C1q)的结合。此类突变可用于降低效应子功能。例如,本公开文本的蛋白质包括SPLE(S228P和L235E)突变、SPLEPA(S228P、L235E和P329A)突变或SPLEPG(S228P、L235E和P329G)突变。

[0174] 表2中提供的任何IgG4抗体Fc结构域多肽可以与表1中提供的任何IgG4铰链序列(其在本发明中是连接所述多亚基蛋白的第一亚基与所述第一IgG4抗体Fc结构域多肽的接头或连接所述多亚基蛋白的第二不同亚基与所述第二不同IgG4抗体Fc结构域多肽的接头的部分或全部)组合使用。示例性IgG4铰链-Fc结构域多肽提供于表3中。在某些实施方案中,所述Fc融合蛋白的第一多肽和第二多肽分别包含SEQ ID NO:205和205;206和207;208和209;210和211;207和206;209和208;或211和210的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述Fc融合蛋白的第一多肽和第二多肽分别包含SEQ ID NO:219和219;220和221;222和223;224和225;226和227;221和220;223和222;225和224;或227和226的氨基酸序列。

二硫键

[0175] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包括多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的天然异二聚体二硫键。例如,在一个示例性实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括IL-12的p35与p40亚基之间的天然异二聚体二硫键。这种蛋白质包括p35的C74与p40的C177之间的天然二硫键。

[0176] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包括多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。例如,在一个示例性实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括IL-12的p35与p40亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。这种蛋白质包括p35的V185C与p40的Y292C之间的人工或工程化的二硫键。

[0177] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包括多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的天然异二聚体二硫键、以及多亚基蛋白的第一亚基与所述多亚基蛋白的第二不同亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。例如,在一个示例性实施方案中,IL-12的p35与p40亚基之间的天然异二聚体二硫键,并且包括IL-12的p35与p40亚基之间的人工或工程化的异二聚体二硫键。这种蛋白质包括p35的C74与p40的C177之间的天然二硫键、以及p35的V185C与p40的Y292C之间的人工或工程化的二硫键。

[0178] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白被工程化以去除天然二硫键,然后用非天然的人工或工程化的二硫键替换它。例如,在一个示例性实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括IL-12的其中天然C74被突变为丝氨酸的p35、以及IL-12的其中天然C177被突变为丝氨酸的p40,从而去除IL-12的p35与p40亚基之间的天然二硫键。向该突变的IL-12中引入两个新的突变,即p35上的V185C和p40上的Y292C,从而引入非天然的人工或工程化的二硫键。

Fc融合多肽的组分的序列

[0179] 本发明的示例性异二聚体Fc融合蛋白用下表1-2中所述的IgG1或IgG4 Fc变体序列中的任一个和相应的接头序列中的任一个来构建。本发明的融合蛋白构建体可以赋予与原生/天然(native/natural)多亚基蛋白相比更高的血清半衰期,改进生产期间的蛋白质产量,增强储存期间的稳定性,和/或改进当用作治疗剂时的功效。

[0180] 表4和5列出了本发明的示例性蛋白质构建体的氨基酸序列。Fc结构域多肽中的所有突变/取代都根据EU编号系统进行编号。p35和p40亚基中的突变从这些亚基的对应N末端氨基酸开始编号。

[0181] 下表2中提供的任何IgG4抗体Fc变体结构域多肽可以与下表1中提供的任何IgG4铰链序列组合使用。类似地,下表2中提供的任何IgG1抗体Fc变体结构域多肽可以与下表1中提供的任何IgG1铰链序列组合使用。示例性IgG1铰链-Fc结构域多肽提供于下表3中。

表1:接头变体

铰链	氨基酸序列
IgG4铰链共有序列	RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG 其中X是L或E（SEQ ID NO: 1）
IgG4铰链S228P	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGG (SEQ ID NO:2)
IgG4铰链S228P/L235E	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GG (SEQ ID NO:4)
IgG1铰链共有序列	EPKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$ 其中X$_1$是L或A；X$_2$是L、E或A；并且X$_3$是A或G（SEQ ID NO: 6）
IgG1铰链C220S	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO:7)
IgG1铰链C220S/ L234A/L235A	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GG (SEQ ID NO:9)
IgG1铰链C220S/ L234A/L235E/G237A	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A** (SEQ ID NO:11)
IgG1铰链ΔE216	PKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$ 其中X$_1$是L或A；X$_2$是L、E或A；并且X$_3$是A或G（SEQ ID NO: 237）
IgG1铰链ΔE216/C220S	PKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO:238)
IgG1铰链 ΔE216/C220S/ L234A/ L235A	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GG (SEQ ID NO:239)
IgG1铰链 ΔE216/C220S/ L234A/L235E/ G237A	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A** (SEQ ID NO:240)

表2:IgG4 Fc和IgG1 Fc野生型序列;以及示例性IgG4抗体Fc变体和IgG1抗体Fc变体序列(氨基酸取代以粗体指示)

Fc结构域	**氨基酸序列***
IgG4 Fc野生型	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:205)
IgG4 Fc Y349C/ K370E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSQEEMTKNQVSLTCV **E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:206)
IgG4 Fc S354C/ E357N/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP**C**QE**N**MTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:207)
IgG4 Fc Y349C/ K360E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:208)
IgG4 Fc Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:209)
IgG4 Fc P329A/ Y349C/ K360E/ R409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGL**A**SSIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:210)

IgG4 Fc P329A/ S354C/ Q347R/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLASSIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:211)
IgG1 Fc野生型	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:212)
IgG1 Fc Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:213)
IgG1 Fc Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:214)
IgG1 Fc P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:215)
IgG1 Fc P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:216)
IgG1 Fc A330S/ P331S/ Y349C/ K360E/ K409W	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:217)
IgG1 Fc A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:218)

*氨基酸序列还可以在C末端包含赖氨酸(K)。

表3:S228P突变的IgG4铰链-Fc(野生型);示例性的S228P突变的IgG4铰链-Fc变体

或铰链部分-Fc变体;C220S突变的IgG1铰链-Fc(野生型);示例性的C220S突变的IgG1铰链-Fc变体或铰链部分-Fc变体

接头-Fc	氨基酸序列*
IgG4铰链-Fc S228P	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:219)
IgG4铰链-Fc S228P/ Y349C/ K370E/ R409W	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV**E**GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:220)
IgG4铰链-Fc S228P/ S354C/ E357N/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPP**C**QE**N**MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:221)
IgG4铰链-Fc S228P/ Y349C/ K360E/ R409W	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:222)
IgG4铰链-Fc S228P/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:223)
IgG4铰链-Fc S228P/ L235E/ Y349C/ K360E/ R409W	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:224)
IgG4铰链-Fc S228P/ L235E/ S354C/ Q347R/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:225)
IgG4铰链-Fc S228P/ L235E/ P329A/ Y349C/ K360E/ R409W	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL**A**SSIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSQEEMT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:226)

IgG4铰链-Fc S228P/ L235E/ P329A/ S354C/ Q347R/ D399V/ F405T	RVESKYGPPCP**P**CPAPEF**E**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL**A**SSIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:227)
IgG1铰链-Fc C220S	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:228)
IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S	PKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:250)
IgG1铰链-Fc C220S/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:229)
IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ Y349C/ K360E/ K409W	PKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:251)
IgG1铰链-Fc C220S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:230)
IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKS**S**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:252)
IgG1铰链-Fc C220S/ L234A/ L235A/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:231)

IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ Y349C/ K360E/ K409W	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:253)
IgG1铰链-Fc C220S/ L234A/ L235A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:232)
IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:254)
IgG1铰链-Fc C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP QV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:233)
IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Y349C/ K360E/ K409W	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP QV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:255)
IgG1铰链-Fc C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:234)
IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235A/ P329A/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP **R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:256)
IgG1铰链-Fc C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Y349C/ K360E/ K409W	EPKS**S**DKTHTCPPCPAPE**AE**G**A**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREPQ V**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:235)

IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Y349C/ K360E/ K409W	PKSSDKTHTCPPCPAPE**A**E**G**A**P**SVFLFPPKPKDTLMI**S**RTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREPQV **C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:257)
IgG1铰链-Fc C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	EPKSSDKTHTCPPCPAPE**A**E**G**A**P**SVFLFPPKPKDTLMI**S**RTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREP**R** VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:236)
IgG1铰链-Fc ΔE216/C220S/ L234A/ L235E/ G237A/ A330S/ P331S/ Q347R/ S354C/ D399V/ F405T	PKSSDKTHTCPPCPAPE**A**E**G**A**P**SVFLFPPKPKDTLMI**S**RTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREP**R**V YTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:258)

*氨基酸序列还可以在C末端包含赖氨酸(K)。

表4:示例性异二聚体Fc融合多肽构建体

接头序列	**异二聚体Fc融合蛋白的序列***	**IgG（IL-12亚基）的类型；突变/取代**
构建体101		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 129） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 130） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体102		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 131） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 132） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体103		

RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 133） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P和L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 134） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P和L235E
构建体104		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 135） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

	RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 136） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
构建体106		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO:238)	（SEQ ID NO: 137） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 259）	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代：Y349C 上铰链中的C220被突变为S

	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO:8)	（SEQ ID NO: 138） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GS EPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体107		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	（SEQ ID NO: 139） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST	IgG1Fc沉默 （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S

	YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 260） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 140） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S
构建体108		

EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	（SEQ ID NO: 141） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 261） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSSDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 142） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
构建体110		
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO:11) 或者 PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO:240)	（SEQ ID NO: 143） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 262） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代：Y349C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S

	WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS PKSS DKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 144） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S
构建体111		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 145） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 146） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCQENMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体112		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 147） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSRVES KYGPPCPPCP APEFLGG (SEQ ID NO:13)	（SEQ ID NO: 148） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF	IgG4 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进

	TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	热稳定性的取代：S228P
构建体113		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 149） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSRVESKYG PPCPPCPAPE FLGG (SEQ ID NO:14)	（SEQ ID NO: 150） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCQENMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体114		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO:238)	（SEQ ID NO: 151）	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代：

	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 263） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Y349C 上铰链中的C220被突变为S
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 152）	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C

	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTL PPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	上铰链中的C220被突变为S
构建体115		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO:238)	（SEQ ID NO: 153） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 264） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S

	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 154） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体116		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO:238)	（SEQ ID NO: 155） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 265）	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S

	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGG (SEQ ID NO:16)	（SEQ ID NO: 156） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPRV YTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体117		
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO:8) 或者 GGGGSGGG GSGGGGSPK SSDKTHTCPP CPAPELLGG (SEQ ID NO:241)	（SEQ ID NO: 157） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S

	或者 （SEQ ID NO: 266） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GS PKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 158） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPRVY TLPPCRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体118		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (SEQ ID NO:15) 或者 GGGGSPKSS DKTHTCPPC PAPELLGG (SEQ ID NO:242)	（SEQ ID NO: 159） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S

	LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG 或者 （SEQ ID NO: 267） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGGS PKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 160） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS GGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体119		

GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE LLGG (SEQ ID NO:15) 或者 GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO:242)	（SEQ ID NO: 161） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG 或者 （SEQ ID NO: 268） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGGS PKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失）
GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 162） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C

	HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	（亚基之间的天然二硫键被缺失）
构建体119-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 163） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 164） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体119-2		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 165） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W

	ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 166） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体119-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 167） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P和L235E

GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 168） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P和L235E
构建体119-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 169） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P、L235E、P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 170） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：

	PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	S228P、L235E、P329A
构建体119-5		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO:238)	（SEQ ID NO: 171） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 269） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO:8)	（SEQ ID NO: 172） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C

	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	上铰链中的C220被突变为S
构建体119-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	（SEQ ID NO: 173） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 270） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化 突变：K360E/K409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S

GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 174） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S
构建体119-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	（SEQ ID NO: 175） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 271） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S

	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 176） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S、V185C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
构建体119-8		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO:11) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (SEQ ID NO:240)	（SEQ ID NO: 177） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 272）	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S

	IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 178） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S、V185C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S
构建体120		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 179） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

	SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 180） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体120-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 181） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 182） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留）

	PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPCQEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体120-2		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 183） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P和L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 184） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P和L235E
构建体120-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 185） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W

	WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 186） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
构建体120-4		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPELL GG (SEQ ID NO:238)	（SEQ ID NO: 187） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 上铰链中的C220被突变为S

	APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 273） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO:8)	（SEQ ID NO: 188） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 上铰链中的C220被突变为S
构建体120-5		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者	（SEQ ID NO: 189） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间

PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGPKS 或者 （SEQ ID NO: 274） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 190） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S

构建体120-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	（SEQ ID NO: 191） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 275） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 192） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留）

	GSEPKSSDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
构建体120-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO:11) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (SEQ ID NO:240)	（SEQ ID NO: 193） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 276） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S

	SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 194） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S
构建体121		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	（SEQ ID NO: 195） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 277） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代：Y349C 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A p40中的另外的突变：Y292C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S

	IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 196） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A p35中的另外的突变：V185C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S
构建体122		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9) 或者 PKSSDKTHT CPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:239)	（SEQ ID NO: 197） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEWASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLT VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 另外的突变Y292C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S

	或者 （SEQ ID NO: 278） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH EDPEVKFNW YVDGVEVHN AKTKPREEQ YNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLT VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 198） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 另外的突变V185C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S
构建体123		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO:11) 或者	（SEQ ID NO: 199） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代：

PKSSDKTHT CPPCPAPEAE GA (SEQ ID NO:240)	ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 或者 （SEQ ID NO: 279） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	Y349C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 另外的突变Y292C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 200） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 另外的突变V185C以引入

		IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S

*氨基酸序列还可以在C末端包含赖氨酸(K)。

表5:示例性二聚体Fc融合蛋白

接头序列	异二聚体Fc融合蛋白的序列*	IgG（IL-12亚基）的类型；突变/取代
构建体1		
RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 17） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 18） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体2		

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 19） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 20） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 21） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

	PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	用于减少FcγR结合的取代：S228P和L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 22） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P和L235E
构建体4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 23） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/R409W 用于稳定二硫键的取代：Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 24） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：

	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
构建体5		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 25） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/R409W 用于稳定二硫键的取代：Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329G
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 26） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329G
构建体6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 27） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：

	PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO:8)	（SEQ ID NO: 28） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 29） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 30） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S
构建体8		
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 31） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 32） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE	IgG1Fc沉默 （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C

	KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
构建体9		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 33） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代：Y349C 用于减少FcγR结合的取代：L234A/L235A/P329G 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 34） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1Fc沉默 （IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A、P329G 上铰链中的C220被突变为S
构建体10		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO:11)	（SEQ ID NO: 35） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变：

	WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 36） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S
构建体11		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 37） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 38） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASRVESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PCQENMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体12		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 39） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSRVES KYGPPCPPCP APEFLGG (SEQ ID NO:13)	（SEQ ID NO: 40） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC QENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF	IgG4 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进

	TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	热稳定性的取代：S228P
构建体13		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 41） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSRVESKYG PPCPPCPAPE FLGG (SEQ ID NO:14)	（SEQ ID NO: 42） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCQENMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG	IgG4 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体14		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 43） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C

	KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	上铰链中的C220被突变为S
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 44） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASEPKSSDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTL PPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLVSDGSFTLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体15		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 45） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 46） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变：

	AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体16		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 47） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSEPKSSDK THTCPPCPAP ELLGG (SEQ ID NO:16)	（SEQ ID NO: 48） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRVMSYLNASGGG GSGGGGSEPK SSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPRV YTLPPCRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL VSDGSFTLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体17		

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO:8)	（SEQ ID NO: 49） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVCTLPPSRDELTENQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSWLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1 Fc （IL-12 p35） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 50） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPRVY TLPPCRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLV SDGSFTLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1 Fc （IL-12 p40） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体18		
GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 51） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCSGGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 上铰链中的C220被突变为S

	QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 52） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS GGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 上铰链中的C220被突变为S
构建体19		
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 53） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS GGGG SEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTENQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSWLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失）
GGGGSEPKS SDKTHTCPP CPAPE LLGG (SEQ ID NO:15)	（SEQ ID NO: 54） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSEPKSSDKT	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C

	HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	（亚基之间的天然二硫键被缺失）
构建体19-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 69） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K370E/R409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 70） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： E357N/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体19-2		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 71） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W

	WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 72） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体19-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 73） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS RVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代： S228P和L235E

GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 74） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P和L235E
构建体19-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 75） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 76） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

	LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
构建体19-5		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 77） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/R409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329G
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 78） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329G
构建体19-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 79） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W p40取代：C177S、Y292C

	EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	（亚基之间的天然二硫键被缺失） 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO:8)	（SEQ ID NO: 80） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 上铰链中的C220被突变为S
构建体19-7		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 81） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代： C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 82） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S
构建体19-8		
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 83） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 84） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S、V185C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S

	TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	
构建体19-9		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 85） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失） 用于减少FcγR结合的取代： L234A/L235A/P329G 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAA GG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 86） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S V185C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329G 上铰链中的C220被突变为S
构建体19-10		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO:11)	（SEQ ID NO: 87） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：C177S、Y292C （亚基之间的天然二硫键被缺失）

	ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 88） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T p35取代：C74S、V185C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S
构建体20		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 55） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVE GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变：K370E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 56） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：E357N/D399V/F405T

	SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPCQENMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体20-1		
RVESKYGPP CPPCPAPEFL GG (SEQ ID NO:2)	（SEQ ID NO: 89） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFLGG (SEQ ID NO:3)	（SEQ ID NO: 90） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPCQEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P
构建体20-2		

RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 91） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P和L235E
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 92） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P和L235E
构建体20-3		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 93） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P

	PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLAS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 94） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLASSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329A
构建体20-4		
RVESKYGPP CPPCPAPEFE GG (SEQ ID NO:4)	（SEQ ID NO: 95） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSRVES KYGPPCPPCP APEFEGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLGS SIEKTISKAK GQPREPQVCT LPPSQEEMTE NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSWL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG	IgG4（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/R409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329G
GGGGSGGG GSGGGGSRV ESKYGPPCPP CPAPEFEGG (SEQ ID NO:5)	（SEQ ID NO: 96） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF	IgG4（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间

	NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSRVESKYGP PCPPCPAPEF EGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLGSSIEK TISKAKGQPR EPRVYTLPPC QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLVSDGSF TLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS LG	的天然二硫键被保留） 用于防止Fab臂交换和改进热稳定性的取代：S228P 用于减少FcγR结合的取代：S228P、L235E、P329G
构建体20-5		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGG (SEQ ID NO:7)	（SEQ ID NO: 97） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPELLG G (SEQ ID NO:8)	（SEQ ID NO: 98） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGSFTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 上铰链中的C220被突变为S
构建体20-6		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 99） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：

	GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 100） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A 上铰链中的C220被突变为S
构建体20-7		
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 101） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCS VMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变：K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 102） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 上铰链中的C220被突变为S
构建体20-8		
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 103） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALG APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329G 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 104） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGGGSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALGAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329G

	TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	上铰链中的C220被突变为S
构建体20-9		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA EGA (SEQ ID NO:11)	（SEQ ID NO: 105） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W p40取代：Y292C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGG GSGGGGSEP KSSDKTHTC PPCPAPEAEG A (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 106） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T p35取代：V185C（亚基之间的天然二硫键被保留） 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 上铰链中的C220被突变为S
构建体21		
EPKSSDKTH TCPPCPAPEA AGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 57） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C

	STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSW LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A p40中的另外的突变：Y292C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 58） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPPCRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变：Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代：S354C 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A p35中的另外的突变：V185C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S
构建体22		
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:9)	（SEQ ID NO: 59） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEWASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALA APIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELTENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSWLT VDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化 突变：K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代：Y349C 用于减少FcγR结合的取代：L234A、L235A、P329A 另外的突变Y292C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S

GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG (SEQ ID NO:10)	（SEQ ID NO: 60） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALAAPIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C 用于减少FcγR结合的取代： L234A、L235A、P329A 另外的突变V185C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S
构建体23		
EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO:11)	（SEQ ID NO: 61） IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCSEPKS SDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVC TLPPSRDELT ENQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSWLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	IgG1（IL-12 p40） 异二聚化突变： K360E/K409W 用于稳定二硫键的取代： Y349C 用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 另外的突变Y292C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S
GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA (SEQ ID NO:12)	（SEQ ID NO: 62） RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNASGGG GSGGGGSGGG GSEPKSSDKT HTCPPCPAPE AEGAPSVFLF	IgG1（IL-12 p35） 异二聚化突变： Q347R/D399V/F405T 用于稳定二硫键的取代： S354C

	PPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPSSIE KTISKAKGQP REPRVYTLPP CRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLVSDGS FTLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG	用于减少FcγR和C1q结合的取代：L234A、L235E、G237A、A330S、P331S 另外的突变V185C以引入IL-12稳定化二硫键 上铰链中的C220被突变为S

*氨基酸序列还可以在C末端包含赖氨酸(K)。

IL-12亚基

[0182] IL-12是包括p40亚基和p35亚基的多亚基蛋白。成熟野生型IL-12p40的氨基酸序列是GenBank登录号NP_002178.2的氨基酸23-328,示于下文的SEQ ID NO:127中。成熟野生型IL-12p35的氨基酸序列是GenBank登录号NP_000873.2的氨基酸57-253,示于下文的SEQ ID NO:128中。本文所用的p40和p35的氨基酸残基的编号对应于成熟野生型蛋白质序列。如本文所用,IL-12p40亚基包含与SEQ ID NO:127至少90％(例如,至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％)的氨基酸序列。如本文所用,IL-12p35亚基包含与SEQ ID NO:128至少90％(例如,至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％)的氨基酸序列。

[0183] 在前述方面中任一个的某些实施方案中,IL-12的p40和p35亚基分别包含SEQ ID NO:121和122;127和128;201和202;203和204;123和124;或125和126的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述第一多肽包含IL-12的p40亚基的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含IL-12的p35亚基的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述第一多肽包含IL-12的p35亚基的氨基酸序列,并且所述第二多肽包含IL-12的p40亚基的氨基酸序列。

[0184] 在某些实施方案中,本公开文本包括异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽,其中所述第一多肽还包含IL-12的通过接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合的第一亚基;并且IL-12的第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,其中IL-12的所述第一亚基和所述第二不同亚基彼此结合,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自含有促进异二聚化的不同突变,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽彼此结合,并且其中IL-12的所述第一亚基是具有Y292C取代的p40亚基,并且IL-12的所述第二不同亚基是具有V185C取代的p35亚基。在某些实施方案中,IL-12的所述第一亚基和所述第二不同亚基分别包含SEQ ID NO:125和126的氨基酸序列。

[0185] IL-12的所述第一亚基和所述第二不同亚基可以经由本文公开的任何接头与任何抗体Fc结构域多肽融合,以形成Fc融合蛋白,其序列包括但不限于如表4中所述的构建体120、120-1、120-2、120-3、120-4、120-5、120-6和120-7以及如表5中所述的构建体20、20-1、20-2、20-3、20-4、20-5、20-6、20-7、20-8和20-9。

[0186] 在某些实施方案中,IL-12的p40亚基还包含C177的替换,并且IL-12的p35亚基还包含C74的替换。在某些实施方案中,IL-12的p40亚基中的C177被S替换,并且IL-12的p35亚基中的C74被S替换。在某些实施方案中,IL-12的p40和p35亚基分别包含SEQ ID NO:123和

124的氨基酸序列。

[0187] IL-12的所述第一亚基和所述第二不同亚基可以经由本文公开的任何接头与任何抗体Fc结构域多肽融合,以形成Fc融合蛋白,其序列包括但不限于如表4中所述的构建体119、119-1、119-2、119-3、119-4、119-5、119-6、119-7和119-8以及如表5中所述的构建体19、19-1、19-2、19-3、19-4、19-5、19-6、19-7、19-8、19-9和19-10。

表6:人IL-12p40和p35氨基酸序列

IL-12 p40	**IL-12 p35**
人IL-12 p40野生型 IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQ VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHK KEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAK NYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLK YENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNS RQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS （SEQ ID NO: 127）	人IL-12 p35野生型 RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSN MLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKT STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGS CLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEF KTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKL CILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS （SEQ ID NO: 128）

人IL-12 p40 C177S Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS （SEQ ID NO: 201）	人IL-12 p35 C74S V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS （SEQ ID NO: 202）
人IL-12 p40 Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS （SEQ ID NO: 203）	人IL-12 p35 V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS （SEQ ID NO: 204）
人IL-12 p40 Q56R IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA	人IL-12 p35 E50V RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS

EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW ASVPCS （SEQ ID NO: 121）	（SEQ ID NO: 122）
人IL-12 p40 Q56R C177S Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSASPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS （SEQ ID NO: 123）	人IL-12 p35 E50V C74S V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESSLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS （SEQ ID NO: 124）
人IL-12 p40 Q56R Y292C IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIRVKEF GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RCYSSSWSEW ASVPCS （SEQ ID NO: 125）	人IL-12 p35 E50V V185C RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHV DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRACTIDRV MSYLNAS （SEQ ID NO: 126）

[0188] 在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列;以及第二多肽,其包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列。在某些实施方

案中,本发明的包含SEQ ID NO:290和SEQ ID NO:291的异二聚体Fc融合蛋白包含所述第一抗体Fc结构域多肽的CH3结构域中的Y349C突变和所述第二抗体Fc结构域多肽的CH3结构域中的S354C突变。在某些实施方案中,本发明的包含SEQ ID NO:290和SEQ ID NO:291的异二聚体Fc融合蛋白包含对应Fc结构域多肽序列中的用于促进所述Fc结构域之间的异二聚化的不同突变。

[0189] 在某些实施方案中,所述第一多肽序列包含第一抗体Fc结构域多肽(人IgG1)序列,其包含K360E和K409W取代。在某些实施方案中,所述第二多肽序列包含第二抗体Fc结构域多肽(人IgG1)序列,其包含Q347R、D399V和F405T取代。在某些实施方案中,所述第一多肽氨基酸序列和所述第二多肽氨基酸序列包含用于降低效应子功能的一个或多个突变。在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包含LALAPA(L234A、L235A和P329A)突变。

[0190] 在某些实施方案中,在本发明的异二聚体Fc融合蛋白的第一多肽(SEQ ID NO:290)中,人IL-12的p40亚基通过包含第一氨基酸序列的第一接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,并且在本发明的异二聚体Fc融合蛋白的第二多肽(SEQ ID NO:291)中,人IL-12的p35亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合。

[0191] SEQ ID NO:290是与人IgG1 Fc结构域多肽融合的人IL-12的p40亚基(加下划线的氨基酸)的序列。突变以粗体显示。

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVL
GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDIL
KDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDP
QGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMV
DAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT
WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVR
AQDRYYSSSWSEWASVPCSPKSSDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA**A**PIEKTISK
AKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:290)

[0192] SEQ ID NO:291是与人IgG1 Fc结构域多肽融合的人IL-12的p35亚基(加下划线的氨基酸)的序列。突变以粗体显示。

RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEID
HEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM
MALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDEL
MQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSY
LNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA**A**PIEKTISK
AKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:291)

[0193] 由氨基酸序列SEQ ID NO:290和SEQ ID NO:291分别表示的所述第一多肽和所述第二多肽由于以SEQ ID NO:290显示的所述第一抗体Fc结构域多肽序列(人IgG1)的CH3结

构域中的Y349C突变(加粗且加下划线)和以SEQ ID NO:291显示的所述第二抗体Fc结构域多肽序列(人IgG1)的CH3结构域中的S354C突变(加粗且加下划线)而形成二硫键,这为所述异二聚体Fc融合蛋白赋予了稳定性(根据EU系统进行Fc编号)。

[0194] 为了促进所述异二聚体Fc融合蛋白的两个Fc结构域多肽之间的异二聚化,以SEQ ID NO:290显示的所述第一抗体Fc结构域多肽序列(人IgG1)包括CH3结构域中的K360E和K409W取代,并且以SEQ ID NO:291显示的所述第二不同Fc结构域多肽序列(人IgG1)包括CH3结构域中的Q347R、D399V和F405T取代(根据EU系统进行Fc编号)。

[0195] 以SEQ ID NO:290和SEQ ID NO:291显示的所述第一抗体Fc结构域多肽序列和所述第二不同Fc结构域多肽序列(人IgG1)还包括用于降低效应子功能的L234A、L235A和P329A(LALAPA)突变。

间隔肽

[0196] 示例性间隔肽序列提供于表7中,并且示例性全长接头序列提供于表4和5中。

[0197] 在本发明的第一多肽内,在氨基到羧基方向上,多亚基蛋白的第一亚基经由接头与第一抗体Fc结构域多肽(例如,如表2中所公开的IgG4抗体Fc变体序列或IgG1抗体Fc变体序列)融合。并且在本发明的第二多肽内,在氨基到羧基方向上,多亚基蛋白的第二不同亚基经由接头与第二抗体Fc结构域多肽(例如,如表2中所公开的IgG4抗体Fc变体序列或IgG1抗体Fc变体序列)融合。

[0198] 在一些实施方案中,本发明的多亚基蛋白的所述第一亚基经由接头与第一抗体Fc结构域序列融合,其中所述接头包含间隔肽L_1和SEQ IDNO:1、2、4、6、7、9、11、237、238、239或240的氨基酸序列,或者由其组成。在一些实施方案中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基经由接头与第二抗体Fc结构域多肽融合,其中所述接头包含间隔肽L_2和SEQ ID NO:1、2、4、6、7、9、11、237、238、239或240的氨基酸序列,或者由其组成。

[0199] 在某些实施方案中,L_1和L_2是肽接头,例如,L_1和/或L_2包括4-50个氨基酸残基。在某些实施方案中,L_1由4-50个氨基酸残基组成。在某些实施方案中,L_1由4-20个氨基酸残基组成。在某些实施方案中,L_2由4-50个氨基酸残基组成。在某些实施方案中,L_2由约4-20个氨基酸残基组成。在某些实施方案中,L_1和L_2各自独立地由约4-50个氨基酸残基组成。在某些实施方案中,L_1和L_2各自独立地由4-20个氨基酸残基组成。

[0200] 在一些实施方案中,L_1和L_2具有优化的长度和/或氨基酸组成。在一些实施方案中,L_1和L_2具有相同的长度并且具有相同的氨基酸组成。在其他实施方案中,L_1和L_2是不同的。

[0201] 在某些实施方案中,L_1具有与L_2相同数量的氨基酸;在某些实施方案中,L_1比L_2更长(即,氨基酸数量更多);在某些实施方案中,L_1比L_2更短(即,氨基酸数量更少)。

[0202] 在某些实施方案中,L_1和/或L_2是“短的”,例如由0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基组成。因此,在某些情形下,所述间隔肽由约12个或更少的氨基酸残基组成。在0个氨基酸残基的情况下,所述间隔肽是肽键。在某些实施方案中,L_1和/或L_2是“长的”,例如由15、20或25个氨基酸残基组成。在一些实施方案中,所述间隔肽由约3至约15个(例如8、9或10个)连续氨基酸残基组成。关于L_1和L_2的氨基酸组成,选择具有为本发明的蛋白质的第一多肽和第二多肽赋予柔性,不干扰所述第一亚基和所述第二不同亚基彼此的结合,以及抵抗蛋白酶的切割的特性的肽。例如,甘氨酸和丝氨酸残基通常提供蛋白酶抗性。作为接头的一部分,适合于将所述多亚基蛋白的第一亚基与SEQ ID NO:1、2、4、6、7、9、11、237、238、

239或240的氨基酸序列连接和/或适合于将所述多亚基蛋白的第二不同亚基与SEQ ID NO:1、2、4、6、7、9、11、237、238、239或240的氨基酸序列连接的间隔肽可以包括$(GS)_n$、$(GGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGSG)_n$、$(GGSGG)_n$和$(GGGGS)_n$序列,其中n是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在一些实施方案中,L_1和/或L_2独立地包括$(GGGGS)_4$(SEQ ID NO:107)或$(GGGGS)_3$(SEQ ID NO:108)序列作为接头的一部分。在其他实施方案中,L_1和/或L_2独立地包括如选自以下的序列所示的肽序列作为接头的一部分:SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:120,如表7中所列。在一些实施方案中,L_1和/或L_2独立地是$(GGGGS)_{n=3}$(SEQ ID NO:108)、$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)或$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)。

表7

SEQ ID	氨基酸序列
SEQ ID NO:111	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS
SEQ ID NO:112	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGS
SEQ ID NO:113	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGS
SEQ ID NO:114	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG
SEQ ID NO:115	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG
SEQ ID NO:116	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:117	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:118	GGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:119	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO:120	GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGG

[0203] 在某些实施方案中,L_1包括序列$(GGGGS)_{n=3}$(SEQ ID NO:108)序列作为接头的一部分,并且L_2包括$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)或$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)序列作为接头的一部分。在某些实施方案中,L_2包括序列$(GGGGS)_{n=3}$(SEQ ID NO:108)序列作为接头的一部分,并且L_1包括$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)或$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)序列作为接头的一部分。在某些实施方案中,作为接头的一部分,L_1不包括如SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:120所示的序列。

[0204] 在某些实施方案中,作为接头的一部分,仅L_2包括如SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:120所示的序列。在某些实施方案中,作为接头序列的一部分,L_1和L_2都不包括如SEQ ID NO:107、SEQ ID NO:108、SEQ ID NO:109、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112、SEQ ID NO:113、SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:118、SEQ ID NO:119或SEQ ID NO:120所示的序列。

[0205] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:118;$(G4S)_3$)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:118;$(G4S)_3$)的接头连接多亚基蛋白的所述第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。

[0206] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:118;$(G4S)_3$)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中所述另外的亚基用不包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:118;$(G4S)_3$)的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0207] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中不包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:118;$(G4S)_3$)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中多亚基蛋白的所述第二不同亚基用包含GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:118;$(G4S)_3$)的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0208] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)的接头连接多亚基蛋白的所述第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多

肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。

[0209] 本公开文本的一些异二聚体Fc融合蛋白包括包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)的接头,其连接多亚基蛋白的第一亚基与第一抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽;并且连接多亚基蛋白的第二不同亚基与第二抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。

[0210] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中多亚基蛋白的另外的亚基用不包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0211] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中不包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中多亚基蛋白的所述第二不同亚基用包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0212] 本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述第一抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)的接头连接多亚基蛋白的所述第二不同亚基与所述第二抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。

[0213] 本公开文本的一些异二聚体Fc融合蛋白包括包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)的接头,其连接多亚基蛋白的第一亚基与第一抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽;并且连接多亚基蛋白的第二不同亚基与第二抗体Fc结构域多肽,例如IgG4抗体的Fc结构域多肽或IgG1抗体的Fc结构域多肽。

[0214] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中多亚基蛋白的所述第二不同亚基用不包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0215] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中不包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中多亚基蛋白的所述第二不同亚基用包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0216] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)序列的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚

基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中多亚基蛋白的所述第二不同亚基用包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)序列的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

[0217] 在某些实施方案中,本发明的一些异二聚体Fc融合蛋白包含第一多肽,其包含多亚基蛋白的第一亚基和第一抗体Fc结构域多肽,其中包含$(GGGGS)_{n=2}$(SEQ ID NO:109)序列的接头连接多亚基蛋白的所述第一亚基与所述Fc结构域多肽;以及第二多肽,其包含多亚基蛋白的第二不同亚基和第二抗体Fc结构域多肽,其中多亚基蛋白的所述第二不同亚基用包含$(GGGGS)_{n=1}$(SEQ ID NO:110)序列的接头与所述第二抗体Fc结构域多肽连接。

Fc结构域和用于促进异二聚化的取代

[0218] 本发明的蛋白质的组装可以通过如下方式来完成:在同一细胞中表达包含多亚基蛋白序列的与第一抗体Fc结构域多肽(例如,如表2中所公开的IgG4抗体Fc变体序列或IgG1抗体Fc变体序列)融合的第一亚基的第一多肽以及包含多亚基蛋白序列的与第二抗体Fc结构域多肽(例如,如表2中所公开的IgG4抗体Fc变体序列或IgG1抗体Fc变体序列)融合的第二不同亚基的第二多肽,这导致根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白的组装。所组装的蛋白质具有异二聚体Fc结构域多肽,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽彼此结合。促进Fc的异二聚体的优先组装可以通过在每个抗体重链恒定区的CH3结构域中掺入不同突变来完成,如US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480和US14/830336中所示的。例如,可以基于人IgG1在CH3结构域中进行突变,并且在第一抗体Fc结构域多肽和第二抗体Fc结构域多肽内掺入不同的氨基酸取代对,其允许这两条链选择性地与彼此异二聚化。下文所展示的氨基酸取代的位置都根据EU索引(如在Kabat中的)进行编号。

[0219] 在一种情境下,所述第一抗体Fc结构域多肽中的氨基酸取代用较大的氨基酸替换原始氨基酸,所述较大的氨基酸选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)或色氨酸(W),并且所述第二抗体Fc结构域多肽中的至少一个氨基酸取代用一个或多个较小的氨基酸替换一个或多个原始氨基酸,所述较小的氨基酸选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)或缬氨酸(V),使得较大的氨基酸取代(突起)适合较小的氨基酸取代(空腔)的表面。例如,一种抗体Fc结构域多肽可以掺入T366W取代,并且另一种可以掺入三个取代,包括T366S、L368A和Y407V。

[0220] 本发明的包含多亚基蛋白序列的第一亚基的第一多肽或包含多亚基蛋白序列的第二不同亚基的第二多肽可以任选地与如下氨基酸序列偶联,其与抗体恒定区(如包括具有或不具有CH1结构域的铰链、CH2和CH3结构域的IgG恒定区)至少90%(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同。在一些实施方案中,所述恒定区的氨基酸序列与人抗体恒定区(如人IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区)至少90%(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同。在一些其他实施方案中,所述恒定区的氨基酸序列与来自另一哺乳动物(如兔、狗、猫、小鼠或马)的抗体恒定区至少90%(例如,至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)相同。与人IgG1恒定区相比,可以将一个或多个突变掺入所述恒定区中,例如在Q347、Y349、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411和/或K439处。示例性取代包括例如Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、S354C、E356K、E357Q、E357L、

E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D和K439E。

[0221] 在某些实施方案中,可以掺入人IgG1恒定区的CH1中的突变可以是在氨基酸V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171和/或V173处。在某些实施方案中,可以掺入人IgG1恒定区的CK中的突变可以是在氨基酸E123、F116、S176、V163、S174和/或T164处。

[0222] 氨基酸取代可以选自表8中所示的以下取代组。

表8

	第一多肽	第二多肽
组1	S364E/F405A	Y349K/T394F
组2	S364H/D401K	Y349T/T411E
组3	S364H/T394F	Y349T/F405A
组4	S364E/T394F	Y349K/F405A
组5	S364E/T411E	Y349K/D401K
组6	S364D/T394F	Y349K/F405A
组7	S364H/F405A	Y349T/T394F
组8	S364K/E357Q	L368D/K370S
组9	L368D/K370S	S364K
组10	L368E/K370S	S364K
组11	K360E/Q362E	D401K
组12	L368D/K370S	S364K/E357L
组13	K370S	S364K/E357Q
组14	F405L	K409R
组15	K409R	F405L

[0223] 可替代地,氨基酸取代可以选自表9中所示的以下取代组。

表9		
	第一多肽	第二多肽
组1	K409W	D399V/F405T
组2	Y349S	E357W
组3	K360E	Q347R
组4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
组5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
组6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

[0224] 可替代地,氨基酸取代可以选自表10中所示的以下取代组。

表10		
	第一多肽	第二多肽
组1	T366K/L351K	L351D/L368E
组2	T366K/L351K	L351D/Y349E
组3	T366K/L351K	L351D/Y349D
组4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
组5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
组6	E356K/D399K	K392D/K409D

[0225] 可替代地,每条多肽链中的至少一个氨基酸取代可以选自表11。

表11	
第一多肽	第二多肽
L351Y、D399R、D399K、S400K、S400R、Y407A、Y407I、Y407V	T366V、T366I、T366L、T366M、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F K392D、K392E、K409F、K409W、T411D和T411E

[0226] 可替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表12中的以下取代组,其中第一多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带负电荷的氨基酸替换,并且第二多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带正电荷的氨基酸替换。

表12	
第一多肽	**第二多肽**
K392、K370、K409或K439	D399、E356或E357

[0227] 可替代地,至少一个氨基酸取代可以选自表13中的以下组,其中第一多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带正电荷的氨基酸替换,并且第二多肽列中指示的一个或多个位置被任何已知的带负电荷的氨基酸替换。

表13	
第一多肽	**第二多肽**
D399、E356或E357	K409、K439、K370或K392

[0228] 可替代地,氨基酸取代可以选自表14中所示的以下组。

表14	
第一多肽	**第二多肽**
T350V、L351Y、F405A和Y407V	T350V、T366L、K392L和T394W

[0229] 可替代地,或者另外,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白的结构稳定性可以通过如下方式来增加:在第一或第二多肽链中的任一条上引入S354C并在相对的多肽链上引入Y349C,其在两个多肽的界面内形成人工二硫键。

[0230] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在位置T366处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自T366、L368和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0231] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、L368和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在位置T366处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0233] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、E357、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0234] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、

D399、S400和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自T366、N390、K392、K409和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0235] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自T366、N390、K392、K409和T411的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自L351、D399、S400和Y407的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0236] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、Y349、K360和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自Q347、E357、D399和F405的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0237] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Q347、E357、D399和F405的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自Y349、K360、Q347和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0238] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自K370、K392、K409和K439的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自D356、E357和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0239] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自D356、E357和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自K370、K392、K409和K439的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0240] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自L351、E356、T366和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自Y349、L351、L368、K392和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0241] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列在选自Y349、L351、L368、K392和K409的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列在选自L351、E356、T366和D399的一个或多个位置处不同于IgG1恒定区的氨基酸序列。

[0242] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于S354C取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于Y349C取代。

[0243] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于Y349C取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于S354C取代。

[0244] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于K360E和K409W取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基

酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于0347R、D399V和F405T取代。

[0245] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于0347R、D399V和F405T取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于K360E和K409W取代。

[0246] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366W取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366S、T368A和Y407V取代。

[0247] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366S、T368A和Y407V取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T366W取代。

[0248] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、L351Y、F405A和Y407V取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、T366L、K392L和T394W取代。

[0249] 在一些实施方案中,所述抗体恒定区的一条多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、T366L、K392L和T394W取代,并且所述抗体恒定区的另一多肽链的氨基酸序列与IgG1恒定区的氨基酸序列的不同之处在于T350V、L351Y、F405A和Y407V取代。

[0250] 本领域技术人员将理解,在蛋白质的生产和/或储存期间,N末端谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)可以被环化以形成内酰胺(例如,自发地或通过生产和/或储存期间存在的酶催化)。因此,在一些实施方案中,在多肽的氨基酸序列的N末端残基是E或Q的情况下,本文还考虑了用焦谷氨酸替换E或Q的相应氨基酸序列。

[0251] 本领域技术人员还将理解,在蛋白质生产和/或储存期间,蛋白质的C末端赖氨酸(K)可以被去除(例如,自发地或通过生产和/或储存期间存在的酶催化)。通常在其C末端包含Fc结构域的蛋白质的情况下观察到K的这种去除。因此,在一些实施方案中,在多肽的氨基酸序列(例如,Fc结构域序列)的C末端残基是K的情况下,本文还考虑了去除K的相应氨基酸序列。

用于降低效应子功能的突变

[0252] 在一个方面,本发明提供了一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和多亚基蛋白的第一亚基;以及(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和所述多亚基蛋白的第二不同亚基,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含降低Fc的效应子功能的一个或多个突变,并且其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基彼此结合。在某些实施方案中,本文公开的包含降低Fc的效应子功能的一个或多个突变的异二聚体Fc融合蛋白具有比没有降低效应子功能的所述一个或多个Fc突变的其对应物增加的抑制肿瘤生长的活性。本文所考虑的突变包括氨基酸残基的取代、插入和缺失。本文公开的Fc结构域或铰链区中的所有氨基酸位置都根据EU编号进行编号。

[0253] 在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多

肽包含降低所述Fc结构域多肽诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)的能力的一个或多个突变。ADCC和ADCP通常由Fc受体介导。例如,在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG(例如,人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4)抗体序列。人IgG的Fc受体(也称为Fcγ受体(FcγR))包括但不限于激活性Fcγ受体FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32A)、FcγRIIIA(CD16或CD16A)和FcγRIIIB(CD16B),以及抑制剂Fcγ受体FcγRIIB(CD32B)。因此,在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括一个或多个突变以减少与所述第一多肽和/或所述第二多肽中的激活性FcγR(例如,FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIIA或FcγRIIIB)的结合。在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括一个或多个突变以增加与所述第一多肽和/或所述第二多肽中的抑制性FcγR(例如,FcγRIIB)的结合。

[0254] 减少与激活性FcγR的结合和/或增加与抑制性FcγR的结合的Fc突变是本领域已知的。例如,在铰链区和Fc区内,CD16结合由铰链区和CH2结构域介导。例如,在人IgG1内,与CD16的相互作用主要集中在CH2结构域中的氨基酸残基Asp 265-Glu 269、Asn 297-Thr 299、Ala 327-Ile 332、Leu 234-Ser 239和碳水化合物残基N-乙酰基-D-葡糖胺上(参见,Sondermann等人,Nature,406(6793):267-273)。基于已知的结构域,可以选择突变以增强或降低与CD16的结合亲和力,如通过使用噬菌体显示文库或酵母表面展示cDNA文库,或者可以基于相互作用的已知三维结构来设计。

[0255] 如Want等人,Protein Cell(2018)9(1):63-73中所综述的,根据人IgG1 Fc的晶体结构,包括氨基酸位置232-239、265-270、296-299和325-332的区域涉及激活性FcγR结合。Wang等人还公开了人IgG4的L235E和F234A/L235A突变、人IgG1的L234A/L235A突变和IgG抗体的N297突变(例如,N297A、N297Q、N297G或N297D)减少激活性FcγR结合。如美国专利号8,969,526中所公开的,在位置329处的突变(例如,P329A、P329G或P329R)也减少了激活性FcγR结合。涉及激活性FcγR结合的另外的氨基酸位置和突变(例如,E233P突变)公开于美国专利号7,943,743和Isaacs等人,J.Immunol.(1998)161:3862-69中。

[0256] 因此,在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽包含在选自233、234、235、297和329的一个或多个位置处的突变(例如,相对于野生型人IgG1的取代)。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1抗体Fc结构域多肽,其包含一个或多个突变E233P;L234A(人IgG1)或F234A(人IgG4);L235A或L235E;N297A、N297Q、N297G或N297D;和/或P329A、P329G或P329R。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1抗体Fc结构域多肽,其包含突变L234A和L235A。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1抗体Fc结构域多肽,其包含突变L234A、L235A和P329A。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG4抗体Fc结构域多肽,其包含突变L235E。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1抗体Fc结构域多肽,其包含突变L235E和P329A。

[0257] 在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含降低所述Fc结构域多肽诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力的一个或多个突变。CDC通常由补体组分(例如,C1q)介导。因此,在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括一个或多个突变以减少与所述第一多肽和/或所述第二多肽中的补体组分(例如,

C1q)的结合。

[0258] 减少与C1q的结合的Fc突变是本领域已知的。例如,如美国专利号5,648,260和5,624,821中所公开的,Fc的在位置234、235、236、237、297、318、320和322处的氨基酸残基涉及C1q结合。如Tao等人,J.Exp.Med.(1993)178:661-667和Brekke等人,Eur.J.Immunol.(1994)24:2542-47中所公开的,在位置331处的残基Pro涉及C1q结合。如Idusogie等人,J.Immunol.(2000)164:4178-84中所公开的,Fc的在位置270(例如,D270A)、322(K322A)、329(例如,P329A)和331(例如,P331A、P331S或P331G)处的突变减少了C1q结合。

[0259] 因此,在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽包含在选自234、235、236、237、270、297、318、320、322、329和331的一个或多个位置处的突变(例如,相对于野生型人IgG1的取代)。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1抗体Fc结构域多肽,其包含一个或多个突变G237A、A330S、P331S和/或P329A。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1抗体Fc结构域多肽,其包含突变G237A、A330S和P331S。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1抗体Fc结构域多肽,其包含突变P329A。

[0260] 降低ADCC和/或ADCP的突变和降低CDC的突变可以组合。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含降低所述Fc结构域多肽诱导ADCC和/或ADCP的能力的一个或多个突变,并且还包含降低所述Fc结构域多肽诱导CDC的能力的一个或多个突变。在某些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含降低所述Fc结构域多肽诱导ADCC和/或ADCP的能力的一个或多个突变,并且还包含降低所述Fc结构域多肽诱导CDC的能力的一个或多个突变。

[0261] 在一些实施方案中,本发明的具有IgG4 Fc的异二聚体Fc融合蛋白包括在所述第一多肽和/或所述第二多肽中的一个或多个突变以减少与Fcγ R(例如,FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA或FcγRIIIB)或补体组分(例如,C1q)的结合。此类突变可用于降低效应子功能。例如,本公开文本的蛋白质可以包括SPLE(S228P和L235E)突变、SPLEPA(S228P、L235E和P329A)突变或SPLEPG(S228P、L235E和P329G)突变。

[0262] 在一些实施方案中,本发明的具有IgG1 Fc的异二聚体Fc融合蛋白包括在所述第一多肽和/或所述第二多肽中的一个或多个突变以减少与Fcγ R(例如,FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA或FcγRIIIB)或补体组分(例如,C1q)的结合。此类突变可用于降低效应子功能。例如,本公开文本的蛋白质可以包括LALA(L234A和L235A)突变、LALAPA(L234A、L235A和P329A)突变、LALAPG(L234A、L235A和P329G)突变或LALEGAASPS(L234A、L235E、G237A、A330S和P331S)突变。

[0263] 在一些实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白包括第一抗体IgG4或IgG1 Fc结构域多肽和第二抗体IgG4或IgG1 Fc结构域多肽,其各自含有突变P329G或P329A。

[0264] 在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自含有选自A330S和P331S的突变。

[0265] 在一些实施方案中,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自含有突变A330S和P331S。

[0266] 在某些实施方案中,在本发明的异二聚体Fc融合蛋白的第一多肽中,所述多亚基

蛋白的第一亚基通过第一接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合。在某些实施方案中,在本发明的异二聚体Fc融合蛋白的第二多肽中,所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合。适合于这种用途的接头的氨基酸序列描述在标题“IgG4构建体”和“IgG1构建体”下。适合于在所述第一多肽和/或所述第二多肽中使用的另外的接头序列包括但不限于野生型IgG(例如,人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4)铰链序列及其突变形式。例如,在某些实施方案中,所述第一接头和所述第二接头各自包含氨基酸序列ESKYGPPCPPCPAPEFXGG(其中X是L或E)(SEQ ID NO:280)或SKYGPPCPPCPAPEFXGG(其中X是L或E)(SEQ ID NO:281)。在某些实施方案中,所述第一接头和所述第二接头各自包含氨基酸序列ESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:282)或SKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:283)。在某些实施方案中,所述第一接头和所述第二接头各自包含氨基酸序列ESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:284)或SKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:285)。

血清半衰期

[0267] 根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白具有适合于治疗用途的药代动力学特性。例如,在某些实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白具有至少约50小时的血清半衰期。在某些实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白具有至少约100小时的血清半衰期。

[0268] 在某些实施方案中,在向受试者静脉内施用后50小时,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白的血清浓度是在施用后1小时本发明的蛋白质在所述受试者中的血清浓度的至少10%。

[0269] 在某些实施方案中,根据本发明的异二聚体Fc融合蛋白具有比未与Fc结构域多肽融合的所述多亚基蛋白长至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的血清半衰期。在某些实施方案中,根据本发明的包含多亚基蛋白的蛋白质序列的异二聚体Fc融合蛋白具有比未与Fc结构域多肽融合的所述多亚基蛋白长至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍或20倍的血清半衰期。

肿瘤保留

[0270] 本发明的异二聚体Fc融合蛋白可以任选地掺入另外的特征以增强所述蛋白质在肿瘤部位的保留。例如,在本发明的某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白还包含蛋白聚糖结合结构域、胶原蛋白结合结构域和/或透明质酸结合结构域。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白还包含结合一种或多种蛋白聚糖(例如,本领域已知的蛋白聚糖,例如如Lozzo等人,Matrix Bio(2015)42:11-55;和Nikitovic等人,Frontiers in Endocrinology(2018)9:69中所公开的)的蛋白聚糖结合结构域,所述蛋白聚糖存在于肿瘤中(例如,在肿瘤细胞的表面上、在肿瘤的细胞周基质中或在肿瘤的细胞外基质中)。在某些实施方案中,所述胶原蛋白结合结构域结合一种或多种胶原蛋白,所述胶原蛋白存在于肿瘤中(例如,在肿瘤细胞的表面上、在肿瘤的细胞周基质中或在肿瘤的细胞外基质中)。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白还包含h酸结合结构域,其与存在于肿瘤中的一种或多种透明质酸结合。此类异二聚体Fc融合蛋白在肿瘤中具有增强的保留,并且可以以较低的剂量和/或频率瘤内地施用给受试者。

[0271] 在某些实施方案中,包含在所述异二聚体Fc融合蛋白中的蛋白聚糖结合结构域结合一种或多种蛋白聚糖,所述蛋白聚糖在肿瘤中(例如,在肿瘤细胞的表面上、在肿瘤的细

胞周基质中或在肿瘤的细胞外基质中)特异性表达。在某些实施方案中,包含在所述异二聚体Fc融合蛋白中的胶原蛋白结合结构域结合一种或多种胶原蛋白,所述胶原蛋白在肿瘤中(例如,在肿瘤细胞的表面上、在肿瘤的细胞周基质中或在肿瘤的细胞外基质中)特异性表达。此类异二聚体Fc融合蛋白可以在施用(例如,静脉内、皮下或肺施用)后富集于肿瘤中,并且具有增强的肿瘤保留,从而允许以较低的剂量和/或频率施用。

[0272] 在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白还包含结合选自以下的一种或多种蛋白聚糖的蛋白聚糖结合结构域:黏结蛋白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、β蛋白聚糖、磷酸酶蛋白聚糖(phosphacan)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、突触蛋白聚糖、胶原蛋白(例如,胶原蛋白IX、XII、XV或XVIII)、透凝蛋白聚糖、聚集蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、神经蛋白聚糖、短蛋白聚糖和小富亮氨酸蛋白聚糖(SLRP)。涉及癌症的蛋白聚糖包括但不限于胶原蛋白、黏结蛋白聚糖(例如,黏结蛋白聚糖-1或黏结蛋白聚糖-2)、丝甘蛋白聚糖、CSPG4、β蛋白聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖(例如,磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3)、串珠蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、短蛋白聚糖和SLPR(例如,饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、无孢蛋白、纤调蛋白聚糖和光蛋白聚糖)。因此,在某些实施方案中,包含在所述异二聚体Fc融合蛋白中的蛋白聚糖结合结构域结合选自以下的一种或多种蛋白聚糖:黏结蛋白聚糖(例如,黏结蛋白聚糖-1或黏结蛋白聚糖-2)、丝甘蛋白聚糖、CSPG4、β蛋白聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖(例如,磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3)、串珠蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、短蛋白聚糖和SLPR。在某些实施方案中,包含在所述异二聚体Fc融合蛋白中的蛋白聚糖结合结构域结合选自以下的一种或多种SLPR:饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、无孢蛋白、纤调蛋白聚糖和光蛋白聚糖。

[0273] 包含在所述异二聚体Fc融合蛋白中的蛋白聚糖结合结构域可以是蛋白质(例如,抗体或其抗原结合片段)、肽(例如,蛋白聚糖结合蛋白的一部分或其变体)、适配体,小分子或其组合。蛋白聚糖结合结构域也是本领域已知的。例如,黏结蛋白聚糖结合结构域公开于美国专利号6,566,489、8,647,828和10,124,038;美国专利申请公开号2009/0297479;以及PCT专利申请公开号WO 2018199176 A1中。CSPG4结合结构域公开于美国专利号9,801,928和10,093,745;以及美国专利申请公开号2016/0032007、2017/0342151和2018/0072811中。β-聚糖结合结构域公开于美国专利号7,455,839中。磷脂酰肌醇蛋白聚糖结合结构域公开于美国专利号7,919,086、7,776,329、8,680,247、8,388,937、9,260,492、9,394,364、9,790,267、9,522,940和9,409,994;美国专利申请公开号2004/0236080、2011/0123998、2018/0244805、2018/0230230和2018/0346592;欧洲专利号2270509;以及PCT专利申请公开号WO 2017053619 A1、WO 2018026533 A1、WO 2018165344A1和WO 2018199318 A1中。串珠蛋白聚糖结合结构域公开于美国专利号10,166,304中。饰胶蛋白聚糖结合结构域公开于美国专利号6,517,838以及PCT专利申请公开号WO 2000021989 A1、WO 2000077041 A2和WO 2000078800A2中。

[0274] 在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白还包含胶原蛋白结合结构域。胶原蛋白是一类在脊椎动物中鉴定的具有至少28种不同类型的蛋白质。每种类型的胶原蛋白都具有其独特的结构特征和分布模式,如Fang等人,Tumor Biol.(2014)35:2871-82和Xiong等人,J.Cancer Metasta.Treat.(2016)2:357-64中所公开的。多种类型的胶原蛋白涉及癌症,包括但不限于Col3A1、Col5A2、Col6、Col7A1、Col15A1、Col19A1和Col22A1。所述

胶原蛋白结合结构域可以是蛋白质(例如,抗体或其抗原结合片段)、肽(例如,胶原蛋白结合蛋白的一部分或其变体)、适配体,小分子或其组合。胶原蛋白结合结构域是本领域已知的,并且公开于例如美国专利号5,788,966、5,587,360、5,851,794、5,741,670、5,849,701、6,288,214、6,387,663、6,908,994、7,169,902、7,488,792、7,820,401、8,956,612、8,642,728和8,906,649,以及美国专利申请公开号2007/0161062、2009/0142345和2012/0100106中。

[0275] 在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白还包含透明质酸结合结构域。所述透明质酸结合结构域可以是蛋白质(例如,抗体或其抗原结合片段)、肽(例如,透明质酸结合蛋白的一部分或其变体)、适配体,小分子或其组合。透明质酸结合结构域是本领域已知的,并且公开于例如美国专利号6,864,235、8,192,744、8,044,022、8,163,498、8,034,630、9,217,016、9,795,686和9,751,919,以及美国专利申请公开号2002/0055488和2007/0259380中。

[0276] 蛋白聚糖结合结构域、胶原蛋白结合结构域和/或透明质酸结合结构域(如果存在)可以在所述异二聚体Fc融合蛋白的任何位置处。例如,在某些实施方案中,在所述IL-12亚基位于所述抗体Fc结构域多肽的N末端的情况下,如本文所公开的蛋白聚糖结合结构域、胶原蛋白结合结构域和/或透明质酸结合结构域可以与所述第一抗体Fc结构域多肽的C末端和/或与所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端融合。在某些实施方案中,在所述IL-12亚基位于所述抗体Fc结构域多肽的C末端的情况下,如本文所公开的蛋白聚糖结合结构域、胶原蛋白结合结构域和/或透明质酸结合结构域可以与所述第一抗体Fc结构域多肽的N末端和/或与所述第二抗体Fc结构域多肽的N末端融合。

[0277] 蛋白聚糖结合结构域、胶原蛋白结合结构域和/或透明质酸结合结构域(如果存在)可以通过接头与所述异二聚体Fc融合蛋白的其余部分融合。在某些实施方案中,所述蛋白聚糖结合结构域通过肽接头与所述异二聚体Fc融合蛋白的其余部分融合。在某些实施方案中,所述肽接头包括本文公开的间隔肽。

II.制备方法

[0278] 本发明的蛋白质可以使用本领域技术人员熟知的重组DNA技术来制备。例如,可以将编码第一多肽的第一核酸序列克隆到第一表达载体中,所述第一多肽包含多亚基蛋白序列的与第一抗体Fc结构域多肽融合的第一亚基;可以将编码第二多肽的第二核酸序列克隆到第二表达载体中,所述第二多肽包含多亚基的与第二抗体Fc结构域多肽融合的第二不同亚基;并且可以将所述第一表达载体和所述第二表达载体一起稳定地转染到宿主细胞中以产生所述多聚体蛋白。

[0279] 为了实现蛋白质的最高产量,可以探索所述第一表达载体和所述第二表达载体的不同比率,以确定转染到宿主细胞中的最佳比率。在转染后,可以使用本领域已知的方法(如有限稀释、ELISA、FACS、显微术或Clonepix)分离单个克隆以产生细胞库。

[0280] 可以在适合于生物反应器放大和本发明蛋白质的维持表达的条件下培养克隆。可以使用本领域已知的方法分离和纯化蛋白质,所述方法包括离心、深度过滤、细胞裂解、均质化、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用交换色谱和混合模式色谱。

III.药物组合物

[0281] 本公开文本的特征还在于含有有效量的本文所述的蛋白质的药物组合物。所述组

合物可以配制用于在多种药物递送系统中使用。一种或多种生理学上可接受的赋形剂或载体也可以包括在所述组合物中,以用于适当的配制。用于在本公开文本中使用的合适的配制品可见于Remington'sPharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Philadelphia,Pa.,第17版,1985。关于药物递送方法的简要综述,参见例如Langer(Science 249:1527-1533,1990)。

[0282] 本公开文本的静脉内药物递送配制品可以包含在袋、笔或注射器中。在某些实施方案中,所述袋可以与包括管和/或针的通道连接。在某些实施方案中,所述配制品可以是冻干配制品或液体配制品。在某些实施方案中,所述配制品可以冷冻干燥(冻干)并包含在约12-60个小瓶中。在某些实施方案中,所述配制品可以冷冻干燥,并且45mg的冷冻干燥的配制品可以包含在一个小瓶中。在某些实施方案中,约40mg-约100mg的冷冻干燥的配制品可以包含在一个小瓶中。在某些实施方案中,将来自12、27或45个小瓶的冷冻干燥的配制品合并以获得所述静脉内药物配制品中蛋白质的治疗剂量。在某些实施方案中,所述配制品可以是液体配制品,并且储存为约250mg/小瓶至约1000mg/小瓶。在某些实施方案中,所述配制品可以是液体配制品,并且储存为约600mg/小瓶。在某些实施方案中,所述配制品可以是液体配制品,并且储存为约250mg/小瓶。

[0283] 本发明的异二聚体Fc融合蛋白可以以液体水性药物配制品存在,所述液体水性药物配制品包括缓冲溶液中的有效量的所述蛋白质,从而形成配制品。

[0284] 这些组合物可以通过常规灭菌技术灭菌,或者可以无菌过滤。所得的水性溶液可以按原样包装使用,或者冻干,在施用前将所述冻干制剂与无菌水性载体组合。所述制剂的pH通常将在3与11之间,更优选地在5与9之间或在6与8之间,最优选地在7与8之间,如7至7.5。所得的固体形式的组合物可以以多个单剂量单位包装,每个单剂量单位含有固定量的一种或多种上述药剂。固体形式的组合物也可以包装在用于柔性量的容器中。

[0285] 在某些实施方案中,本公开文本提供了具有延长的保质期的配制品,其包括本公开文本的异二聚体Fc融合蛋白与甘露醇、柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物、磷酸二氢钠二水合物、氯化钠、聚山梨醇酯80、水和氢氧化钠的组合。

[0286] 在某些实施方案中,制备水性配制品,其包括在pH缓冲溶液中的本公开文本的异二聚体Fc融合蛋白。本发明的缓冲液可以具有范围从约4至约8(例如,从约4.5至约6.0或从约4.8至约5.5)的pH,或者可以具有约5.0至约5.2的pH。上述pH中间的范围也旨在成为本公开文本的一部分。例如,旨在包括使用上述值中的任一个的组合作为上限和/或下限的值的范围。将pH控制在此范围内的缓冲剂的例子包括乙酸盐(例如,乙酸钠)、琥珀酸盐(如琥珀酸钠)、葡糖酸盐、组氨酸、柠檬酸盐和其他有机酸缓冲剂。

[0287] 在某些实施方案中,所述配制品包括如下缓冲体系,其含有柠檬酸盐和磷酸盐以将pH维持在约4至约8的范围内。在某些实施方案中,pH范围可以从约4.5至约6.0或从约pH 4.8至约5.5,或在约5.0至约5.2的pH范围内。在某些实施方案中,所述缓冲体系包括柠檬酸一水合物、柠檬酸钠、磷酸二钠二水合物和/或磷酸二氢钠二水合物。在某些实施方案中,所述缓冲体系包括约1.3mg/mL的柠檬酸(例如,1.305mg/mL)、约0.3mg/mL的柠檬酸钠(例如,0.305mg/mL)、约1.5mg/mL的磷酸二钠二水合物(例如,1.53mg/mL)、约0.9mg/mL的磷酸二氢钠二水合物(例如,0.86)和约6.2mg/mL的氯化钠(例如,6.165mg/mL)。在某些实施方案中,所述缓冲体系包括1-1.5mg/mL的柠檬酸、0.25至0.5mg/mL的柠檬酸钠、1.25至1.75mg/mL的

磷酸二钠二水合物、0.7至1.1mg/mL的磷酸二氢钠二水合物和6.0至6.4mg/mL的氯化钠。在某些实施方案中,用氢氧化钠调节所述配制品的pH。

[0288] 多元醇也可以包括在所述配制品中,所述多元醇充当张度剂并可以稳定抗体。将所述多元醇以相对于所述配制品的所需等渗性可变化的量添加到所述配制品中。在某些实施方案中,所述水性配制品可以是等渗的。多元醇的添加量也可以相对于所述多元醇的分子量改变。例如,与二糖(如海藻糖)相比,可以添加更低量的单糖(例如,甘露醇)。在某些实施方案中,可以在所述配制品中用作张度剂的多元醇是甘露醇。在某些实施方案中,甘露醇浓度可以是约5至约20mg/mL。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以是约7.5至15mg/mL。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以是约10-14mg/mL。在某些实施方案中,甘露醇的浓度可以是约12mg/mL。在某些实施方案中,多元醇山梨醇可以包括在所述配制品中。

[0289] 也可以将洗涤剂或表面活性剂添加到所述配制品中。示例性洗涤剂包括非离子型洗涤剂,如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、80等)或泊洛沙姆(例如,泊洛沙姆188)。洗涤剂的添加量使得其减少所配制的抗体的聚集和/或最小化所述配制品中颗粒的形成和/或减少吸附。在某些实施方案中,所述配制品可以包括表面活性剂,其是聚山梨醇酯。在某些实施方案中,所述配制品可以含有洗涤剂聚山梨醇酯80或Tween 80。Tween 80是用于描述聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单油酸酯的术语(参见Fiedler,Lexikon der Hifsstoffe,Editio Cantor Verlag Aulendorf,第4版,1996)。在某些实施方案中,所述配制品可以含有在约0.1mg/mL与约10mg/mL之间或在约0.5mg/mL与约5mg/mL之间的聚山梨醇酯80。在某些实施方案中,可以在所述配制品中添加约0.1%聚山梨醇酯80。

[0290] 在某些实施方案中,将本公开文本的蛋白质产品配制为液体配制品。所述液体配制品可以以10mg/mL的浓度存在于USP/Ph Eur I型50R小瓶中,所述小瓶用橡胶塞封闭并用铝压边封口盖密封。所述塞子可以由符合USP和Ph Eur的弹性体制成。在某些实施方案中,小瓶可以填充有61.2mL的蛋白质产品溶液,以便允许60mL的可提取体积。在某些实施方案中,可以用0.9%盐水溶液稀释所述液体配制品。

[0291] 在某些实施方案中,本公开文本的液体配制品与稳定水平的糖的组合可以制备为10mg/mL浓度的溶液。在某些实施方案中,可以在水性载体中制备所述液体配制品。在某些实施方案中,稳定剂的添加量可以不大于可能导致粘度不理想或不适合静脉内施用的量。在某些实施方案中,所述糖可以是二糖,例如蔗糖。在某些实施方案中,所述液体配制品还可以包括缓冲剂、表面活性剂和防腐剂中的一种或多种。

[0292] 在某些实施方案中,可以通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定所述液体配制品的pH。在某些实施方案中,所述药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中,所述碱可以是氢氧化钠。

[0293] 除聚集外,脱酰胺是肽和蛋白质的常见产品变体,其可能在发酵、收获/细胞澄清、纯化、药物物质/药物产品储存期间以及在样品分析期间发生。脱酰胺是从蛋白质中损失U,从而形成可进行水解的琥珀酰亚胺中间体。琥珀酰亚胺中间体导致母体肽的质量降低17道尔顿。随后的水解导致质量增加18道尔顿。由于在水性条件下的不稳定性,难以分离琥珀酰亚胺中间体。因此,脱酰胺通常可检测为质量增加1道尔顿。天冬酰胺的脱酰胺产生天冬氨酸或异天冬氨酸。影响脱酰胺率的参数包括pH、温度、溶剂介电常数、离子强度、一级序列、局部多肽构象和三级结构。肽链中与Asn相邻的氨基酸残基影响脱酰胺率。蛋白质序列中

Asn后的Gly和Ser导致较高的脱酰胺敏感性。

[0294] 在某些实施方案中,本公开文本的液体配制品可以保存在防止蛋白质产品脱酰胺的pH和湿度条件下。

[0295] 本文中感兴趣的水性载体是这样的载体,其是药学上可接受的(对于施用给人是安全且无毒的)并且可用于制备液体配制品。说明性载体包括注射用无菌水(SWFI)、注射用抑菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0296] 可以任选地将防腐剂添加到本文的配制品中以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如促进多用途(多剂量)配制品的生产。

[0297] 在特定情形下,如当患者在移植后住院经由静脉内(IV)途径接受所有药物时,IV配制品可以是优选的施用途径。在某些实施方案中,在施用前用0.9%氯化钠溶液稀释所述液体配制品。在某些实施方案中,注射用的稀释的药物产品是等渗的并且适合于通过静脉内输注施用。

[0298] 在某些实施方案中,可以以10mM-200mM的量添加盐或缓冲剂组分。所述盐和/或缓冲剂是药学上可接受的,并且源自各种已知酸(无机和有机)与“成碱”金属或胺。在某些实施方案中,所述缓冲剂可以是磷酸盐缓冲剂。在某些实施方案中,所述缓冲剂可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲剂,在这种情况下,钠、钾或铵离子可以用作反离子。

[0299] 可以任选地将防腐剂添加到本文的配制品中以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如促进多用途(多剂量)配制品的生产。

[0300] 本文中感兴趣的水性载体是这样的载体,其是药学上可接受的(对于施用给人是安全且无毒的)并且可用于制备液体配制品。说明性载体包括注射用无菌水(SWFI)、注射用抑菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0301] 本公开文本的蛋白质可以以包括所述蛋白质和冻干保护剂的冻干配制品存在。所述冻干保护剂可以是糖,例如二糖。在某些实施方案中,所述冻干保护剂可以是蔗糖或麦芽糖。所述冻干配制品还可以包括缓冲剂、表面活性剂、填充剂和/或防腐剂中的一种或多种。

[0302] 可用于稳定所述冻干药物产品的蔗糖或麦芽糖的量可以是至少1:2蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比。在某些实施方案中,蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比可以是从1:2至1:5。

[0303] 在某些实施方案中,在冻干前,可以通过添加药学上可接受的酸和/或碱来设定所述配制品的pH。在某些实施方案中,所述药学上可接受的酸可以是盐酸。在某些实施方案中,所述药学上可接受的碱可以是氢氧化钠。

[0304] 在冻干前,可以将含有本公开文本的蛋白质的溶液的pH调节在6至8之间。在某些实施方案中,所述冻干药物产品的pH范围可以是从7至8。

[0305] 在某些实施方案中,可以以10mM-200mM的量添加盐或缓冲剂组分。所述盐和/或缓冲剂是药学上可接受的,并且源自各种已知酸(无机和有机)与“成碱”金属或胺。在某些实施方案中,所述缓冲剂可以是磷酸盐缓冲剂。在某些实施方案中,所述缓冲剂可以是甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲剂,在这种情况下,钠、钾或铵离子可以用作反离子。

[0306] 在某些实施方案中,可以添加“填充剂”。“填充剂”是向冻干混合物中添加质量并

有助于冻干饼的物理结构(例如,促进基本上均匀的冻干饼的生产,其保持开放的孔结构)的化合物。说明性填充剂包括甘露醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨醇。本发明的冻干配制品可以含有此类填充剂。

[0307] 可以任选地将防腐剂添加到本文的配制品中以减少细菌作用。防腐剂的添加可以例如促进多用途(多剂量)配制品的生产。

[0308] 在某些实施方案中,所述冻干药物产品可以用水性载体构成。本文中感兴趣的水性载体是这样的载体,其是药学上可接受的(例如,对于施用给人是安全且无毒的)并且可用于在冻干后制备液体配制品。说明性稀释剂包括SWFI、BWFI、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或右旋糖溶液。

[0309] 在某些实施方案中,用SWFI(USP)或0.9%氯化钠注射液(USP)重构本公开文本的冻干药物产品。在重构期间,冻干粉溶解成溶液。

[0310] 在某些实施方案中,本公开文本的冻干蛋白质产品用约4.5mL注射用水构成,并且用0.9%盐水溶液(氯化钠溶液)稀释。

[0311] 可以改变本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得有效实现针对特定患者、组合物和施用方式的所需治疗反应而对患者无毒的活性成分的量。

[0312] 具体剂量可以是每名患者的均匀剂量,例如50-5000mg蛋白质。可替代地,患者的剂量可以根据患者的大约体重或表面积进行调整。确定适当剂量的其他因素可以包括待治疗或预防的疾病或病症、疾病的严重程度、施用途径以及患者的年龄、性别和身体状况。本领域技术人员常规地对确定用于治疗的适当剂量所必需的计算进行进一步的细化,尤其是根据本文公开的剂量信息和测定。还可以通过使用已知的用于确定与适当的剂量-反应数据结合使用的剂量的测定来确定剂量。可以在监测疾病进展时调整个体患者的剂量。可以测量患者中可靶向构建体或复合物的血液水平,以查看是否需要调整剂量以达到或维持有效浓度。药物基因组学可以用于确定哪些可靶向构建体和/或复合物及其剂量最可能对给定个体有效(Schmitz等人,Clinica Chimica Acta 308:43-53,2001;Steimer等人,Clinica Chimica Acta 308:33-41,2001)。

[0313] 通常,基于体重的剂量是从约0.01μg至约100mg/kg体重,如约0.01μg至约100mg/kg体重、约0.01μg至约50mg/kg体重、约0.01μg至约10mg/kg体重、约0.01μg至约1mg/kg体重、约0.01μg至约100μg/kg体重、约0.01μg至约50μg/kg体重、约0.01μg至约10μg/kg体重、约0.01μg至约1μg/kg体重、约0.01μg至约0.1μg/kg体重、约0.1μg至约100mg/kg体重、约0.1μg至约50mg/kg体重、约0.1μg至约10mg/kg体重、约0.1μg至约1mg/kg体重、约0.1μg至约100μg/kg体重、约0.1μg至约10μg/kg体重、约0.1μg至约1μg/kg体重、约1μg至约100mg/kg体重、约1μg至约50mg/kg体重、约1μg至约10mg/kg体重、约1μg至约1mg/kg体重、约1μg至约100μg/kg体重、约1μg至约50μg/kg体重、约1μg至约10μg/kg体重、约10μg至约100mg/kg体重、约10μg至约50mg/kg体重、约10μg至约10mg/kg体重、约10μg至约1mg/kg体重、约10μg至约100μg/kg体重、约10μg至约50μg/kg体重、约50μg至约100mg/kg体重、约50μg至约50mg/kg体重、约50μg至约10mg/kg体重、约50μg至约1mg/kg体重、约50μg至约100μg/kg体重、约100μg至约100mg/kg体重、约100μg至约50mg/kg体重、约100μg至约10mg/kg体重、约100μg至约1mg/kg体重、约1mg至约100mg/kg体重、约1mg至约50mg/kg体重、约1mg至约10mg/kg体重、约10mg至约100mg/kg体重、约10mg至约50mg/kg体重、约50mg至约100mg/kg体重。

[0314] 剂量可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次,或甚至每2至20年给予一次。本领域普通技术人员可以基于所测量的停留时间和体液或组织中的可靶向构建体或复合物的浓度容易地估计用于给药的重复率。本发明的施用可以是静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、胸膜内、鞘内、腔内、通过经由导管灌注或通过直接病灶内注射。这可以每天施用一次或多次,每周施用一次或多次,每月施用一次或多次,以及每年施用一次或多次。在一些实施方案中,瘤内地施用所述异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)。在一些实施方案中,以比全身施用时更低的剂量或频率瘤内地施用所述异二聚体Fc融合蛋白。在一些实施方案中,在施用局部麻醉剂后,瘤内地施用所述异二聚体Fc融合蛋白。在一些实施方案中,根据肿瘤块的直接触诊瘤内地施用所述异二聚体Fc融合蛋白。

IV.治疗应用

[0315] 本发明提供了用于使用本文所述的异二聚体Fc融合结合蛋白和/或本文所述的药物组合物治疗癌症的方法。通过向有需要的患者施用有效量的本文所述的异二聚体Fc融合蛋白,所述方法可以用于治疗多种癌症。在一些实施方案中,通过本文公开的方法治疗的癌症是局部晚期恶性肿瘤。在一些实施方案中,所述局部晚期恶性肿瘤可以被完全切除。在一些实施方案中,所述局部晚期恶性肿瘤已经被完全切除,并且在切除之后提供所述治疗。

[0316] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)作为单一疗法用于治疗晚期恶性肿瘤。在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)用作严重感染性疾病的主动免疫疗法的佐剂。在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)用作预防性疫苗接种的佐剂。在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白用于治疗放疗后的骨髓抑制。

[0317] 本发明还提供了降低造血毒性的方法。造血毒性可以由遗传、感染或环境原因(包括但不限于辐照和化疗)引起。例如,在某些实施方案中,本发明提供了治疗与辐射(例如,电离辐射、α辐射、β辐射、γ辐射、X辐射或中子辐射)相关的疾病或障碍的方法。例如,在某些实施方案中,本发明提供了治疗放射疗法后的骨髓抑制的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本文所述的异二聚体Fc融合蛋白或配制品。在某些实施方案中,所述放射疗法的剂量是至少1、5、10、15或20Gy。在某些实施方案中,所述放射疗法引起对选自以下的系统、器官或组织的损害:骨髓、淋巴系统、免疫系统、粘膜组织、粘膜免疫系统、胃肠系统、心血管系统、神经系统、生殖器官、前列腺、卵巢、肺、肾、皮肤和大脑。在某些实施方案中,本发明的方法减少所述损害。

[0318] 本文提供的方法可用于治疗由辐射引起的骨髓抑制。因此,在某些实施方案中,本发明提供了治疗在意外暴露于辐射的情况下发生的骨髓抑制的方法,所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的本文所述的异二聚体Fc融合蛋白或配制品。

[0319] 在某些实施方案中,本发明提供了治疗急性放射综合征(ARS)的方法,所述方法包括向有需要的患者施用有效量的本文所述的异二聚体Fc融合蛋白或配制品。ARS包括但不限于造血放射综合征、胃肠放射综合征、神经血管放射综合征和皮肤放射综合征。例如,造血放射综合征至少部分地由造血干细胞池的耗竭引起,并且显示出淋巴细胞减少症和粒细胞减少症的病征。胃肠综合征至少部分地由位于隐窝中的干细胞和祖细胞受损以及无法替换绒毛表面中的细胞引起,并且显示出水样腹泻、脱水、电解质丧失、胃肠道出血和穿孔的

病征。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法在ARS的前驱期进行。前驱期是急性疾患的初始阶段,其特征在于恶心、呕吐、厌食、发热、头痛和/或早期皮肤红斑的症状,通常在暴露于辐射后1-3天内。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法在ARS的潜伏期进行。潜伏期是特征在于症状改善但在实验室测试中表现出淋巴细胞减少症和粒细胞减少症的阶段,并且根据暴露剂量,可能持续数小时至数周。在前驱期或潜伏期中的治疗可能减轻受累系统、器官和/或组织中综合征的发展。在某些实施方案中,本文提供的治疗方法在ARS的明显疾患阶段进行。在此阶段中的治疗仍可能促进从ARS中康复。

[0320] 本发明还提供了增加免疫细胞的存活、增殖、分化和/或活性的方法,所述方法包括使所述免疫细胞与本文公开的异二聚体Fc融合蛋白或配制品接触。在某些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞(例如,$CD4^+$T细胞)。在某些实施方案中,所述免疫细胞是NK细胞。

[0321] 在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)用于治疗诊断患有癌症的受试者。在某些实施方案中,所述癌症是膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、食道癌、胃癌、头颈癌、肝细胞癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、间皮瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、脑癌、肉瘤、神经母细胞瘤或头颈癌细胞的鳞状细胞癌。在某些实施方案中,所述癌症是结肠癌。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白作为单一疗法施用给诊断患有结肠癌的受试者。在某些实施方案中,所述癌症是黑色素瘤。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白作为单一疗法施用给诊断患有黑色素瘤的受试者。在某些实施方案中,所述癌症是乳腺癌。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白作为单一疗法施用给诊断患有乳腺癌的受试者。

[0322] 在某些实施方案中,本公开文本提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患者仅施用单剂量的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白。在某些实施方案中,所述单剂量的量足以诱导对所述癌症的完全反应。在某些实施方案中,所述单剂量的量足以延迟或防止所述癌症的复发。

[0323] 在某些实施方案中,本公开文本提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患者仅施用单剂量的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二多肽;或包含所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白和药学上可接受的载体的配制品。

[0324] 在某些实施方案中,包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二多肽的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白或包含所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白(例如,包含SEQ ID NO:290和SEQ ID NO:291)和药学上可接受的载体的配制品的单剂量的量足以诱导对所述癌症的完全反应。在某些实施方案中,所述单剂量的量足以延迟或防止所述癌症的复发。在某些实施方案中,完全治疗的癌症(例如,用本发明的IL-12-Fc融合蛋白治疗后的完全反应)的复发被延迟或防止6个月至72个月或更长时间(例如,6个月、12个月、24个月、36个月、48个月、60个月、72个月、84个月或96个月)。

[0325] 在某些实施方案中,用单剂量或更多的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白(例如,包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二多肽)治疗的癌症是转移性癌症。在某些实施方案中,所述转移性癌症是局部、区域或远端转移性癌症。在某些实施方案中,单剂量或多剂量的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白(例如,包含

含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二多肽)通过远位效应来治疗远端癌症,其不是源器官或组织的原发癌和/或治疗方案的直接靶标。在某些实施方案中,在包括放射和/或化疗的治疗计划期间和/或之后,异二聚体IL-12-Fc融合蛋白的远位效应得到增强。在某些实施方案中,单剂量或多剂量的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白(例如,包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二多肽)通过诱导全身抗肿瘤反应来治疗患者的癌症,所述全身抗肿瘤反应例如通过患者血清和/或肿瘤中IFNγ、CXCL9和/或CXCL10的表达增加来确定。

V.组合疗法

[0326] 本发明的另一个方面提供了组合疗法。本文所述的多特异性结合蛋白可以与另外的治疗剂组合使用以治疗癌症。

[0327] 在某些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)作为组合疗法施用以治疗诊断患有癌症的受试者。在某些实施方案中,所述癌症是膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、食道癌、胃癌、头颈癌、肝细胞癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、间皮瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、脑癌、肉瘤、神经母细胞瘤或头颈癌细胞的鳞状细胞癌。在某些实施方案中,所述癌症是结肠癌。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白作为组合疗法施用给诊断患有结肠癌的受试者。在某些实施方案中,所述癌症是黑色素瘤。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白作为组合疗法施用给诊断患有黑色素瘤的受试者。在某些实施方案中,所述癌症是乳腺癌。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白作为组合疗法施用给诊断患有乳腺癌的受试者。

[0328] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)与选自以下的另一种治疗剂组合用于治疗晚期恶性肿瘤:细胞毒性化疗;放疗;靶向参与抗肿瘤免疫反应的分子(如CTLA-4、PD-1、PD-L1或TGF-β)的抗体;通过ADCC作用于肿瘤相关抗原的抗体;结合NKG2D、CD16和肿瘤相关抗原的多特异性抗体,任选地与靶向PD-1或PD-L1的抗体组合施用;个性化癌症疫苗;溶瘤癌症疫苗;以及与靶向PD-1或PD-L1的抗体组合施用的个性化疫苗。

[0329] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)与另一种疗法组合用于治疗恶性肿瘤(例如,晚期恶性肿瘤),所述另一种疗法包括但不限于NK靶向疗法(例如,CAR-NK疗法)、抗体疗法、检查点抑制剂疗法、另外的细胞因子疗法、先天免疫系统激动剂疗法、化疗、靶向剂疗法、放疗、过继性NK疗法、干细胞移植(SCT)疗法、激动性抗体、嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法、T细胞受体(TCR)工程化疗法、多特异性结合蛋白(TriNKET)、诱导细胞衰老的药剂以及疫苗和/或溶瘤病毒疗法。在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白与选自以下的两种或更多种另外的疗法组合用于治疗恶性肿瘤(例如,晚期恶性肿瘤):NK靶向疗法(例如,CAR-NK疗法)、抗体疗法、检查点抑制剂疗法、另外的细胞因子疗法、先天免疫系统激动剂疗法、化疗、靶向剂疗法、放疗、过继性NK疗法、干细胞移植(SCT)疗法、激动性抗体、嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法、T细胞受体(TCR)工程化疗法、多特异性结合蛋白(TriNKET)、诱导细胞衰老的药剂以及疫苗和/或溶瘤病毒疗法。

[0330] 在一些实施方案中,本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12的异二聚体

Fc融合蛋白)与癌症疫苗或靶向PD-1或PD-L1的抗体组合用于治疗可以被完全切除的局部晚期恶性肿瘤。

[0331] 本发明的蛋白质也可以用作手术切除原发病变的补充。

[0332] 可以选择本发明的异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12的异二聚体Fc融合蛋白)和另外的治疗剂的量和施用的相对时机,以便实现期望的联合治疗效果。例如,当向需要这种施用的患者施用组合疗法时,所述组合中的治疗剂或包含所述治疗剂的一种或多种药物组合物可以以任何顺序施用,例如像相继地、并行时地、一起地、同时地等。此外,例如,异二聚体Fc融合蛋白可以在所述另外的一种或多种治疗剂发挥其预防或治疗作用的时间期间施用,或反之亦然。

[0333] 如本文所公开的,本发明的方法包括共同施用异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)和另外的治疗剂的组合。如本文所公开的,本发明的方法包括共同施用包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白和另外的治疗剂的组合。

[0334] 共同施用包括这样的方法,其中同时地给予异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)和另外的治疗剂,其中相继地给予异二聚体Fc融合蛋白和另外的治疗剂,以及其中间歇地或连续地或以下的任何组合给予异二聚体Fc融合蛋白和另外的治疗剂中的任一种或两种:同时地、相继地、间歇地和/或连续地。熟练技术人员将认识到,间歇施用不一定与相继施用相同,因为间歇还包括药剂的第一次施用,然后在该同一药剂的时间之后另一次施用。此外,熟练技术人员理解,在一些实施方案中,间歇施用还包括相继施用,因为间歇施用确实包括在再次施用第一药剂之前中断药剂的第一次施用与不同药剂的施用。此外,熟练技术人员还将知道,连续施用可以通过多种途径(包括静脉内滴注(IV输注)或饲管等)实现。

[0335] 此外,并且以更一般的方式,术语“共同施用”包括这样的任何和所有方法,其中对受试者的异二聚体Fc融合蛋白的单独施用和另外的治疗剂的单独施用在任何时间范围内重叠。

[0336] 向受试者施用异二聚体Fc融合蛋白或另外的治疗剂的频率在本领域中已知为Qnd或qnd,其中n是连续施用该药剂的频率(以天计)。例如,Q3d将是每三(3)天施用一次药剂。在某些实施方案中,所述方法包括以Q1d、Q2d、Q3d、Q4d、Q5d、Q6d、Q7d、Q8d、Q9d、Q10d、Q14d、Q21d、Q28d、Q30d、Q90d、Q120d、Q240d或Q365d向受试者施用异二聚体Fc融合蛋白和/或另外的治疗剂中的任一种或两种或其任何组合。

[0337] 在某些实施方案中,间歇地施用异二聚体Fc融合蛋白和/或另外的治疗剂中的任一种或两种。在某些实施方案中,所述方法包括以施用之间至少十(10)分钟、十五(15)分钟、二十(20)分钟、三十(30)分钟、四十(40)分钟、六十(60)分钟、两(2)小时、三(3)小时、四(4)小时、六(6)小时、八(8)小时、十(10)小时、十二(12)小时、十四(14)小时、十八(18)小时、二十四(24)小时、三十六(36)小时、四十八(48)小时、三(3)天、四(4)天、五(5)天、六(6)天、七(7)天、八(8)天、九(9)天、十(10)天、十一(11)天、十二(12)天、十三(13)天、十四(14)天、三(3)周或四(4)周的延迟向受试者施用异二聚体Fc融合蛋白或另外的治疗剂中的任一种或两种。在某些实施方案中,具有延迟的施用遵循这样的模式,其中连续施用异二聚体Fc融合蛋白和/或另外的治疗剂中的一种或两种或其任何组合持续从约十(10)分钟至约三百六十五(365)天的给定时间段,然后不施用持续从约十(10)分钟至约三十(30)天的给定时

间段。

[0338] 在某些实施方案中,间歇地施用异二聚体Fc融合蛋白和/或另外的治疗剂中的任一种或两种或其组合,而连续地给予另一者。在某些实施方案中,相继地施用第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白与第二有效量的另外的治疗剂的组合。

[0339] 在某些实施方案中,同时地施用异二聚体Fc融合蛋白和另外的治疗剂。在某些实施方案中,相继地施用第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白与第二有效量的另外的治疗剂的组合。在此类实施方案中,所述组合也被称为“共同施用”,因为所述术语包括这样的任何和所有方法,其中受试者暴露于所述组合中的两种组分。然而,此类实施方案并不限于仅在一种配制品或组合物中给出的组合。可能的是,某些浓度的异二聚体Fc融合蛋白和所述另外的治疗剂以一定的间隔递送是更有利的,因此,第一有效量和第二有效量可以根据所施用的配制品而改变。

[0340] 在某些实施方案中,同时地或相继地施用异二聚体Fc融合蛋白和所述另外的治疗剂。在某些实施方案中,在第二有效量的另外的治疗剂后相继地施用第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白。在某些实施方案中,在第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白后相继地施用第二有效量的另外的治疗剂。

[0341] 在某些实施方案中,在一种配制品中施用异二聚体Fc融合蛋白(例如,包含IL-12亚基的异二聚体Fc融合蛋白)和另外的治疗剂的组合。在某些实施方案中,在两(2)种组合物中施用所述组合,其中在与第二有效量的另外的治疗剂的配制品分开的配制品中施用第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白。在某些实施方案中,在两(2)种组合物中施用所述组合,其中在与第二有效量的另外的治疗剂的配制品分开的配制品中施用第一有效量的所述异二聚体Fc融合蛋白。在某些实施方案中,在第二有效量的另外的治疗剂后相继地施用第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白。在某些实施方案中,在第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白后相继地施用第二有效量的另外的治疗剂。在某些实施方案中,施用异二聚体Fc融合蛋白和所述另外的治疗剂;随后,间歇地施用所述异二聚体Fc融合蛋白和所述另外的治疗剂两者持续至少二十四(24)小时。在某些实施方案中,以非重叠的每隔一天的时间表施用所述异二聚体Fc融合蛋白和所述另外的治疗剂。

[0342] 在某些实施方案中,在第二有效量的另外的治疗剂后不少于四(4)小时施用第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白。在某些实施方案中,在第二有效量的另外的治疗剂后不少于十(10)分钟、不少于十五(15)分钟、不少于二十(20)分钟、不少于三十(30)分钟、不少于四十(40)分钟、不少于六十(60)分钟、不少于一(1)小时、不少于两(2)小时、不少于四(4)小时、不少于六(6)小时、不少于八(8)小时、不少于十(10)小时、不少于十二(12)小时、不少于二十四(24)小时、不少于两(2)天、不少于四(4)天、不少于六(6)天、不少于八(8)天、不少于十(10)天、不少于十二(12)天、不少于十四(14)天、不少于二十一(21)天或不少于三十(30)天施用第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白。在某些实施方案中,在第一有效量的异二聚体Fc融合蛋白后不少于十(10)分钟、不少于十五(15)分钟、不少于二十(20)分钟、不少于三十(30)分钟、不少于四十(40)分钟、不少于六十(60)分钟、不少于一(1)小时、不少于两(2)小时、不少于四(4)小时、不少于六(6)小时、不少于八(8)小时、不少于十(10)小时、不少于十二(12)小时、不少于二十四(24)小时、不少于两(2)天、不少于四(4)天、不少于六(6)天、不少于八(8)天、不少于十(10)天、不少于十二(12)天、不少于十四(14)天、不少于二十一(21)

天或不少于三十(30)天施用第二有效量的另外的治疗剂。

[0343] 在某些实施方案中,异二聚体Fc融合蛋白和/或另外的治疗剂中的任一种或两种通过选自以下的途径来施用:静脉内、皮下、皮肤、口服、肌内和腹膜内。在某些实施方案中,静脉内地施用异二聚体Fc融合蛋白和/或另外的治疗剂中的任一种或两种。在某些实施方案中,口服地施用异二聚体Fc融合蛋白和/或另外的治疗剂中的任一种或两种或其任何组合。

[0344] 熟练技术人员应理解,本公开文本的单位剂量形式可以以相同或不同的物理形式来施用,即经由胶囊或片剂口服施用和/或通过液体经由IV输注施用等。此外,每次施用的单位剂量形式可能因特定的施用途径而异。对于异二聚体Fc融合蛋白和另外的治疗剂的组合中的任一种或两种,可能存在几种不同的剂型。因为不同的医疗状况可以保证不同的施用途径,所以本文所述的组合的相同组分在组成和物理形式上可能完全相同,并且仍可能需要以不同的方式和可能在不同的时间给予以缓解病症。例如,诸如持续性恶心(尤其是伴随呕吐)等的状况可能使得使用口服剂型变得困难,并且在这种情况下,可能需要通过吸入、经颊、舌下或栓剂途径代替地或同样地施用另一种单位剂型,甚至可能与之前或之后使用的其他剂型相同的剂型。特定剂型可能是异二聚体Fc融合蛋白和另外的治疗剂的某些组合的要求,因为可能存在与像化学稳定性或药代动力学等各种因素有关的问题。

NK靶向疗法

[0345] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与NK靶向疗法组合。例如,在一个实施方案中,将所述异二聚体Fc融合蛋白与靶向NKp46的治疗剂共同施用。在某些实施方案中,靶向NKp46的治疗剂还结合CD16、一种或多种肿瘤相关抗原或其组合。靶向NKp46的示例性治疗剂更详细地描述于美国申请号US20170198038 A1(出于所有目的通过引用并入本文)中。

[0346] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与双特异性和三特异性杀伤接合剂(BiKE和TriKE)疗法(包括靶向NK细胞的BiKE和TriKE疗法)组合。BiKE和TriKE由每种感兴趣的抗体的可变区的单条重链(VH)和轻链(VL)构成。VH和VL结构域通过短的柔性多肽接头连接以防止解离。BiKE和TriKE更详细地描述于美国申请号US20180282386 A1和US20180258396A1(出于所有目的通过引用并入本文)中。BiKE和TriKE可以含有对NK细胞具有特异性的结合结构域。

[0347] 在某些实施方案中,BiKE和TriKE疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有高风险骨髓增生异常综合征、急性髓细胞性白血病、系统性肥大细胞增多症或肥大细胞白血病的受试者。在某些实施方案中,BiKE和TriKE疗法作为3个每周治疗块的单个疗程施用。在某些实施方案中,治疗块包括4次连续的24小时连续输注(大约96小时),随后是72小时的休息。在某些实施方案中,以5μg/kg/天、10μg/kg/天、25μg/kg/天、50μg/kg/天、100μg/kg/天或200μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以至少5μg/kg/天、至少10μg/kg/天、至少25μg/kg/天、至少50μg/kg/天、至少100μg/kg/天或至少200μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以至少1μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以至少5μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以至少200μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以至少500μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以至

少1000μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以200μg/kg/天或更少的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以500μg/kg/天或更少的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以1000μg/kg/天或更少的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以1-200μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以5-200μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以1-500μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以1-1000μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以5-500μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以5-1000μg/kg/天的剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以最大耐受剂量施用BiKE和TriKE疗法。在某些实施方案中,以小于最大耐受剂量施用BiKE和TriKE疗法。

多特异性结合蛋白("TriNKET")疗法

[0348] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与包含多特异性结合蛋白的疗法组合,所述多特异性结合蛋白包含:(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;(b)结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合位点;以及(c)足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的第三抗原结合位点("TriNKET")(例如,在国际公开号WO 2019/157332中描述的包含各种NKG2D结合剂和肿瘤相关抗原结合位点的多特异性结合蛋白,将其与其中所述的多特异性结合蛋白有关的内容通过引用并入本文),以治疗已知或怀疑患有癌症的受试者。示例性肿瘤相关抗原包括但不限于HER2、CD20、CD33、B细胞成熟抗原(BCMA)、EpCAM、CD2、CD19、CD25、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、CLL1/CLEC12A、FLT3、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4、HLA-E和PD-L1。

[0349] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与包含基于体重的一定剂量的多特异性结合蛋白的疗法组合。例如,基于体重的多特异性结合蛋白的剂量是从约0.01μg至约100mg/kg体重,如约0.01μg至约100mg/kg体重、约0.01μg至约50mg/kg体重、约0.01μg至约10mg/kg体重、约0.01μg至约1mg/kg体重、约0.01μg至约100μg/kg体重、约0.01μg至约50μg/kg体重、约0.01μg至约10μg/kg体重、约0.01μg至约1μg/kg体重、约0.01μg至约0.1μg/kg体重、约0.1μg至约100mg/kg体重、约0.1μg至约50mg/kg体重、约0.1μg至约10mg/kg体重、约0.1μg至约1mg/kg体重、约0.1μg至约100μg/kg体重、约0.1μg至约10μg/kg体重、约0.1μg至约1μg/kg体重、约1μg至约100mg/kg体重、约1μg至约50mg/kg体重、约1μg至约10mg/kg体重、约1μg至约1mg/kg体重、约1μg至约100μg/kg体重、约1μg至约50μg/kg体重、约1μg至约10μg/kg体重、约10μg至约100mg/kg体重、约10μg至约50mg/kg体重、约10μg至约10mg/kg体重、约10μg至约1mg/kg体重、约10μg至约100μg/kg体重、约10μg至约50μg/kg体重、约50μg至约100mg/kg体重、约50μg至约50mg/kg体重、约50μg至约10mg/kg体重、约50μg至约1mg/kg体重、约50μg至约100μg/kg体重、约100μg至约100mg/kg体重、约100μg至约50mg/kg体重、约100μg至约10mg/kg体重、约100μg至约1mg/kg体重、约1mg至约100mg/kg体重、约1mg至约50mg/kg体重、约1mg至约10mg/kg体重、约10mg至约100mg/kg体重、约10mg至约50mg/kg体重、约50mg至约100mg/kg体重。

[0350] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与包含每天、每周、每月或每年给予一次或多次或甚至每2至20年给予一次的多特异性结合蛋白的剂量的疗法组合。本领域普通技术人员可以基于所测量的停留时间和体液或组织中的可靶向构建体或复合物的

浓度容易地估计用于给药的重复率。多特异性结合蛋白的施用可以是静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、胸膜内、鞘内、腔内、通过经由导管灌注或通过直接病灶内注射。这可以每天施用一次或多次,每周施用一次或多次,每月施用一次或多次,以及每年施用一次或多次。

嵌合抗原受体(CAR)疗法

[0351] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与CAR疗法组合。术语“嵌合抗原受体”或者可替代地“CAR”是指至少包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和含有源自刺激分子的功能性信号传导结构域(在本文中也称为“初级信号传导结构域”)的细胞内信号传导结构域的重组多肽构建体。

[0352] 因此,在某些实施方案中,所述CAR包含结合肿瘤相关抗原的细胞外抗原结合位点、跨膜结构域和包含初级信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。在某些实施方案中,所述CAR还包含源自至少一种共刺激分子的一个或多个功能性信号传导结构域(也称为“共刺激信号传导结构域”)。

[0353] 在一个实施方案中,所述CAR包含嵌合融合蛋白,其包含含有重链可变结构域和轻链可变结构域的肿瘤相关抗原结合结构域(例如,肿瘤相关抗原结合scFv结构域)作为细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和含有初级信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,所述CAR包含嵌合融合蛋白,其包含含有重链可变结构域和轻链可变结构域的肿瘤相关抗原结合结构域(例如,肿瘤相关抗原结合scFv结构域)作为细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和含有共刺激信号传导结构域和初级信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。在某些实施方案中,所述CAR包含嵌合融合蛋白,其包含含有重链可变结构域和轻链可变结构域的肿瘤相关抗原结合结构域(例如,肿瘤相关抗原结合scFv结构域)作为细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和含有两个共刺激信号传导结构域和初级信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。在一个实施方案中,所述CAR包含嵌合融合蛋白,其包含含有重链可变结构域和轻链可变结构域的肿瘤相关抗原结合结构域作为细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和含有至少两个共刺激信号传导结构域和初级信号传导结构域的细胞内信号传导结构域。

[0354] 关于跨膜结构域,在各种实施方案中,所述CAR被设计为包含与所述CAR的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,所述跨膜结构域是天然地与所述CAR中的一个结构域相关的结构域。在一些情形下,可以通过氨基酸取代选择或修饰所述跨膜结构域以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与所述受体复合物的其他成员的相互作用。在另一个实施方案中,所述跨膜结构域能够与CAR T细胞表面上的另一种CAR同二聚化。在另一个实施方案中,可以修饰或取代所述跨膜结构域的氨基酸序列,以便最小化与存在于同一CAR T细胞中的天然结合配偶体的结合结构域的相互作用。

[0355] 所述跨膜结构域可以源自任何天然存在的膜结合或跨膜蛋白。在一个实施方案中,无论何时所述CAR已经与靶标结合,所述跨膜区都能够向所述一个或多个细胞内结构域发信号。在一些实施方案中,所述跨膜结构域包含选自以下的一种或多种蛋白质的一个或多个跨膜区:TCRα链、TCRβ链、TCRζ链、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137和CD154。在一些实施方案中,所述跨膜结构域包含选自以下的一种或多种蛋白质的一个或多个跨膜区:KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1(CD11a、CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD40、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、

NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA1、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、PAG/Cbp、NKG2D和NKG2C。

[0356] 所述细胞外肿瘤相关抗原结合结构域(例如,肿瘤相关抗原结合scFv结构域)可以通过铰链区与所述跨膜结构域连接。可以采用多种铰链,包括但不限于人Ig铰链(例如,IgG4铰链、IgD铰链)、Gly-Ser接头、$(G_4S)_4$接头、KIR2DS2铰链和CD8α铰链。

[0357] 所述CAR的细胞内信号传导结构域负责激活其中已经放置了所述CAR的免疫细胞的至少一种专门功能(例如,T细胞的溶细胞活性或辅助活性,包括细胞因子的分泌)。因此,如本文所用,术语"细胞内信号传导结构域"是指蛋白质的转导效应子功能信号并指导细胞执行专门功能的部分。虽然通常可以采用完整的细胞内信号传导结构域,但在多种情况下不需要使用整条链。就使用所述细胞内信号传导结构域的截短部分而言,这种截短部分可以用于代替完整链,只要它转导效应子功能信号即可。因此,术语细胞内信号传导结构域意在包括细胞内信号传导结构域的足以转导效应子功能信号的任何截短部分。

[0358] 所述CAR的细胞内信号传导结构域包含初级信号传导结构域(即,源自刺激分子的功能性信号传导结构域)和一个或多个共刺激信号传导结构域(即,源自至少一种共刺激分子的功能性信号传导结构域)。

[0359] 如本文所用,术语"刺激分子"是指由免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞或b细胞)表达的分子,其为免疫细胞信号传导途径的至少某个方面提供了以刺激方式调节免疫细胞的激活的一个或多个胞质信号传导序列。在一个实施方案中,所述信号是初级信号,其通过例如TCR/CD3复合物与装载有肽的MHC分子结合而启动,并且其导致T细胞反应(包括但不限于增殖、激活、分化等)的介导。

[0360] 以刺激方式起作用的初级信号传导结构域可以含有信号传导基序(其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM)。在本公开文本中特别有用的含有ITAM的胞质信号传导序列的例子包括源自CD3ζ、共同FcRγ(FCER1G)、FcγRIIa、FcRβ(FcεR1b)、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD79a、CD79b、DAP10和DAP12的那些。在一个实施方案中,任何一种或多种CAR中的初级信号传导结构域包含衍生自CD3-ζ的胞质信号传导序列。

[0361] 在一些实施方案中,所述初级信号传导结构域是TCRζ、FcRγ、FcRβ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、4-1BB和/或CD3-ζ的功能性信号传导结构域。在一个实施方案中,所述细胞内信号传导结构域包含CD3ζ、共同FcRγ(FCER1G)、FcγRIIa、FcRβ(FcεR1b)、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD79a、CD79b、DAP10和/或DAP12的功能性信号传导结构域。在一个特定的实施方案中,所述初级信号传导结构域是与所述T细胞受体复合物相关的ζ链的功能性信号传导结构域。

[0362] 如本文所用,术语"共刺激分子"是指T细胞上的同源结合配偶体,其与共刺激配体特异性结合,从而介导T细胞的共刺激反应,如但不限于增殖。共刺激分子是除抗原受体或其配体以外的为淋巴细胞对抗原有效反应所需的细胞表面分子。此类分子的例子包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1、

CD11a/CD18)、CD2、CD7、CD258(LIGHT)、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体等。此类共刺激分子的其他实例包括CD5、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM(LIGHTR)、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp和与CD83特异性结合的配体。在一些实施方案中,所述CAR的共刺激信号传导结构域是本文所述的共刺激分子的功能性信号传导结构域,所述共刺激分子是例如OX40、CD27、CD28、CD30、CD40、PD-1、CD2、CD7、CD258、NKG2C、B7-H3、与CD83结合的配体、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS和4-1BB(CD137)或其任何组合。

[0363] 如本文所用,术语“信号传导结构域”是指蛋白质的功能部分,其通过在细胞内传递信息以通过产生第二信使或通过响应此类信使充当效应子而经由定义的信号传导途径调节细胞活性来起作用。

[0364] 所述CAR的胞质信号传导部分内的胞质信号传导序列可以以随机或指定的顺序彼此连接。任选地,短的寡肽或多肽接头(例如,长度在2与10个氨基酸之间)可以形成所述连接。

抗体疗法

[0365] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与抗体疗法组合,以治疗已知或怀疑患有癌症的受试者。

[0366] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白与包含抗HER2结合结构域的疗法组合,所述抗HER2结合结构域是如抗HER2抗体或抗HER2抗体平台(例如,包含抗HER2结合结构域的双特异性或三特异性抗体、抗HER2抗体-药物缀合物或抗HER2 CAR)。抗HER2抗体包括但不限于曲妥珠单抗(HERCEPTIN®-Roche/Genentech;Kanjinti-Amgen)、帕妥珠单抗(PERJETA®-Roche/Genentech)和MGAH22(详细描述于美国专利号8,802,093中,出于所有目的通过引用并入本文)。抗HER2抗体平台包括但不限于厄妥索单抗(ertumaxomab)(REXOMUN®-Creative Biolabs)和恩美曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine)(恩美曲妥珠单抗偶联物(ado-trastuzumab emtansine)/T-DM1;KADCYLA®-Roche/Genentech)。在某些实施方案中,所述抗HER2结合结构域疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有癌症的受试者。在某些实施方案中,通过IV输注施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,以1mg/kg/天、2mg/kg/天、3mg/kg/天、4mg/kg/天、5mg/kg/天、6mg/kg/天、7mg/kg/天、8mg/kg/天、9mg/kg/天、10mg/kg/天的剂量施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,以至少1mg/kg/天、至少2mg/kg/天、至少3mg/kg/天、至少4mg/kg/天、至少5mg/kg/天、至少6mg/kg/天、至少7mg/kg/天、至少8mg/kg/天、至少9mg/kg/天、至少10mg/kg/天的剂量施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,以小于1mg/kg/天的剂量施用所述抗HER2结合结构域疗法。

[0367] 在某些实施方案中,所述抗HER2结合结构域疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有乳腺癌的受试者,例如诊断患有过表达HER2的转移性乳

腺癌的受试者。在某些实施方案中,以4mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,在90分钟内通过IV输注以4mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,以2mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,在30分钟内通过IV输注以2mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,以4mg/kg/天的初始剂量施用所述抗HER2结合结构域疗法,然后随后以2mg/kg/天每周进行施用。在某些实施方案中,以4mg/kg/天的初始剂量施用所述抗HER2结合结构域疗法,然后随后以2mg/kg/天每周进行施用持续52周。

[0368] 在某些实施方案中,所述抗HER2结合结构域疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有胃癌的受试者,例如诊断患有过表达HER2的转移性胃癌的受试者。在某些实施方案中,以8mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,在90分钟内通过IV输注以8mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,以6mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,在30-90分钟内通过IV输注以6mg/kg/天施用所述抗HER2结合结构域疗法。在某些实施方案中,以8mg/kg/天的初始剂量施用所述抗HER2结合结构域疗法,然后随后以6mg/kg/天每周进行施用。在某些实施方案中,以8mg/kg/天的初始剂量施用所述抗HER2结合结构域疗法,然后随后以6mg/kg/天每周进行施用持续52周。

[0369] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与包含抗CD20结合结构域的疗法组合,所述抗CD20结合结构域是如抗CD20抗体或抗CD20抗体平台(例如,包含抗CD20结合结构域的双特异性或三特异性抗体、抗CD20抗体-药物缀合物或抗CD20 CAR)。抗CD20抗体包括但不限于利妥昔单抗(RITUXAN®-Roche/Genentech)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)(OCREVUS®-Roche/Genentech)、奥比妥珠单抗(obinutuzumab)(GAZYVA®-Roche/Genentech)、奥法木单抗(ARZERRA®-Novartis)和维妥珠单抗(veltuzumab)。在某些实施方案中,所述抗CD20结合结构域疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有癌症的受试者。在某些实施方案中,通过IV输注施用所述抗CD20结合结构域疗法。在某些实施方案中,以100mg/m^2、200mg/m^2、300mg/m^2、400mg/m^2、500mg/m^2、600mg/m^2、700mg/m^2、800mg/m^2、900mg/m^2或1000mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。在某些实施方案中,以375mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。在某些实施方案中,以至少100mg/m^2、至少200mg/m^2、至少300mg/m^2、至少400mg/m^2、至少500mg/m^2、至少600mg/m^2、至少700mg/m^2、至少800mg/m^2、至少900mg/m^2或至少1000mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。在某些实施方案中,以小于400mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。在某些实施方案中,以小于375mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。

[0370] 在某些实施方案中,所述抗CD20结合结构域疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有非霍奇金淋巴瘤(NHL)的受试者。在某些实施方案中,通过IV输注以375mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。在某些实施方案中,通过IV输注以小于375mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。

[0371] 在某些实施方案中,所述抗CD20结合结构域疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有慢性淋巴细胞白血病(CLL)的受试者。在某些实施方案中,所述抗CD20结合结构域疗法在第一周期中通过IV输注以375mg/m^2的剂量来施用,并且在另外2-6个周期中每个周期通过IV输注以500mg/m^2的剂量来施用。在某些实施方案中,通

过IV输注以小于375mg/m^2的剂量施用所述抗CD20结合结构域疗法。所组合的抗CD20结合结构域和异二聚体Fc融合蛋白疗法可以与氟达拉滨和环磷酰胺(FC)组合使用。

[0372] 在某些实施方案中,所述抗CD20结合结构域疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有类风湿性关节炎(RA)的受试者。在某些实施方案中,通过IV输注作为1000mg的两个剂量(剂量隔开2周)施用所述抗CD20结合结构域疗法。在某些实施方案中,通过IV输注作为1000mg的两个剂量(剂量隔开2周)施用所述抗CD20结合结构域疗法长达24周。在某些实施方案中,将所组合的抗CD20结合结构域和异二聚体Fc融合蛋白疗法与甲氨蝶呤共同施用。

[0373] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与包含含有激动剂抗体的抗体疗法的疗法组合。在某些实施方案中,所述激动剂抗体是抗4-1BB抗体、抗CD137抗体、抗FAP抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗GITR抗体或抗CD27抗体。在某些实施方案中,所述激动剂抗体是双特异性抗体。在某些实施方案中,所述激动剂抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体),其包含选自抗4-1BB抗体、抗CD137抗体、抗FAP抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗GITR抗体或抗CD27抗体的两个或更多个抗原结合结构域。一个说明性例子是靶向4-1BB和CD137的双特异性激动剂抗体,如乌托米单抗(utomilumab)(Pfizer)。

检查点抑制剂疗法

[0374] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法可以与检查点抑制剂疗法组合。可以被靶向以阻断或抑制的说明性免疫检查点分子包括但不限于CTLA-4、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4(属于CD2家族分子,并在所有NK、γδ和记忆CD8+(αβ)T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)和CGEN-15049。免疫检查点抑制剂包括与以下中的一种或多种结合并阻断或抑制以下中的一种或多种的活性的抗体或其抗原结合片段或其他结合蛋白:CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160和CGEN-15049。说明性免疫检查点抑制剂包括说明性免疫检查点抑制剂包括纳武单抗(nivolumamb)(抗PD-1;OPDIVO®-BMS)、AMP224(抗PD-1;NCI)、派姆单抗(抗PD-1;MK-3475/KEYTRUDA®-Merck)、匹地利珠单抗(pidilizumab)(抗PD-1抗体;CT-011-Teva/CureTech)、阿特珠单抗(抗PD-L1;TECENTRIQ®-Roche/Genentech)、度伐鲁单抗(durvalumab)(抗PD-L1;MEDI4736/IMFINZI®-Medimmune/AstraZeneca)、阿维鲁单抗(avelumab)(抗PD-L1;BAVENCIO®-Pfizer)、BMS-936559(抗PD-L1-BMS)、伊匹单抗(抗CTLA-4;YERVOY®-BMS)、替西木单抗(tremelimumab)(抗CTLA-4;Medimmune/AstraZeneca)、利瑞鲁单抗(lirilumab)(抗KIR;BMS)、莫纳珠单抗(monalizumab)(抗NKG2A;Innate Pharma/AstraZeneca)、BY55(抗CD160)、抗OX40、抗TIM3和抗LAG3。

[0375] 在某些实施方案中,所述检查点抑制剂疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有癌症的受试者。在某些实施方案中,通过IV输注施用所述检查点抑制剂疗法。在某些实施方案中,在30分钟内通过IV输注施用所述检查点抑制剂疗法。在某些实施方案中,每3周施用所述检查点抑制剂疗法。在某些实施方案中,以100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg或1000mg的剂量施用所述检查点抑制剂疗

法。在某些实施方案中,以200mg的剂量施用所述检查点抑制剂疗法。在某些实施方案中,以至少100mg、至少200mg、至少300mg、至少400mg、至少500mg、至少600mg、至少700mg、至少800mg、至少900mg或至少1000mg的剂量施用所述检查点抑制剂疗法。在某些实施方案中,以小于200mg的剂量施用所述检查点抑制剂疗法。在某些实施方案中,所述检查点抑制剂疗法与所述异二聚体Fc融合蛋白疗法组合使用,以治疗已知或怀疑患有黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、经典霍奇金淋巴瘤(cHL)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、尿路上皮癌、高微卫星不稳定性癌症、胃癌、宫颈癌、肝细胞癌(HCC)、梅克尔细胞癌(MCC)、肾细胞癌(RCC)的受试者。

另外的细胞因子疗法

[0376] 在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种另外的细胞因子疗法、一种或多种趋化因子疗法或其组合进行组合。在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种另外的细胞因子疗法组合。在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种趋化因子疗法组合。在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包含促炎细胞因子、Th1细胞因子或Th2细胞因子。在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包含重组人细胞因子或趋化因子。

[0377] 在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包括作为白介素(例如,IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21和IL-22)的细胞因子。在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包括作为生长因子(例如,肿瘤坏死因子(TNF)、LT、EMAP-II、GM-CSF、FGF和PDGF)的细胞因子。在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包含抗炎细胞因子(例如,IL-4、IL-10、IL-11、IL-13和TGF)。

[0378] 在一些实施方案中,所述趋化因子疗法包括促炎趋化因子(例如,GRO-α、GRO-b、LIX、GCP-2、MIG、IP10、I-TAC、和MCP-1、RANTES、嗜酸性粒细胞趋化因子、SDF-1和MIP3a)。在一些实施方案中,所述趋化因子疗法包括趋化因子受体。在一些实施方案中,所述趋化因子疗法包括CXC趋化因子受体(例如,CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6和CXCR7)、CC趋化因子受体(例如,CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10和CCR11)、CX3C趋化因子受体(例如,CX3C11)或XC趋化因子受体(例如,XCR1)。在一些实施方案中,所述趋化因子疗法包含G蛋白连接的跨膜受体。

[0379] 在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包含与IL-12信号传导协同的细胞因子疗法。在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包含IL-2细胞因子或其衍生物。在一些实施方案中,所述IL-2疗法是阿地白介素(Proleukin-Prometheus Therapeutics)。在一些实施方案中,静脉内地施用所述IL-2疗法和/或阿地白介素。在一些实施方案中,所述细胞因子疗法包含IL-15细胞因子或其衍生物。在一些实施方案中,所述IL-15疗法是ALT-803(Altor Bioscience)或NKTR-255(Nektar)。在一些实施方案中,皮下地施用所述IL-15疗法、NKTR-255和/或ALT-803。在一些实施方案中,所述趋化因子疗法包含CXCL9趋化因子、CXCL10趋化因子或其衍生物。

[0380] 在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括向受试者施用细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括向受试者施用重组细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括工程化细胞以产生所述细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括离体

地、在体外或在体内工程化细胞以产生所述细胞因子或趋化因子。

[0381] 在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括使用以下来工程化细胞以产生所述细胞因子或趋化因子:基于病毒载体的递送平台,如牛痘、禽痘、自我复制型α病毒、马拉巴病毒、腺病毒(参见例如,Tatsis等人,Adenoviruses,Molecular Therapy(2004)10,616-629);慢病毒,包括但不限于被设计为靶向特定细胞类型或受体的第二、第三或杂交的第二/第三代慢病毒和任何世代的重组慢病毒(参见例如,Hu等人,Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases,Immunol Rev.(2011)239(1):45-61;Sakuma等人,Lentiviral vectors:basic to translational,Biochem J.(2012)443(3):603-18;Cooper等人,Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter,Nucl.Acids Res.(2015)43(1):682-690;Zufferey等人,Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery,J.Virol.(1998)72(12):9873-9880);或腺相关病毒("AAV")载体,如美国专利号5,173,414;Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.5:3251-3260(1985);Tratschin等人,Mol.Cell,Biol.4:2072-2081(1984);Hermonat&Muzyczka,PNAS 81:64666470(1984);和Samuiski等人,J.Virol.63:03822-3828(1989)中更详细地描述的。在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括使用LNP、脂质体或外泌体工程化细胞以产生所述细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括使用基因组编辑,如使用基于核酸酶的基因组编辑系统(例如,基于成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)家族、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)和归巢核酸内切酶(HE)的基因组编辑系统或其衍生物)工程化细胞以产生所述细胞因子或趋化因子。在一些实施方案中,所述细胞因子或趋化因子疗法包括使用电穿孔工程化细胞以产生所述细胞因子或趋化因子。

先天免疫系统激动剂疗法

[0382] 在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种先天免疫系统激动剂组合。

[0383] 在一些实施方案中,所述先天免疫系统激动剂包含toll样受体(TLR)激动剂。在一些实施方案中,所述TLR激动剂包含TLR1/2、TLR2/6、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、TLR7/8或TLR9激动剂。在一些实施方案中,TLR2/6激动剂包含脂蛋白,如细菌脂蛋白或衍生物,如Pam2CSK4。在一些实施方案中,TLR1/2激动剂包含脂蛋白。在一些实施方案中,TLR3激动剂包含dsRNA类似物,如林托莫德(rintatolimod)(AMPLIGEN®-Hemispherx Biopharma)或聚IC-LC(例如,HILTONOL®)。在一些实施方案中,TLR4激动剂包含脂多糖(LPS,也称为内毒素)或衍生物,如脂质A。在一些实施方案中,TLR7激动剂包含ssRNA或衍生物,或咪唑喹啉衍生物,包括但不限于瑞喹莫德(也称为R848)、咪喹莫特(ZYCLARA®,Aldara-Medicis)和嘎德莫特(gardiquimod)。在一些实施方案中,TLR7激动剂也是TLR8激动剂,如咪喹莫特或Medi-9197(AstraZeneca/MedImmune)。在一些实施方案中,TLR9激动剂包含含有CpG的寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)或SD-101(Dynavax)。

[0384] 在一些实施方案中,所述先天免疫系统激动剂包含干扰素基因刺激蛋白(STING)激动剂。在一些实施方案中,所述STING激动剂包含环状二核苷酸(CDN)。在一些实施方案

中,所述CDN包含环状二AMP、环状二GMP或环状GMP-AMP(cGAMP)。在一些实施方案中,所述STING激动剂包含刺激cGAS的核酸(例如,DNA或RNA)。在一些实施方案中,所述STING激动剂是ADU-S100(也称为MIW815-Aduro/Novartis)。

化疗

[0385] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种化疗组合。在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种化疗组合,以治疗诊断患有癌症的受试者。化疗剂的例子包括阿地白介素、奥沃赛德(alvocidib)、抗瘤酮AS2-1、抗瘤酮A10、抗胸腺细胞球蛋白、氨磷汀三水合物、氨基喜树碱、三氧化二砷、β阿立辛(beta alethine)、Bcl-2家族蛋白抑制剂ABT-263、ABT-199、BMS-345541、硼替佐米(VELCADE®)、苔藓虫素1、白消安、卡铂、坎帕斯-1H(campath-1H)、CC-5103、卡莫司汀、醋酸卡泊芬净、氯法拉滨、顺铂、克拉屈滨(LEUSTARIN®)、苯丁酸氮芥(LEUKERAN®)、姜黄素、环孢素、环磷酰胺(Cyloxan、癌得星(Endoxan)、Endoxana、Cyclostin)、阿糖胞苷、地尼白介素、地塞米松、DT PACE、多西他赛、尾海兔素10、阿霉素(ADRIAMYCIN®、ADRIBLASTINE®)、盐酸阿霉素、恩扎妥林(enzastaurin)、阿法依伯汀、依托泊苷、依维莫司(RAD001)、维甲酰酚胺、非格司亭、美法仑、美司钠、夫拉平度、氟达拉滨(FLUDARA®)、格尔德霉素(17-AAG)、异环磷酰胺、盐酸伊立替康、伊沙匹隆、来那度胺(REVLIMID®、CC-5013)、淋巴因子激活的杀伤细胞、美法仑、甲氨蝶呤、盐酸米托蒽醌、莫特沙芬钆、霉酚酸酯、奈拉滨、奥利默森(oblimersen)(GENASENSE®)奥巴托克斯(Obatoclax)(GX15-070)、奥利默森、醋酸奥曲肽、ω-3脂肪酸、奥沙利铂、紫杉醇、PD0332991、聚乙二醇化脂质体盐酸阿霉素、培非格司亭、喷司他丁(Pentstatin)(NIPENT®)、哌立福辛、泼尼松龙、泼尼松、R-罗斯科维汀(R-roscovitine)(SELICILIB®、CYC202)、重组干扰素α、重组白介素-12、重组白介素-11、重组flt3配体、重组人血小板生成素、利妥昔单抗、沙格司亭、柠檬酸西地那非、辛伐他汀、西罗莫司、苯乙烯基砜、他克莫司、坦螺旋霉素(tanespimycin)、替西罗莫司(CC1-779)、沙利度胺、治疗性同种异体淋巴细胞、噻替派、替匹法尼(tipifamib)、VELCADE®(BORTEZOMIB®或PS-341)、长春新碱(ONCOVIN®)、硫酸长春新碱、双酒石酸长春瑞滨、伏立诺他(SAHA)、和FR(氟达拉滨、利妥昔单抗)、CHOP(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、泼尼松)、CVP(环磷酰胺、长春新碱和泼尼松)、FCM(氟达拉滨、环磷酰胺、米托蒽醌)、FCR(氟达拉滨、环磷酰胺、利妥昔单抗)、超CVAD(超分割环磷酰胺、长春新碱、阿霉素、地塞米松、甲氨蝶呤、阿糖胞苷)、ICE(异环磷酰胺、卡铂和依托泊苷)、MCP(米托蒽醌、苯丁酸氮芥和泼尼松龙)、R-CHOP(利妥昔单抗+CHOP)、R-CVP(利妥昔单抗+CVP)、R-FCM(利妥昔单抗+FCM)、R-ICE(利妥昔单抗-ICE)和R-MCP(R-MCP)。

[0386] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种化疗组合,以治疗诊断患有结肠癌、直肠癌或结直肠癌(CRC)的受试者。在某些实施方案中,所述化疗包含FOLFOX(5-FU、亚叶酸和奥沙利铂/乐沙啶)、FOLFIRI(亚叶酸、5-FU和伊立替康/开普拓(Camptosar))、FOLFOXIRI(亚叶酸、5-FU、奥沙利铂和伊立替康)、CapeOx(卡培他滨和奥沙利铂)、与亚叶酸共同施用的5-FU、单独的卡培他滨(XELODA®)或三氟尿苷和地匹福林

(tipiracil)(LONSURF®)。在某些实施方案中,所述化疗包含VEGF靶向剂,如贝伐单抗(AVASTIN®)、阿柏西普(ZALTRAP®)、雷莫卢单抗(CYRAMZA®)或瑞戈非尼(STIVARGA®);或EGFR靶向剂,如西妥昔单抗(爱必妥)或帕尼单抗(VECTIBIX®)。在某些实施方案中,所述化疗与VEGF靶向剂或EGFR靶向剂一起共同施用选自以下的化疗:FOLFOX、FOLFIRI、FOLFOXIRI、CapeOx、与亚叶酸共同施用的5-FU、单独的卡培他滨和三氟尿苷/地匹福林。

[0387] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种化疗组合,以治疗诊断患有乳腺癌的受试者。在某些实施方案中,所述化疗包含阿霉素(ADRIAMYCIN®)、聚乙二醇化脂质体阿霉素、表阿霉素(ELLENCE®)、紫杉醇(泰素)、多西他赛(TAXOTERE®)、白蛋白结合型紫杉醇(ABRAXANE®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(CYTOXAN®)、卡铂(PARAPLATIN®)、顺铂、长春瑞滨(NAVELBINE®)、卡培他滨(希罗达)、吉西他滨(GEMZAR®)、伊沙匹隆(IXEMPRA®)或艾日布林(海乐卫(HALAVEN))。在某些实施方案中,所述化疗包含选自以下的两种或更多种化疗的组合:阿霉素(ADRIAMYCIN®)、聚乙二醇化脂质体阿霉素、表阿霉素(ELLENCE®)、紫杉醇(泰素)、多西他赛(TAXOTERE®)、白蛋白结合型紫杉醇(ABRAXANE®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、环磷酰胺(CYTOXAN®)、卡铂(PARAPLATIN®)、顺铂、长春瑞滨(NAVELBINE®)、卡培他滨(XELODA®)、吉西他滨(GEMZAR®)、伊沙匹隆(IXEMPRA®)和艾日布林(HALAVEN®)。

[0388] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种化疗组合,以治疗诊断患有黑色素瘤/皮肤癌的受试者。在某些实施方案中,所述化疗包含达卡巴嗪(也称为DTIC)、替莫唑胺、白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、紫杉醇、顺铂、卡铂或长春碱。

靶向剂疗法

[0389] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种靶向剂组合。通常,靶向剂作用于特定的分子靶标,如与癌症相关的靶标。靶向剂与标准化疗的区别在于,标准化疗作用于所有快速分裂的正常细胞和癌细胞。靶向剂包括但不限于激素疗法、信号转导抑制剂、基因表达调节剂、凋亡诱导剂、血管生成抑制剂、免疫疗法、毒素递送分子(例如,抗体-药物缀合物)和激酶抑制剂。在某些实施方案中,靶向剂包含受体激动剂或配体。

[0390] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种靶向剂组合,以治疗诊断患有结肠癌、直肠癌或结直肠癌(CRC)的受试者。在某些实施方案中,所述靶向剂包含西妥昔单抗(ERBITUX®)、帕尼单抗(VECTIBIX®)、贝伐单抗(AVASTIN®)、阿柏西普(ZALTRAP®)、瑞戈非尼(STIVARGA®)、雷莫卢单抗(CYRAMZA®)、纳武单抗(OPDIVO®)或伊匹单抗(YERVOY®)。

[0391] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种靶向剂组合,以治疗诊断患有乳腺癌的受试者。在某些实施方案中,所述靶向剂包含依维莫司(AFINITOR®)、他莫昔芬(NOLVADEX®)、托瑞米芬(FARESTON®)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®)、氟维司群(FASLODEX®)、阿那曲唑(ARIMIDEX®)、依西美坦(

AROMASIN®）、拉帕替尼（TYKERB®）、来曲唑（FEMARA®）、帕妥珠单抗（PERJETA®）、恩美曲妥珠单抗偶联物（KADCYLA®）、帕博西尼（IBRANCE®）、瑞博西尼（KISQALI®）、马来酸来那替尼（NERLYNX™）、阿贝西尼（abemaciclib）（VERZENIO™）、奥拉帕尼（LYNPARZA™）、阿特珠单抗（TECENTRIQ®）或阿培利司（alpelisib）（PIQRAY®）。

[0392] 在某些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种靶向剂组合，以治疗诊断患有黑色素瘤/皮肤癌的受试者。在某些实施方案中，所述靶向剂包含维莫德吉（Vismodegib）（ERIVEDGE®）、索尼德吉（sonidegib）（ODOMZO®）、伊匹单抗（YERVOY®）、威罗菲尼（ZELBORAF®）、曲美替尼（MEKINIST®）、达拉菲尼（TAFINLAR®）、派姆单抗（KEYTRUDA®）、纳武单抗（OPDIVO®）、考比替尼（COTELLIC™）、阿利维A酸（PANRETIN®）、阿维鲁单抗（BAVENCIO®）、恩考芬尼（encorafenib）（BRAFTOVI™）、比美替尼（binimetinib）（MEKTOVI®）或西米普利单抗（cemiplimab-rwlc）（LIBTAYO®）。

[0393] 在某些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与受体激动剂或配体疗法组合。在某些实施方案中，所述受体激动剂或配体疗法包含激动剂抗体。在某些实施方案中，所述受体激动剂或配体疗法包含受体配体，如4-1BBL或CD40L。

放疗

[0394] 在一些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与放疗组合。在某些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与放射性同位素颗粒（如铟In-111、钇Y-90或碘I-131）组合。组合疗法的例子包括但不限于碘-131托西莫单抗（BEXXAR®）、钇-90替伊莫单抗（ZEVALIN®）和BEXXAR®与CHOP。在某些实施方案中，所述放疗包含外射束放射疗法（EBRT）、内放射疗法（近距放射疗法）、腔内放射疗法、间质近距放射疗法、放射性栓塞、大分割放射疗法、术中放射疗法（IORT）、三维适形放疗、立体定向放射外科（SRS）或体部立体定向放射疗法（SBRT）。

[0395] 在某些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种放疗组合，以治疗诊断患有结肠癌、直肠癌或结直肠癌（CRC）的受试者。在某些实施方案中，所述放疗包含外射束放射疗法（EBRT）、内放射疗法（近距放射疗法）、腔内放射疗法、间质近距放射疗法或放射性栓塞。

[0396] 在某些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种放疗组合，以治疗诊断患有乳腺癌的受试者。在某些实施方案中，所述放疗包含外射束放射疗法、大分割放射疗法、术中放射疗法（IORT）或三维适形放疗。

[0397] 在某些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与一种或多种放疗组合，以治疗诊断患有黑色素瘤/皮肤癌的受试者。在某些实施方案中，所述放疗包含立体定向放射外科（SRS；例如，使用伽玛刀或线性加速器）或体部立体定向放射疗法（SBRT）。

疫苗和溶瘤病毒疗法

[0398] 在一些实施方案中，所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与能够产生特异性免疫反应（例如，肿瘤特异性免疫反应）的一种或多种免疫原性组合物（例如，疫苗组合物）或溶瘤病

毒组合。

[0399] 在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与疫苗组合物组合。疫苗组合物通常包含对待靶向的肿瘤具有特异性的多种抗原和或新抗原。疫苗组合物也可以被称为疫苗。

[0400] 在一些实施方案中,疫苗组合物还包含佐剂和/或载体。在一些实施方案中,疫苗组合物与能够将所述肽呈递给T细胞的载体(如蛋白质)或抗原呈递细胞(如树突细胞(DC))相关联。在一些实施方案中,载体是能够与抗原或新抗原相关联的支架结构,例如多肽或多糖。

[0401] 通常,佐剂是其混入疫苗组合物中增加或以其他方式改变对抗原或新抗原的免疫反应的任何物质。任选地,佐剂共价或非共价地缀合。佐剂增加对抗原的免疫反应的能力通常表现为免疫介导的反应显著或大幅增加,或疾病症状减轻。例如,体液免疫的增加通常表现为针对抗原产生的抗体滴度的显著增加,并且T细胞活性的增加通常表现为细胞增殖或细胞毒性或细胞因子分泌的增加。佐剂还可以改变免疫反应,例如通过将主要的体液反应或Th反应变成主要的细胞反应或Th反应。合适的佐剂包括但不限于1018ISS、明矾、铝盐、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893、CpG7909、CyaA、dSLIM、GM-CSF、IC30、IC31、咪喹莫特、ImuFact IMP321、IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、Juvlmmune、LipoVac、MF59、单磷酰脂质A、蒙塔尼德(Montanide)IMS1312、蒙塔尼德ISA 206、蒙塔尼德ISA 50V、蒙塔尼德ISA-51、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、PepTel载体系统、PLG微粒、瑞喹莫德、SRL172、病毒体和其他病毒样颗粒、YF-17D、VEGF肽、R848、β-葡聚糖、Pam3Cys、Aquila的QS21刺激子(Aquila Biotech,美国马萨诸塞州伍斯特)(其源自皂素、分枝杆菌提取物和合成细菌细胞壁模拟物)以及其他专有佐剂(如Ribi的Detox、Quil或Superfos)。佐剂(如不完全弗氏佐剂或GM-CSF)是有用的。对树突细胞具有特异性的几种免疫佐剂(例如,MF59)及其制备先前已经进行了描述(Dupuis M等人,Cell Immunol.1998;186(1):18-27;Allison AC;Dev Biol Stand.1998;92:3-11)。也可以使用细胞因子。几种细胞因子已经与影响树突细胞向淋巴组织迁移(例如,TNF-α)、加速树突细胞成熟为T淋巴细胞的有效抗原呈递细胞(例如,GM-CSF、IL-1和IL-4)(美国专利号5,849,589,明确地通过引用以其整体并入本文)和充当免疫佐剂(例如,IL-12)(Gabrilovich D I等人,J Immunother Emphasis Tumor Immunol.1996(6):414-418)直接联系。在一些实施方案中,佐剂包含CpG免疫刺激寡核苷酸。在一些实施方案中,佐剂包含TLR激动剂。

[0402] 有用佐剂的其他例子包括但不限于化学修饰的CpG(例如CpR,Idera);聚(I:C)(例如聚i:CI2U);非CpG细菌DNA或RNA;以及免疫活性小分子和抗体,如环磷酰胺、舒尼替尼、贝伐单抗、西乐葆、NCX-4016、西地那非、他达拉非、伐地那非、索拉非尼、XL-999、CP-547632、帕唑帕尼、ZD2171、AZD2171、伊匹单抗、替西木单抗和SC58175;其可以起治疗作用和/或充当佐剂。佐剂和添加剂的量和浓度可以由熟练技术人员容易地确定,而无需过度的实验。另外的佐剂包括集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,沙格司亭)。

[0403] 在一些实施方案中,疫苗组合物包含多于一种的不同佐剂。在一些实施方案中,疫苗组合物包含任何佐剂物质,包括任何上述物质或其组合。还考虑了疫苗和佐剂可以以任何适当的顺序一起或分开施用。

[0404] 在一些实施方案中,载体(或赋形剂)独立于佐剂而存在。在一些实施方案中,载体

的功能是增加分子量、增加活性或免疫原性、赋予稳定性、增加生物活性或增加血清半衰期。在一些实施方案中,载体帮助向T细胞呈递肽。在一些实施方案中,载体包含本领域技术人员已知的任何合适的载体,例如蛋白质或抗原呈递细胞。载体蛋白的例子包括但不限于钥孔戚血蓝蛋白、血清蛋白(如转铁蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵清蛋白)、免疫球蛋白或激素(如胰岛素)或棕榈酸。对于免疫人,所述载体通常是人可接受且安全的生理学上可接受的载体。然而,破伤风类毒素和/或白喉类毒素是合适的载体。可替代地,所述载体可以是右旋糖酐,例如琼脂糖。

[0405] 在一些实施方案中,疫苗包含基于病毒载体的疫苗平台,如牛痘、禽痘、自我复制型α病毒、马拉巴病毒、腺病毒(参见例如,Tatsis等人,Adenoviruses,Molecular Therapy (2004)10,616-629);或慢病毒,包括但不限于被设计为靶向特定细胞类型或受体的第二、第三或杂交的第二/第三代慢病毒和任何世代的重组慢病毒(参见例如,Hu等人,Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases,Immunol Rev.(2011)239(1):45-61;Sakuma等人,Lentiviral vectors:basic to translational,Biochem J.(2012)443(3):603-18;Cooper等人,Rescue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter,Nucl.Acids Res.(2015)43(1):682-690;Zufferey等人,Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery,J.Virol.(1998)72(12):9873-9880)。通常,在引入宿主时,受感染的细胞表达所述抗原或新抗原,从而引发针对所述一种或多种肽的宿主免疫(例如,CTL)反应。

[0406] 取决于上文提及的基于病毒载体的疫苗平台的包装能力,在一些实施方案中,所述疫苗组合物包含一种或多种病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体包含侧接非突变序列、由接头隔开或前面有靶向亚细胞区室的一个或多个序列的序列(参见例如,Gros等人,Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients,Nat Med.(2016)22(4):433-8;Stronen等人,Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires,Science.(2016)352(6291):1337-41;Lu等人,Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions,Clin Cancer Res.(2014)20(13):3401-10)。可用于免疫方案的牛痘载体和方法描述于例如美国专利号4,722,848中。另一种载体是BCG(卡介菌(Bacille Calmette Guerin))。BCG载体描述于Stover等人(Nature 351:456-460(1991))中。根据本文的描述,可用于治疗性施用或免疫新抗原的多种多样的其他疫苗载体(例如,伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)载体等)对于本领域技术人员而言将是清楚的。

[0407] 在一些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与溶瘤病毒疗法组合。通常,溶瘤病毒是被工程化以主要感染和杀死癌细胞的病毒。在一些实施方案中,除杀死癌细胞的溶瘤病毒外,所述溶瘤病毒还诱导对所述癌细胞的免疫反应。

[0408] 在某些实施方案中,所述异二聚体Fc融合蛋白疗法与溶瘤病毒疗法组合,以治疗诊断患有黑色素瘤/皮肤癌的受试者。在某些实施方案中,所述溶瘤病毒包含talimogene laherparepvec(IMLYGIC®),也称为T-VEC。在一些实施方案中,包含IL-12的亚基的异二聚体Fc融合蛋白与溶瘤病毒(例如,Talimogene Laherparepvec(IMLYGIC®)或T-VEC)

组合用于治疗癌症(例如,晚期恶性肿瘤)。

[0409] 上文的描述对本发明的多个方面和实施方案进行了描述。本专利申请明确地考虑了所述方面和实施方案的所有组合和排列。

实施例

[0410] 现在一般性地描述本发明,通过参考以下实施例将更容易地理解本发明,所述实施例仅用于说明本发明的某些方面和实施方案的目的而被包括在内,并不旨在限制本发明。

实施例1-制备方法

[0411] 本发明的蛋白质通常使用重组DNA技术来制备。在一个示例性实施方案中,将编码第一多肽的第一核酸序列克隆到第一表达载体(pET-pSURE-Puro)中,所述第一多肽包含与第一抗体Fc结构域多肽融合的多亚基蛋白的第一亚基(人IL-12的p40亚基);将编码第二多肽的第二核酸序列克隆到第二表达载体(pET-pSURE-Puro)中,所述第二多肽包含与第二抗体Fc结构域多肽融合的多亚基蛋白的第二不同亚基(人IL-12的p35亚基);并且将第一和第二表达载体一起稳定地转染到宿主细胞中以产生异二聚体Fc融合蛋白。

[0412] 由第一表达载体编码的示例性氨基酸序列示于SEQ ID NO:292中。第一表达载体编码第一多肽,其包含人IL-12的与含有Y349C突变的人IgG1 Fc序列融合的p40亚基。第一多肽还包括促进异二聚化的K360E和K409W突变、以及降低效应子功能的LALAPA(L234A、L235A和P329A)突变。在SEQ ID NO:292中,前导序列以斜体显示,人IL-12的p40亚基序列加下划线,并且突变以粗体显示。

*MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC*IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMV
VLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGG
EVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTC
WWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYS
VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPK
NLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK
DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSPKSSDK
THTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQV**C**TLPPSRDELT**E**NQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS**W**LTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:292)

[0413] 由第二表达载体编码的示例性氨基酸序列示于SEQ ID NO:293中。第二表达载体编码第二多肽,其包含人IL-12的与含有S354C突变的人IgG1 Fc序列融合的p35亚基。第二多肽还包括促进异二聚化的Q347R、D399V和F405T突变、以及降低效应子功能的LALAPA(L234A、L235A和P329A)突变。在SEQ ID NO:293中,前导序列以斜体显示,人IL-12的p35亚基序列加下划线,并且突变以粗体显示。

*MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC*RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAV
SNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCL
NSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL
LMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKI
KLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDK
THTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKAL**A**APIEKTISKAKGQPREP**R**VYTLPP**C**RDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL**V**SDGSF**T**LYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:293)

[0414] 为了实现蛋白质的最高产量,探索第一和第二表达载体的不同比率,以确定转染到宿主细胞中的最佳比率。在转染后,使用本领域已知的方法(如有限稀释、ELISA、FACS、显微术或Clonepix)分离单个克隆以产生细胞库。

[0415] 在适合于生物反应器放大和蛋白质的维持表达的条件下培养克隆。使用本领域已知的方法分离和纯化蛋白质,所述方法包括离心、深度过滤、细胞裂解、均质化、冻融、亲和纯化、凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用交换色谱和混合模式色谱。

实施例2-在CT26肿瘤模型中与沉默的Fc结构域多肽融合的IL-12对肿瘤的抑制

[0416] 本实施例描述了重组鼠IL-12(rmIL-12)的两种IL-12-Fc融合构建体在小鼠结肠癌模型中控制肿瘤进展的相对能力。在本实施例中使用的两种IL-12-Fc融合变体是mIL-12-Fc野生型(DF-mIL-12-Fc wt),其包括与野生型鼠IgG2a Fc结构域多肽的N末端融合的野生型鼠IL-12p40和p35亚基;以及mIL-12-Fc沉默(DF-mIL-12-Fc si),其包括与具有突变L234A、L235A和P329G的鼠IgG2a Fc结构域多肽的N末端融合的野生型鼠IL-12p40和p35亚基。下文示出了蛋白质的氨基酸序列:

mIL-12-p40-mIgG2A-EW(DF-mIL-12-Fc wt的第一链)

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGV
IGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEIL
KNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAV
TCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEAR
QQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWST
PHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGG
NVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG
GPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVH
TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPI
ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSCS
VVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (SEQ ID NO:286)

mIL-12-p35-mIgG2A-RVT(DF-mIL-12-Fc wt的第二链)

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDI
TRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLC
LGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLN
HNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSS
AGGGGSGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK
DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRED
YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV
RAPRVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN
YKNTEPVLVSDGSYTMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH
TTKSFSRTPG (SEQ ID NO:287)

mIL-12-p40-mIgG2A-EW-LALAPG(DF-mIL-12-Fc si的第一链)

MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHGV
IGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEIL
KNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAV
TCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEAR
QQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWST
PHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGG
NVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAA
GGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEV
HTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGA
PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTEKQVTLTCMVTDFMPEDIYV
EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSWLRVEKKNWVERNSYSC
SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG (SEQ ID NO:288)

mIL-12-p35-mIgG2A-RVT-LALAPG(DF-mIL-12-Fc si的第二链)

RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDI
TRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPPQKTSLMMTLC
LGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLN
HNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSS
AGGGGSGGGGSGGGGSPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIK
DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHRED
YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSV
RAPRVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN
YKNTEPVLVSDGSYTMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH
TTKSFSRTPG (SEQ ID NO:289)

[0417] 简而言之,将10^6个CT26-Tyrp1结肠癌细胞皮下注射到Balb/c小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第14天,当肿瘤体积达到270mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(每组n=10),并且用1μg的rmIL-12、摩尔剂量等于1μgrmIL-12的DF-mIL-12-Fc wt、摩尔剂量等于1μg rmIL-12的DF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照每周腹膜内处理一次。评估肿瘤生长持续60天。

[0418] 如图5A-图5C所示,尽管IL-12(图5A)和DF-mIL-12-Fc wt(图5B)在一些小鼠中有效地控制肿瘤进展,但仅DF-mIL-12-Fc si诱导了稳健的肿瘤消退并产生了100%完全肿瘤消退(图5C)。此外,DF-mIL-12-Fc si疗法的处理显著延长了总存活期-100%的处理小鼠在第60天仍然存活,而用同种型对照、DF-mIL-12-Fc wt和IL-12处理的小鼠的中位存活时间分别是27天、33天和46天(图6)。

[0419] 接下来,在控制肿瘤进展方面比较了不同剂量的DF-mIL-12-Fc wt和DF-mIL-12-Fc si。简而言之,将10^6个CT26-Tyrp1结肠癌细胞皮下注射到Balb/c小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第14天,当肿瘤体积达到300mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(每组n=10),并且用摩尔剂量等于1μg或0.1μgrmIL-12的DF-mIL-12-Fc wt或者摩尔剂量等于1μg或0.1μg IL-12的DF-mIL-12-Fc si每周腹膜内处理一次。评估肿瘤生长持续55天。

[0420] 如图7A-图7D所示,在1μg rmIL-12摩尔当量剂量下,用DF-mIL-12-Fc wt处理导致一些小鼠的肿瘤进展减少,并且在两只小鼠中导致完全消退(图7A),但是在0.1μg IL-12摩尔当量剂量下没有观察到肿瘤抑制(图7C)。相比之下,在1μg IL-12摩尔当量剂量下的DF-mIL-12-Fc si处理产生了100%完全肿瘤消退(图7B),并且在0.1μg IL-12摩尔当量的较低剂量下诱导了稳健的肿瘤生长延迟(图7D)。用1μg IL-12摩尔当量的DF-mIL-12-Fc wt处理的小鼠的中位存活期是32天,类似于用0.1μg IL-12摩尔当量的DF-mIL-12-Fc si处理的小鼠的34天的中位存活期,表明DF-mIL-12-Fc si的效力是其野生型变的10倍(图8)。DF-mIL-12-Fc wt在0.1μg IL-12摩尔当量的剂量下无效,并且显示出与同种型处理组相同的24天的中位存活期。

[0421] 接下来,比较了施用DF-mIL-12-Fc si的不同途径的体内功效。简而言之,将10^6个CT26-Tyrp1结肠癌细胞皮下注射到Balb/c小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第14天,当肿瘤体积达到270mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(每组n=10),并且用摩尔剂量等于1μg IL-12的DF-mIL-12-Fc si或摩尔当量的mIgG2a同种型对照每周腹膜内或皮下处理一次。评估肿瘤生长持续超过60天。

[0422] 如图22A-图22B所示,腹膜内(图22A)和皮下(图22B)施用DF-mIL-12-Fc si都诱导了稳健的肿瘤消退并产生了100%完全肿瘤消退。因此,DF-mIL-12-Fc si治疗展现出了使用不同施用途径的功效。

实施例3-在B16F10肿瘤模型中与沉默的Fc结构域多肽融合的IL-12对肿瘤的抑制

[0423] 本实施例描述了DF-mIL-12-Fc wt和DF-mTT-12-Fc si在小鼠黑色素瘤模型中控制肿瘤进展的相对能力。简而言之,将10^6个B16F10黑色素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠中。在肿瘤接种后第8天,当肿瘤体积达到250mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(n=10),并且用0.5μg的IL-12、摩尔剂量等于0.5μg IL-12的DF-mIL-12-Fc wt、摩尔剂量等于0.5μg IL-12的DF-mIL-12-Fc si或0.5μg的mIgG2a同种型对照每周处理一次。评估肿瘤生长持续32天。

[0424] 如图9A-图9C所示,尽管所测试的每种IL-12-Fc构建体都延迟了肿瘤进展,但DF-mIL-12-Fc si在控制肿瘤生长方面是最有效的。用DF-mIL-12-Fc si处理的小鼠的中位存活时间是29天,其长于用同种型对照、DF-mIL-12-Fc wt和IL-12处理的小鼠的中位存活时间,它们分别是16天、26天和22天(图10)。

[0425] 接下来,在控制肿瘤进展方面比较了不同剂量的DF-mIL-12-Fc wt和DF-mIL-12-Fc si。简而言之,将10^6个B16F10黑色素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第8天,将小鼠随机分为不同的处理组(每组n=10),并且用0.5μg或0.1μg IL-12摩尔当量的DF-mIL-12-Fc wt或者0.5μg或0.1μg IL-12摩尔当量的DF-mIL-12-Fc si每周腹膜内处理一次。评估肿瘤生长持续30天。

[0426] 如图11A-图11D所示,在两个剂量下,DF-mIL-12-Fc si在抑制肿瘤生长方面都优

于DF-mIL-12-Fc wt。此外,在每个剂量下,用DF-mIL-12-Fc wt处理的小鼠的中位存活期是20天。相比之下,用0.1μg IL-12摩尔当量的DF-mIL-12-Fc si处理的小鼠的中位存活期是21天,并且用0.5μg IL-12摩尔当量的DF-mIL-12-Fc si处理的小鼠的中位存活期是28天(图12)。这些结果证明,与其野生型对应物或同种型对照相比,高剂量(0.5μg IL-12摩尔当量)的DF-mIL-12-Fc si显著增加了小鼠的存活。

[0427] 接下来,将DF-mIL-12-Fc si处理的单剂量施用与先前描述的每周处理进行了比较。简而言之,将10^6个B16F10黑色素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠中。在肿瘤接种后第8天,当肿瘤体积达到200mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(n=10),并且用摩尔剂量等于0.5μg IL-12的DF-mIL-12-Fc si或摩尔当量的mIgG2a同种型对照每周处理一次。评估肿瘤生长持续39天。

[0428] 如图23所示,DF-mIL-12-Fc si的单次施用在100%的小鼠中导致肿瘤外生长减少,尽管与每周施用相比,肿瘤外生长更快地发生(图9C)。另外,小鼠展现出了暂时的体重减轻,但是仅在第一剂量后(数据未示出)。因此,DF-mIL-12-Fc si的单次施用在难以治疗的肿瘤模型中展现出了初始功效,尽管随后的每周施用在此模型中更好地延迟肿瘤外生长。

[0429] 接下来,比较了施用DF-mIL-12-Fc si的不同途径的体内功效。简而言之,将10^6个B16F10黑色素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠中。在肿瘤接种后第7天,当肿瘤体积达到260mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(n=10),并且用摩尔剂量等于1μg IL-12的DF-mIL-12-Fc si或摩尔当量的mIgG2a同种型对照每周腹膜内或皮下处理一次。评估肿瘤生长持续40天。

[0430] 如图24A-图24B所示,腹膜内(图24A)和皮下(图24B)施用DF-mIL-12-Fc si在100%的小鼠中都诱导了肿瘤消退。因此,DF-mIL-12-Fc si治疗展现出了使用不同施用途径的功效。

实施例4-DF-hIL-12-Fc wt和rhIL-12的体外效力

[0431] 使用体外生物测定评估DF-hIL-12-Fc si与rhIL-12相比的效力。

[0432] 使用HEK-Blue IL-12报告物测定评估IL-12效力。从培养物中收获IL-12R+HEK-Blue报告细胞(InvivoGen),并且在培养基中调节至1x 10^6个细胞/mL。在培养基中稀释DF-hIL-12-Fc si(DF IL-12-Fc)和重组人IL-12(rhIL-12;PeproTech)。将100μL的PBMC悬浮液与100μL稀释的测试制品混合并孵育48小时。收获上清液,并且根据制造商的说明通过测量细胞分泌的胚胎碱性磷酸酶来检测IL-12受体和报告细胞稳定表达的信号传导组分的接合。简而言之,将25μL样品上清液与200μL的QUANTI-Blue试剂混合,并且在黑暗中于室温下孵育10分钟。然后用SpectraMax i3x读板器在620nM下读取板,并且报告光密度以表示相对IL-12活性。

[0433] 如图13A所示,IL-12R+HEK报告细胞的SEAP产生随着DF-hIL-12-Fc si或rhIL-12浓度的增加而增加。在所检查的浓度下,在DF-hIL-12-Fc si与rhIL-12之间,在HEK-Blue报告物测定中所测量的IL-12反应是可比的。

[0434] 接下来,通过定量人PBMC的IFNγ产生来评估IL-12效力。使用密度梯度离心从人外周血血沉棕黄层中分离出PBMC,并且在培养基中调节至1x 10^6个细胞/mL。在培养基中稀释DF-hIL-12-Fc si和重组人IL-12(rhIL-12)。将100μL的PBMC悬浮液与100μL稀释的测试

制品混合并孵育48小时。收获上清液,并且使用人IFN-γELISA MAX试剂盒(BioLegend)定量IFNγ。在IFNγELISA板显色后,使用SpectraMax i3x仪器在450nm下读取它们,并且在540nm下进行背景减法。通过从测定标准曲线中插值样品读数来近似估计样品孔中的IFNγ含量。

[0435] 如图13B所示,当用DF-hIL-12-Fc si或rhIL-12培养人PBMC时,IFNγ的产生增加,同时用5μg/ml的PHA处理放大IFNγ反应的幅度。在所检查的浓度下,在DF-hIL-12-Fc si与rhIL-12之间,IL-12刺激后的IFN-γ产生是可比的。

[0436] 因此,尽管两种细胞类型和刺激条件的EC50值相差超过一个数量级,但在两种测定中都展现出了DF-hIL-12-Fc si和rhIL-12的可比活性,表明DF-hIL-12-Fc si构建体的效力表现出与天然重组人IL-12的效力类似的效力。

实施例5-IV输注DF-hIL-12-Fc si或rhIL-12后猴血浆中的IL-12、DF-hIL-12-Fc si和IFNγ浓度

[0437] 在IV输注DF-hIL-12-Fc si或rhIL-12后,在食蟹猴中评估药效学(PD)和药代动力学(PK)。

[0438] 通过IV输注向食蟹猴施用10μg/kg的DF-hIL-12-Fc si和重组人IL-12。

[0439] 使用免疫测定来基于Quantikine ELISA人IL-12p70免疫测定试剂盒检测DF-hIL-12-Fc si和人IL-12:此测定采用定量夹心酶免疫测定技术。将对人IL-12p70具有特异性的单克隆抗体用作固相捕获,并且使用抗体HRP标记的报告物完成检测。将掺有rhIL-12或DF-hIL-12-Fc si参考标准品的标准品和QC以及测试样品移入微量滴定板的孔中,并且样品中存在的任何IL-12p70被固相上的固定的抗体结合。洗去未结合的物质,并且将对人IL-12p70具有特异性的酶联多克隆抗体添加到孔中。洗去未结合的抗体-酶试剂,并且将TMB底物添加到每个孔中。所得的酶反应产生了蓝色产物,当添加酸终止溶液时,其变成黄色。在每个孔中测量到的颜色强度与初始步骤中结合的rhIL-12或DF-hIL-12-Fc si的量成正比。在带有数据收集软件SoftMax Pro企业版4.6的SpectraMax微板读取器上在450nm下读取板,使用540nm作为参考。将数据转换为文本文件,并且在Watson LIMS v.7.2.0.02中导入/处理。使用加权因子为1的逻辑斯谛(自动估计)曲线拟合进行回归。

[0440] 还使用免疫测定(中尺度发现(meso scalediscovery,MSD)-类似ELISA的免疫测定)来检测DF-hIL-12-Fc si,所述免疫测定涉及用猴吸附山羊抗人IgG包被未处理的MSD微量滴定板并在室温下进行孵育。将板洗涤,封闭,洗涤,并且与掺有DF-hIL-12-Fc si参考标准品的标准曲线和质量控制样品以及测试样品一起孵育。在此孵育后,洗涤板,并且将生物素抗人IL-12/IL-23p40作为第一检测抗体添加到板中。在另一个洗涤步骤后,添加链霉亲和素缀合的磺基标签(Sulfo-Tag)作为第二检测抗体。最后一次洗涤板,将MSD读取缓冲液T添加到板中,并且使用MSD Sector成像器S600读取板。将原始MSD数据导出为文本文件,然后使用Envigo定制设计的编程Excel电子表格将其转换为Watson LIMS兼容文件。在Watson LIMS软件v.7.2.0.02中导入和回归数据。

[0441] 进行中尺度发现方法,用于对食蟹猴血浆中NHP促炎生物标志物进行相对定量测量。所述方法使用夹心免疫测定程序对食蟹猴K2 EDTA血浆(称为猴血浆)中的促炎组1生物标志物进行相对定量测量:IFNγ、IL-1β、IL-2、IL-6IL-8和IL-10。所述方法是基于用于V-PLEX和V-PLEX Plus的MSD非人灵长类动物(NHP)试剂盒,目录号:K15056D-1、K15056D-2、

K15056D-4、K15056D-6、K15056G-1、K15056G-2、K15056G-4、K15056G-6。所述方法采用与食蟹猴反应的人捕获和检测抗体。所述试剂盒提供了在96孔多斑点板的每个孔中在独立的明确定义的斑点上预包被有捕获抗体的板。将板与猴血浆样品一起孵育,洗涤,然后与和电化学发光(ECL)标记(MSD磺基标签)缀合的检测抗体(对每种分析物具有特异性)一起孵育。样品中的分析物与固定在工作电极表面上的捕获抗体结合;结合的分析物募集检测抗体使夹心完整。洗涤板,并且添加MSD读取缓冲液以为电化学发光(ECL)创造适当的化学环境。将板装载到MSD Sector成像器600(SI600)仪器中,其中将电压施加到板电极上,从而使得捕获的标记发光。所述仪器测量用相对光单位(RLU)来表示的发射光强度,以提供样品中分析物的相对定量测量。将原始RLU数据导出为文本文件,然后使用Envigo定制设计的编程Excel电子表格将其转换为Watson LIMS兼容文件。随后在Watson LIMS软件v.7.2.0.02中导入和回归数据。

[0442] 图14示出了IV施用后DF-hIL-12-Fc si和重组人IL-12随时间的相对血浆浓度。数据表明,如预期的那样,DF-hIL-12-Fc si和rhIL-12的浓度随时间降低。然而,随着时间的推移,与rhIL-12相比,DF-hIL-12-Fc si展现出了延长的半衰期和总体上更大的暴露。

[0443] 图14还示出了IV施用后猴血浆中IFNγ的相对浓度(PD)。数据表明,如通过IFNγ产生所评估的,DF-hIL-12-Fc si和rhIL-12的药效学在IV施用后都展现出了活性。然而,与rhIL-12相比,DF-hIL-12-Fc si展现出了更高的峰活性和更长的持续时间。

实施例6-小鼠替代物DF-mIL-12-Fc si的药理学表征

[0444] 检查了半衰期延长的鼠IL-12变体(称为DF-mIL-12-Fc si)的血清半衰期和体内药效学。

[0445] 在非荷瘤Balb/c小鼠中静脉内注射对应于1μg IL-12的当量摩尔量的DF-mIL-12-Fc si,并且将PK/PD特征与IL-12进行了比较。向幼稚Balb/c(n=6)静脉内注射1μg DF-mIL-12-Fc si和IL-12(当量摩尔为1μg IL-12)。在注射后0.017、0.5、3、6、24、48、72、96、144和219小时对血液采样。如先前所述,通过ELISA分析血清中的IL-12和IFNγ水平。

[0446] 如图15A和图15B所示并如表15所定量,DF-mIL-12-Fc si显示出大约30小时的持久的血清半衰期(图15B,DF-mIL-12-Fc si $T_{1/2}$=29.85小时),其是IL-12的血清半衰期(图15A;IL-12$T_{1/2}$=6.05小时)的5倍。除延长的半衰期外,与IL-12(AUC=20304)相比,DF-mIL-12-Fc si介导的IFNγ产生(AUC=916654)也延长了。

[0447] 接下来,比较了施用DF-mIL-12-Fc si的不同途径的PK/PD特性。通过静脉内、腹膜内或皮下施用在非荷瘤Balb/c小鼠中注射作为单剂量的对应于1μg IL-12的当量摩尔量的DF-mIL-12-Fc si,并且如所述的评估PK/PD特征。

[0448] 如图15C-图15E所示并如表16所定量,静脉内(图15C)、腹膜内(图15D)或皮下(图15E)施用都导致DF-mIL-12-Fc si介导的IFNγ产生在不同施用途径之间可比。值得注意的是,皮下施用导致较低的IL-12Cmax。因此,DF-mIL-12-Fc si施用的药代动力学特性(例如,IL-12浓度)根据施用途径而变化,而药效学特性(IFNγ产生)在不同途径之间保持持久且相对可比。

表15-DF-mIL-12-Fc si和rmIL-12的药理学特征

	IL-12					IFNγ 10
	$T_{1/2}$	跨度	T_{max}	C_{max}	AUC	AUC
rmIL-12	6.05	9.15	0.13	358.65	999.81	20304
DF-mIL-12-Fc	29.85	6.92	0.19	258.20	5636.49	916654

表16-经由IV、IP和SC的DF-mIL-12-Fc si的药理学特征

	T1/2	跨度	Tmax	Cmax	AUC
静脉内	31.5	6.4	0.2	257.2	5985.6
腹膜内	34.70	5.19	N/A	75.09	3964.21
皮下	37.5	4.1	36.0	23.1	1938.1

实施例7-在B16F10小鼠模型中DF-mIL-12-Fc si和PD-1阻断的组合

[0449] 进行DF-mIL-12-Fc si和PD-1阻断的组合疗法,以分析是否可以在已建立的B16F10肿瘤中放大抗肿瘤免疫反应。

[0450] 向C57BL/6小鼠皮下注射10^6个B16F10黑色素瘤细胞到小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第8天,将小鼠随机分组(每组n=10)。当平均肿瘤体积达到约245mm^3时,用0.5μg同种型对照、0.5μg DF-mIL-12-Fc si、200μg抗PD-1克隆RMP1-14或组合的DF-mIL-12-Fc si/抗PD-1腹膜内处理小鼠。每周给动物注射一次DF-mIL-12-Fc si,并且每周给动物注射两次抗PD-1。评估肿瘤生长持续60天,并且监测存活和体重。

[0451] 如图16A-图16C所示,虽然单独施用DF-mIL-12-Fc si延迟了肿瘤消退(图16A)并且单独施用PD-1对肿瘤生长具有最小的作用(图16B),但DF-mIL-12-Fc si与PD-1阻断的组合进一步延迟了肿瘤生长(图16C),表明抗PD-1治疗进一步放大了对DF-mIL-12-Fc si治疗的抗肿瘤反应。

[0452] 如图17A和图17B所示,在DF-mIL-12-Fc si疗法和与PD-1阻断的组合的情况下的总存活期延长,显示出的中位存活期是29天(DF-mIL-12-Fc si单一疗法)和36天(组合),相比之下,同种型处理的小鼠是15天且200μg抗PD-1处理的小鼠是17.5天(图17A)。值得注意的是,尽管反应率高,但DF-mIL-12-Fc si和组合疗法的方案似乎被携带B16F10肿瘤的小鼠良好地耐受(图17B)。

[0453] 因此,与任一种单独治疗相比,DF-mIL-12-Fc si和PD-1阻断的组合疗法展现出了改进的功效。

实施例8-在B16F10小鼠模型中DF-mIL-12-Fc si与mcFAE-C26.99TriNKET的组合

[0454] 进行DF-mIL-12-Fc si和mcFAE-C26.99 TriNKET的组合疗法,以分析是否可以在已建立的B16F10肿瘤中放大抗肿瘤免疫反应。

[0455] 向C57BL/6小鼠皮下注射10^6个B16F10黑色素瘤细胞到小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第7天,将小鼠随机分组(每组n=10)。当肿瘤平均值达到200mm^3时,用150μg同种型对照或者0.5μg DF-mIL-12-Fc si、150μgTriNKET或组合DF-mIL-12-Fc si/TriNKET腹膜内处理小鼠。评估肿瘤生长持续60天,并且监测存活和体重。

[0456] 如图18A所示,用DF-mIL-12-Fc si的单一疗法导致肿瘤生长减少。在200mm^{3}的起始肿瘤体积下用mcFAE-C26.99 TriNKET作为单一药剂进行处理没有导致肿瘤进展延迟(图18B)。相比之下,与单独的DF-mIL-12-Fc si相比,DF-mIL-12-Fc si与mcFAE-C26.99的组合进一步增强了抗肿瘤反应(图18C),并且产生30%完全反应者(CR)(n=3),表明TriNKET治疗进一步放大了对DF-mIL-12-Fc si治疗的抗肿瘤反应。

[0457] 如图19A所示,在DF-mIL-12-Fc si疗法和与mcFAE-C26.99TriNKET的组合的情况下的总存活期延长,显示出的中位存活期是29天(DF-mIL-12-Fc si单一疗法)和60天(TriNKET组合),相比之下,同种型处理的小鼠是16天且TriNKET处理的小鼠是17天。值得注意的是,尽管反应率高,但DF-mIL-12-Fc si和组合疗法的方案似乎被携带B16F10肿瘤的小鼠良好地耐受(图19B)。

[0458] 在首次肿瘤接种后72天,用2x 10^{6}个B16F10黑色素瘤细胞再激发三个完全反应者(来自上述实验的CR并且数据呈现于图18C中)。将年龄匹配的幼稚C57BL/6小鼠用作对照组。来自初始DF-mIL-12-Fc si/TriNKET组合处理组的3只小鼠中有1只保持无肿瘤,另一只小鼠在第95天开始显示出肿瘤形成,并且第三只小鼠的肿瘤进展与年龄匹配的对照组类似(图20),表明在组合疗法的情况下形成了免疫记忆。

[0459] 因此,与任一种单独治疗相比,DF-mIL-12-Fc si和TriNKET的组合疗法展现出了改进的功效,包括在小鼠群体中展现出完全的持久的反应。

实施例9-在CT26肿瘤模型中用DF-mIL-12-Fc si治疗促进完全恢复

[0460] 本实施例证明,在携带CT26肿瘤的小鼠中用DF-mIL-12-Fc si治疗促进恢复。

[0461] 简而言之,将10^{6}个CT26-Tyrp1结肠癌细胞皮下注射到Balb/c小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第14天,当肿瘤体积达到270mm^{3}时,将小鼠随机分为不同的处理组,并且用摩尔剂量等于1μg rmIL-12的1μgDF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照每周腹膜内注射一次。评估肿瘤生长持续60天。在首次肿瘤接种后72天,用10^{6}个CT26细胞再激发完全反应者。将年龄匹配的幼稚Balb/C小鼠用作对照组。

[0462] 图21A是示出接种CT26肿瘤细胞并施用单剂量的1μgDF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图21B是示出接种CT26肿瘤细胞并施用每周剂量的1μg DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的体重的图。图21C是示出通过接种CT26肿瘤细胞再激发的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0463] 如图21A-图21B所示,与mIgG2a同种型相比,DF-mIL-12-Fc si的施用导致稳健的肿瘤消退,并且没有可观察到的影响处理动物的体重的毒性。如图21C所示,初始的DF-mIL-12-Fc si处理的小鼠保持无肿瘤,表明在用DF-mIL-12-Fc si处理的情况下形成了免疫记忆。

实施例10-在CT26肿瘤模型中腹膜内或皮下递送的DF mIL-12-Fc si有效地减小肿瘤体积

[0464] 本实施例证明,腹膜内或皮下施用DF-mIL-12-Fc si在携带CT26肿瘤的小鼠中确保100%完全恢复。

[0465] 简而言之,将10^{6}个CT26-Tyrp1结肠癌细胞皮下注射到Balb/c小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第14天,当肿瘤体积达到270mm^{3}时,将小鼠随机分为不同的处理组,并且用摩尔剂量等于1μg IL-12的1μg DF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照每周腹腔内注射一

次,或者用摩尔剂量等于1μgIL-12的1μg DF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照每周皮下注射一次。评估肿瘤生长持续多于60天。

[0466] 图22A是示出接种CT26肿瘤细胞并施用每周剂量的1μgDF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型(腹膜内递送)的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图22B是示出接种CT26肿瘤细胞并施用每周剂量的1μg DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型(皮下递送)的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0467] 如图22A-图22B所示,腹膜内或皮下递送DF-mIL-12-Fc si都有效地减小CT26肿瘤体积。

实施例11-在B16F10小鼠模型中单剂量施用DF-mIL-12-Fc si有效地减小肿瘤体积

[0468] 本实施例证明,单剂量的DF-mI12-Fc si在携带B16F10黑色素瘤肿瘤的小鼠中有效地减小肿瘤体积。

[0469] 简而言之,向C57BL/6小鼠皮下注射10^6个B16F10黑色素瘤细胞到小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第7天,将小鼠随机分组。当肿瘤平均值达到200mm^3时,用单剂量的同种型对照或1μg的DF-mIL-12-Fc si腹膜内处理小鼠。评估肿瘤生长持续50天。

[0470] 如图23所示,在携带B16F10肿瘤的小鼠中,单次施用μg的DF-mIL-12-Fc si有效地减小肿瘤体积。

实施例12-在B16F10小鼠模型中腹膜内或皮下递送的DF-mIL-12-Fc si有效地减小肿瘤体积

[0471] 本实施例证明,腹膜内或皮下施用DF-mIL-12-Fc si在携带B16F10黑色素瘤肿瘤的小鼠中导致100%完全恢复。

[0472] 简而言之,将10^6个B16F10黑色素瘤细胞皮下注射到C57BL/6小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第7天,将小鼠随机分组。当肿瘤平均值达到200mm^3时,向小鼠每周腹腔内注射一次摩尔剂量等于1μg IL-12的1μgDF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照,或者每周皮下注射一次摩尔剂量等于1μg IL-12的1μg DF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照。评估肿瘤生长持续40天。

[0473] 如图24A-图24B所示,与同种型对照相比,腹膜内或皮下递送DF-mIL-12-Fc si都有效地减小B16F10肿瘤体积。

实施例13-DF-mIL-12-Fc si作为单剂量是有效的

[0474] 本实施例证明,DF-mIL-12-Fc si当作为单剂量施用时有效地减小CT26肿瘤体积,并且当经由重复给药施用时,甚至更有效。

[0475] 简而言之,将10^6个CT26-Tyrp1结肠癌细胞皮下注射到Balb/c小鼠的侧腹中。在肿瘤接种后第14天,当肿瘤体积达到270mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(每组n=10),并且用摩尔剂量等于0.1μg IL-12的单剂量的1μg DF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照每周腹膜内注射一次。可替代地,向小鼠每周腹膜内注射一次摩尔剂量等于1μg IL-12的1μgDF-mIL-12-Fc si或1μg的mIgG2a同种型对照。评估肿瘤生长持续多于60天。

[0476] 图25A是示出接种CT26肿瘤细胞并施用单剂量的1μgDF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图25B是示出接种CT26肿瘤细胞并施用每周剂量的1μg DF-mIL-12-Fc si或mIgG2a同种型的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0477] 如图21A和图25A所示,与mIgG2a同种型相比,单次施用1μg的DF-mIL-12-Fc si导致荷瘤小鼠的稳健的70％完全恢复。然而,如图5C和图25B所示,与mIgG2a同种型相比,重复每周给药1μg的DF-mIL-12-Fc si确保了荷瘤小鼠的100％完全恢复。如图21B所示,即使重复施用DF-mIL-12-Fc si也是良好地耐受的,并且没有观察到毒性,如通过体重所评估的。

[0478] 另外,在相对侧腹用5x 10^5个CT26-Tyrp1结肠癌细胞再激发完全反应者(CR),并且将肿瘤进展与以相同肿瘤剂量激发的幼稚小鼠进行了比较。如图21C所示,虽然肿瘤在幼稚小鼠中生长,但100％的完全反应者在再激发后仍然无肿瘤。因此,DF-mIL-12-Fc si的单次施用在小鼠群体中展现出了完全的持久的反应。

实施例14-用单次皮下剂量的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中的药代动力学

[0479] 利用类似ELISA的免疫测定-中尺度发现(MSD)免疫测定方法,在食蟹猴中在皮下注射1μg/kg(图28A)、2μg/kg(图28B)或4μg/kg(图28C)的DF-hIL-12-FC si后确定了药代动力学。简而言之,将未处理的MSD微量滴定板包被上猴吸附山羊抗人IgG,并且在室温下进行孵育。在包被和孵育后,将板洗涤,封闭,洗涤,并且与掺有DF-hIL-12-Fc si参考标准品的标准曲线和质量控制样品以及测试样品一起孵育。在孵育后,洗涤板,并且将生物素抗人IL-12/IL-23p40作为第一检测抗体添加到板中。在另一个洗涤步骤后,添加链霉亲和素缀合的磺基标签作为第二检测抗体。在将MSD读取缓冲液T添加到板中之前,最后一次洗涤板。使用MSD Sector成像器S6000读取板。

[0480] 图28A-图28C是示出用单次皮下剂量的1μg/kg(图28A)、2μg/kg(图28B)或4μg/kg(图28C)的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中的药代动力学的线形图。

[0481] 数据表明,如预期的那样,DF-hIL-12-Fc si和rhIL-12的浓度随时间降低,并且在所测试的所有剂量下具有类似的药代动力学谱。

实施例15-用单次皮下剂量的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中的细胞因子释放

[0482] 使用MSD免疫测定试剂盒确定了在食蟹猴中在皮下注射1μg/kg(图29A和图29B)、2μg/kg(图29C和图29D)或4μg/kg(图29E和图29F)的DF-hIL-12-Fc si后细胞因子的定量测量。所述方法使用夹心免疫测定试剂盒(促炎组1生物标志物和V-PLEX Plus趋化因子组1NHP试剂盒)对食蟹猴K2 EDTA血浆(称为猴血浆)中的促炎组1生物标志物进行相对定量测量:IFNγ、IL-1β、IL-2、IL-6IL-8和IL-10。所述方法是基于用于V-PLEX和V-PLEX Plus的MSD非人灵长类动物(NHP)试剂盒,目录号:K15056D-1、K15056D-2、K15056D-4、K15056D-6、K15056G-1、K15056G-2、K15056G-4、K15056G-6。所述方法采用与食蟹猴反应的人捕获和检测抗体。所述试剂盒提供了在96孔多斑点板的每个孔内在独立的明确定义的斑点上预包被有捕获抗体的板。将板与猴血浆样品一起孵育,洗涤,然后与和电化学发光(ECL)标记(MSD磺基标签)缀合的检测抗体(对每种分析物具有特异性)一起孵育。样品中的分析物与固定在工作电极表面上的捕获抗体结合;结合的分析物募集检测抗体使夹心完整。洗涤板,并且添加MSD读取缓冲液以为电化学发光(ECL)创造适当的化学环境。将板装载到MSD Sector成像器600(SI600)仪器中,其中将电压施加到板电极上,从而使得捕获的标记发光。所述仪器测量用相对光单位(RLU)来表示的发射光强度,以提供样品中分析物的相对定量测量。将原始RLU数据导出为文本文件,然后使用Envigo定制设计的编程Excel电子表格将其转换为Watson LIMS兼容文件。随后在Watson LIMS软件v.7.2.0.02中导入和回归数据。

[0483] 图29A-图29F是示出用单次皮下剂量的1μg/kg(图29A和图29B)、2μg/kg(图29C和

图29D)或4μg/kg(图29E和图29F)的DF-hIL-12-Fc si处理的食蟹猴中IFNγ(图29A、图29C和图29E)和IP10/CXCL10(图29B、图29D和图29F)的浓度的线形图。

[0484] 如图29A所示,单次皮下剂量的1μg/kg的DF-hIL-12-Fc si没有产生可检测水平的IFNγ。皮下剂量的2μg/kg和4μg/kg的DF-hIL-12-Fc si在一些动物中导致IFNγ水平增加,其在给药后第4天达到峰值(图29C和图29E)。皮下剂量的1μg/kg、2μg/kg和4μg/kg的DF-hIL-12-Fc si都导致IP10/CXCL10水平升高,其在给药后第4天达到峰值(图29B、图29D和图29F)。

实施例16-在4T1原位小鼠模型中使用放射或化疗的DF-mIL-12-Fc si组合疗法

[0485] 为了证明是否可以放大通过施用DF-mIL-12-Fc si引起的抗肿瘤活性,进行了使用放射或化疗的组合研究。简而言之,向Balb/c小鼠的乳腺脂肪垫中原位注射5x 10^5个4T1-luc肿瘤细胞。在肿瘤接种后第14天,将小鼠随机分组(每组n=10)。将小鼠用同种型、DF-mIL-12-Fc si(都等摩尔于1μg IL-12)皮下处理,用5mg/kg Doxil®(化疗)静脉内处理,或者用10Gy作为单一疗法或用DF-mIL-12-Fc si与Doxil®或放射的组合辐照。随时间评估肿瘤生长。图30是示出接种乳腺癌细胞并施用每周剂量的同种型对照、DF-mIL-12-Fc si、多喜(Doxil)(化疗)或者用10Gy作为单一疗法或DF-mIL-12-Fc si与Doxil®或放射的组合辐照的单独小鼠的肿瘤生长曲线的图。图示出了肿瘤生长组平均值±均值标准误差。

[0486] 如图30所见,尽管DF-mIL-12-Fc si的单一疗法本身在携带4T1肿瘤的小鼠中是有效的,但组合疗法放大了抗肿瘤免疫反应,在10%-30%的小鼠中导致肿瘤完全消退。

实施例17-DF-mIL-12-Fc si介导的针对大的PD-1阻断抗性的CT26结肠癌肿瘤的抗肿瘤功效

[0487] 本实施例分析DF-mIL-12-Fc si是否引起针对PD-1阻断抗性CT26-Tyrp1肿瘤的有效力的抗肿瘤反应。简而言之,向Balb/c小鼠注射0.5x10^6个CT26-Tyrp1肿瘤细胞。在接种后,当平均肿瘤体积达到约120mm^3时,将小鼠在第9天随机分组。用200μg同种型或抗PD-1抗体处理小鼠(每周两次)。图31A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用同种型对照或抗PD-1抗体处理(每两周)的Balb/c小鼠的肿瘤生长曲线的图。在第17天,将先前用抗PD-1处理的组(平均肿瘤体积为约800mm^3)细分为两个处理组。第1组继续每周接受两次PD-1阻断处理,第2组接受PD-1阻断(每周两次)以及DF-mIL-12-Fc si(每周1μg)。图31B是示出用抗PD-1抗体(每两周)以及用1μg的DF-mIL-12-Fc si的每周处理进行处理的先前经抗PD-1抗体处理的Balb/c小鼠的肿瘤生长曲线的图。

[0488] 如图31A所示,抗PD-1单一疗法未能控制肿瘤进展。然而,如图31B所示,添加DF-mIL-12-Fc si导致有效的肿瘤消退。

实施例18-DF-mIL-12-Fc si针对大的CT26结肠癌肿瘤的局部治疗诱导远位抗肿瘤反应

[0489] 本实施例证明了DF-mIL-12-Fc si治疗是否可以诱导远位治疗效果。简而言之,为Balb/c在左侧(0.8x 10^6个肿瘤细胞)和右侧(0.4x 10^6个肿瘤细胞)两侧侧腹皮下植入CT26-Tyrp1结肠癌细胞。在肿瘤接种后第13天,向左侧肿瘤每周注射一次0.1μg同种型对照或0.1μg DF-mIL-12-Fc si,持续2-3周。图32A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用同种型对照或DF-mIL-12-Fc si处理一次(每周)的Balb/c小鼠的处理(Tr)肿瘤的肿瘤生长曲线的图。右侧肿瘤不做处理(NT)。

[0490] 图32B是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞的Balb/c小鼠中未处理的(NT)肿瘤的肿瘤生长曲线的图。

[0491] 如图32A-图32B所示,对照同种型处理的肿瘤在左右两个部位都逐渐生长。如图32A-图32B所示,DF-mIL-12-Fc si在局部注射部位(图32A)和远端未处理的肿瘤(图32B)处引起有效的抗肿瘤反应,表明了远位治疗效果。

实施例19-DF-mIL-12-Fc si介导的针对大的CT26结肠癌肿瘤的抗肿瘤功效

[0492] 本实施例证明,DF-mIL-12-Fc si(其包括与具有突变L234A、L235A和P329G的鼠IgG2a Fc结构域多肽的N末端融合的野生型鼠IL-12p40和p35亚基)(在实施例2中讨论)针对较大的肿瘤体积是有效的。

[0493] 测试了DF-mIL-12-Fc si介导的针对大的CT26结肠癌肿瘤的抗肿瘤功效。简而言之,向Balb/c小鼠皮下注射10^6个CT26-Tyrp1结肠癌细胞。在肿瘤接种后第18天,当肿瘤体积达到800mm^3时,将小鼠随机分为不同的处理组(每组n=10),并且用摩尔剂量等于1μg或2μg IL-12的DF-mIL-12-Fc si或摩尔当量的mIgG2a同种型对照腹膜内处理一次或者每周腹膜内处理一次。

[0494] 评估肿瘤生长持续65天。图26A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μg mIgG2a同种型对照或1μg DF-mIL-12-Fc si处理一次(每周)的Balb/c小鼠的肿瘤生长曲线的图。图26B是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μg mIgG2a同种型对照或2μg DF-mIL-12-Fc si处理一次(每周)的Balb/c小鼠的肿瘤生长曲线的图。图33A是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μgmIgG2a同种型对照或2μg DF-mIL-12-Fc si处理一次的Balb/c小鼠的肿瘤生长曲线的图。图33B是示出接种CT26-Tyrp1肿瘤细胞并用2μg mIgG2a同种型对照、1μg DF-mIL-12-Fc si(每周施用)、2μg DF-mIL-12-Fc si(每周施用)或2μg DF-mIL-12-Fc si(一次)处理的Balb/c小鼠的平均肿瘤生长曲线的图。图26A、图26B和图33A示出了单独小鼠的肿瘤生长曲线。图33B示出了肿瘤平均值±均值标准误差。

[0495] 如图26A、图26B和图33B所示,每周剂量(1μg或2μg)的DF-mIL-12-Fc si有效地控制肿瘤进展,并且100%的小鼠对DF-mIL-12-Fc si处理有反应。另外,如图33A所示,用2μg DF-mIL-12-Fc si的单次处理显示出肿瘤消退,产生100%的反应率。在本实施例中描述的数据和图证明,当作为单剂量施用时,DF-mIL-12-Fc si不仅有效地减小较大的CT26肿瘤体积,而且有效地减小CT26肿瘤体积。

实施例20-针对B16F10黑色素瘤的DF-mIL-12-Fc si治疗在血清和肿瘤中诱导细胞因子和趋化因子产生

[0496] 本实施例证明,DF-mIL-12-Fc si治疗导致携带B16F10肿瘤的C57BL/6小鼠的血液和肿瘤中IFNγ、CXCL9和CXCL10的水平升高。简而言之,向C57BL/6小鼠皮下注射10^6个B16F10黑色素瘤细胞。在肿瘤接种后第7天(当平均肿瘤体积达到150mm^3时),将小鼠随机分组(每组n=8)。用同种型对照、IL-12或等摩尔于1μg IL-12的DF-mIL-12-Fc腹膜内处理小鼠。

[0497] 在处理后72小时后,制备血清和肿瘤裂解物,并且使用多重技术分析IFNγ(图27A)、CXCL9(图27B)和CXCL10(图27C)表达。图27A-图27C示出了小鼠中的平均细胞因子/趋化因子水平。

[0498] 如图27A-图27C所示,单次施用0.5μg的DF-mIL-12-Fc si导致血清中(左图)和肿

瘤内(右图)IFNγ(图27A)、CXCL9(图27B)和CXCL10(图27C)的表达增加,而IL-12处理几乎没有或没有效果。

实施例21-具有LALAPA和LALAPG突变的DF hIL-12-Fc si具有类似的IFNγ刺激活性和消除的FcγR结合

[0499] 本实施例证明了具有IgG1 Fc(其具有LALAPA(L234A、L235A和P329A)突变或LALAPG(L234A、L235A和P329G)突变)的DF hIL-12-Fc si的IFNγ刺激和FcγR结合活性。简而言之,用5μg/ml植物凝集素(PHA)和具有LALAPA或LALAPG突变的DF hIL-12-Fc-si的剂量滴定物两者将人PBMC培养2天。在2天刺激后,收获上清液,并且通过ELISA测量IFNγ含量。为了确定FcγR结合活性,通过流式细胞术检测与表达高亲和力FcγR CD32和CD64的THP-1细胞结合的荧光团缀合的hIgG1同种型抗体(83nM)。

[0500] 如图34A所示,hIL-12-Fc-LALAPA和hIL-12-Fc-LALAPG具有类似的与PHA同时刺激PBMC产生IFNγ的能力,远高于PHA单独产生的量。

[0501] 如图34B所示,在混合物中同时包含16倍摩尔过量的hIL-12-Fc-wt(1.3μM)与标记的hIgG1同种型抗体导致结合信号显著降低,这可能是由于对IgG1与CD32和CD64结合的竞争。相比之下,在相同浓度下,用hIL-12-Fc-LALAPA和hIL-12-Fc-LALAPG孵育都没有导致可检测到的IgG1同种型结合,表明可归因于LALAPA和LALAPG突变的两种蛋白质的FcγR接合被消除。

编号实施方案

[0502] 本文公开的实施方案包括如在本公开文本的编号实施方案中提供的实施方案P1至P121。

[0503] 实施方案P1:一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:

第一多肽,其包含第一抗体Fc序列;以及第二多肽,其包含第二不同抗体Fc序列,

其中所述第一多肽还包含多亚基蛋白的亚基的蛋白质序列,

其中所述蛋白质序列通过包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(SEQ ID NO:1)的接头与所述第一抗体Fc序列融合,其中X表示L或E;并且

所述多亚基蛋白的另外的亚基与所述第二不同抗体Fc序列融合,并且所述多亚基蛋白的亚基彼此结合,

其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列彼此结合。

[0504] 实施方案P2:根据实施方案P1所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述接头包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)。

[0505] 实施方案P3:根据实施方案P2所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0506] 实施方案P4:根据实施方案P3所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0507] 实施方案P5:根据实施方案P2所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白

的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0508] 实施方案P6:根据实施方案P5所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0509] 实施方案P7:根据实施方案P2所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0510] 实施方案P8:根据实施方案P7所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0511] 实施方案P9:根据实施方案P2至P8中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中将所述蛋白质序列与所述第一抗体Fc序列融合的接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)组成。

[0512] 实施方案P10:根据实施方案P1所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述接头包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)。

[0513] 实施方案P11:根据实施方案P10所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0514] 实施方案P12:根据实施方案P11所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0515] 实施方案P13:根据实施方案P10所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0516] 实施方案P14:根据实施方案P13所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0517] 实施方案P15:根据实施方案P10所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0518] 实施方案P16:根据实施方案P15所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0519] 实施方案P17:根据实施方案P10至P16中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中将所述蛋白质序列与所述第一抗体Fc序列融合的接头由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)组成。

[0520] 实施方案P18:一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:

第一多肽,其包含第一抗体Fc序列;以及第二多肽,其包含第二不同抗体Fc序列,

其中所述第一多肽还包含多亚基蛋白的亚基的蛋白质序列，

其中所述蛋白质序列通过包含氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:6)或PKSSDKTHTCPPCPAPEX$_1$X$_2$GX$_3$(SEQ ID NO:237)的接头与所述第一抗体Fc序列融合，其中X$_1$表示L或A，X$_2$表示L、E或A，并且X$_3$表示A或G；并且

所述多亚基蛋白的另外的亚基与所述第二不同抗体Fc序列融合，并且所述多亚基蛋白的亚基彼此结合，并且

其中当X$_1$表示L和/或X$_2$表示L时，所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列中的至少一个包含用于促进异二聚化的Q347R突变，

其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列彼此结合。

[0521] 实施方案P19:根据实施方案P18所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述接头包含氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:7)或PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)。

[0522] 实施方案P20:根据实施方案P19所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:241)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0523] 实施方案P21:根据实施方案P20所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:241)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0524] 实施方案P22:根据实施方案P19所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:242)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0525] 实施方案P23:根据实施方案P22所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:242)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0526] 实施方案P24:根据实施方案P19所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:243)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0527] 实施方案P25:根据实施方案P24所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:243)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0528] 实施方案P26:根据实施方案P19至P25中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白，其中将所述蛋白质序列与所述第一抗体Fc序列融合的接头由氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:7)或PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)组成。

[0529] 实施方案P27:根据实施方案P18所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述接头包含氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:9)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)。

[0530] 实施方案P28:根据实施方案P27所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:244)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0531] 实施方案P29:根据实施方案P28所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:244)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0532] 实施方案P30:根据实施方案P27所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:65)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:245)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0533] 实施方案P31:根据实施方案P30所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:64)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:245)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0534] 实施方案P32:根据实施方案P27所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:246)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0535] 实施方案P33:根据实施方案P32所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:246)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0536] 实施方案P34:根据实施方案P27至P33中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中将所述蛋白质序列与所述第一抗体Fc序列融合的接头由氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:9)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)组成。

[0537] 实施方案P35:根据实施方案P18所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述接头包含氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:11)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)。

[0538] 实施方案P36:根据实施方案P35所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:247)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0539] 实施方案P37:根据实施方案P36所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID

NO:12)或GGGGSGGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:247)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0540] 实施方案P38:根据实施方案P35所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)或GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:248)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0541] 实施方案P39:根据实施方案P38所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)或GGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:248)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0542] 实施方案P40:根据实施方案P35所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:249)的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0543] 实施方案P41:根据实施方案P40所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的另外的亚基通过由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)或GGGGSGGGGSPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:279)组成的接头与所述第二不同抗体Fc序列融合。

[0544] 实施方案P42:根据实施方案P35至P41中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中将所述蛋白质序列与所述第一抗体Fc序列融合的接头由氨基酸序列EPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:11)或PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)组成。

[0545] 实施方案P43:根据实施方案P1至P17中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列是被突变以促进与彼此的异二聚化的IgG4 Fc序列。

[0546] 实施方案P44:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含选自K370E、R409W及其组合的一个或多个突变,并且所述第二不同抗体Fc序列包含选自E357N、D399V、F405T及其任何一种或多种组合的一个或多个突变。

[0547] 实施方案P45:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含选自E357N、D399V、F405T及其任何一种或多种组合的一个或多个突变,并且所述第二不同抗体Fc序列包含选自K370E、R409W及其组合的一个或多个突变。

[0548] 实施方案P46:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变K370E和R409W,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变E357N、D399V和F405T。

[0549] 实施方案P47:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变E357N、D399V和F405T,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变K370E和R409W。

[0550] 实施方案P48:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含选自K360E、R409W及其组合的一个或多个突变,并且所述第二不同抗体Fc序列包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何一种或多种组合的一个或多个突变。

[0551] 实施方案P49:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何一种或多种组合的一个或多个突变,并且所述第二不同抗体Fc序列包含选自K360E、R409W及其组合的一个或多个突变。

[0552] 实施方案P50:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变K360E和R409W,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变Q347R、D399V和F405T。

[0553] 实施方案P51:根据实施方案P43所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变K360E和R409W。

[0554] 实施方案P52:根据实施方案P18至P42中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列是被突变以促进与彼此的异二聚化的IgG1 Fc序列。

[0555] 实施方案P53:根据实施方案P52所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含选自K360E、K409W及其组合的一个或多个突变,并且所述第二不同抗体Fc序列包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何一种或多种组合的一个或多个突变。

[0556] 实施方案P54:根据实施方案P52所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何一种或多种组合的一个或多个突变,并且所述第二不同抗体Fc序列包含选自K360E、K409W及其组合的一个或多个突变。

[0557] 实施方案P55:根据实施方案P52所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变K360E和K409W,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变Q347R、D399V和F405T。

[0558] 实施方案P56:根据实施方案P52所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变K360E和K409W。

[0559] 实施方案P57:根据实施方案P43至P56中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IgG4或IgG1 Fc序列被进一步突变以降低效应子功能。

[0560] 实施方案P58:根据实施方案P57所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列各自包含突变L234A、L235A或L235E、和/或P329A。

[0561] 实施方案P59:根据实施方案P57或实施方案P58所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列各自包含选自G237A、A330S、P331S及其任何一种或多种组合的一个或多个突变。

[0562] 实施方案P60:根据实施方案P57或实施方案P58所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列各自包含突变G237A、A330S和P331S。

[0563] 实施方案P61:根据实施方案P43至P60中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述IgG4或IgG1 Fc序列被进一步突变以引入链间二硫桥。

[0564] 实施方案P62:根据实施方案P61所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变Y349C,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变S354C。

[0565] 实施方案P63:根据实施方案P61所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc序列包含突变S354C,并且所述第二不同抗体Fc序列包含突变Y349C。

[0566] 实施方案P64:根据实施方案P1至P63中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的所述亚基是多亚基细胞因子的亚基。

[0567] 实施方案P65:根据实施方案P64所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述细胞因子是IL-12。

[0568] 实施方案P66:根据实施方案P1至P65中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含至少一个抗体可变结构域。

[0569] 实施方案P67:根据实施方案P66所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述至少一个抗体重链可变区与抗体轻链可变区连接以形成Fab,其中所述Fab在所述第一抗体Fc序列和/或所述第二不同的抗体Fc序列的N末端连接。

[0570] 实施方案P68:根据实施方案P67所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的亚基和所述多亚基蛋白的另外的亚基的蛋白质序列分别与所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列的C末端连接。

[0571] 实施方案P69:根据实施方案P67所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的亚基和所述多亚基蛋白的另外的亚基的蛋白质序列分别与所述第二不同抗体Fc序列和所述第一抗体Fc序列的C末端连接。

[0572] 实施方案P70:根据实施方案P66所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一多肽包含位于所述第一抗体Fc序列的C末端的抗体重链可变结构域。

[0573] 实施方案P71:根据实施方案P66或实施方案P70所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二多肽包含位于所述第二不同抗体Fc序列的C末端的抗体重链可变结构域。

[0574] 实施方案P72:根据实施方案P70或实施方案P71所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述抗体重链可变区与抗体轻链可变区连接以形成scFv。

[0575] 实施方案P73:根据实施方案P70至72中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的亚基和所述多亚基蛋白的另外的亚基的蛋白质序列分别与所述第一抗体Fc序列和所述第二不同抗体Fc序列的N末端连接。

[0576] 实施方案P74:根据实施方案P70至P72中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中多亚基蛋白的亚基和所述多亚基蛋白的另外的亚基的蛋白质序列分别与所述第二不同抗体Fc序列和所述第一抗体Fc序列的N末端连接。

[0577] 实施方案P75:根据实施方案P1至P65中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其不包含抗体可变结构域。

[0578] 实施方案P76:根据实施方案P1至P65或实施方案P75中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含蛋白聚糖结合结构域。

[0579] 实施方案P77:根据实施方案P76所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种蛋白聚糖。

[0580] 实施方案P78:根据实施方案P77所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合选自以下的一种或多种蛋白聚糖:黏结蛋白聚糖、丝甘蛋白聚糖、CSPG4、β蛋白聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、短蛋白聚糖和小富亮氨酸蛋白聚糖(SLRP)。

[0581] 实施方案P79:根据实施方案P78所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述SLRP选自饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、无孢蛋白、纤调蛋白聚糖和光蛋白聚糖。

[0582] 实施方案P80:根据实施方案P1至P65或实施方案P75至P79中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含胶原蛋白结合结构域。

[0583] 实施方案P81:根据实施方案P80所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种胶原蛋白。

[0584] 实施方案P82:根据实施方案P1至P65或实施方案P75至P81中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含透明质酸结合结构域。

[0585] 实施方案P83:根据实施方案P76至P82中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述蛋白聚糖结合结构域、所述胶原蛋白结合结构域或所述透明质酸结合结构域与所述第一抗体Fc结构域多肽或所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端融合。

[0586] 实施方案P84:一种配制品,其包含根据前述实施方案中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白和药学上可接受的载体。

[0587] 实施方案P85:一种细胞,其包含一种或多种核酸,所述核酸编码根据实施方案P1至P83中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白。

[0588] 实施方案P86:一种治疗癌症的方法,其中所述方法包括向患者施用根据实施方案P1至P83中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白或根据实施方案P84所述的配制品。

[0589] 实施方案P87:一种治疗急性放射综合征的方法,其中所述方法包括向患者施用根据实施方案P1至P83中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白或根据实施方案P84所述的配制品。

[0590] 实施方案P88:根据实施方案P87所述的方法,其中所述急性放射综合征包含选自以下的一种或多种综合征:造血放射综合征、胃肠放射综合征、神经血管放射综合征、皮肤放射综合征及其任何一种或多种组合。

[0591] 实施方案P89:一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含第一多肽,其包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列;以及第二多肽,其包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

[0592] 实施方案P90:一种多肽,其包含多亚基细胞因子的亚基和免疫球蛋白Fc结构域多肽,其中所述Fc结构域多肽包含用于促进与不同免疫球蛋白Fc结构域多肽的异二聚化的突变和降低Fc的效应子功能的一个或多个突变。

[0593] 实施方案P91:根据实施方案P90所述的多肽,其中所述Fc结构域是人IgG1抗体Fc结构域。

[0594] 实施方案P92:根据实施方案P91所述的多肽,其中降低Fc的效应子功能的所述一个或多个突变选自L234A、L235A或L235E、G237A、P329A、A330S和P331S,根据EU编号系统进行编号。

[0595] 实施方案P93:根据实施方案P91或实施方案P92所述的多肽,其中降低Fc的效应子功能的所述突变是L234A、L235A和P329A,根据EU编号系统进行编号。

[0596] 实施方案P94:根据实施方案P91-P93中任一项所述的多肽,其中用于促进异二聚化的所述突变是K360E和K409W,根据EU编号系统进行编号。

[0597] 实施方案P95:根据实施方案P91-P93中任一项所述的多肽,其中用于促进异二聚化的所述突变是Q347R、D399V和F405T,根据EU编号系统进行编号。

[0598] 实施方案P96:根据实施方案P94或P95所述的多肽,其中所述Fc结构域还包含用于促进与不同免疫球蛋白Fc结构域多肽形成二硫键的突变。

[0599] 实施方案P97:根据实施方案P96所述的多肽,其中当所述异二聚化突变是K360E和K409W时,用于促进二硫键形成的所述突变是Y349C,根据EU编号系统进行编号。

[0600] 实施方案P98:根据实施方案P96所述的多肽,其中当所述异二聚化突变是Q347R、D399V和F405T时,用于促进二硫键形成的所述突变是S354C,根据EU编号系统进行编号。

[0601] 实施方案P99:根据实施方案P97所述的多肽,其包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列。

[0602] 实施方案P100:根据实施方案P98所述的多肽,其包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

[0603] 实施方案P101:根据实施方案P90-P100中任一项所述的多肽,其还包含抗体可变结构域。

[0604] 实施方案P102:根据实施方案P101所述的多肽,其中所述抗体可变结构域包含抗体重链可变结构域。

[0605] 实施方案P103:根据实施方案P102所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与所述多肽的N末端融合。

[0606] 实施方案P104:根据实施方案P103所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域结合抗体轻链可变结构域以形成Fab。

[0607] 实施方案P105:根据实施方案P103所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与抗体轻链可变结构域进一步融合以形成scFv。

[0608] 实施方案P106:根据实施方案P101-P105中任一项所述的多肽,其中所述多亚基细胞因子的亚基与所述免疫球蛋白Fc结构域的C末端融合。

[0609] 实施方案P107:根据实施方案P101所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与所述多肽的C末端融合。

[0610] 实施方案P108:根据实施方案P107所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与抗体轻链可变结构域进一步融合以形成scFv。

[0611] 实施方案P109:根据实施方案P107或P108所述的多肽,其中所述多亚基细胞因子的亚基与所述免疫球蛋白Fc结构域的N末端融合。

[0612] 实施方案P110:根据实施方案P90-P100中任一项所述的多肽,其不包含抗体可变结构域。

[0613] 实施方案P111:根据实施方案P90-P100或P110中任一项所述的多肽,其还包含蛋白聚糖结合结构域。

[0614] 实施方案P112:根据实施方案P111所述的多肽,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种蛋白聚糖。

[0615] 实施方案P113:根据实施方案P112所述的多肽,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合选自以下的一种或多种蛋白聚糖:黏结蛋白聚糖、丝甘蛋白聚糖、CSPG4、β蛋白聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、短蛋白聚糖和小富亮氨酸蛋白聚糖(SLRP)。

[0616] 实施方案P114:根据实施方案P113所述的多肽,其中所述SLRP选自饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、无孢蛋白、纤调蛋白聚糖和光蛋白聚糖。

[0617] 实施方案P115:根据实施方案P90-P100或110-114中任一项所述的多肽,其还包含

胶原蛋白结合结构域。

[0618] 实施方案P116:根据实施方案P115所述的多肽,其中所述胶原蛋白结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种胶原蛋白。

[0619] 实施方案P117:根据实施方案P90-P100或110-116中任一项所述的多肽,其还包含透明质酸结合结构域。

[0620] 实施方案P118:根据实施方案P111-P117中任一项所述的多肽,其中所述蛋白聚糖结合结构域、所述胶原蛋白结合结构域或所述透明质酸结合结构域与所述多肽的C末端融合。

[0621] 实施方案P119:一种核酸,其编码根据实施方案P89-P118中任一项所述的多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:290或SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

[0622] 实施方案P120:一种表达载体,其包含核酸,所述核酸包含编码根据实施方案P89-P118中任一项所述的多肽的序列,所述多肽包含SEQ ID NO:290或SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

[0623] 实施方案P121:一种细胞,其包含根据实施方案P119所述的核酸或根据实施方案P120所述的表达载体。

通过引用并入

[0624] 将本文提到的每个专利文件和科学文章的全部公开内容出于所有目的通过引用而并入。

等效内容

[0625] 在不脱离本发明的精神或本质特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。因此,前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的,而不是限制本文所述的本发明。因此,本发明的范围由所附权利要求而不是由前述描述来指示,并且在权利要求的等同意义和范围内的所有变化都旨在包含在其中。

[0626] 本公开涉及下述实施方案。

1.一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和多亚基蛋白的第一亚基;

以及

(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和所述多亚基蛋白的第二不同亚基,

其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含降低Fc的效应子功能的一个或多个突变,并且

其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基彼此结合。

2.根据项1所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述效应子功能包含Fc诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。

3.根据项1或2所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述异二聚体Fc融合蛋白是岩藻糖基化的。

4.根据项1-3中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc

结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人抗体Fc结构域多肽。

5.根据项1-4中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE Fc结构域多肽。

6.根据项1-5中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在一个或多个位置233、234、235、236、237、297、318、320、322、329、330和/或331处的一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

7.根据项1-6中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc

结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1 Fc结构域多肽。

8.根据项7所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在一个或多个位置234、235、237、329、330和/或331处的一个或多个突变,根据EU编号系统。

9.根据项8所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自L234A、L235A、L235E、G237A、P329A、A330S和P331S的一个或多个突变。

10.根据项9所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽

和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235A和P329A。

11.根据项9所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A和L235A。

12.根据项9所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。

13.根据项7-12中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc

结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变C220S。

14.根据项1-6中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc

结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG4 Fc结构域多肽。

15.根据项14所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含在一个或多个位置235和/或329处的一个或多个突变,根据EU编号进行编号。

16.根据项15所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自L235E和P329A的一个或多个突变。

17.根据项16所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E。

18.根据项16所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E和P329A。

19.根据项14-18中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体

Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变S228P。

20.一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含第一多肽,其包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列;以及第二多肽,其包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

21.一种多肽,其包含多亚基细胞因子的亚基和免疫球蛋白Fc结构域多肽,其中所

述Fc结构域多肽包含用于促进与不同免疫球蛋白Fc结构域多肽的异二聚化的突变和降低Fc的效应子功能的一个或多个突变。

22.根据项21所述的多肽,其中所述Fc结构域是人IgG1抗体Fc结构域。

23.根据项22所述的多肽,其中降低Fc的效应子功能的所述一个或多个突变选自L234A、L235A或L235E、G237A、P329A、A330S和P331S,根据

EU编号系统进行编号。

24.根据项22或23所述的多肽,其中降低Fc的效应子功能的所述突变是

L234A、L235A和P329A,根据EU编号系统进行编号。

25.根据项22-24中任一项所述的多肽,其中用于促进异二聚化的所述突变是K360E和K409W,根据EU编号系统进行编号。

26.根据项22-24中任一项所述的多肽,其中用于促进异二聚化的所述突变是Q347R、D399V和F405T,根据EU编号系统进行编号。

27.根据项25或26所述的多肽,其中所述Fc结构域还包含用于促进与不同免疫球蛋白Fc结构域多肽形成二硫键的突变。

28.根据项27所述的多肽,其中当所述异二聚化突变是K360E和K409W时,

用于促进二硫键形成的所述突变是Y349C,根据EU编号系统进行编号。

29.根据项27所述的多肽,其中当所述异二聚化突变是Q347R、D399V和F405T时,用于促进二硫键形成的所述突变是S354C,根据EU编号系统进行编号。

30.根据项28所述的多肽,其包含SEQ ID NO:290的氨基酸序列。

31.根据项29所述的多肽,其包含SEQ ID NO:291的氨基酸序列。

32.一种核酸,其编码包含SEQ ID NO:290或SEQ ID NO:291的氨基酸序列的多肽。

33.一种表达载体,其包含核酸,所述核酸包含编码包含SEQ ID NO:290或

SEQ ID NO:291的氨基酸序列的多肽的序列。

34.一种细胞,其包含根据项32所述的核酸或根据项33所述的表达载体。

35.一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和多亚基蛋白的第一亚基;以及

(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和所述多亚基蛋白的第二不同亚基,

其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中所述多亚基蛋白的第一亚基通过第一接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,其中所述第一接头包含第一氨基酸序列,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列$PKSSDKTHTCPPCPAPEX_1X_2GX_3$(SEQ ID NO:237),其中$X_1$表示L或A,$X_2$表示L、E或A,并且$X_3$表示A或G,

其中当X_1表示L和/或X_2表示L时,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽中的至少一种包含用于促进异二聚化的Q347R突变,并且

其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基彼此结合。

36.根据项35所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)。

37.根据项36所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序

列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)组成。

38.根据项36或37所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)。

39.根据项38所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)组成。

40.根据项35所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)。

41.根据项40所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)组成。

42.根据项40或41所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:18)。

43.根据项42所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)组成。

44.根据项40或41所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)。

45.根据项44所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)组成。

46.根据项40或41所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)。

47.根据项46所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)组成。

48.根据项40或41所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)。

49.根据项48所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)组成。

50.根据项40或41所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)。

51.根据项50所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)组成。

52.根据项35所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)。

53.根据项52所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)组成。

54.根据项52或53所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)。

55.根据项54所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)组成。

56.根据项52或53所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)。

57.根据项56所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)组成。

58.根据项52或53所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)。

59.根据项58所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)组成。

60.一种异二聚体Fc融合蛋白,所述融合蛋白包含:

(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和多亚基蛋白的第一亚基;以及

(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和所述多亚基蛋白的第二不同亚基,

其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中所述多亚基蛋白的第一亚基通过第一接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,其中所述第一接头包含第一氨基酸序列,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(SEQ ID NO:1),

其中X表示L或E,并且

其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基彼此结合。

61.根据项60所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)。

62.根据项61所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)组成。

63.根据项61或62所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)。

64.根据项63所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)组成。

65.根据项61或62所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同

亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)。

66.根据项65所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)组成。

67.根据项61或62所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)。

68.根据项67所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)组成。

69.根据项60所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)。

70.根据项69所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)组成。

71.根据项69或70所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)。

72.根据项71所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)组成。

73.根据项69或70所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)。

74.根据项73所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)组成。

75.根据项69或70所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)。

76.根据项75所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)组成。

77.根据项35-76中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含降低Fc的效应子功能的一个或多个突变。

78.根据项77所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述效应子功能包含Fc诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。

79.根据项77或78所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1 Fc结构域多肽。

80.根据项79所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含选自L234A、L235A或L235E、G237A、P329A、A330S和P331S的一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

81.根据项80所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235A和P329A。

82.根据项80所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A和L235A。

83.根据项80所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。

84.根据项79-83中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体

Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变C220S。

85.根据项77或78所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG4 Fc结构域多肽。

86.根据项85所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含选自L235E和P329A的一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

87.根据项86所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E。

88.根据项86所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E和P329A。

89.根据项85-88中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体

Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变S228P。

90.根据项7-13、35-59和79-84中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中

所述第一抗体Fc结构域多肽包含选自K360E、K409W及其组合的一个或多个突变,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何组合的一个或多个突变。

91.根据项90所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽包含突变K360E和K409W,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变

Q347R、D399V和F405T。

92.根据项7-13、35-59和79-84中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中

所述第一抗体Fc结构域多肽包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何一种或多种组合的一个或多个突变,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自K360E、K409W及其组合的一个或多个突变。

93.根据项92所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽包含突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变K360E和K409W。

94.根据项14-19、60-76和85-89中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中

所述第一抗体Fc结构域多肽包含选自K370E、R409W及其组合的一个或多个突变,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自E357N、D399V、F405T及其任何组合的一个或多个突变。

95.根据项94所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽包含突变K370E和R409W,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变

E357N、D399V和F405T。

96.根据项14-19、60-76和85-89中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中

所述第一抗体Fc结构域多肽包含选自E357N、D399V、F405T及其任何组合的一个或多个突变,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自

K370E、R409W及其组合的一个或多个突变。

97.根据项96所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽包含突变E357N、D399V和F405T,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变K370E和R409W。

98.根据项14-19、60-76和85-89中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中

所述第一抗体Fc结构域多肽包含选自K360E、R409W及其组合的一个或多个突变,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何组合的一个或多个突变。

99.根据项98所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多肽包含突变K360E和R409W,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变

Q347R、D399V和F405T。

100.根据项14-19、60-76和85-89中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中

所述第一抗体Fc结构域多肽包含选自Q347R、D399V、F405T及其任何组合的一个或多个突变,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自

K360E、R409W及其组合的一个或多个突变。

101.根据项100所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多

肽包含突变Q347R、D399V和F405T,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变K360E和R409W。

102.根据项1-19或35-101中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第

一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽被进一步突变以引入链间二硫键。

103.根据项102所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多

肽包含突变Y349C,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变S354C。

104.根据项102所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述第一抗体Fc结构域多

肽包含突变S354C,并且所述第二抗体Fc结构域多肽包含突变Y349C。

105.根据项1-19或35-104中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多

亚基蛋白是多亚基细胞因子。

106.根据项105所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基细胞因子是

IL-12。

107.根据项106所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基细胞因子的第

一亚基是人IL-12的p40亚基,并且所述多亚基细胞因子的第二不同亚基是人IL-12的p35亚基。

108.根据项106所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基细胞因子的第

一亚基是人IL-12的p35亚基,并且所述多亚基细胞因子的第二不同亚基是人IL-12的p40亚基。

109.根据项107或108所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中对应于野生型p35序

列的C74被丝氨酸取代,并且对应于野生型p40序列的C177被丝氨酸取代,其中所

述取代去除在人IL-12的野生型p35与野生型p40亚基之间形成的天然二硫键。

110.根据项109所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中人IL-12的p35亚基包含V185C取代,并且人IL-12的p40亚基包含Y292C取代,所述取代在人

IL-12的p35亚基与p40亚基之间形成非天然二硫键。

111.根据项1-19或35-110中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含抗体可变结构域。

112.根据项111所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述抗体可变结构域包含抗体重链可变结构域。

113.根据项112所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述抗体重链可变结构域与所述第一抗体Fc结构域多肽或所述第二抗体Fc结构域多肽的N末端融合。

114.根据项113所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述抗体重链可变结构域结合抗体轻链可变结构域以形成Fab。

115.根据项113所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述抗体重链可变结构域与抗体轻链可变结构域进一步融合以形成scFv。

116.根据项113-115中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基分别与所述第一抗体Fc结构域多肽的C末端和所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端融合。

117.根据项112所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述抗体重链可变结构域与所述第一抗体Fc结构域多肽或所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端融合。

118.根据项117所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述抗体重链可变结构域与抗体轻链可变结构域进一步融合以形成scFv。

119.根据项117或118所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述多亚基蛋白的第一亚基和第二不同亚基分别与所述第一抗体Fc结构域多肽的N末端和所述第二抗体Fc结构域多肽的N末端融合。

120.根据项21-31中任一项所述的多肽,其还包含抗体可变结构域。

121.根据项120所述的多肽,其中所述抗体可变结构域包含抗体重链可变结构域。

122.根据项121所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与所述多肽的N末端融合。

123.根据项122所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域结合抗体轻链可变结构域以形成Fab。

124.根据项122所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与抗体轻链可变结构域进一步融合以形成scFv。

125.根据项122-124中任一项所述的多肽,其中所述多亚基细胞因子的亚基与所述免疫球蛋白Fc结构域的C末端融合。

126.根据项121所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与所述多肽的C末端融合。

127.根据项126所述的多肽,其中所述抗体重链可变结构域与抗体轻链可变结构域进一步融合以形成scFv。

128.根据项126或127所述的多肽,其中所述多亚基细胞因子的亚基与所述免疫球蛋白Fc结构域的N末端融合。

129.根据项1-19或35-110中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其不包含抗体可变结构域。

130.根据项1-19、35-110或129中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含蛋白聚糖结合结构域。

131.根据项130所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种蛋白聚糖。

132.根据项131所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合选自以下的一种或多种蛋白聚糖:黏结蛋白聚糖、丝甘蛋白聚糖、CSPG4、β蛋白聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、短蛋白聚糖和小富亮氨酸蛋白聚糖(SLRP)。

133.根据项132所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述SLRP选自饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、无孢蛋白、纤调蛋白聚糖和光蛋白聚糖。

134.根据项1-19、35-110或129-133中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含胶原蛋白结合结构域。

135.根据项134所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述胶原蛋白结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种胶原蛋白。

136.根据项1-19、35-110或129-135中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其还包含透明质酸结合结构域。

137.根据项130-136中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白,其中所述蛋白聚糖结合结构域、所述胶原蛋白结合结构域或所述透明质酸结合结构域与所述第一抗体Fc结构域多肽或所述第二抗体Fc结构域多肽的C末端融合。

138.根据项21-31中任一项所述的多肽,其不包含抗体可变结构域。

139.根据项21-31中任一项所述的多肽,其还包含蛋白聚糖结合结构域。

140.根据项139所述的多肽,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种蛋白聚糖。

141.根据项140所述的多肽,其中所述蛋白聚糖结合结构域结合选自以下的一种或多种蛋白聚糖:黏结蛋白聚糖、丝甘蛋白聚糖、CSPG4、β蛋白聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、多能蛋白聚糖、短蛋白聚糖和小富亮氨酸蛋白聚糖(SLRP)。

142.根据项141所述的多肽,其中所述SLRP选自饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、无孢蛋白、纤调蛋白聚糖和光蛋白聚糖。

143.根据项21-31或138-142中任一项所述的多肽,其还包含胶原蛋白结合结构域。

144.根据项143所述的多肽,其中所述胶原蛋白结合结构域结合在肿瘤中特异性表达的一种或多种胶原蛋白。

145.根据项21-31或138-144中任一项所述的多肽,其还包含透明质酸结合结构域。

146.根据项139-145中任一项所述的多肽,其中所述蛋白聚糖结合结构域、所述胶

原蛋白结合结构域或所述透明质酸结合结构域与所述多肽的C末端融合。

147.一种配制品,其包含根据项1-20、35-119或129-137中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白和药学上可接受的载体。

148.一种细胞,其包含一种或多种核酸,所述核酸编码根据项1-20、35-119或129-137中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白或根据项120-128或138-146中任一项所述的多肽。

149.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患者施用根据项1-20、35-119或129-137中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白或根据项147所述的配制品。

150.一种治疗急性放射综合征的方法,所述方法包括向患者施用根据项1-20、35-119或129-137中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白或根据项147所述的配制品。

151.根据项150所述的方法,其中所述急性放射综合征包含选自以下的一种或多种综合征:造血放射综合征、胃肠放射综合征、神经血管放射综合征、皮肤放射综合征及其任何一种或多种组合。

152.根据项149所述的方法,其还包括向所述患者施用选自以下的第二治疗剂:检查点阻断剂、细胞因子、TLR激动剂、STING激动剂、化疗剂、癌症靶向剂、溶瘤病毒、疫苗、放射、过继性NK疗法、干细胞移植(SCT)疗法、激动性抗体、嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法、多特异性结合蛋白(TriNKET)和诱导细胞衰老的药剂。

153.根据项152所述的方法,其中所述检查点阻断剂选自:抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、抗KIR抗体、抗NKG2A抗体、抗LAG3抗体和抗TIM3抗体。

154.根据项152所述的方法,其中所述TLR激动剂选自TLR7激动剂、TLR8激动剂、TLR7/8激动剂、TLR9激动剂、TLR4激动剂和TLR3激动剂。

155.根据项152所述的方法,其中所述STING激动剂是ADU-S100。

156.根据项152所述的方法,其中所述化疗剂是紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、阿霉素、吉西他滨或环磷酰胺。

157.根据项152所述的方法,其中所述检查点阻断剂选自:

纳武单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、伊匹单抗、替西木单抗、利瑞鲁单抗和莫纳珠单抗。

158.根据项152所述的方法,其中所述TLR激动剂选自:

R848/瑞喹莫德、VTX-2337、咪喹莫特和CpG寡脱氧核苷酸。

159.根据项152所述的方法,其中所述激动抗体选自抗4-1BB/CD137抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗GITR抗体和抗CD27抗体。

160.根据项152所述的方法,其中所述细胞因子选自IL-2、IL-15、CXCL9和

CXCL10。

161.根据项152所述的方法,其中所述多特异性结合蛋白(TriNKET)包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合位点;以及

(c)足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的第三抗原结合位点;

其中所述肿瘤相关抗原选自EpCAM、CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、

CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、

SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4和PD-L1。

162.根据项149或152-161中任一项所述的方法,其中向所述患者静脉内、皮下、腹膜内或瘤内施用根据项1-20、35-119或129-137中任一项所述的异二聚体Fc融合蛋白或根据项147所述的配制品。

163.根据项149或152-162中任一项所述的方法,其中所述癌症选自急性髓系白血病、急性粒单核细胞白血病、B细胞淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食管癌、尤文氏肉瘤、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃肠癌、胃肠道间质瘤、胶质母细胞瘤、头颈癌、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、肾细胞癌、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、神经内分泌瘤、卵巢癌、和胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、小细胞肺癌、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、尿路上皮癌、髓源性抑制细胞浸润的癌症、具有细胞外基质沉积的癌症、具有高水平反应性基质的癌症以及具有新生血管形成的癌症。

164.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向患者仅施用单剂量的异二聚体IL-12-Fc融合蛋白。

165.根据项164所述的方法,其中所述单剂量的量足以诱导对所述癌症的完全反应。

166.根据项165所述的方法,其中所述单剂量的量足以延迟或防止所述癌症的复发。

167.根据项164-166中任一项所述的方法,其中所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白包含

(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和IL-12的第一亚基;以及

(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和IL-12的第二不同亚基,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中IL-12的所述第一亚基通过第一接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,其中所述第一接头包含第一氨基酸序列,其中所述第一氨基酸序列包含$PKSSDKTHTCPPCPAPEX_1X_2GX_3$(SEQ ID NO:237),其中$X_1$表示L或A,$X_2$表示L、E或A,并且$X_3$表示A或G,

其中当X_1表示L和/或X_2表示L时,所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽中的至少一种包含用于促进异二聚化的Q347R突变,并且

其中IL-12的所述第一亚基和所述第二不同亚基彼此结合。

168.根据项167所述的方法,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)。

169.根据项168所述的方法,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:239)组成。

170.根据项168或169所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)。

171.根据项170所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:10)组成。

172.根据项167或168所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二

氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:65)。

173.根据项172所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:65)组成。

174.根据项167或168所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)。

175.根据项174所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG(SEQ ID NO:66)组成。

176.根据项167所述的方法,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)。

177.根据项176所述的方法,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:238)组成。

178.根据项176或177所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)。

179.根据项178所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:8)组成。

180.根据项176或177所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)。

181.根据项180所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:15)组成。

182.根据项176或177所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)。

183.根据项182所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:16)组成。

184.根据项167所述的方法,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)。

185.根据项184所述的方法,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列PKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:240)组成。

186.根据项184或185所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)。

187.根据项186所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:12)组成。

188.根据项184或185所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列

包含氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)。

189.根据项188所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:67)组成。

190.根据项184或185所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)。

191.根据项190所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAEGA(SEQ ID NO:68)组成。

192.根据项164-166中任一项所述的方法,其中所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白包含

(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和IL-12的第一亚基;以及

(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和IL-12的第二不同亚基,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中IL-12的所述第一亚基通过包含第一氨基酸序列的第一接头与所述第一抗体Fc结构域多肽融合,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFXGG(SEQ ID NO:1),其中X表示L或E,并且其中IL-12的所述第一亚基和所述第二不同亚基彼此结合。

193.根据项192所述的方法,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)。

194.根据项193所述的方法,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:2)组成。

195.根据项193或194所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)。

196.根据项195所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:3)组成。

197.根据项193或194所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)。

198.根据项197所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:13)组成。

199.根据项193或194所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)。

200.根据项199所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG(SEQ ID NO:14)组成。

201.根据项192所述的方法,其中所述第一氨基酸序列包含氨基酸序列RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)。

202.根据项201所述的方法,其中所述第一氨基酸序列由氨基酸序列

RVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:4)组成。

203.根据项201或202所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)。

204.根据项203所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:5)组成。

205.根据项201或202所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)。

206.根据项205所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:63)组成。

207.根据项201或202所述的方法,其中IL-12的所述第二不同亚基通过包含第二氨基酸序列的第二接头与所述第二抗体Fc结构域多肽融合,并且其中所述第二氨基酸序列包含氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)。

208.根据项207所述的方法,其中所述第二氨基酸序列由氨基酸序列GGGGSGGGGSRVESKYGPPCPPCPAPEFEGG(SEQ ID NO:64)组成。

209.根据项164-166中任一项所述的方法,其中所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白包含

(a)第一多肽,其包含第一抗体Fc结构域多肽和IL-12的第一亚基;以及

(b)第二多肽,其包含第二抗体Fc结构域多肽和IL-12的第二不同亚基,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含促进异二聚化的不同突变,

其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含降低Fc的效应子功能的一个或多个突变,并且

其中IL-12的所述第一亚基和所述第二不同亚基彼此结合。

210.根据项209所述的方法,其中所述效应子功能包含Fc诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。

211.根据项209或210所述的方法,其中所述异二聚体Fc融合蛋白是岩藻糖基化的。

212.根据项209-211中任一项所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人抗体Fc结构域多肽。

213.根据项209-212中任一项所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD或IgE Fc结构域多肽。

214.根据项213所述的方法,其中所述第一多肽和/或所述第二多肽包含在一个或多个位置233、234、235、236、237、297、318、320、322、329、330和/或331处的一个或多个突变,根据EU编号系统进行编号。

215.根据项209-214中任一项所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG1 Fc结构域多肽。

216.根据项215所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二

抗体Fc结构域多肽包含在一个或多个位置234、235、237、329、330和/或331处的一个或多个突变,根据EU编号系统。

217.根据项216所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二

抗体Fc结构域多肽包含选自L234A、L235A、L235E、G237A、P329A、A330S和P331S的一个或多个突变。

218.根据项217所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235A和P329A。

219.根据项217所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A和L235A。

220.根据项217所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。221.根据项215-220中任一项所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽

和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变C220S。

222.根据项209-214中任一项所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽

和所述第二抗体Fc结构域多肽是人IgG4 Fc结构域多肽。

223.根据项222所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二

抗体Fc结构域多肽包含在一个或多个位置235和/或329处的一个或多个突变,根据EU编号进行编号。

224.根据项223所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和/或所述第二抗体Fc结构域多肽包含选自L235E和P329A的一个或多个突变。

225.根据项223所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E。

226.根据项223所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变L235E和P329A。

227.根据项222-226中任一项所述的方法,其中所述第一抗体Fc结构域多肽

和所述第二抗体Fc结构域多肽各自包含突变S228P。

228.根据项164-166或209-219中任一项所述的方法,其中所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白包含含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第二不同多肽。

229.根据项164-166或209-219中任一项所述的方法,其中所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白包含含有SEQ ID NO:291的氨基酸序列的第一多肽和含有SEQ ID NO:290的氨基酸序列的第二不同多肽。

230.根据项164-229中任一项所述的方法,其中向所述患者瘤内、皮下、腹

膜内或静脉内施用所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白。

231.根据项230所述的方法,其中向所述患者瘤内施用所述异二聚体IL-12-Fc融合蛋白。

232.根据项164-231中任一项所述的方法,其还包括向所述患者施用选自以

下的第二治疗剂:检查点阻断剂、细胞因子、TLR激动剂、STING激动剂、化疗剂、癌症靶向剂、溶瘤病毒、疫苗、放射、过继性NK疗法、干细胞移植(SCT)疗法、激动性抗体、嵌合

抗原受体(CAR)T细胞疗法、多特异性结合蛋白(TriNKET)和诱导细胞衰老的药剂。

233.根据项232所述的方法,其中所述检查点阻断剂选自:抗PD1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体、抗KIR抗体、抗NKG2A抗体、抗LAG3抗体和抗TIM3抗体。

234.根据项232所述的方法,其中所述TLR激动剂选自TLR7激动剂、TLR8

激动剂、TLR7/8激动剂、TLR9激动剂、TLR4激动剂和TLR3激动剂。

235.根据项232所述的方法,其中所述STING激动剂是ADU-S100。

236.根据项232所述的方法,其中所述化疗剂是紫杉醇、白蛋白结合型紫杉醇、阿霉素、吉西他滨或环磷酰胺。

237.根据项232所述的方法,其中所述检查点阻断剂选自:纳武单抗、派姆单抗、阿特珠单抗、度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、伊匹单抗、替西木单抗、利瑞鲁单抗和莫纳珠单抗。

238.根据项232所述的方法,其中所述TLR激动剂选自:R848/瑞喹莫德、VTX-2337、咪喹莫特和CpG寡脱氧核苷酸。

239.根据项232所述的方法,其中所述激动抗体选自抗4-IBB/CD137抗体、抗OX40抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗GITR抗体和抗CD27抗体。240.根据项232所述的方法,其中所述细胞因子选自IL-2、IL-15、CXCL9和CXCL10。

241.根据项232所述的方法,其中所述多特异性结合蛋白(TriNKET)包含:

(a)结合NKG2D的第一抗原结合位点;

(b)结合肿瘤相关抗原的第二抗原结合位点;以及

(c)足以结合CD16的抗体Fc结构域或其部分,或结合CD16的第三抗原结合位点;

其中所述肿瘤相关抗原选自EpCAM、CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERBB1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4和PD-L1。

242.根据项164-241中任一项所述的方法,其中所述癌症选自急性髓系白血病、急性粒单核细胞白血病、B细胞淋巴瘤、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、弥漫性大B细胞淋巴瘤、食管癌、尤文氏肉瘤、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃肠癌、胃肠道间质瘤、胶质母细胞瘤、头颈癌、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、肾细胞癌、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、神经内分泌瘤、卵巢癌、和胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、小细胞肺癌、T细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、尿路上皮癌、髓源性抑制细胞浸润的癌症、具有细胞外基质沉积的癌症、具有高水平反应性基质的癌症以及具有新生血管形成的癌症。

243.根据项149或152-242中任一项所述的方法,其中所述癌症是转移性癌症。

244.根据项243所述的方法,其中所述转移性癌症是局部、区域或远端转移性癌症。

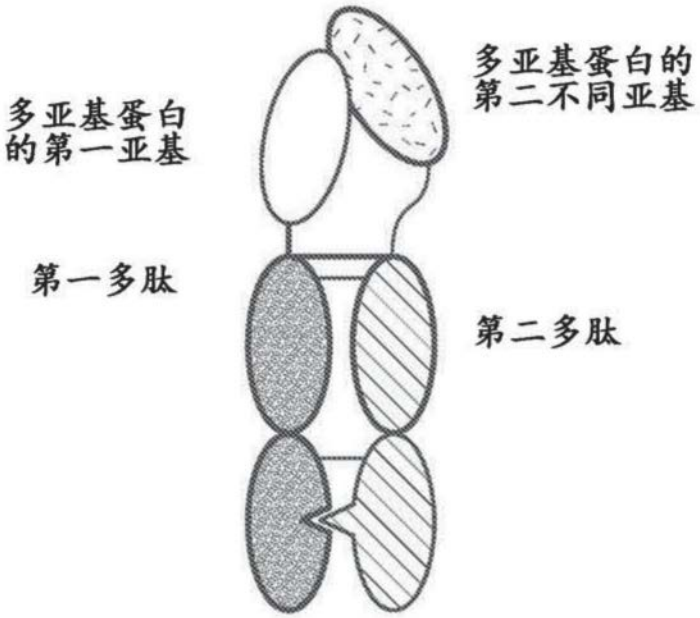

多亚基蛋白的
第二不同亚基
多亚基蛋白
的第一亚基
第一多肽
第二多肽

图1A

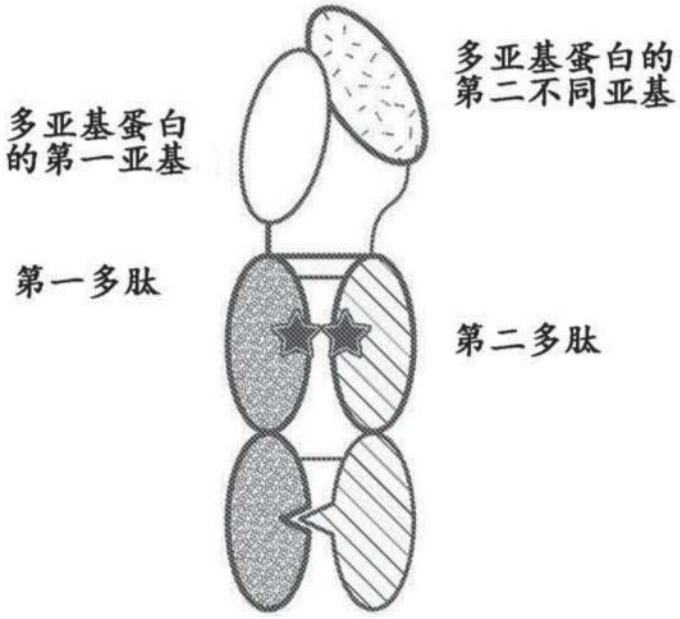

多亚基蛋白的
第二不同亚基
多亚基蛋白
的第一亚基
第一多肽
第二多肽

图1B

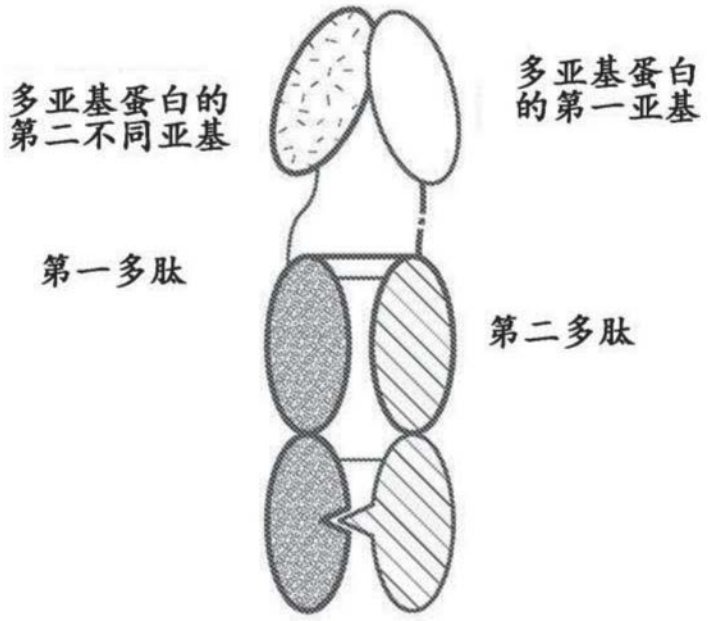

多亚基蛋白的
第二不同亚基
多亚基蛋白
的第一亚基
第一多肽
第二多肽

图1C

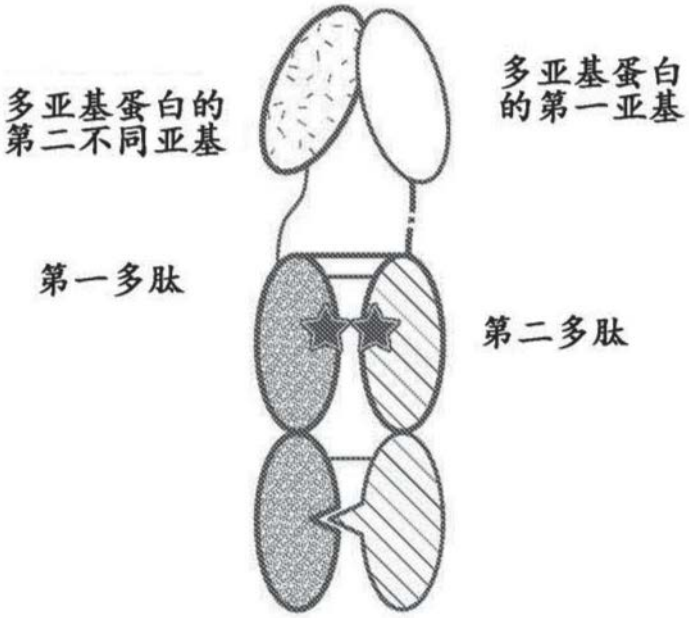

多亚基蛋白的
第二不同亚基
多亚基蛋白
的第一亚基
第一多肽
第二多肽

图1D

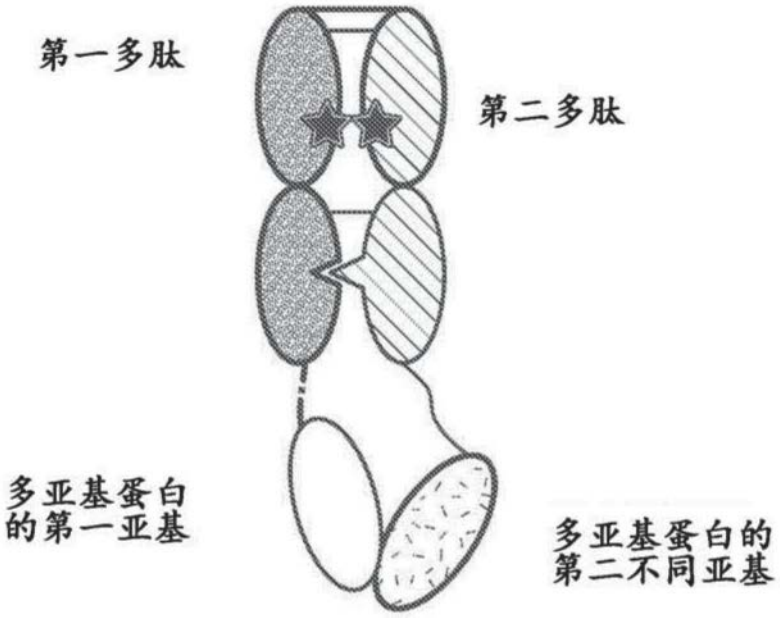

第一多肽
第二多肽
多亚基蛋白
的第一亚基
多亚基蛋白的
第二不同亚基

图1E

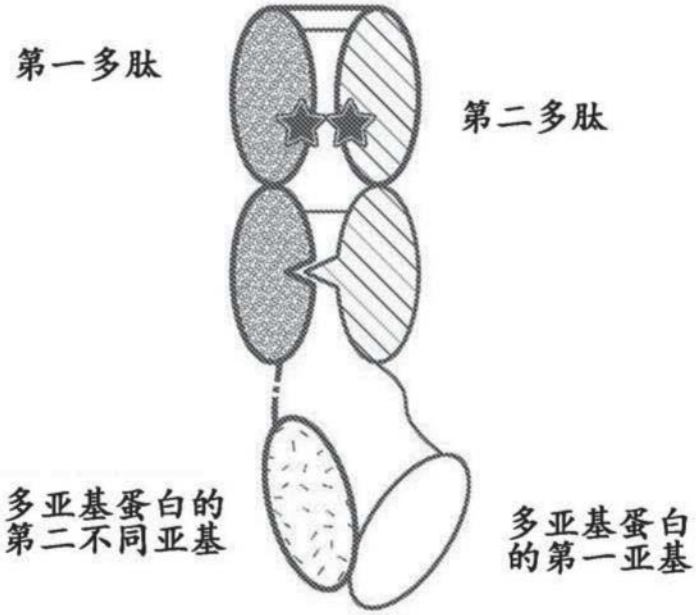

第一多肽
第二多肽
多亚基蛋白的
第二不同亚基
多亚基蛋白
的第一亚基

图1F

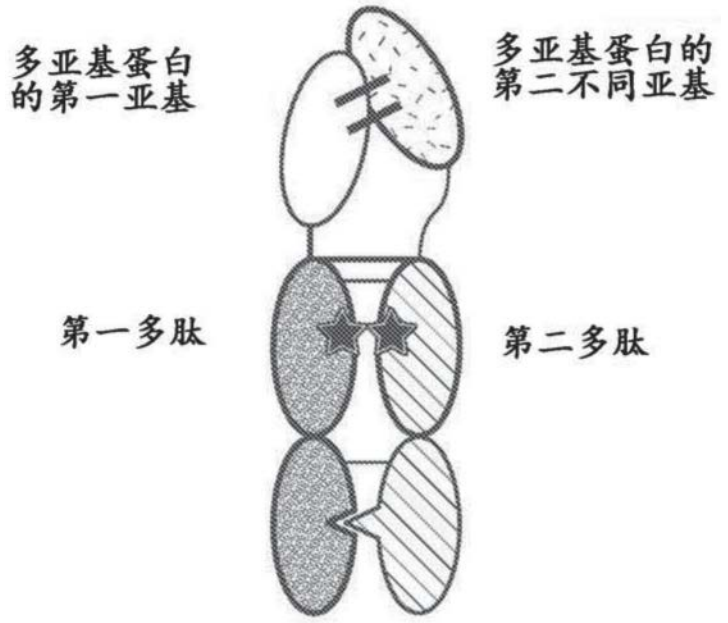

多亚基蛋白
的第一亚基
多亚基蛋白的
第二不同亚基
第一多肽
第二多肽

图2A

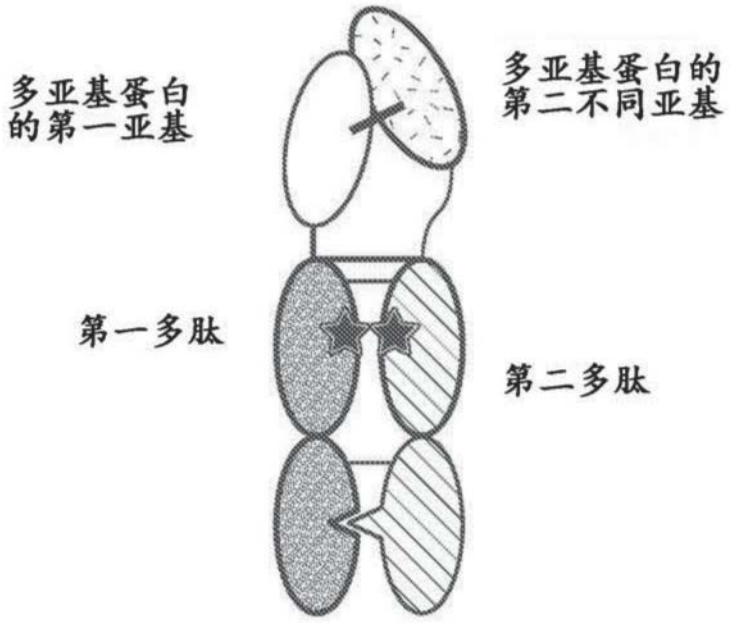

多亚基蛋白
的第一亚基
多亚基蛋白的
第二不同亚基
第一多肽
第二多肽

图2B

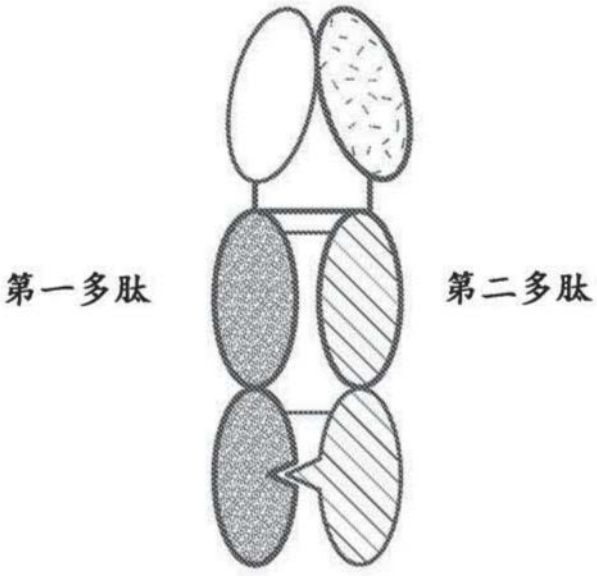


图3A

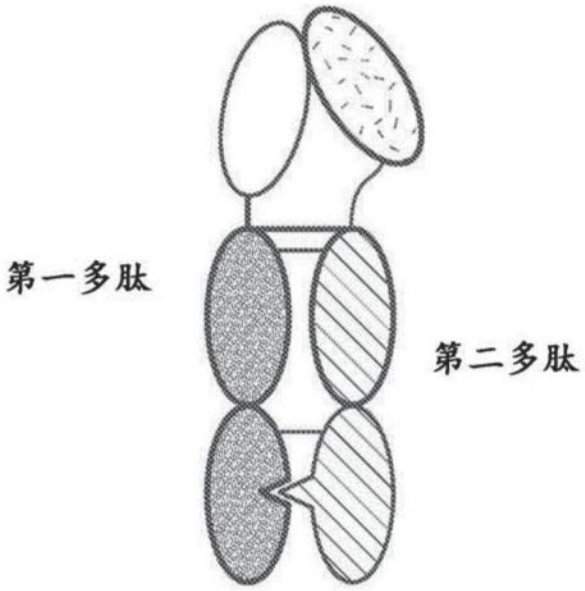


图3B

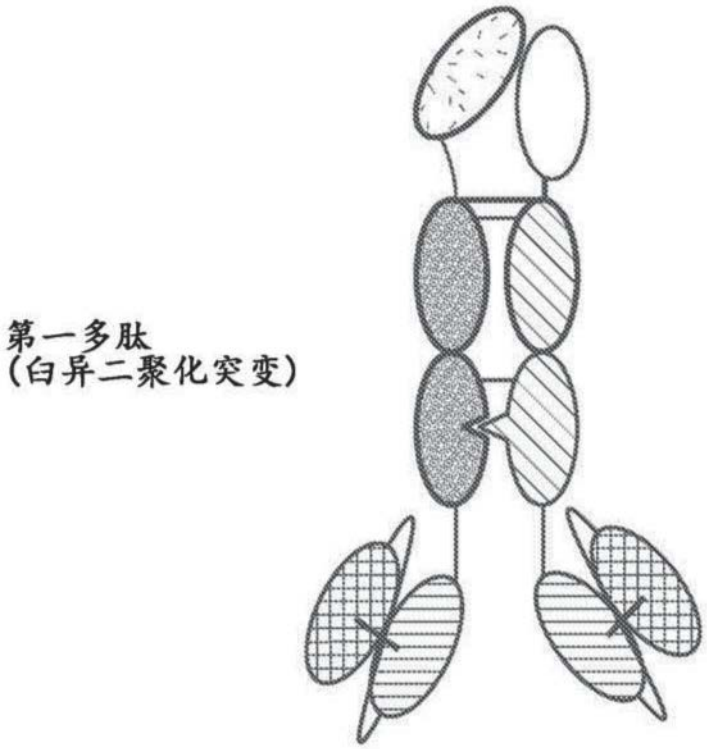


图4A

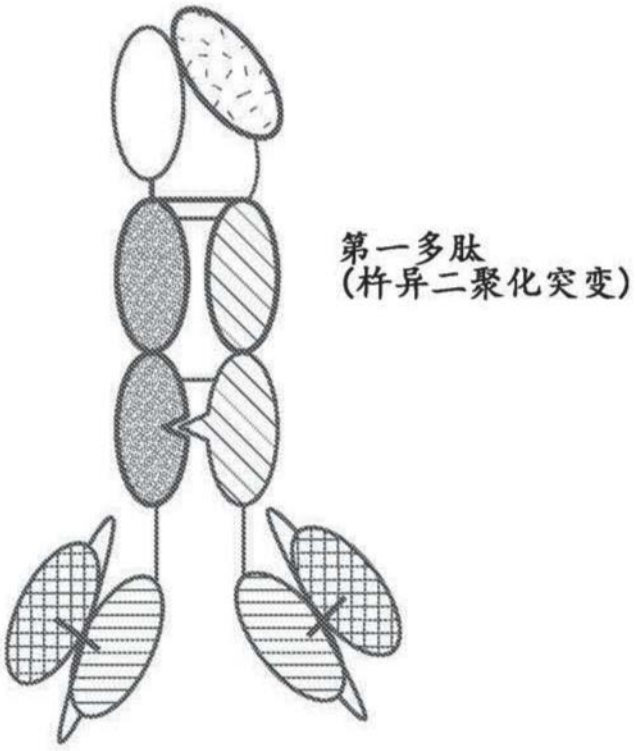


图4B

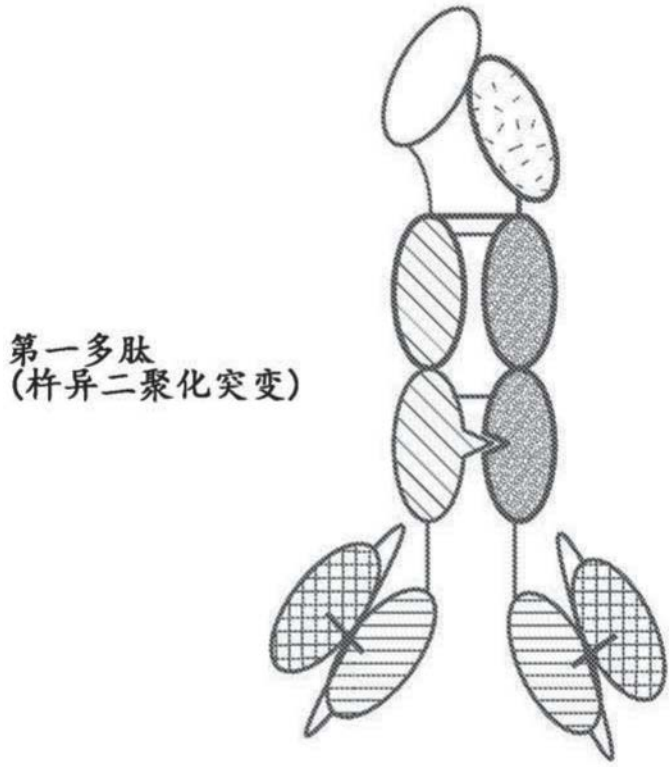


图4C

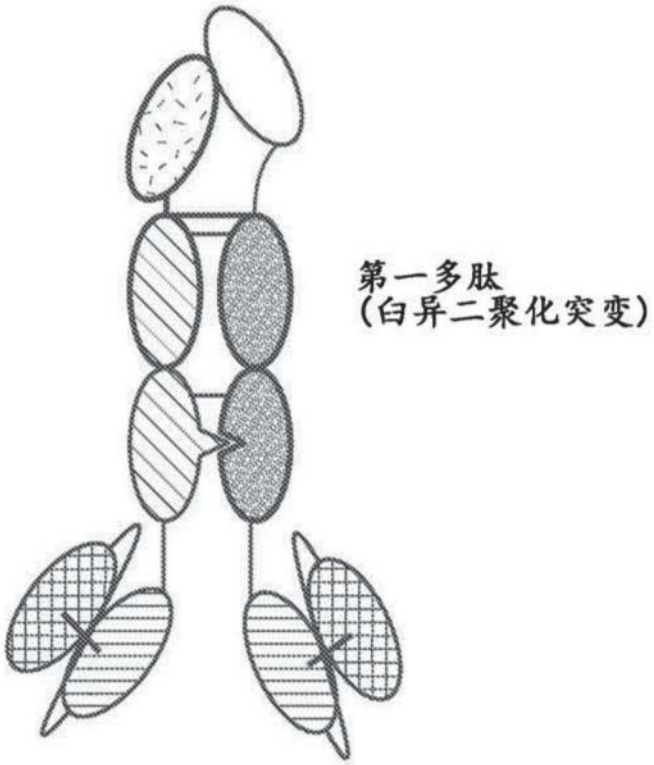


图4D

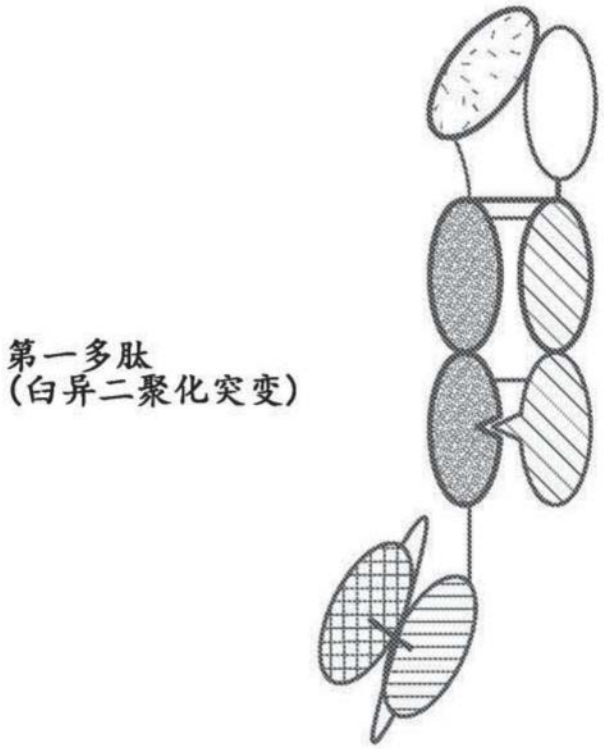


图4E

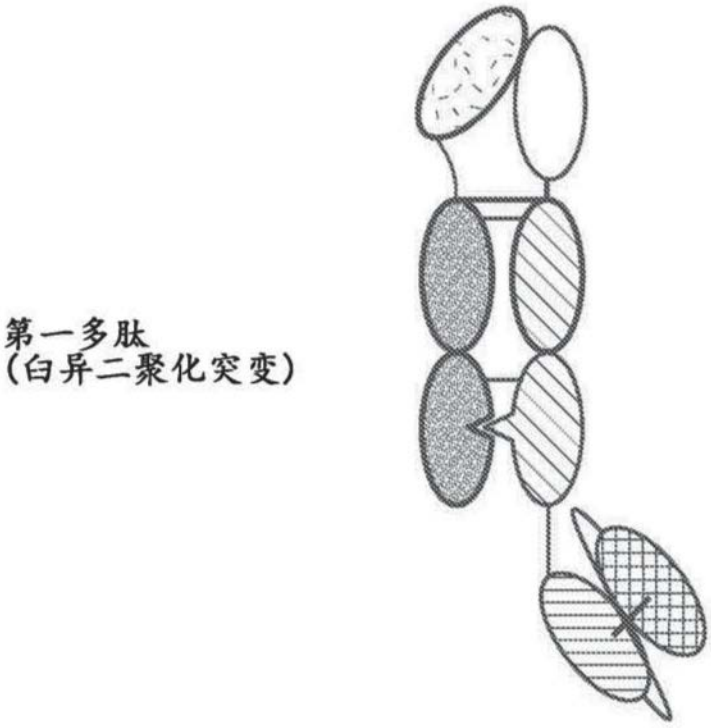


图4F

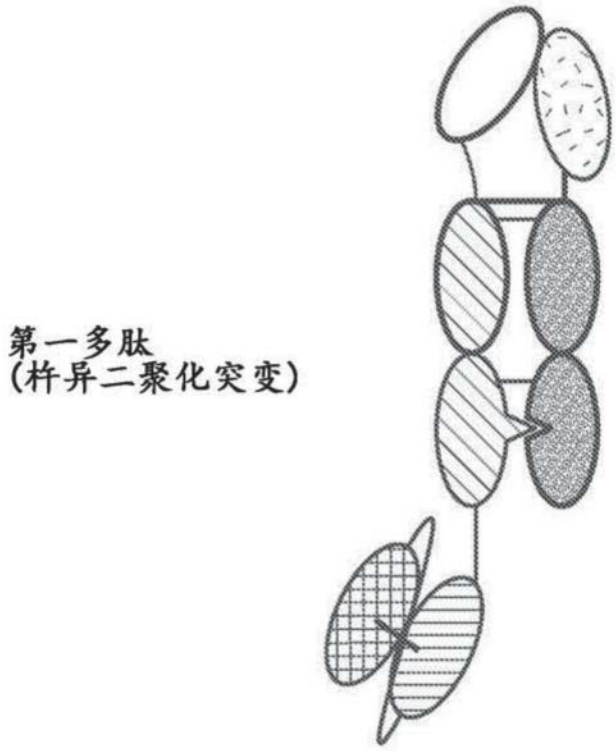


图4G

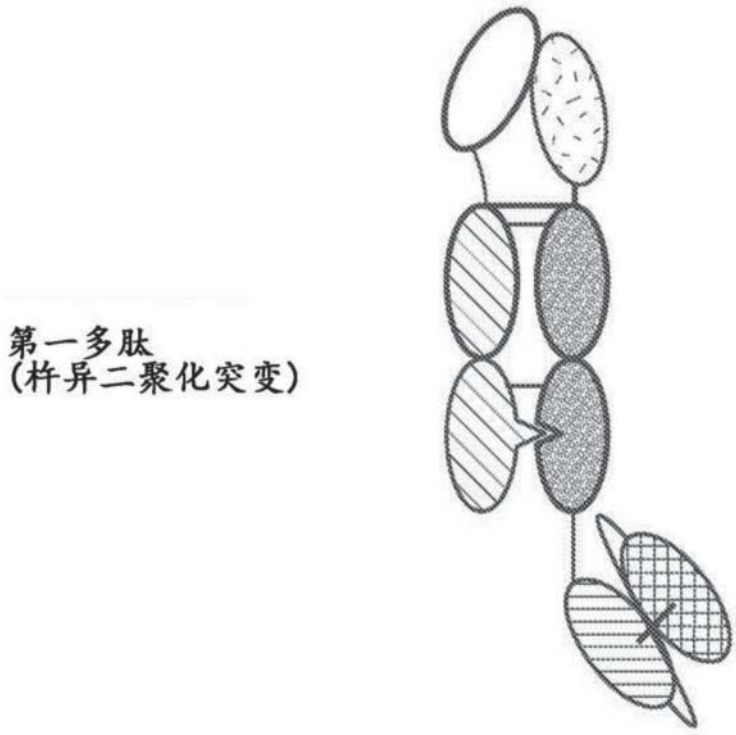


图4H

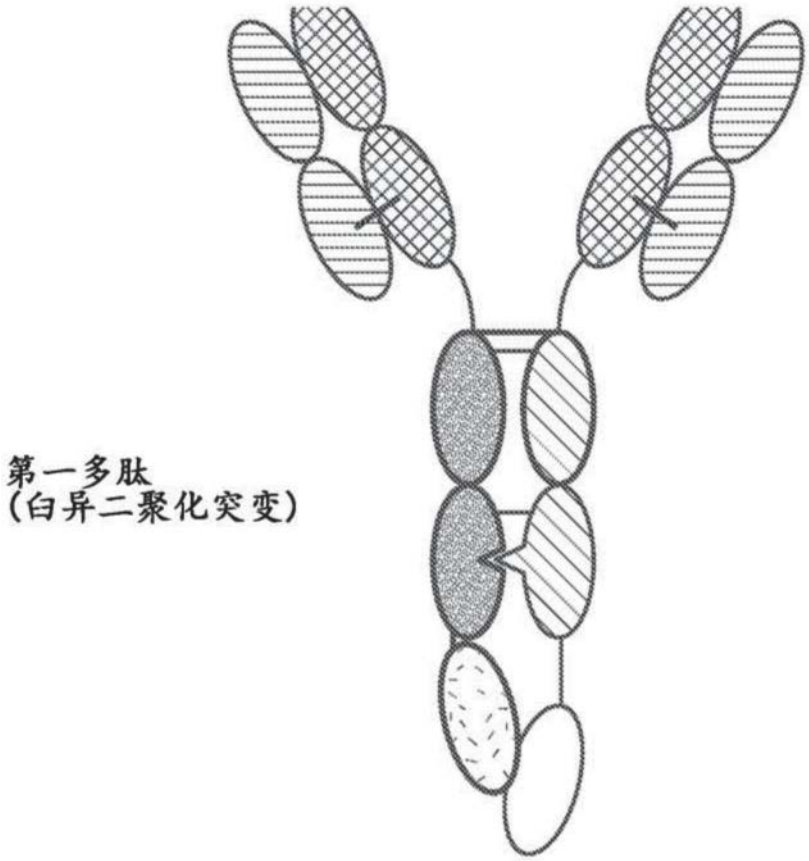


图4I

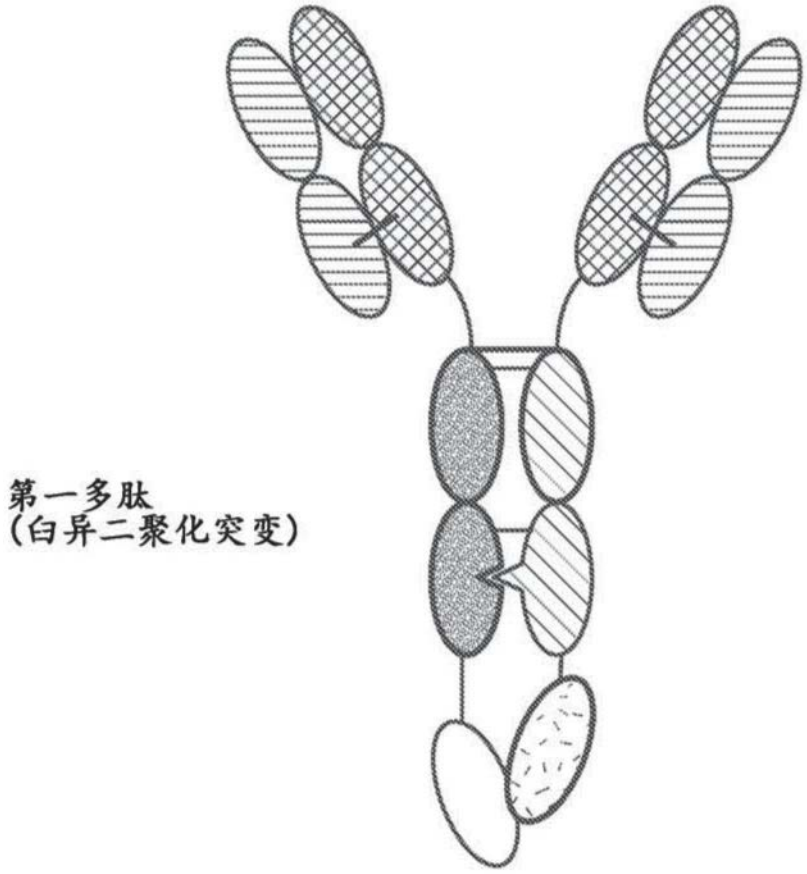


图4J

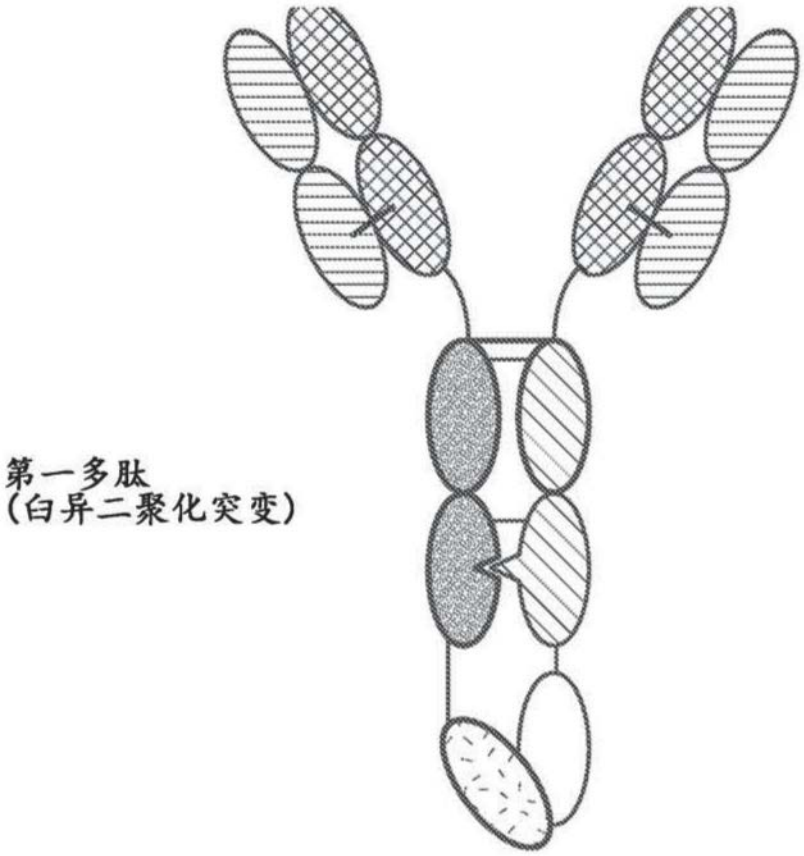


图4K

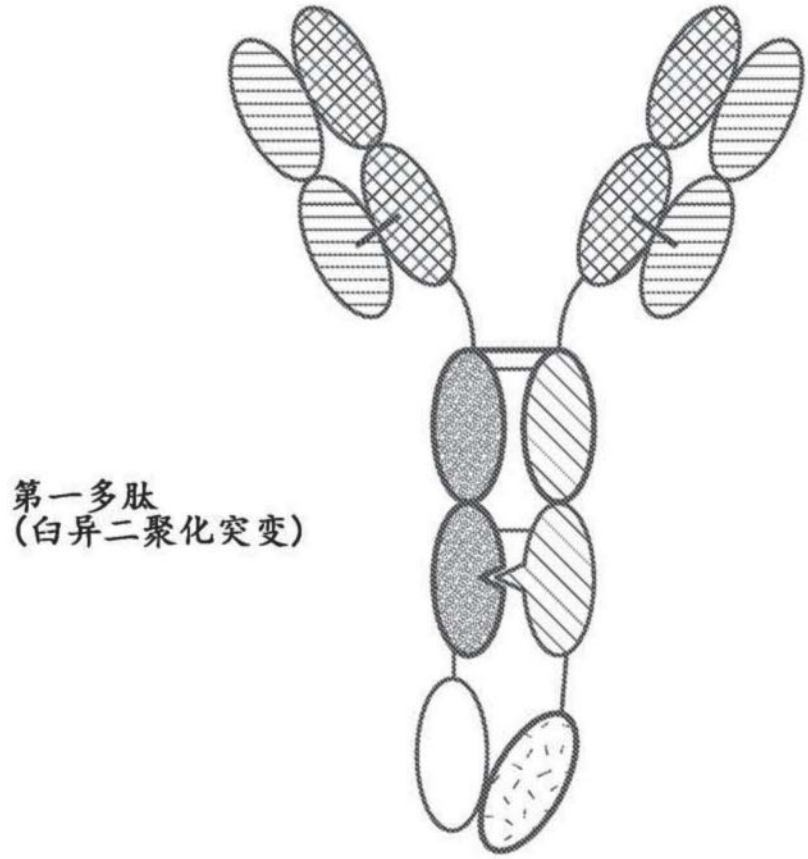

第一多肽
(白异二聚化突变)

图4L

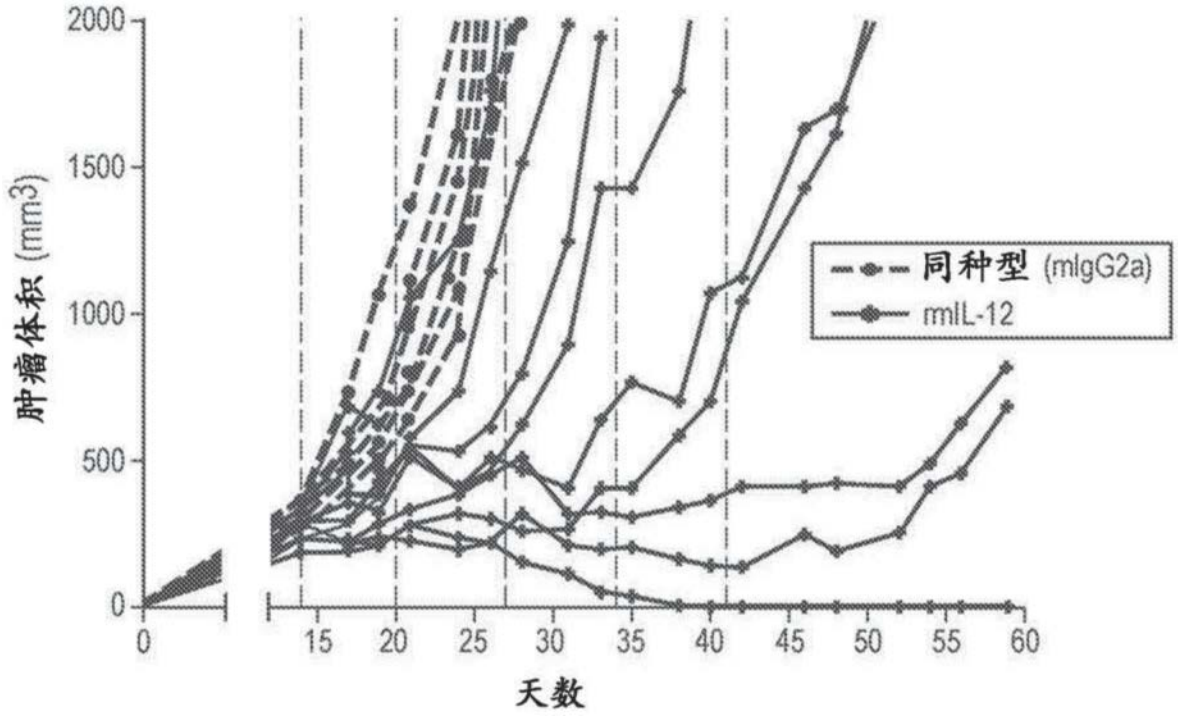

肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数
同种型 (mIgG2a)
mIL-12

图5A

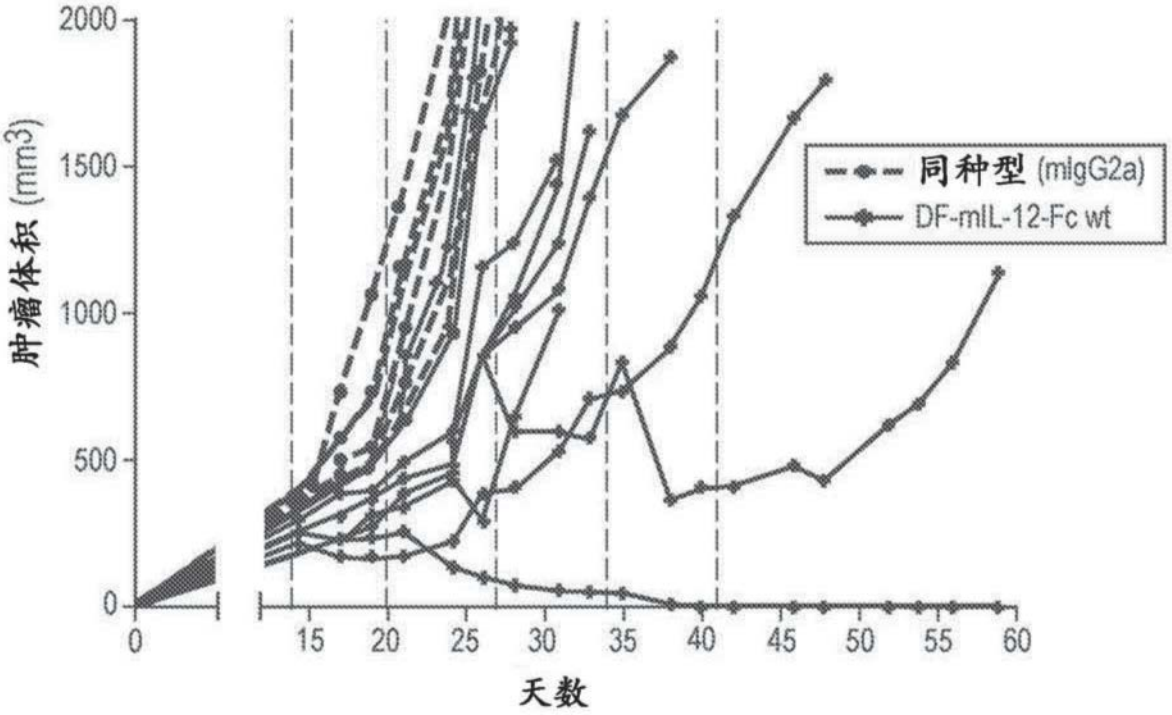

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数
同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt

图5B

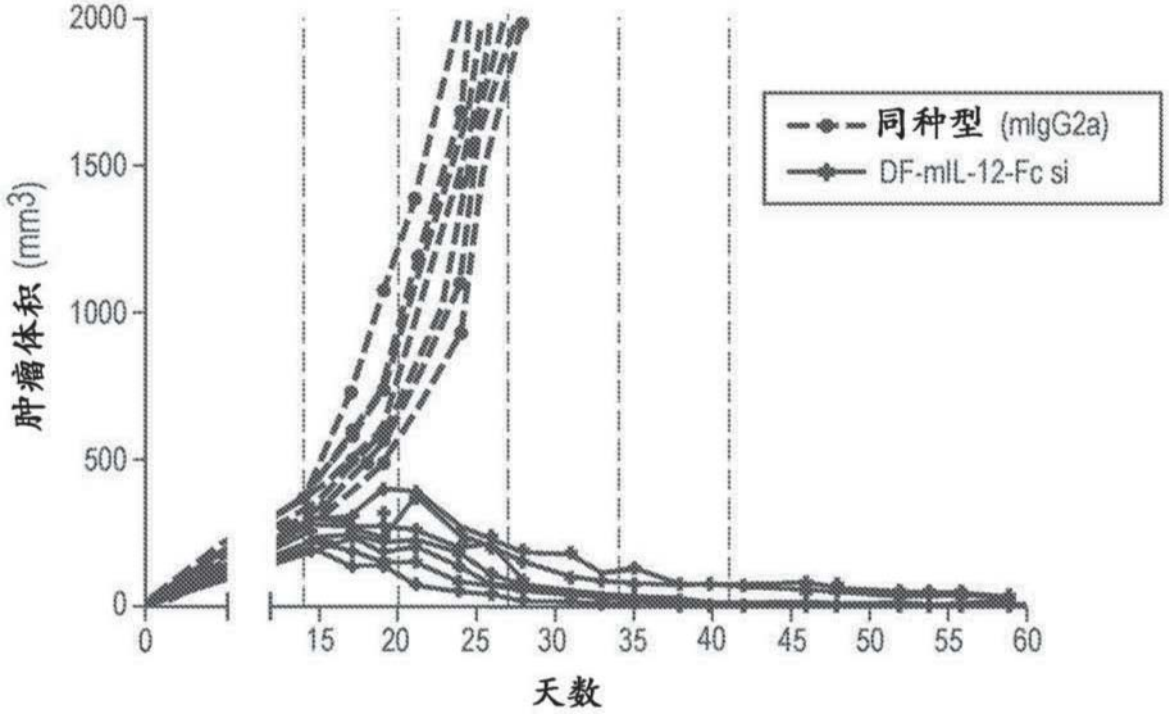

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数
同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si

图5C

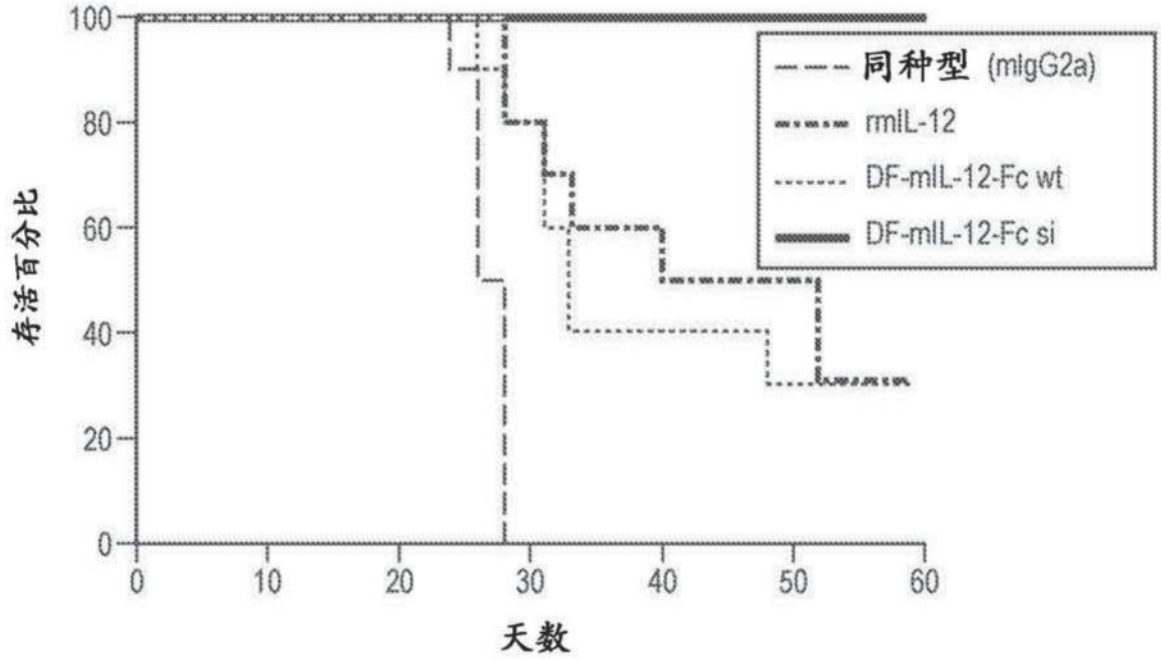

100
80
60
40
20
0
存活百分比
0
10
20
30
40
50
60
天数
同种型 (mIgG2a)
rmIL-12
DF-mIL-12-Fc wt
DF-mIL-12-Fc si

图6

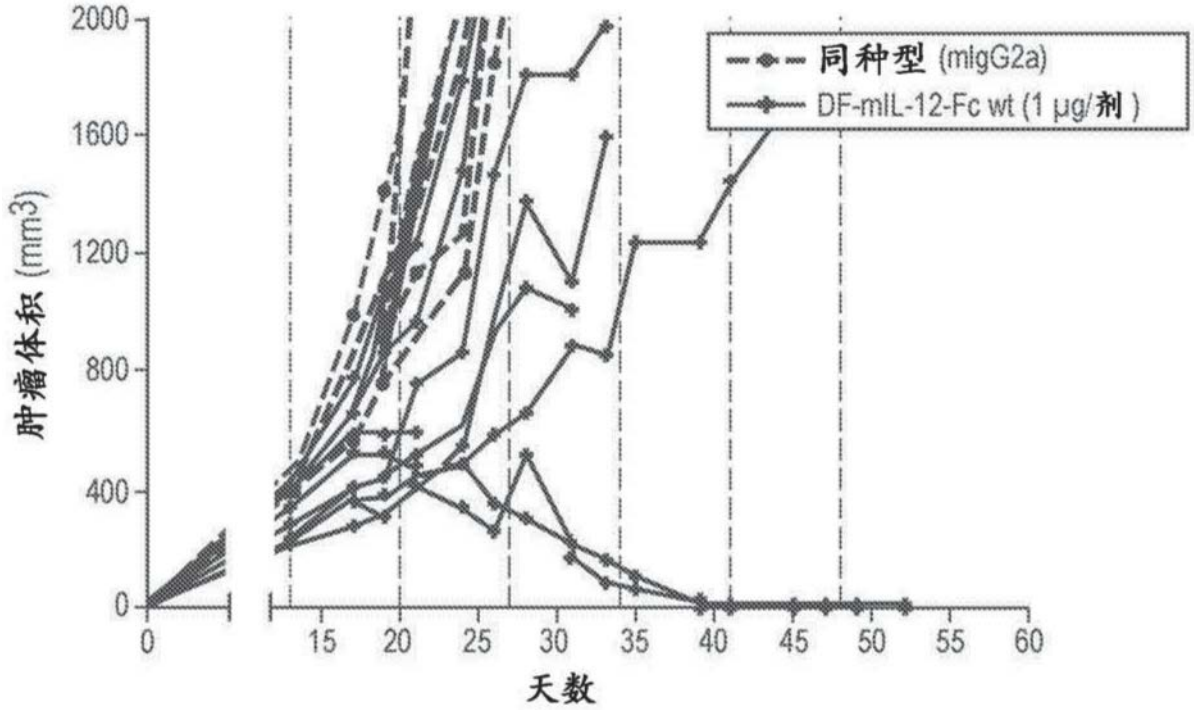

2000
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 (mm3)
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数
同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt (1 μg/剂)

图7A

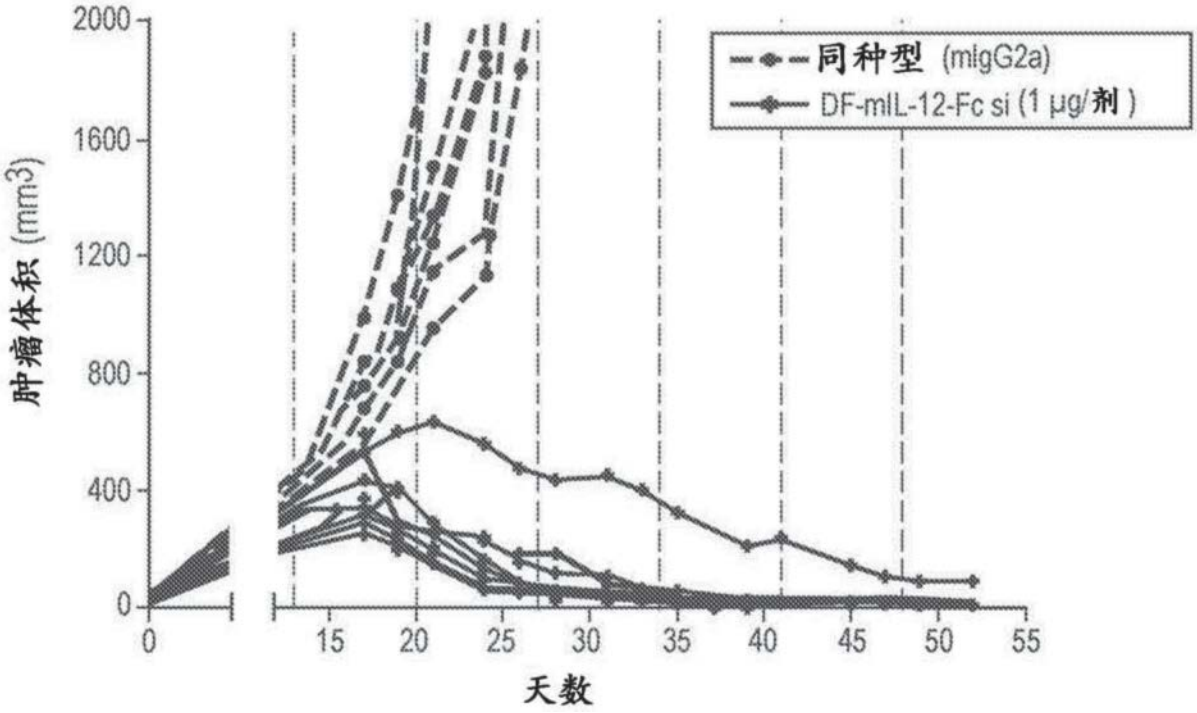

同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si (1 μg/剂)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
天数

图7B

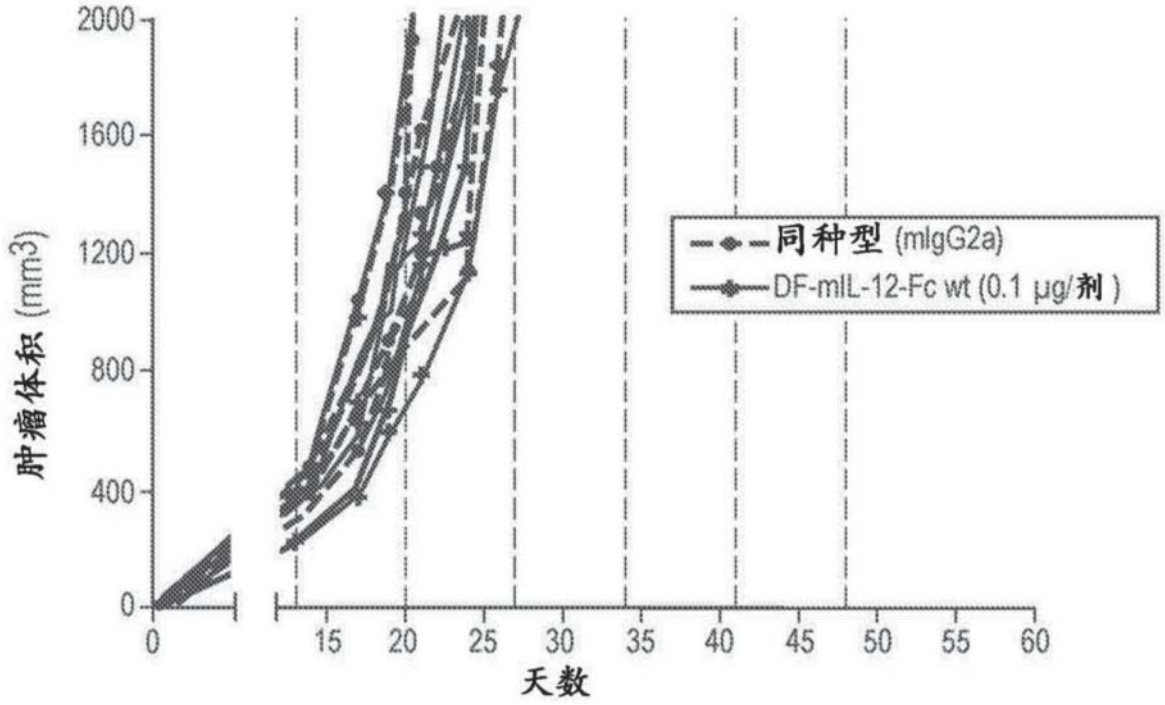

同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt (0.1 μg/剂)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数

图7C

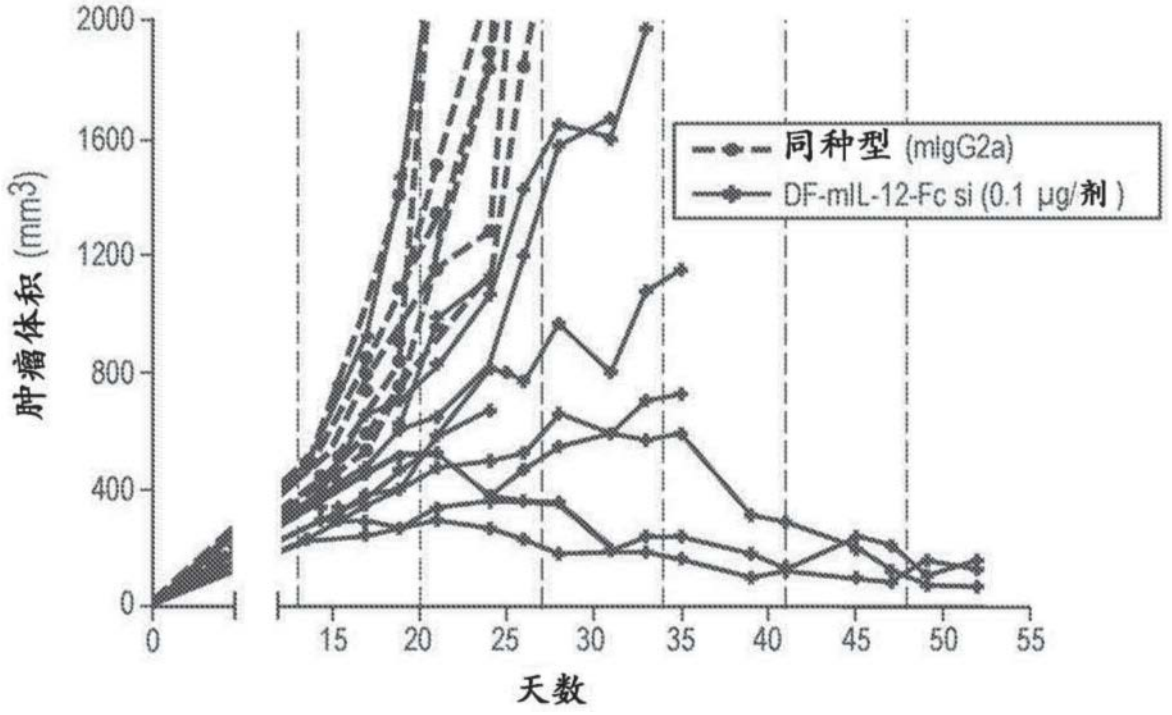

肿瘤体积 (mm3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
天数
同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si (0.1 μg/剂)

图7D

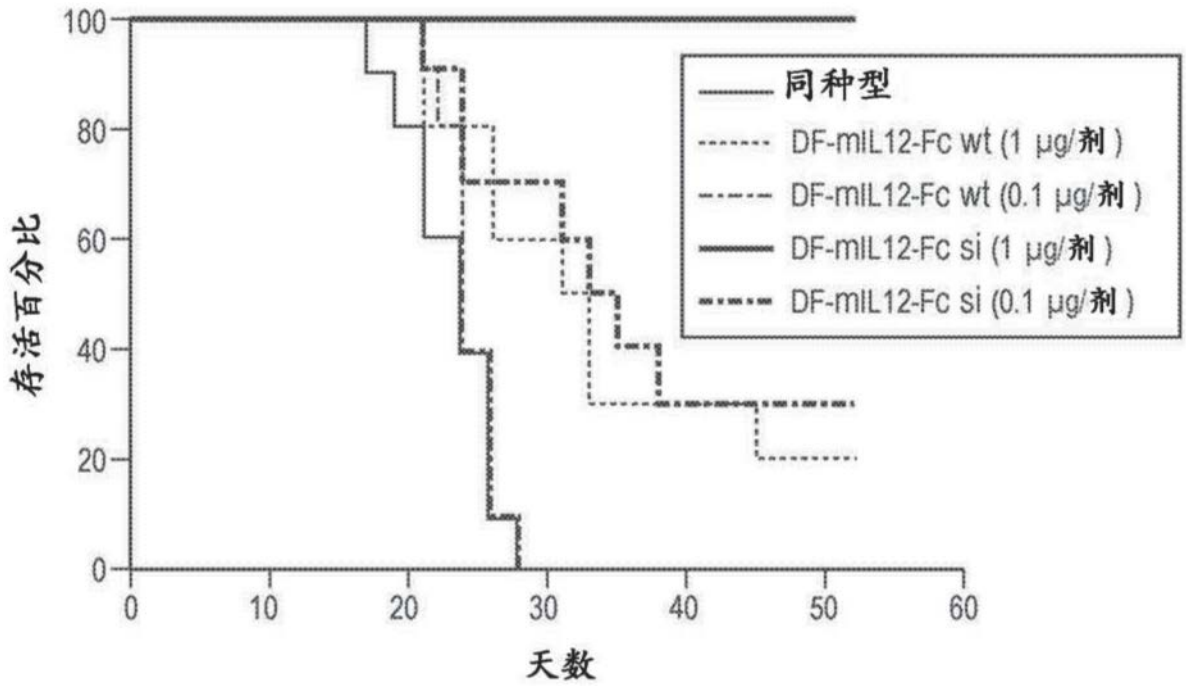

存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
天数
同种型
DF-mIL12-Fc wt (1 μg/剂)
DF-mIL12-Fc wt (0.1 μg/剂)
DF-mIL12-Fc si (1 μg/剂)
DF-mIL12-Fc si (0.1 μg/剂)

图8

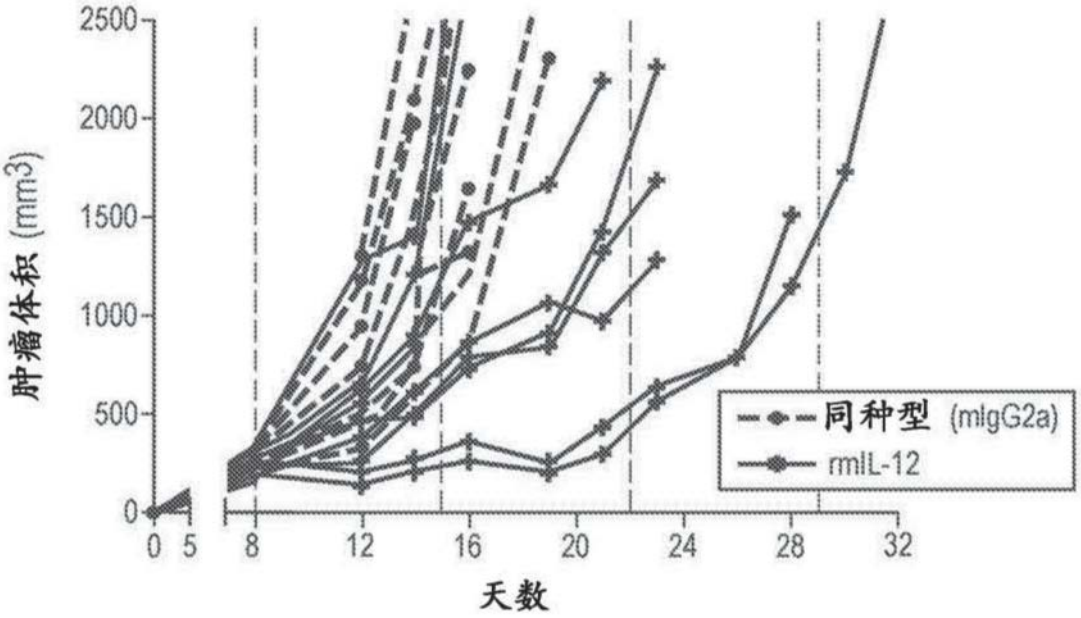

肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 8 12 16 20 24 28 32
天数
同种型 (mIgG2a)
rmIL-12

图9A

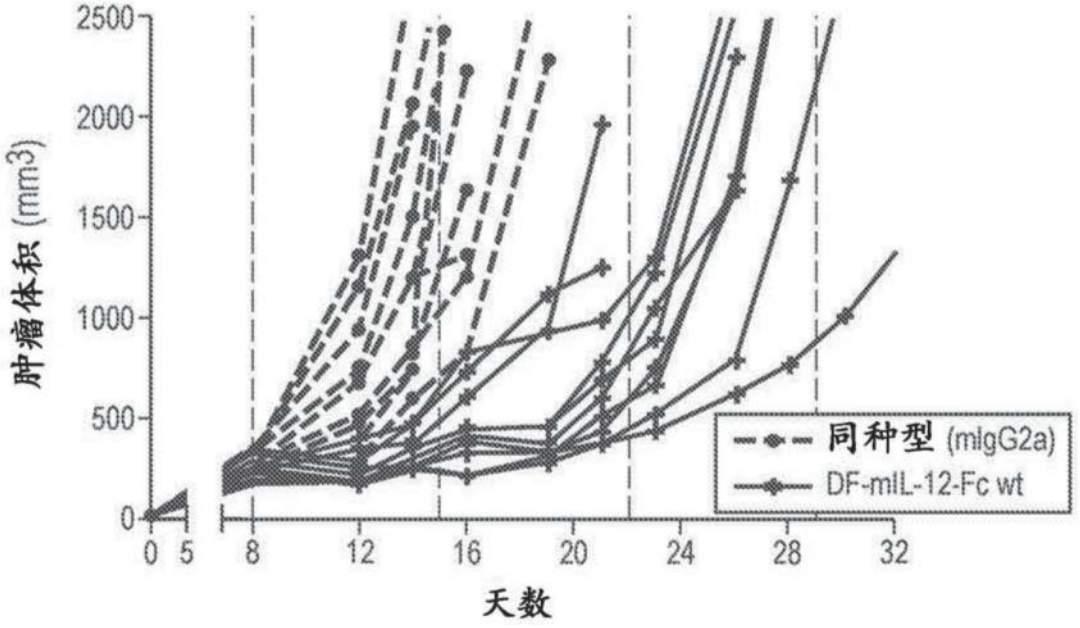

肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 8 12 16 20 24 28 32
天数
同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt

图9B

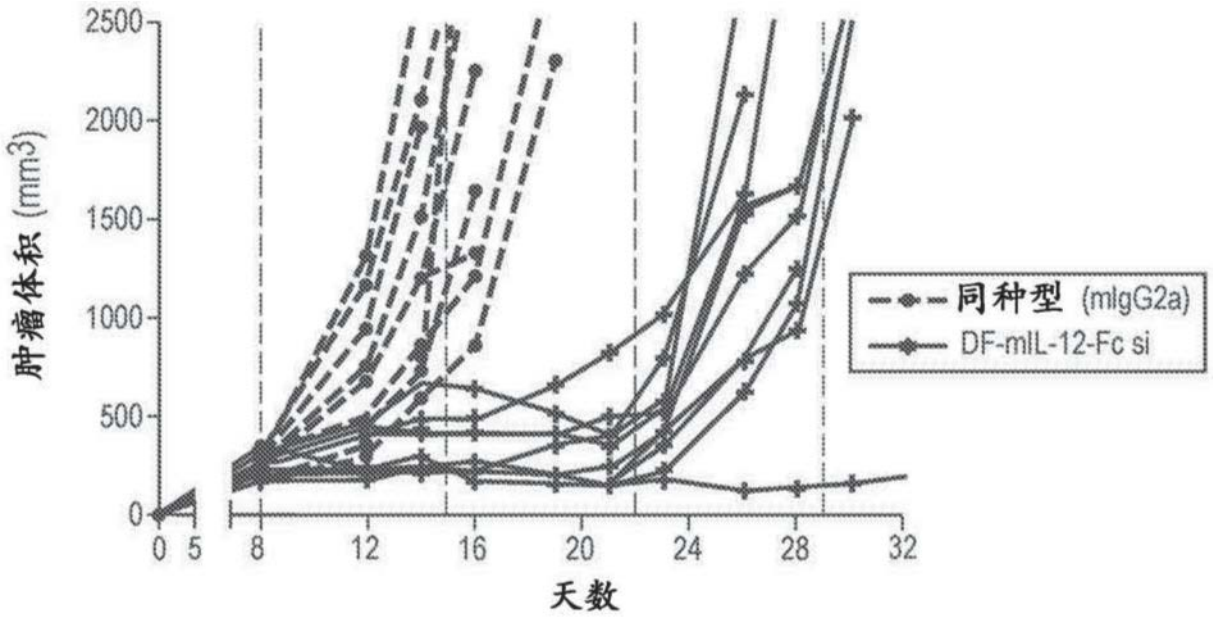

肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5 8 12 16 20 24 28 32
天数
同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si

图9C

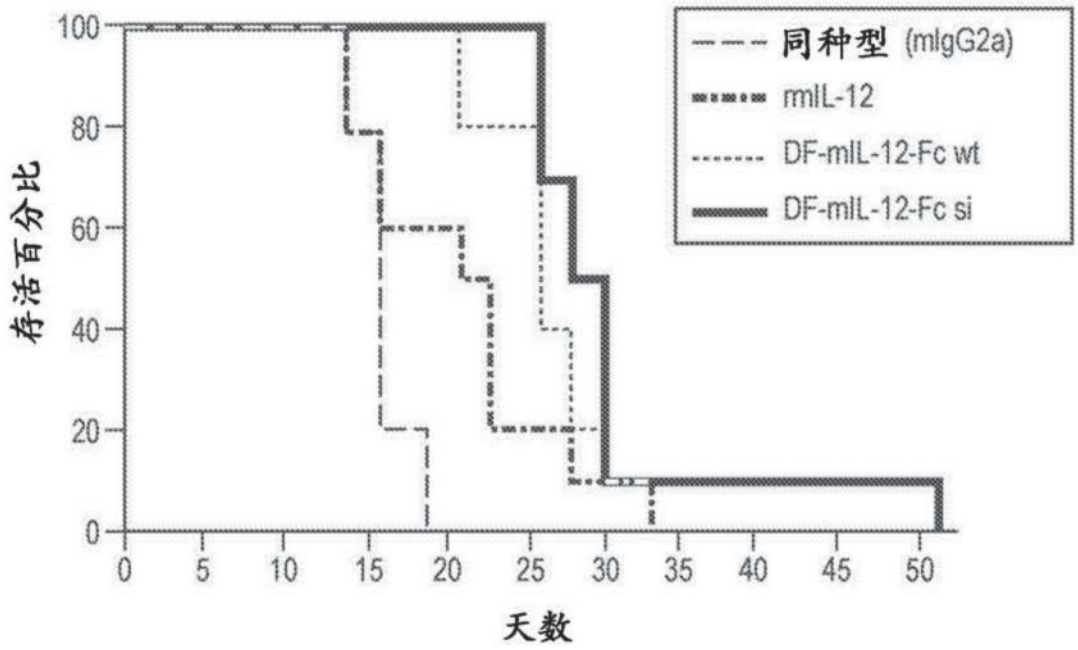

存活百分比
100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
天数
同种型 (mIgG2a)
mIL-12
DF-mIL-12-Fc wt
DF-mIL-12-Fc si

图10

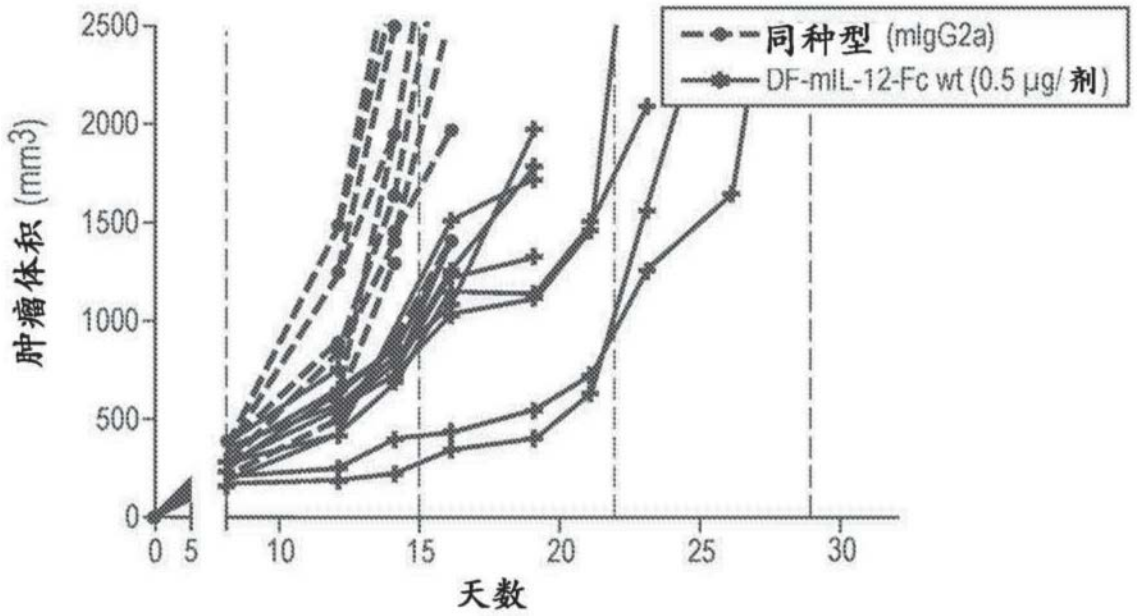

同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt (0.5 μg/剂)
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5
10
15
20
25
30
天数

图11A

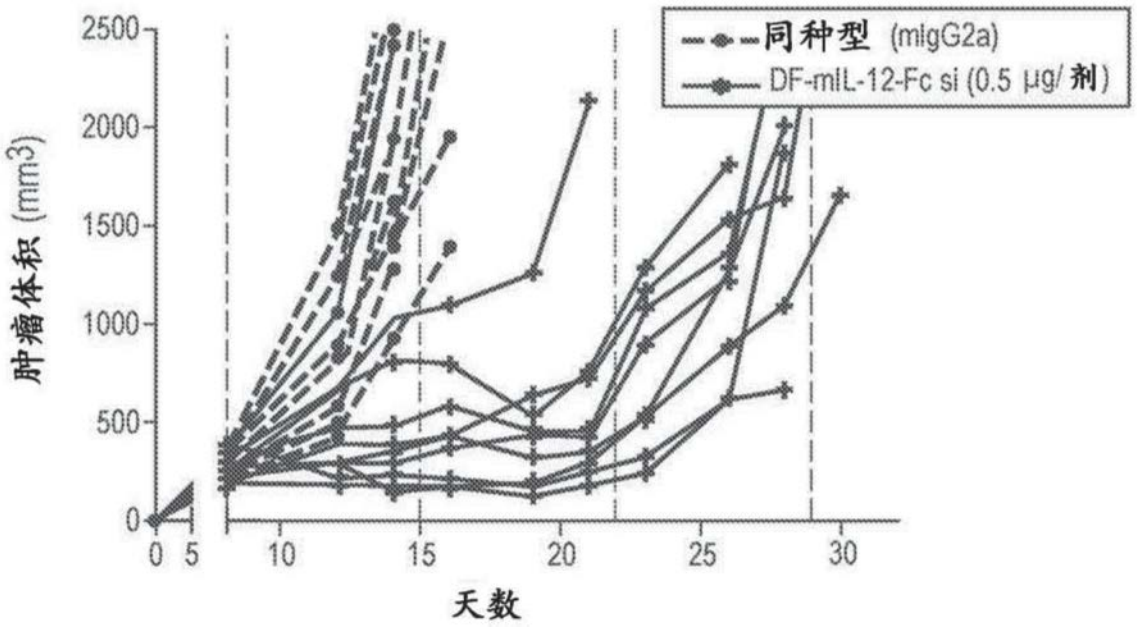

同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si (0.5 μg/剂)
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5
10
15
20
25
30
天数

图11B

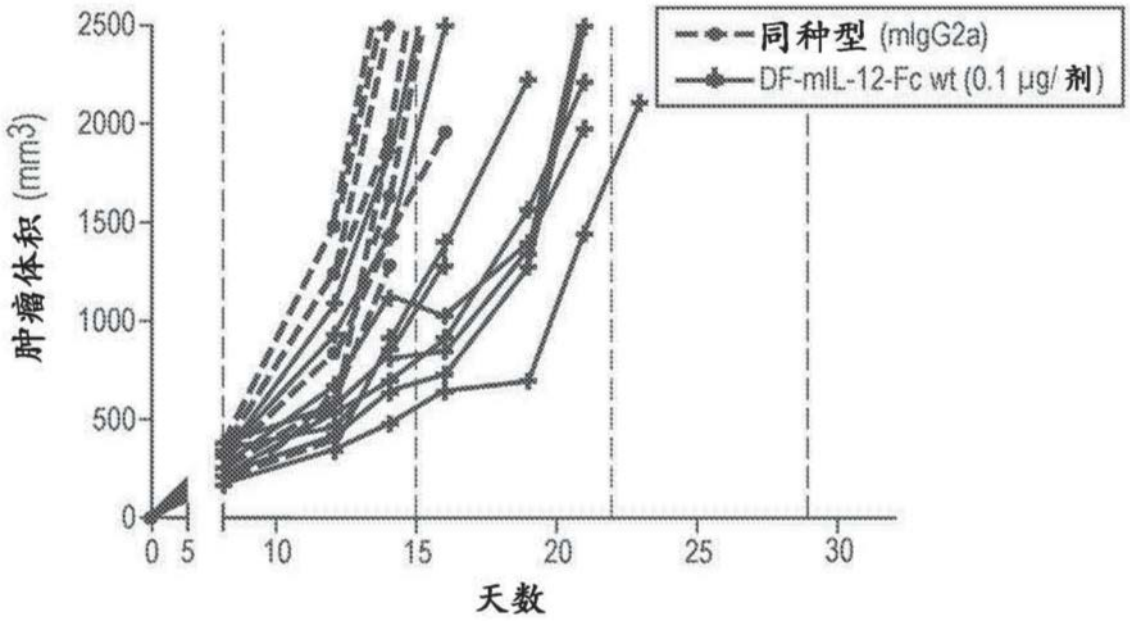

同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc wt (0.1 μg/剂)
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5
10
15
20
25
30
天数

图11C

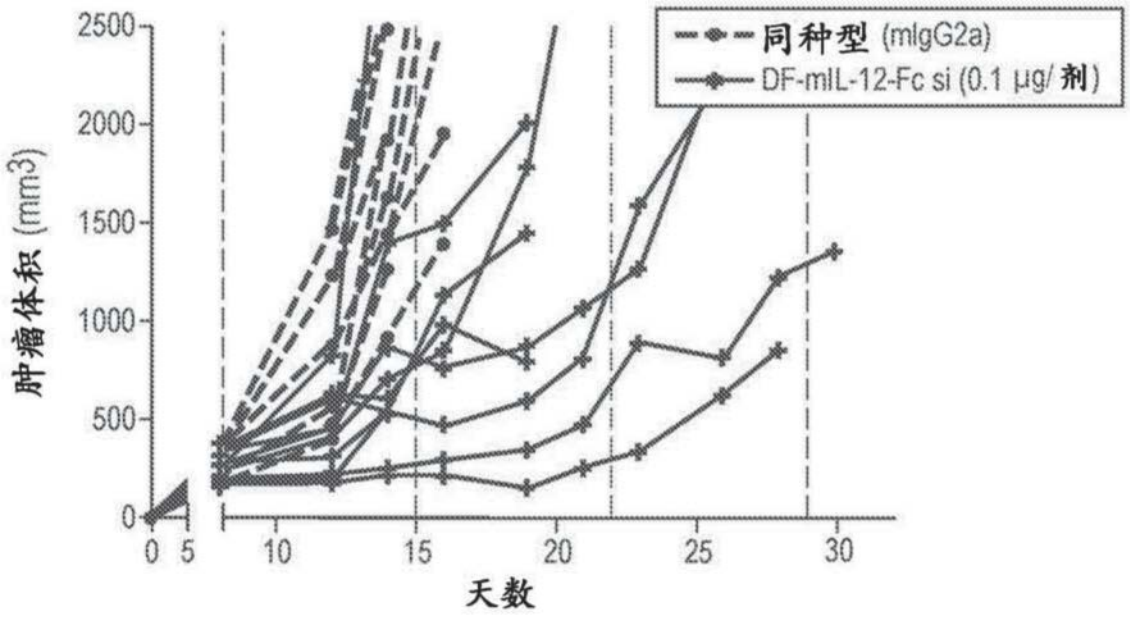

同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si (0.1 μg/剂)
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 5
10
15
20
25
30
天数

图11D

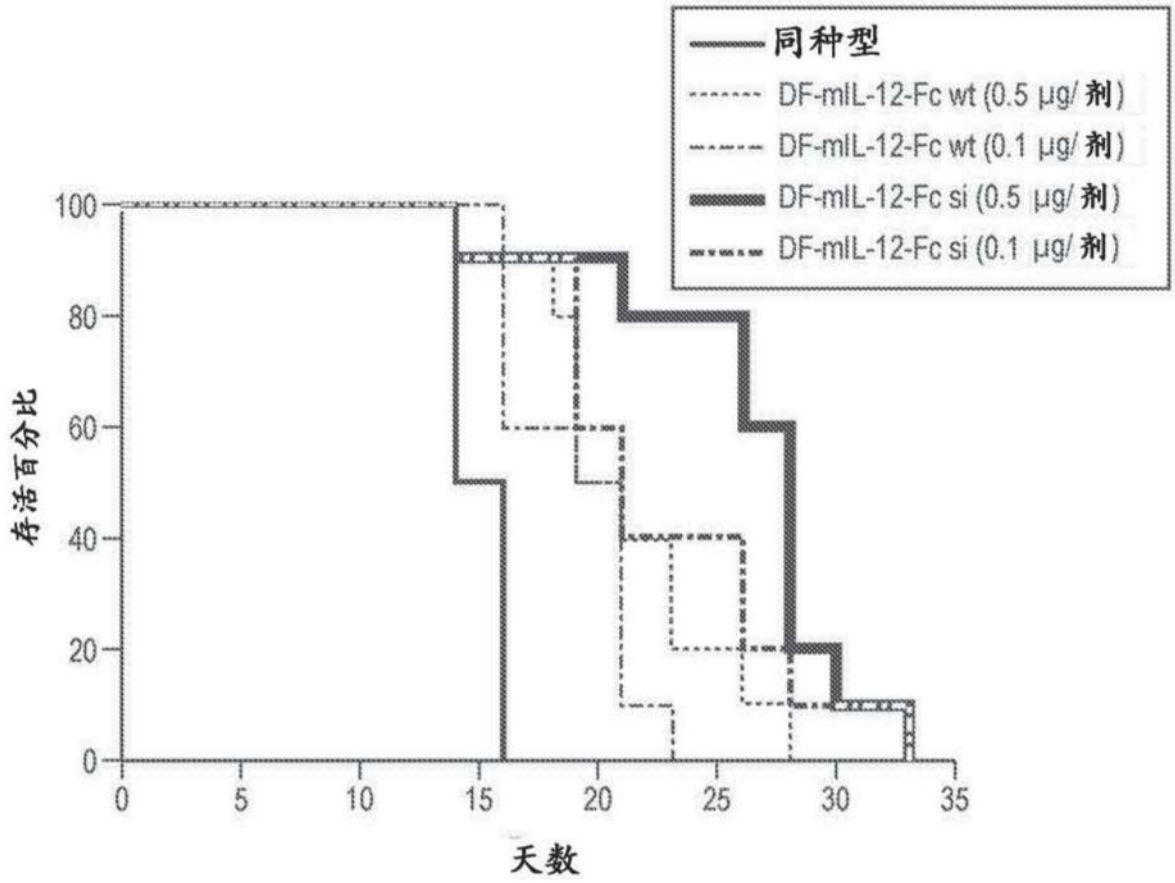

同种型
DF-mIL-12-Fc wt (0.5 μg/剂)
DF-mIL-12-Fc wt (0.1 μg/剂)
DF-mIL-12-Fc si (0.5 μg/剂)
DF-mIL-12-Fc si (0.1 μg/剂)
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
天数

图12

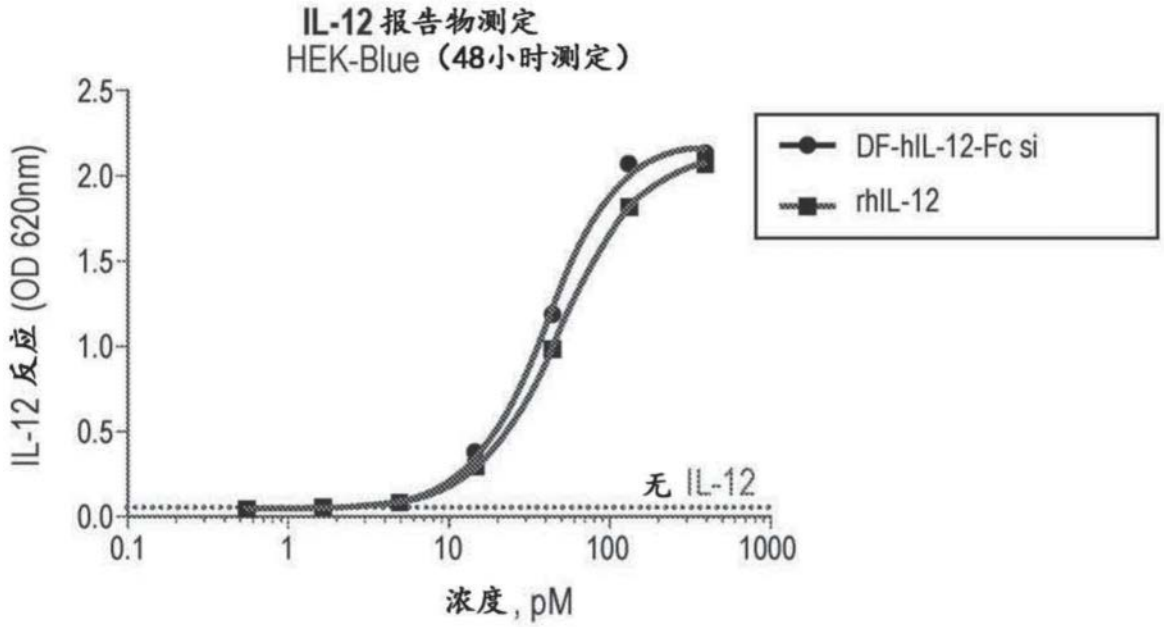

IL-12 报告物测定
HEK-Blue（48小时测定）
DF-hIL-12-Fc si
rhIL-12
IL-12 反应 (OD 620nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
无 IL-12
0.1
1
10
100
1000
浓度，pM

图13A

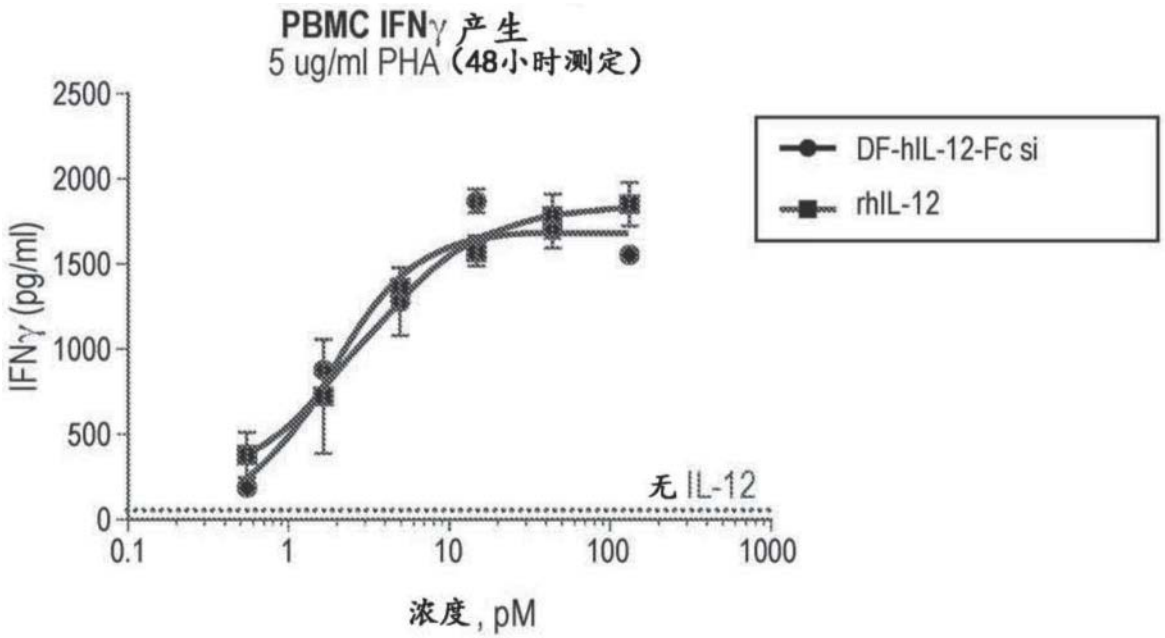

PBMC IFNγ 产生
5 ug/ml PHA（48小时测定）
IFNγ (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
0.1
1
10
100
1000
浓度，pM
无 IL-12
DF-hIL-12-Fc si
rhIL-12

图13B

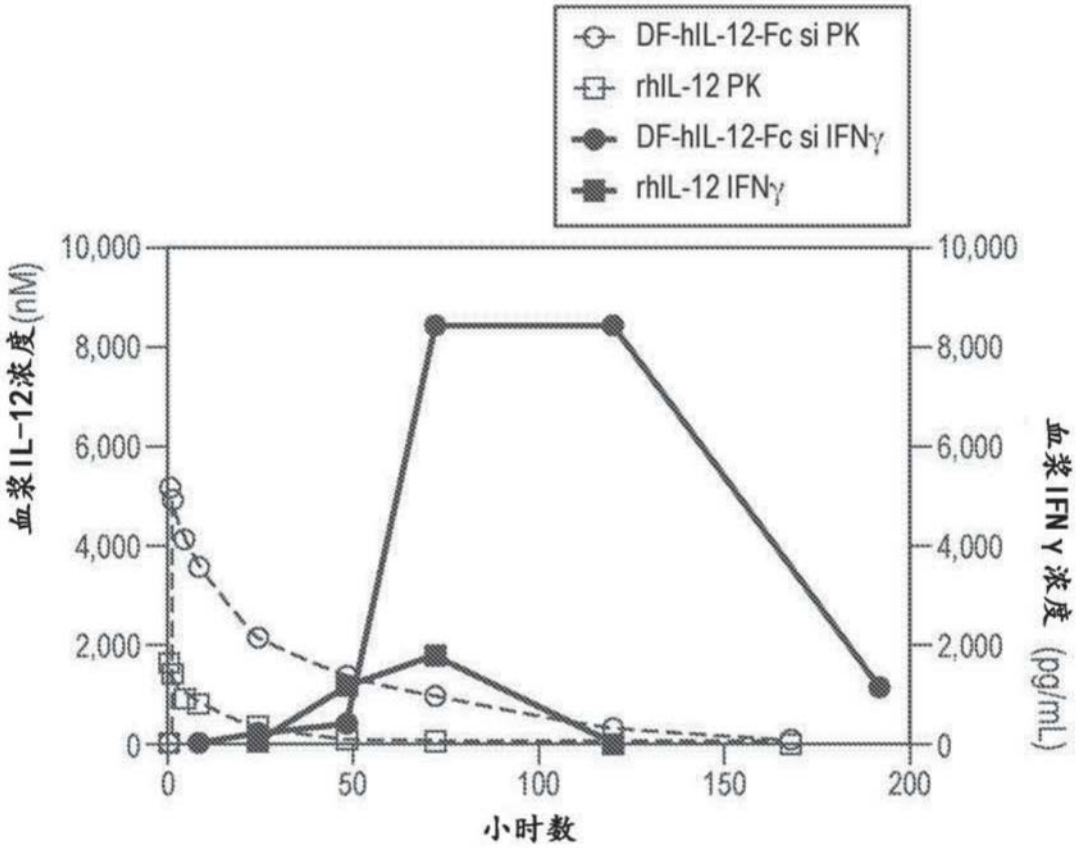

DF-hIL-12-Fc si PK
rhIL-12 PK
DF-hIL-12-Fc si IFNγ
rhIL-12 IFNγ
血浆IL-12浓度(nM)
血浆IFN γ 浓度 (pg/mL)
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0
50
100
150
200
小时数

图14

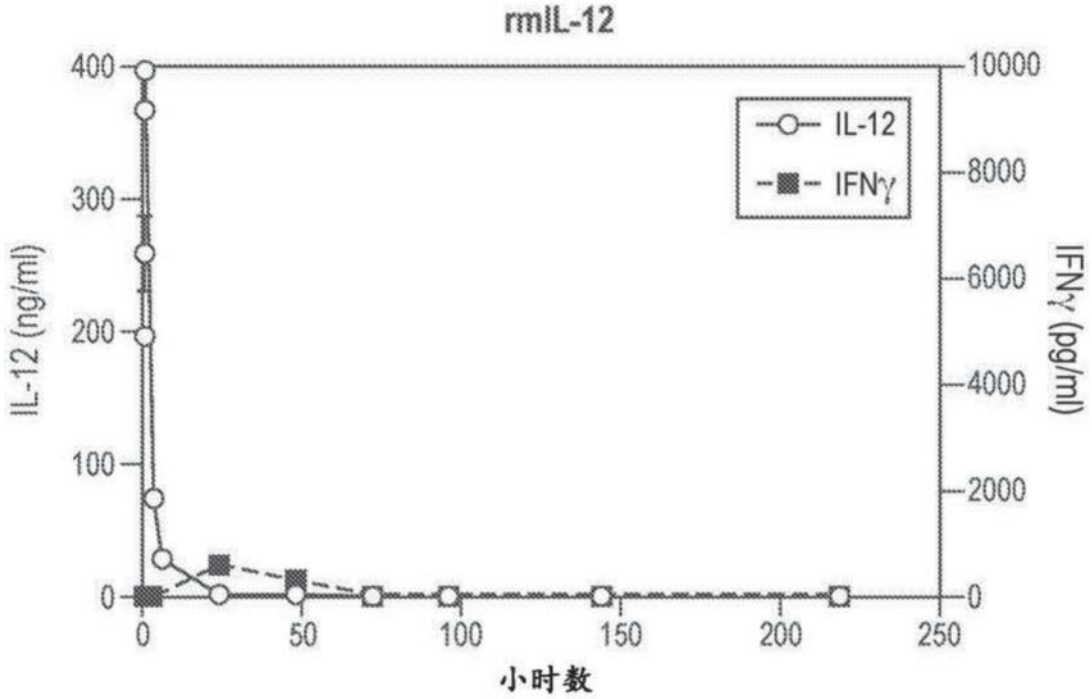

rmIL-12
IL-12
IFNγ
IL-12 (ng/ml)
IFNγ (pg/ml)
小时数
0
100
200
300
400
2000
4000
6000
8000
10000
50
150
250

图15A

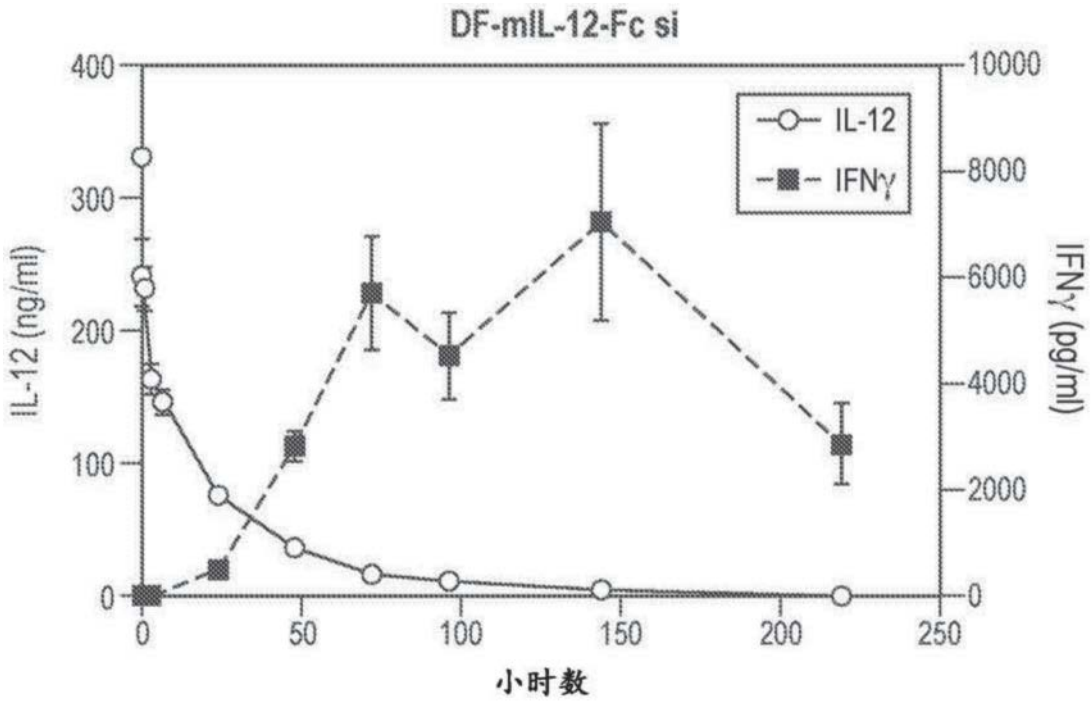

DF-mIL-12-Fc si
IL-12
IFNγ
IL-12 (ng/ml)
IFNγ (pg/ml)
小时数
0
100
200
300
400
2000
4000
6000
8000
10000
50
150
250

图15B

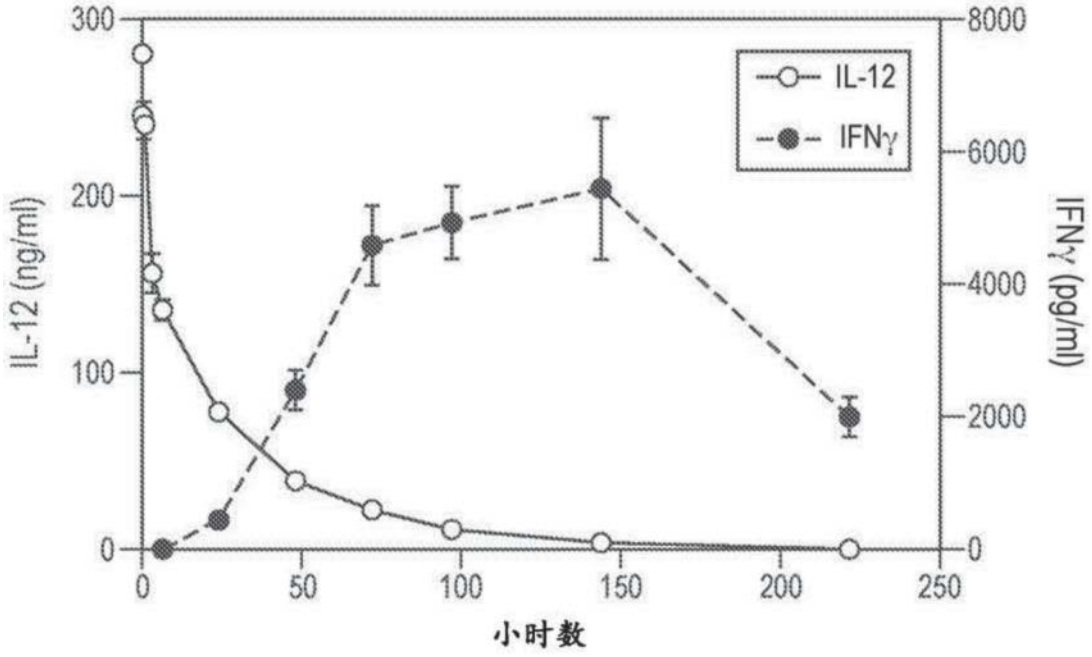

300
200
100
0
8000
6000
4000
2000
0
IL-12
IFNγ
IL-12 (ng/ml)
IFNγ (pg/ml)
0
50
100
150
200
250
小时数

图15C

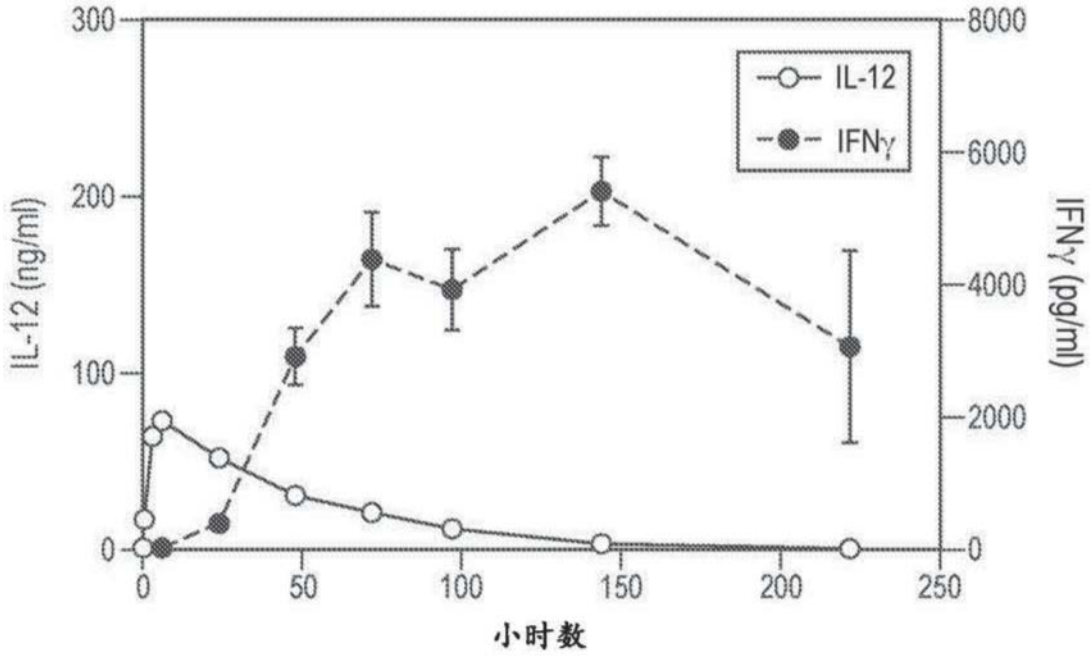

300
200
100
0
8000
6000
4000
2000
0
IL-12
IFNγ
IL-12 (ng/ml)
IFNγ (pg/ml)
0
50
100
150
200
250
小时数

图15D

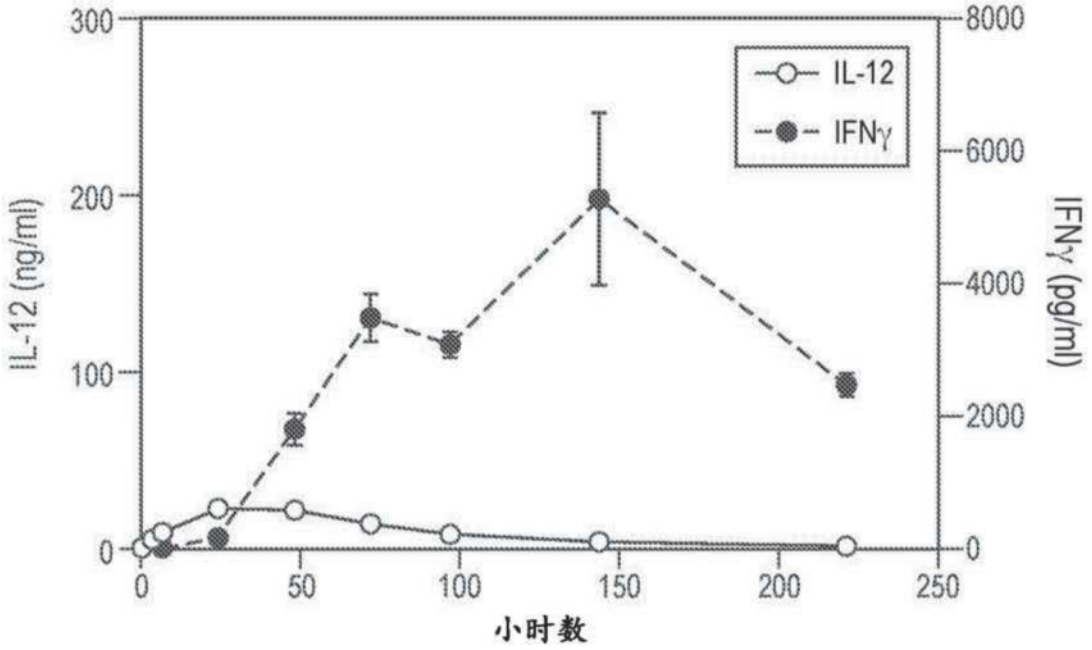

300
200
100
0
8000
6000
4000
2000
0
IL-12 (ng/ml)
IFNγ (pg/ml)
IL-12
IFNγ
0
50
100
150
200
250
小时数

图15E

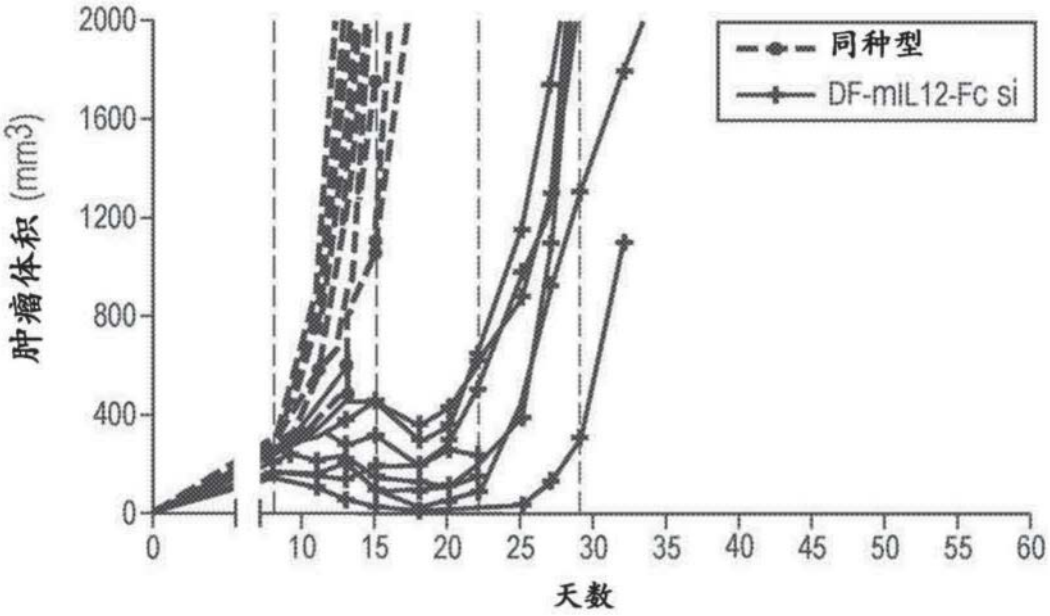

2000
1600
1200
800
400
0
肿瘤体积 (mm3)
同种型
DF-mIL12-Fc si
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数

图16A

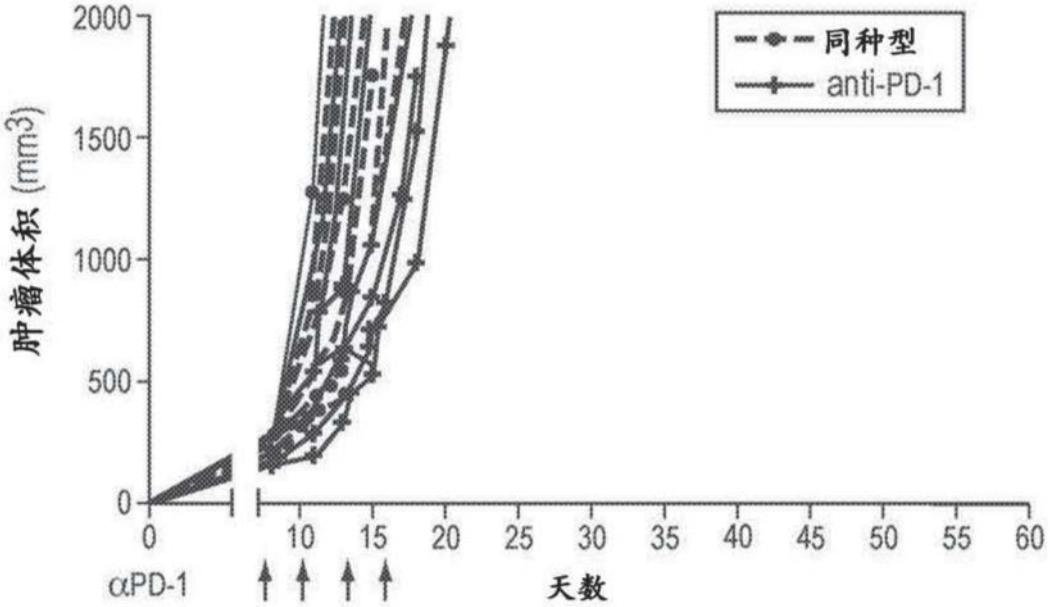

同种型
anti-PD-1
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
αPD-1
天数

图16B

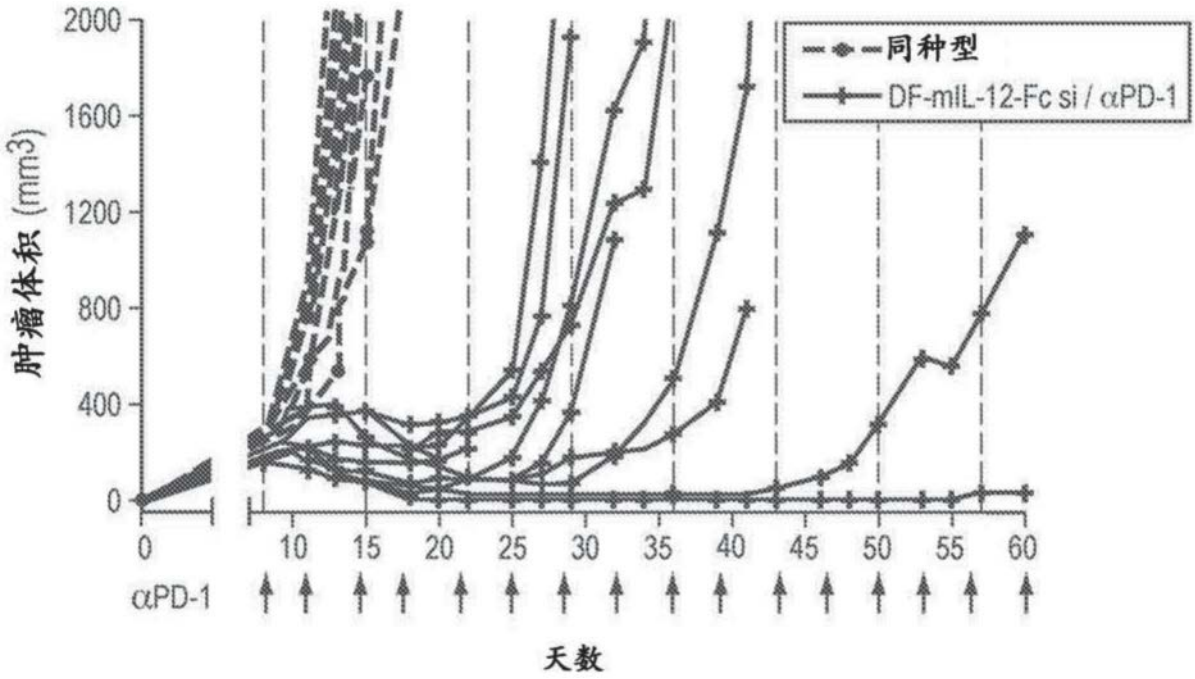

同种型
DF-mIL-12-Fc si / αPD-1
肿瘤体积 (mm3)
2000
1600
1200
800
400
0
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
αPD-1
天数

图16C

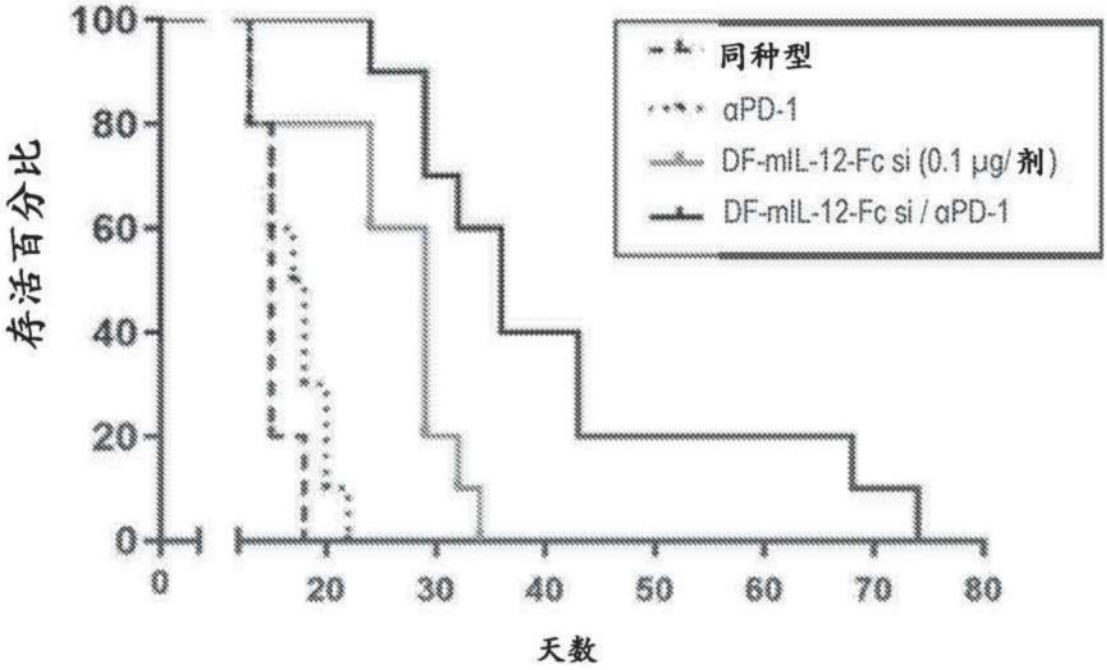

存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
30
40
50
60
70
80
天数
同种型
αPD-1
DF-mIL-12-Fc si (0.1 μg/剂)
DF-mIL-12-Fc si / αPD-1

图17A

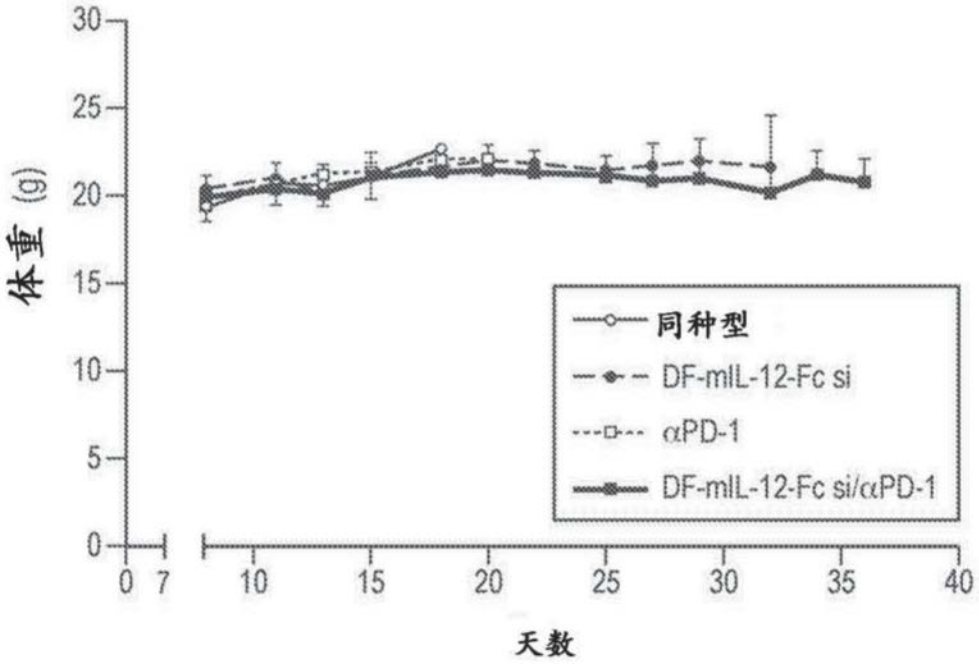

体重 (g)
30
25
20
15
10
5
0
0 7
10
15
20
25
30
35
40
天数
同种型
DF-mIL-12-Fc si
αPD-1
DF-mIL-12-Fc si/αPD-1

图17B

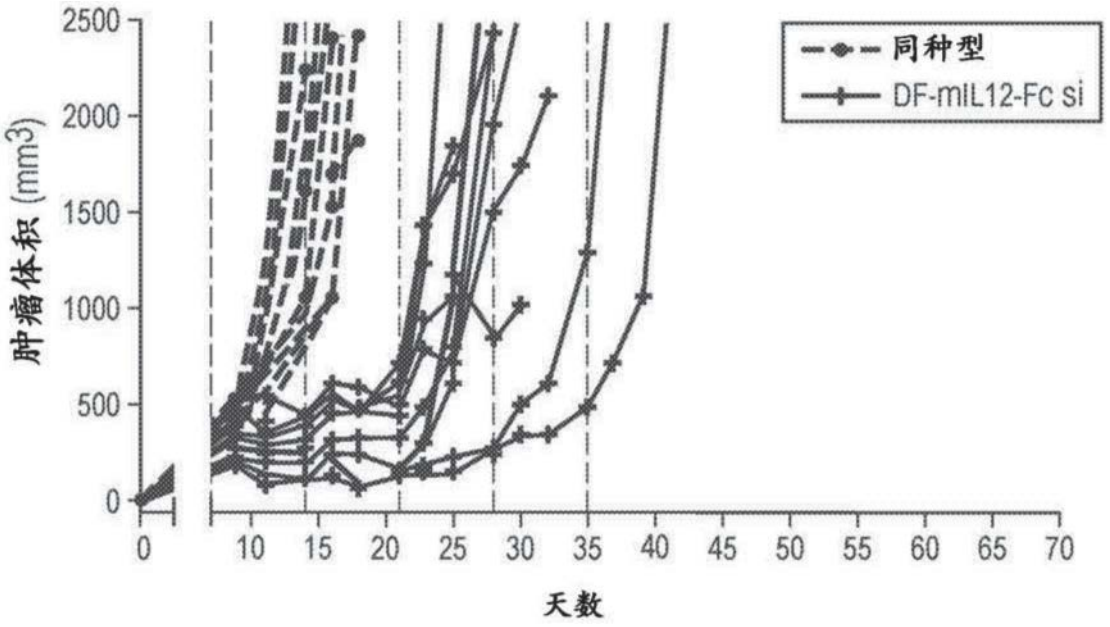

同种型
DF-mIL12-Fc si
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
天数

图18A

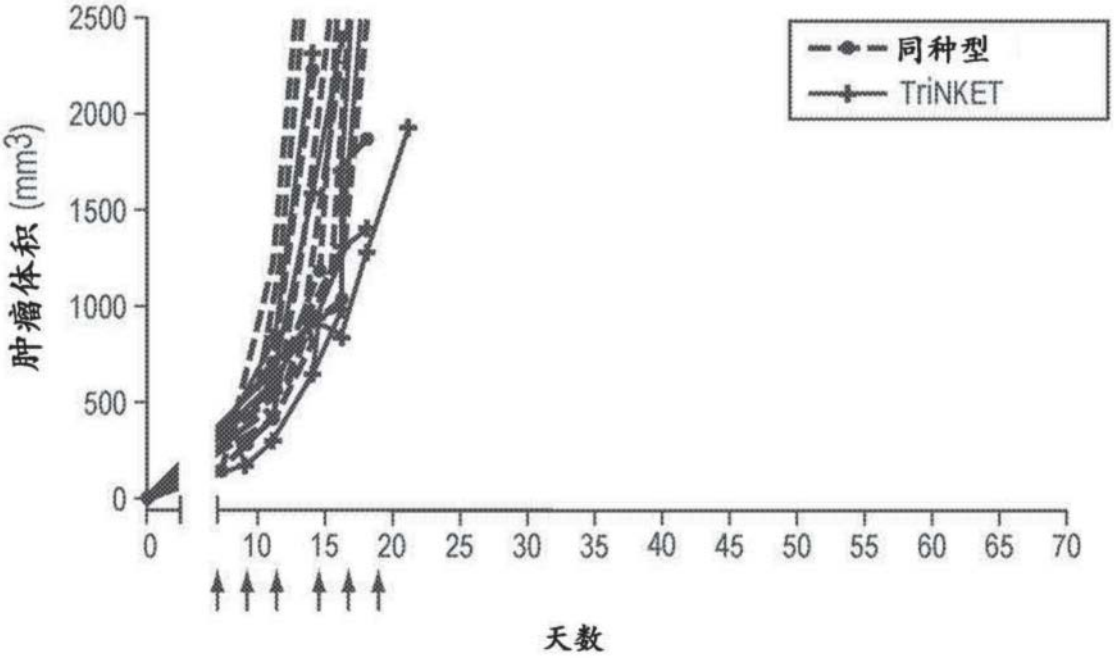

同种型
TriNKET
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
天数

图18B

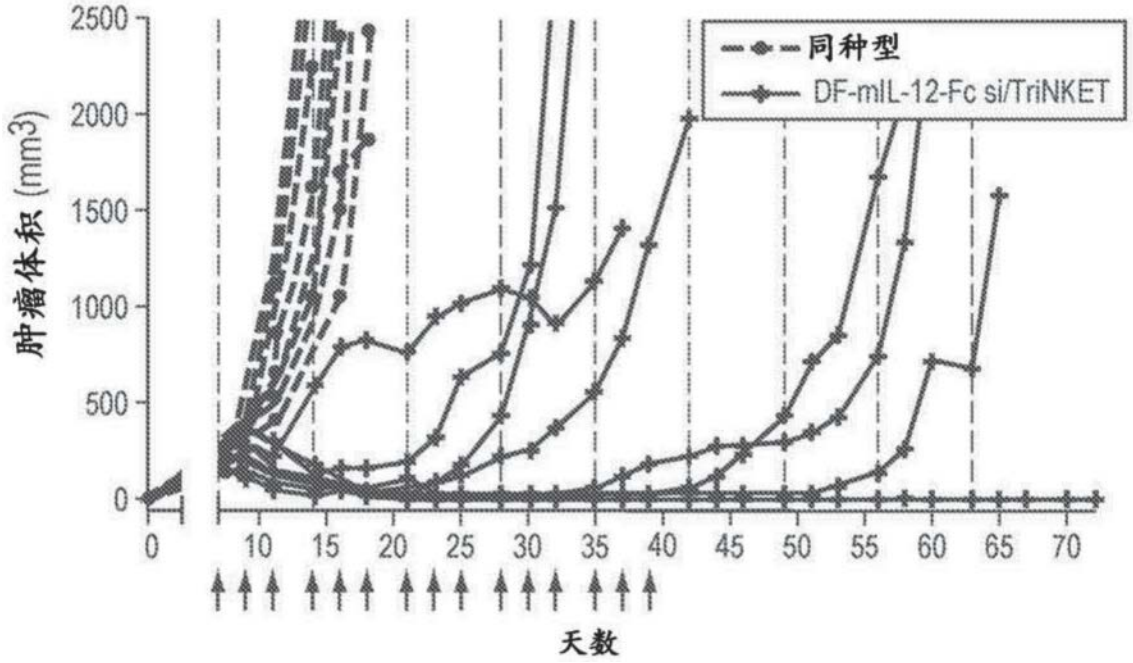

同种型
DF-mIL-12-Fc si/TriNKET
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
天数

图18C

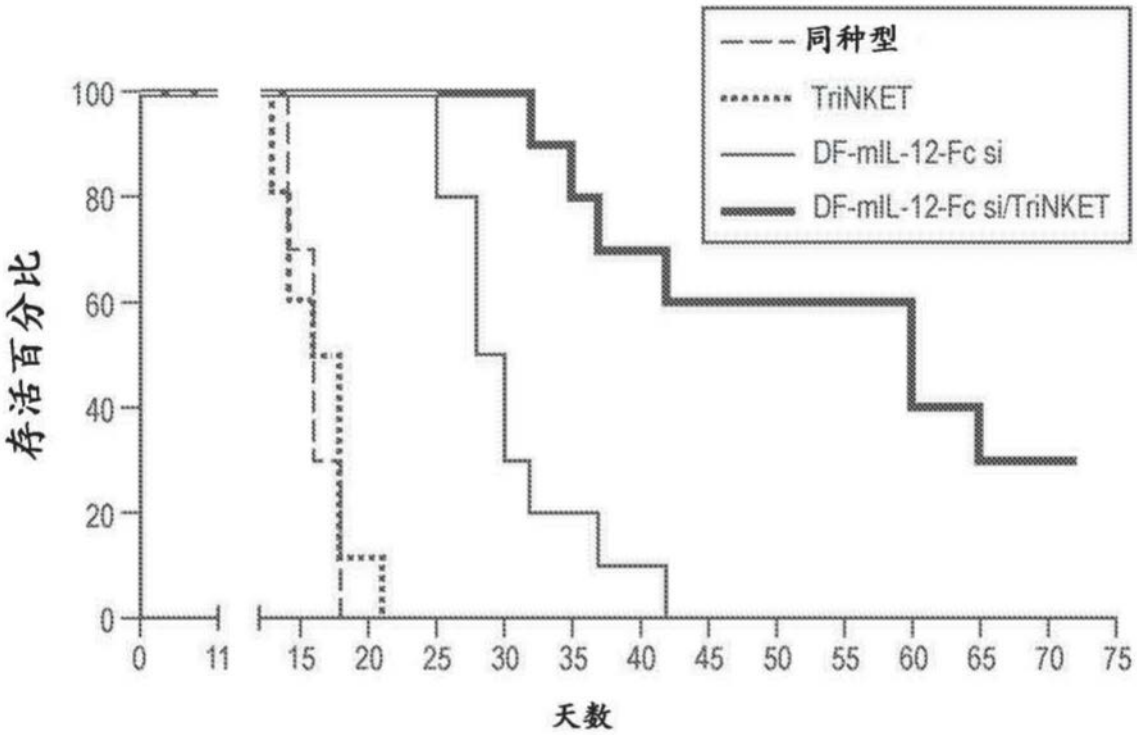

同种型
TriNKET
DF-mIL-12-Fc si
DF-mIL-12-Fc si/TriNKET
存活百分比
100
80
60
40
20
0
0
11
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
天数

图19A

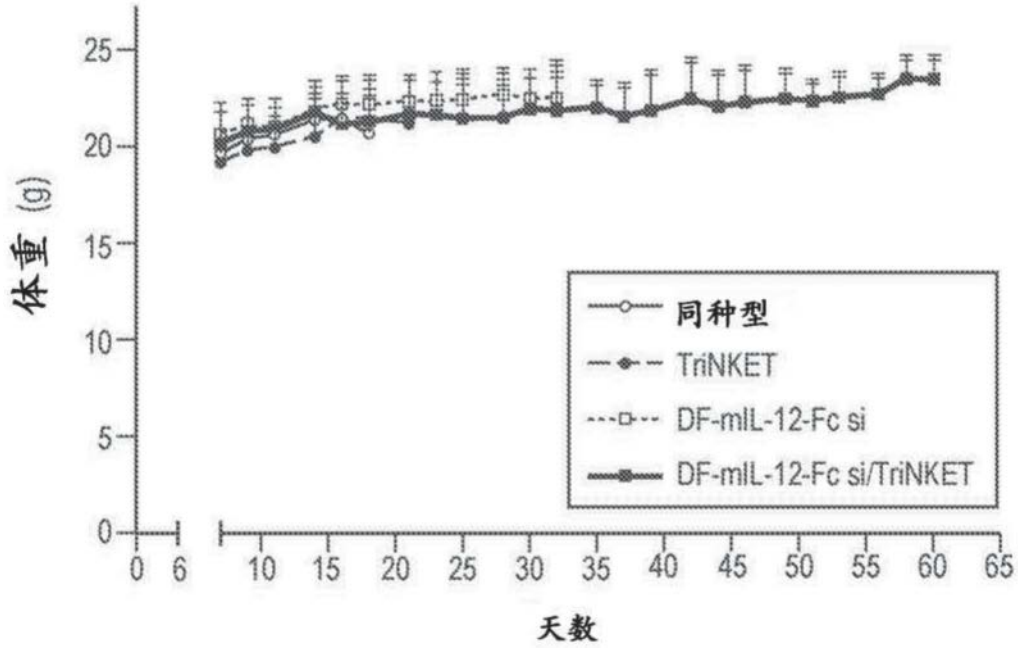

体重 (g)
25
20
15
10
5
0
0 6
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
天数
同种型
TriNKET
DF-mIL-12-Fc si
DF-mIL-12-Fc si/TriNKET

图19B

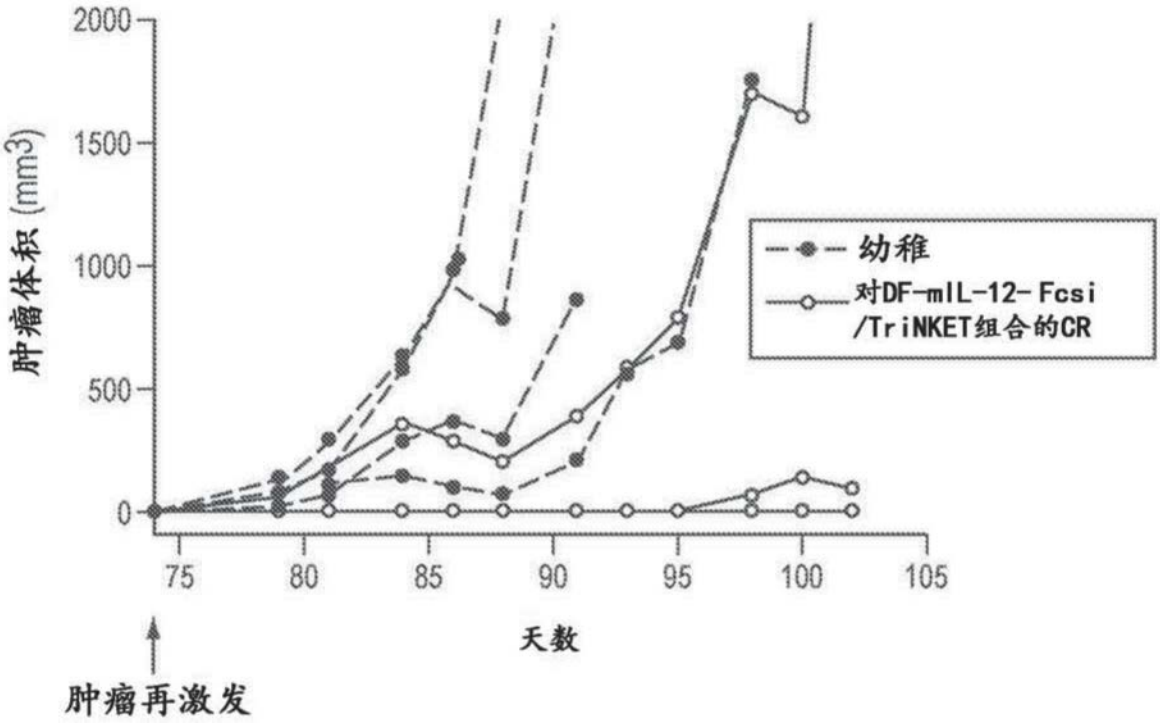

肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
75 80 85 90 95 100 105
天数
肿瘤再激发
幼稚
对DF-mIL-12-Fcsi
/TriNKET组合的CR

图20

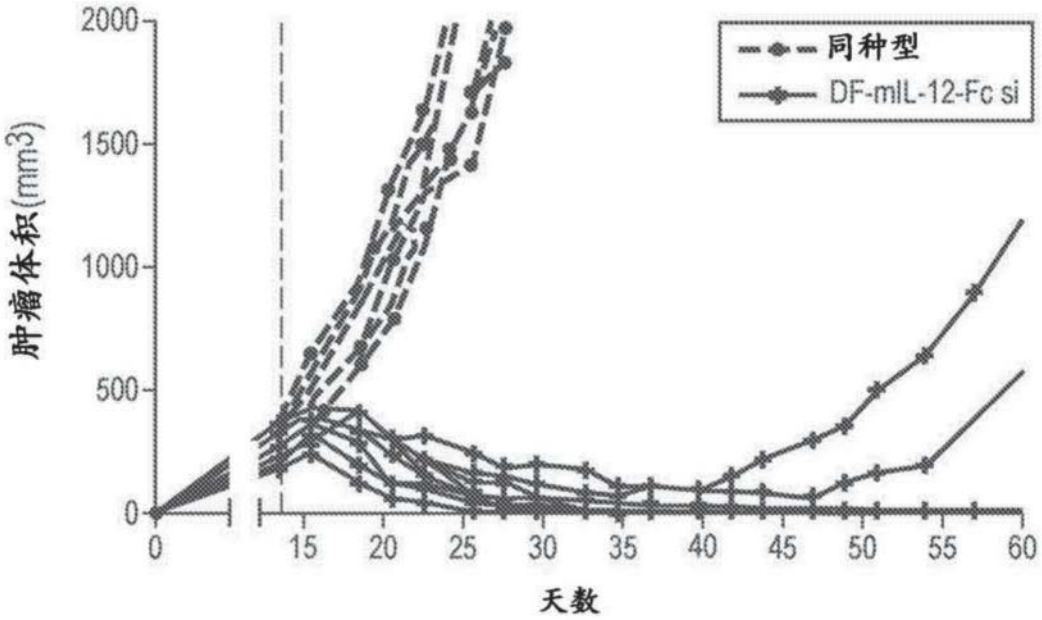

同种型
DF-mIL-12-Fc si
肿瘤体积(mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数

图21A

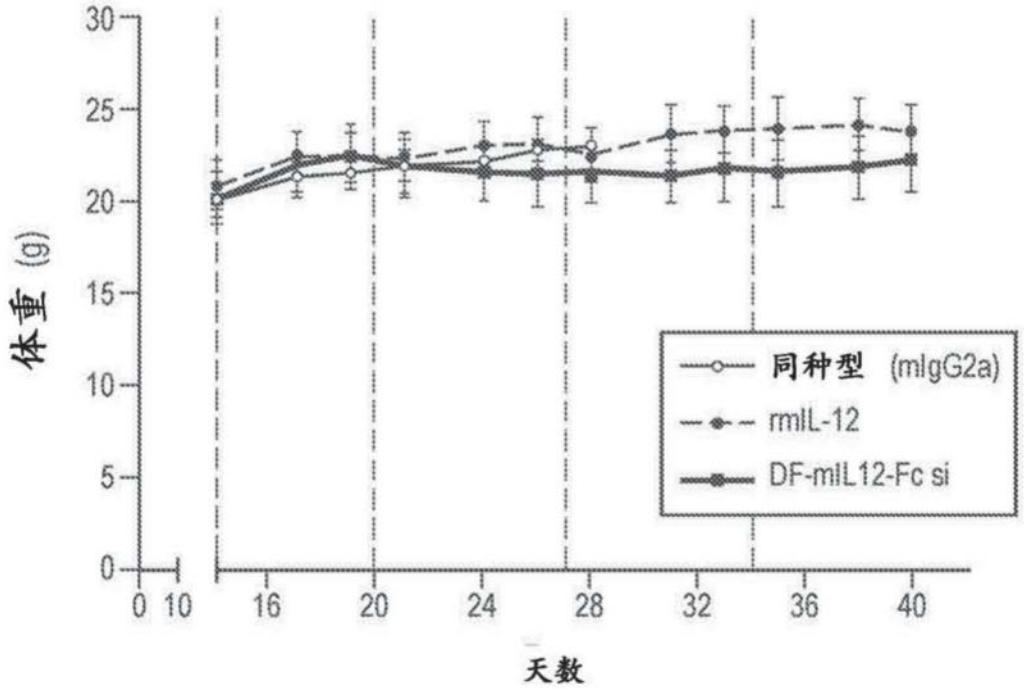

体重 (g)
30
25
20
15
10
5
0
0 10
16
20
24
28
32
36
40
天数
同种型 (mIgG2a)
rmIL-12
DF-mIL12-Fc si

图21B

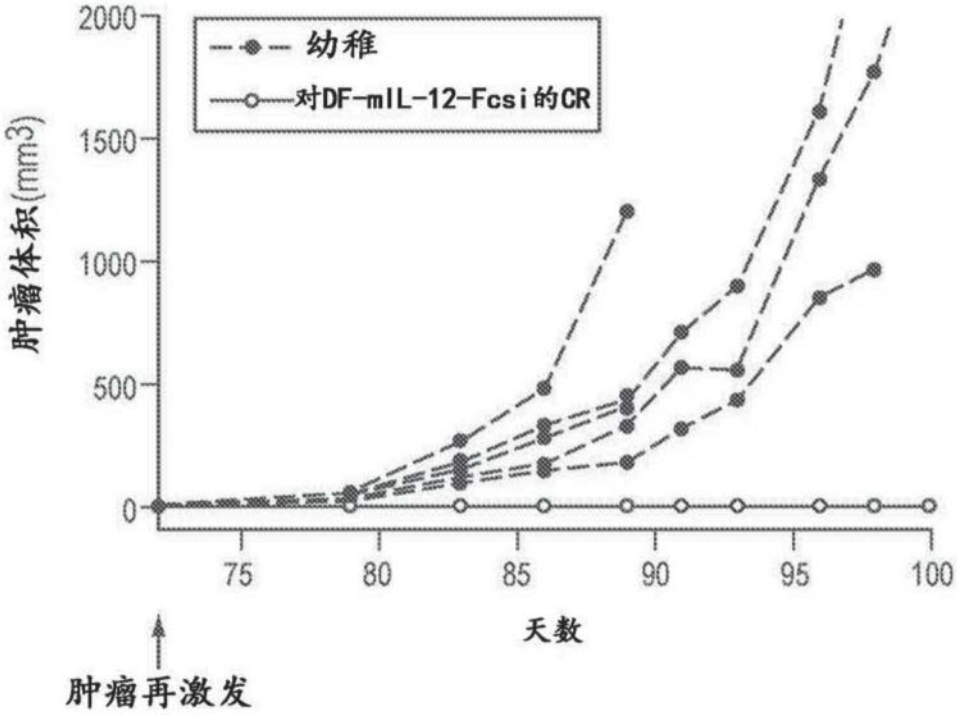

幼稚
对DF-mIL-12-Fcsi的CR
肿瘤体积(mm3)
2000
1500
1000
500
0
75
80
85
90
95
100
天数
肿瘤再激发

图21C

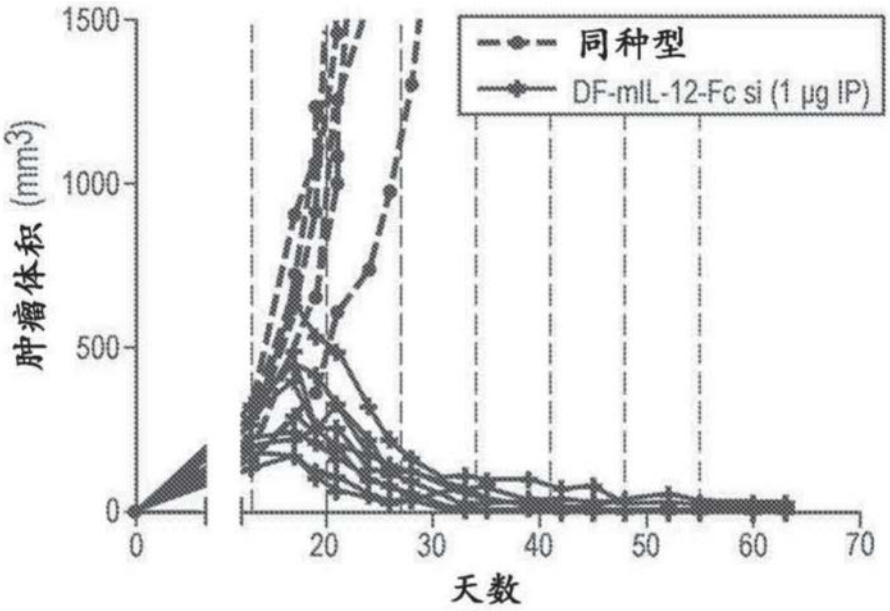

同种型
DF-mIL-12-Fc si (1 µg IP)
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
0
20
30
40
50
60
70
天数

图22A

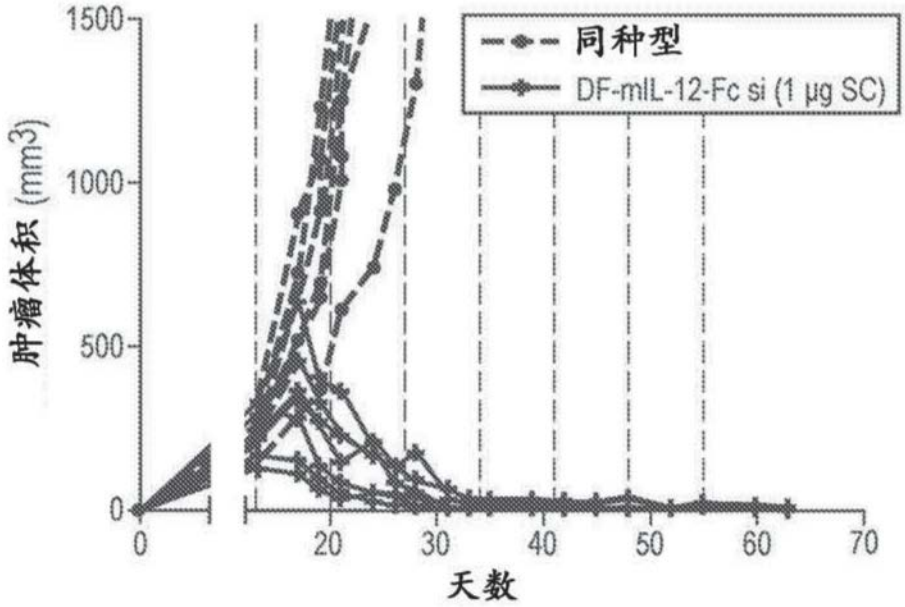

同种型
DF-mIL-12-Fc si (1 μg SC)
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
0
20
30
40
50
60
70
天数

图22B

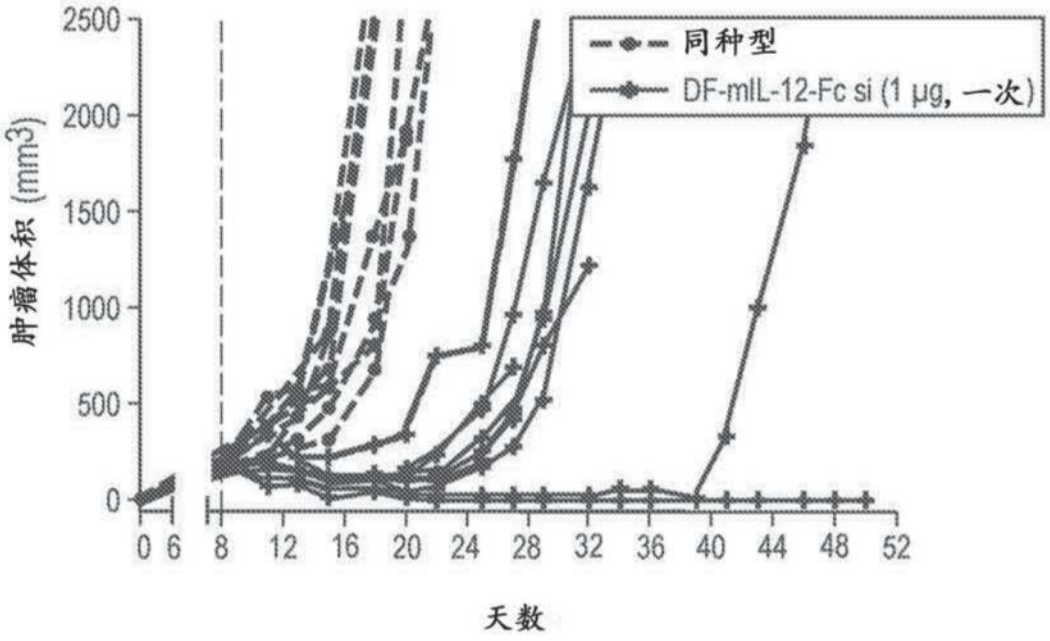

同种型
DF-mIL-12-Fc si (1 μg, 一次)
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 6 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52
天数

图23

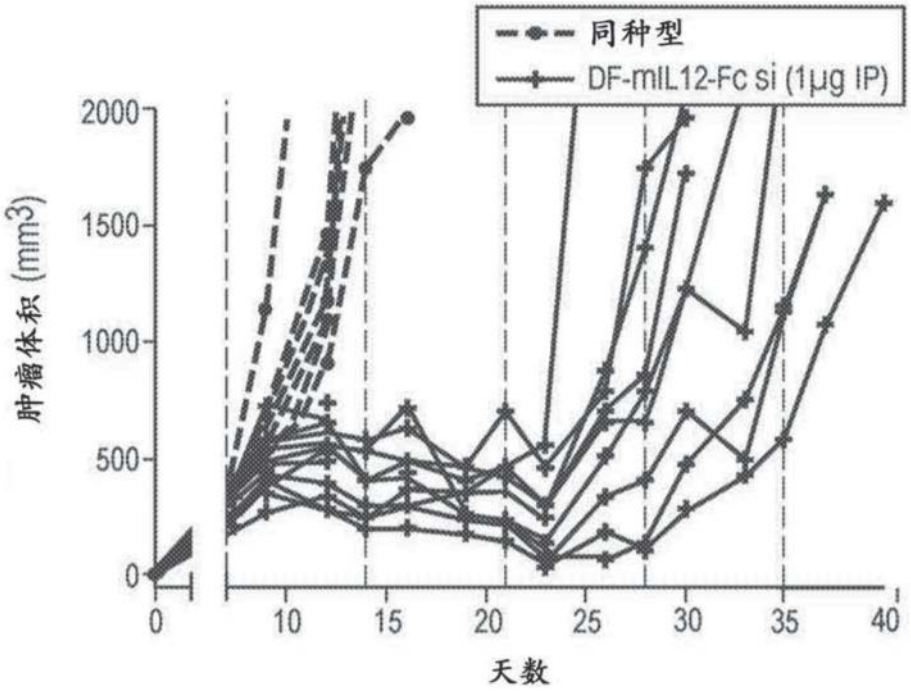

同种型
DF-mIL12-Fc si (1μg IP)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
15
20
25
30
35
40
天数

图24A

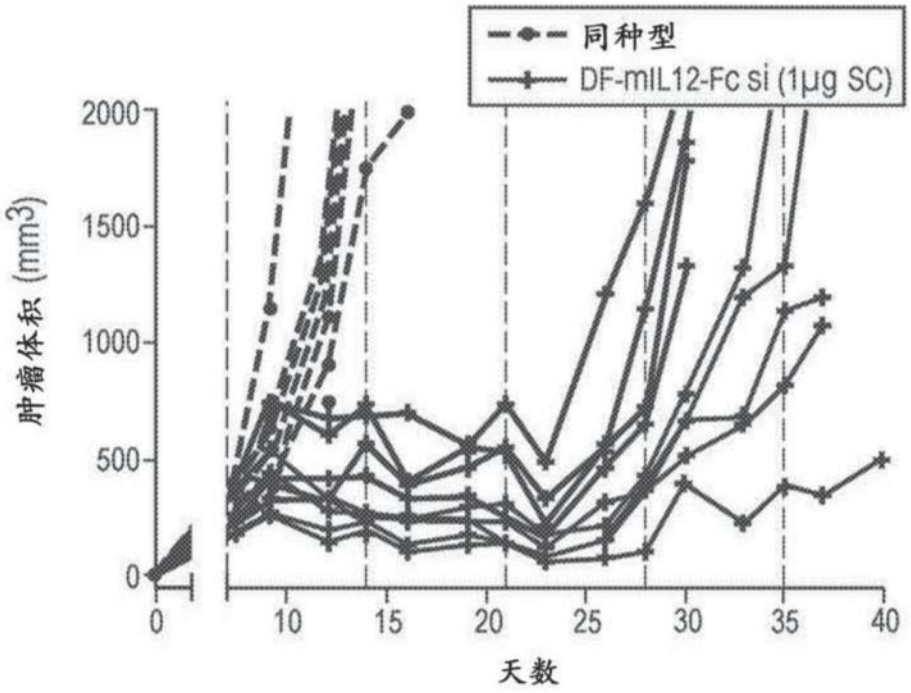

同种型
DF-mIL12-Fc si (1μg SC)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
15
20
25
30
35
40
天数

图24B

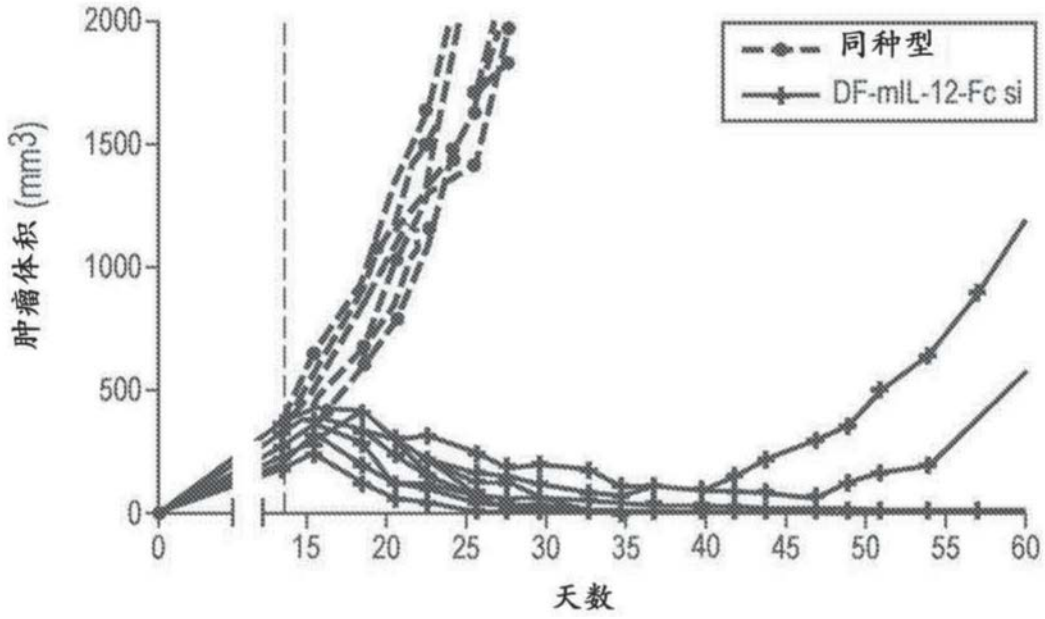

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
同种型
DF-mIL-12-Fc si
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数

图25A

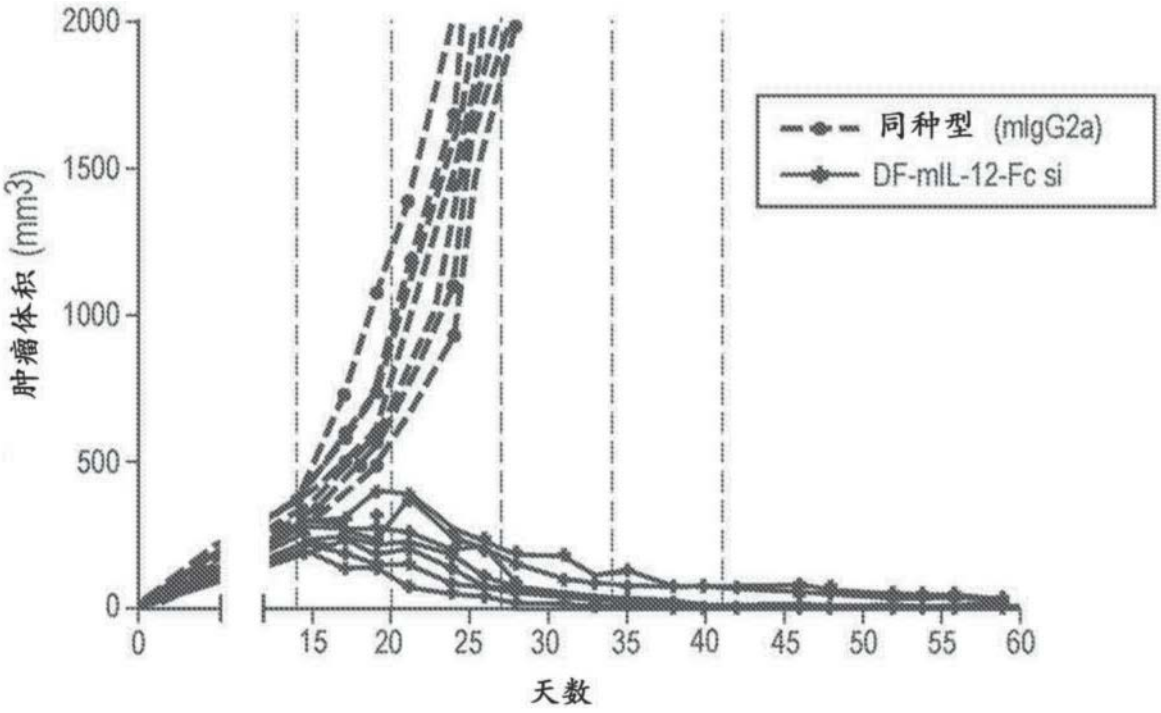

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
同种型 (mIgG2a)
DF-mIL-12-Fc si
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
天数

图25B

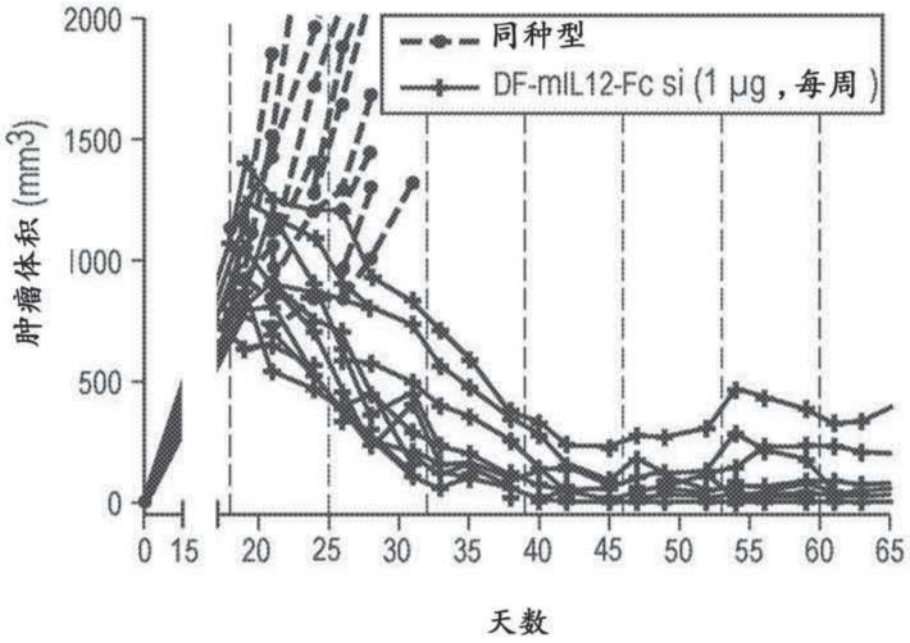

同种型
DF-mIL12-Fc si (1 μg，每周)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
天数

图26A

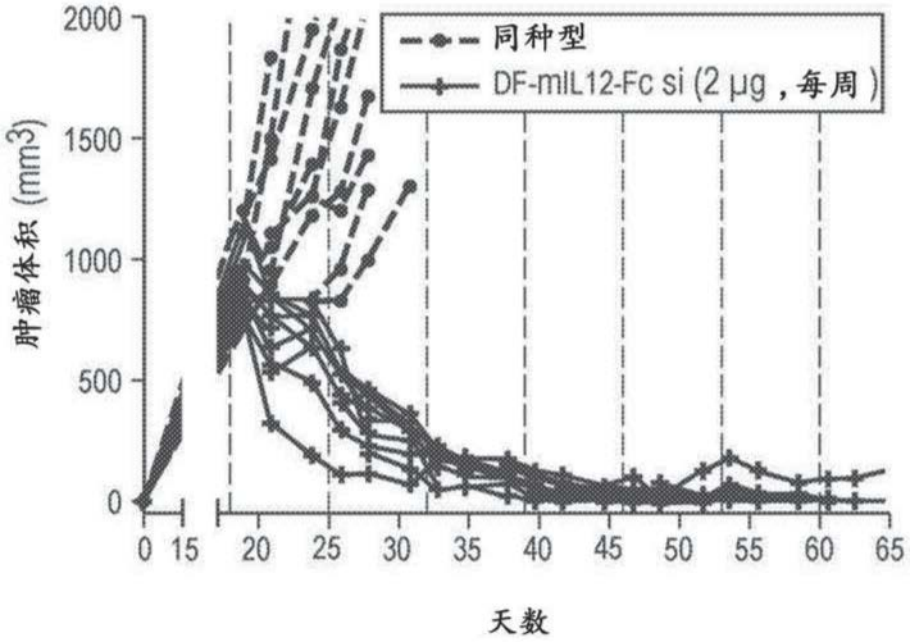

同种型
DF-mIL12-Fc si (2 μg，每周)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
天数

图26B

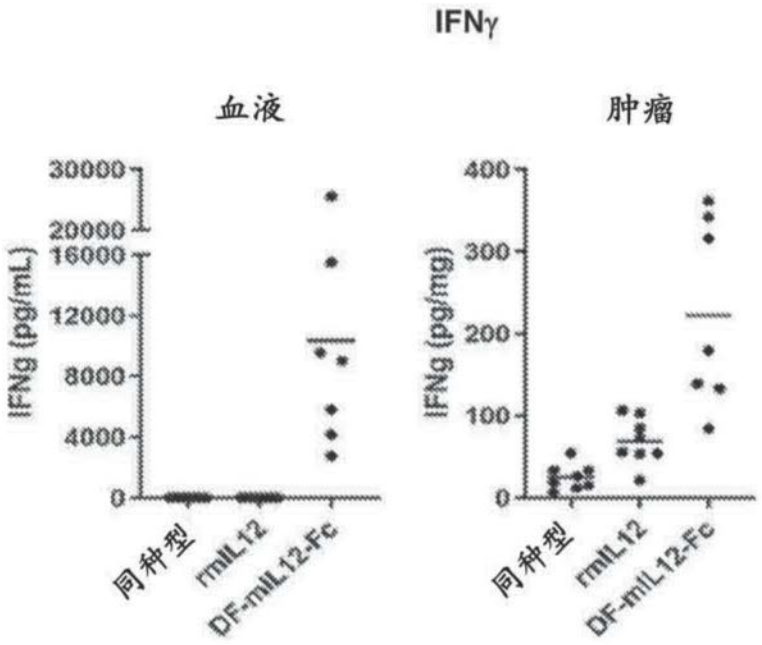

IFNγ
血液
肿瘤
IFNg (pg/mL)
IFNg (pg/mg)
30000
20000
16000
12000
8000
4000
0
400
300
200
100
同种型
rmIL12
DF-mIL12-Fc

图27A

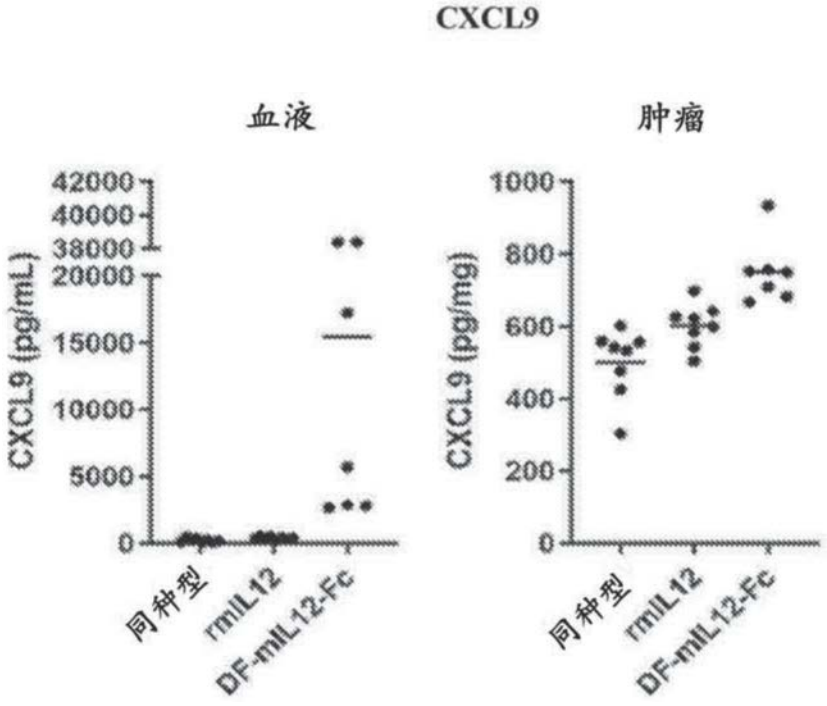

CXCL9
血液
肿瘤
CXCL9 (pg/mL)
CXCL9 (pg/mg)
42000
40000
38000
20000
15000
10000
5000
0
1000
800
600
400
200
同种型
rmIL12
DF-mIL12-Fc

图27B

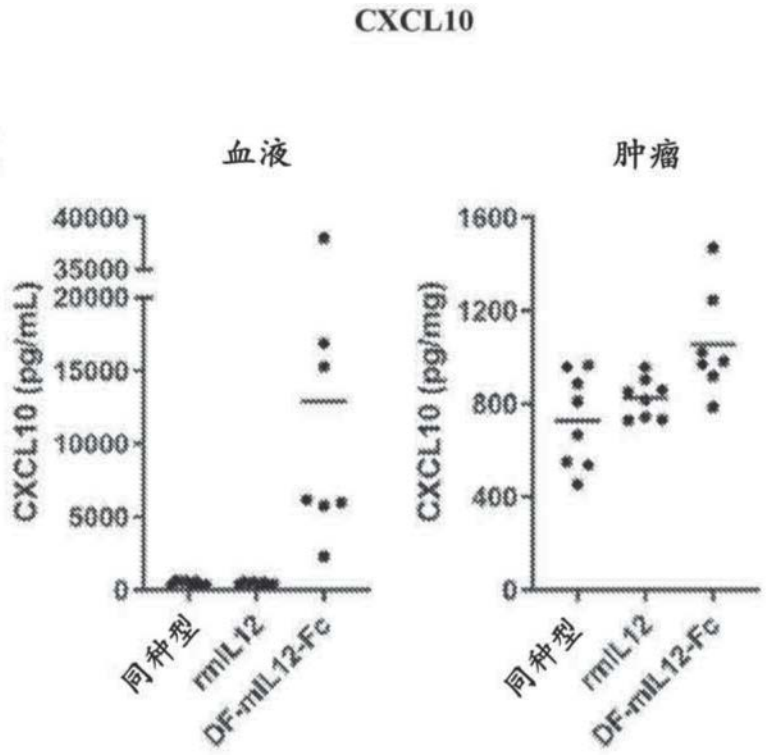

CXCL10
血液
肿瘤
CXCL10 (pg/mL)
CXCL10 (pg/mg)
40000
35000
20000
15000
10000
5000
0
1600
1200
800
400
同种型
rmIL12
DF-mIL12-Fc

图27C

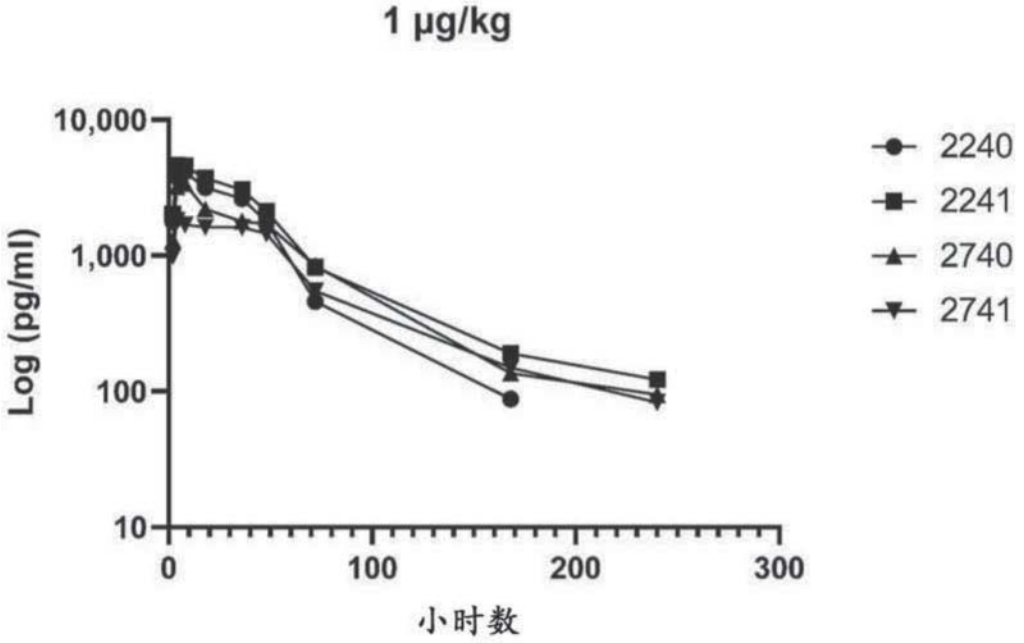

1 μg/kg
10,000
1,000
100
10
Log (pg/ml)
0
100
200
300
小时数
2240
2241
2740
2741

图28A

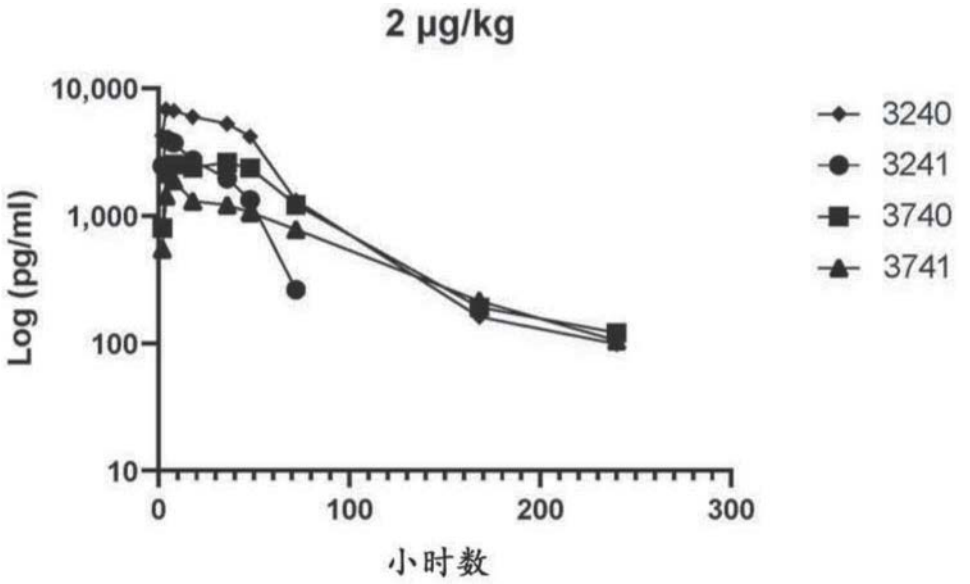

2 μg/kg
10,000
1,000
100
10
Log (pg/ml)
0
100
200
300
小时数
3240
3241
3740
3741

图28B

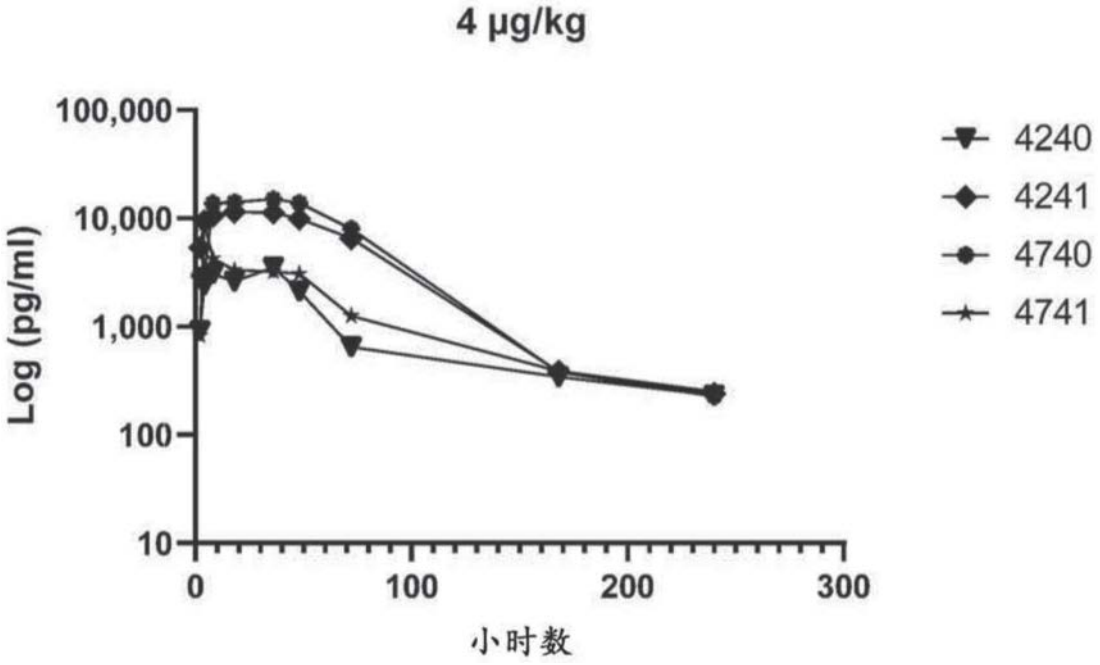

4 μg/kg
100,000
10,000
1,000
100
10
Log (pg/ml)
0
100
200
300
小时数
4240
4241
4740
4741

图28C

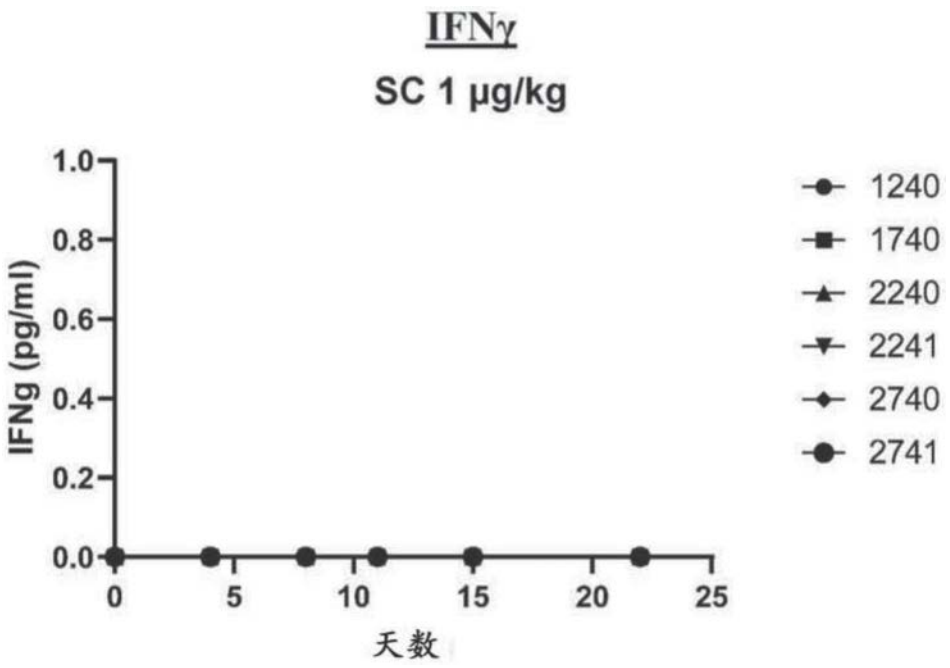

IFNγ
SC 1 μg/kg
IFNg (pg/ml)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
25
天数
1240
1740
2240
2241
2740
2741

图29A

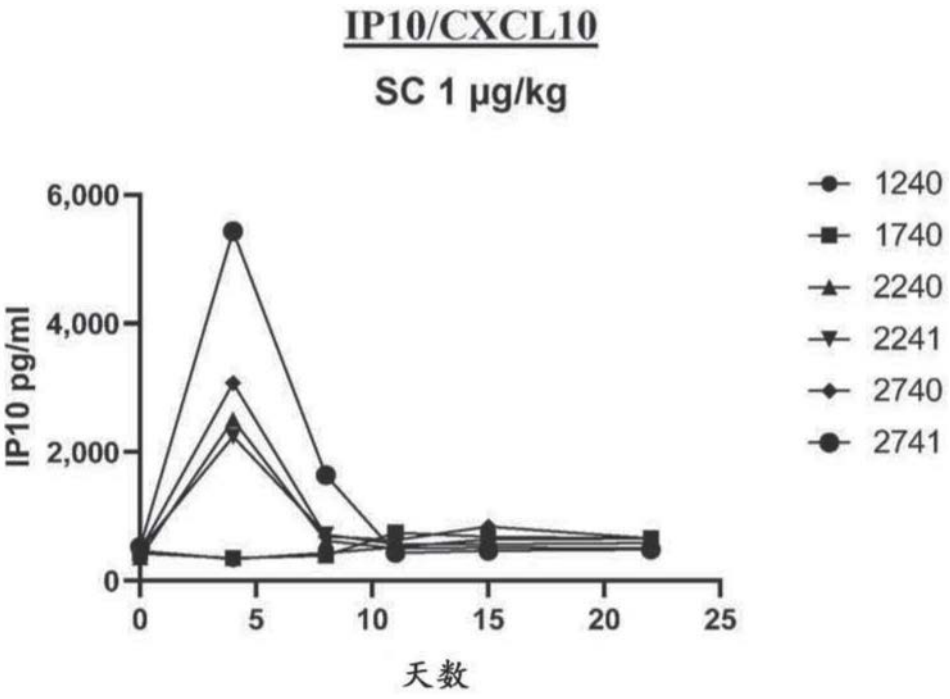

IP10/CXCL10
SC 1 μg/kg
IP10 pg/ml
6,000
4,000
2,000
0
0
5
10
15
20
25
天数
1240
1740
2240
2241
2740
2741

图29B

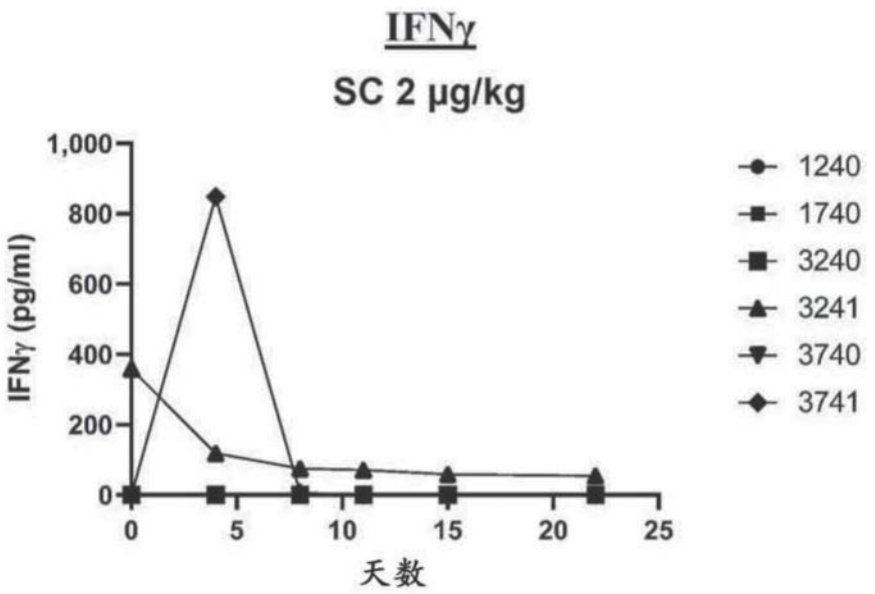

IFNγ
SC 2 μg/kg
IFNγ (pg/ml)
1,000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
天数
1240
1740
3240
3241
3740
3741

图29C

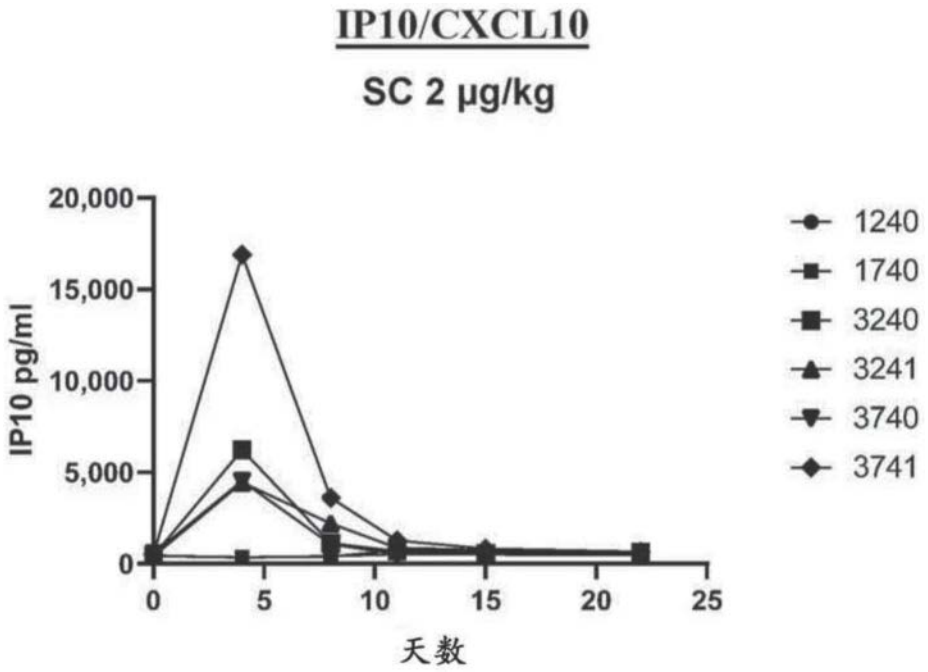

IP10/CXCL10
SC 2 μg/kg
IP10 pg/ml
20,000
15,000
10,000
5,000
0
0
5
10
15
20
25
天数
1240
1740
3240
3241
3740
3741

图29D

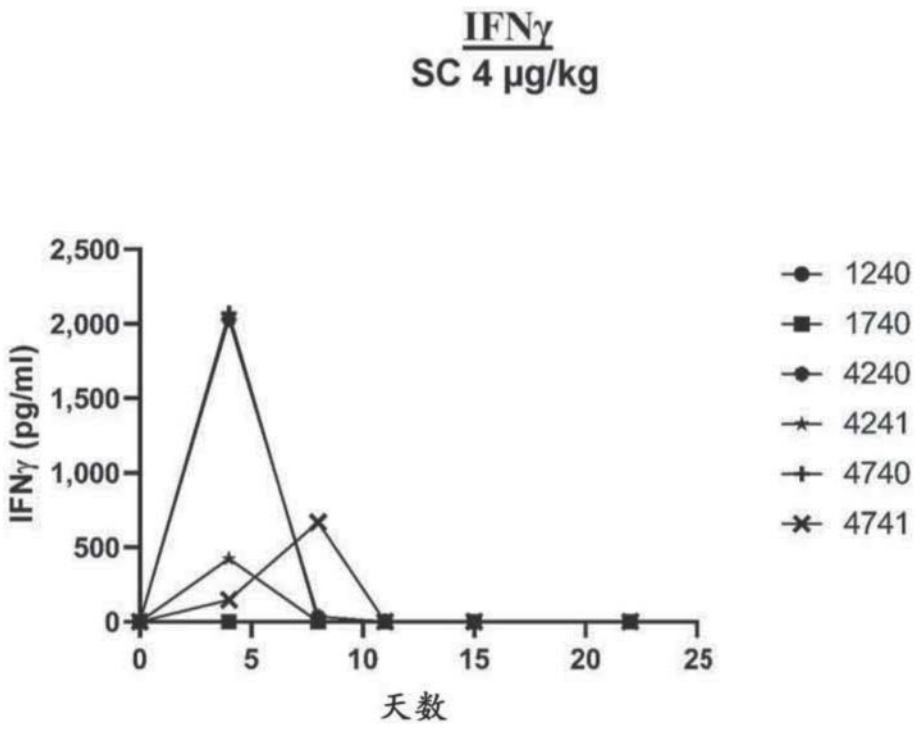

IFNγ
SC 4 μg/kg
IFNγ (pg/ml)
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
0
5
10
15
20
25
天数
1240
1740
4240
4241
4740
4741

图29E

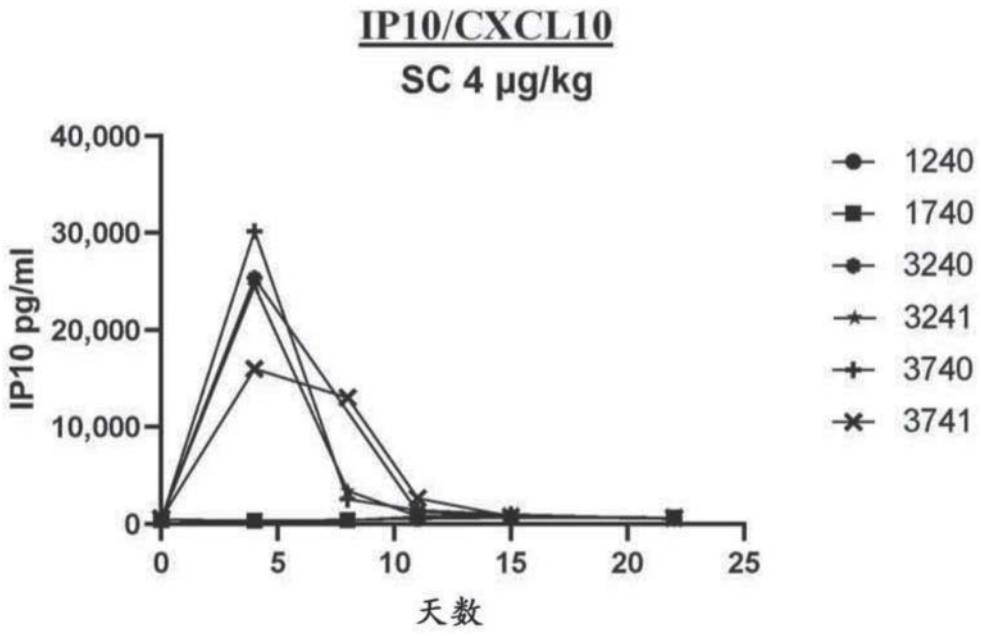

IP10/CXCL10
SC 4 μg/kg
IP10 pg/ml
40,000
30,000
20,000
10,000
0
0
5
10
15
20
25
天数
1240
1740
3240
3241
3740
3741

图29F

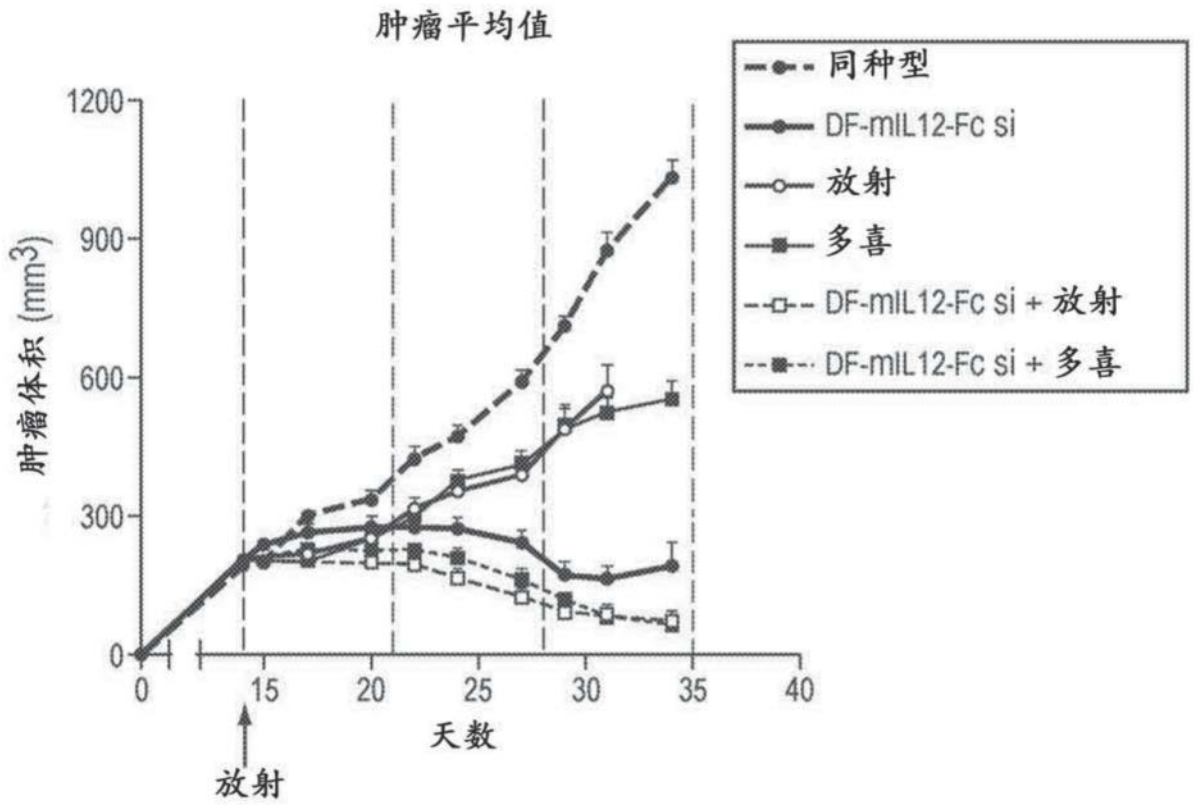

肿瘤平均值
肿瘤体积 (mm3)
1200
900
600
300
0
0
15
20
25
30
35
40
天数
放射
同种型
DF-mIL12-Fc si
放射
多喜
DF-mIL12-Fc si + 放射
DF-mIL12-Fc si + 多喜

图30

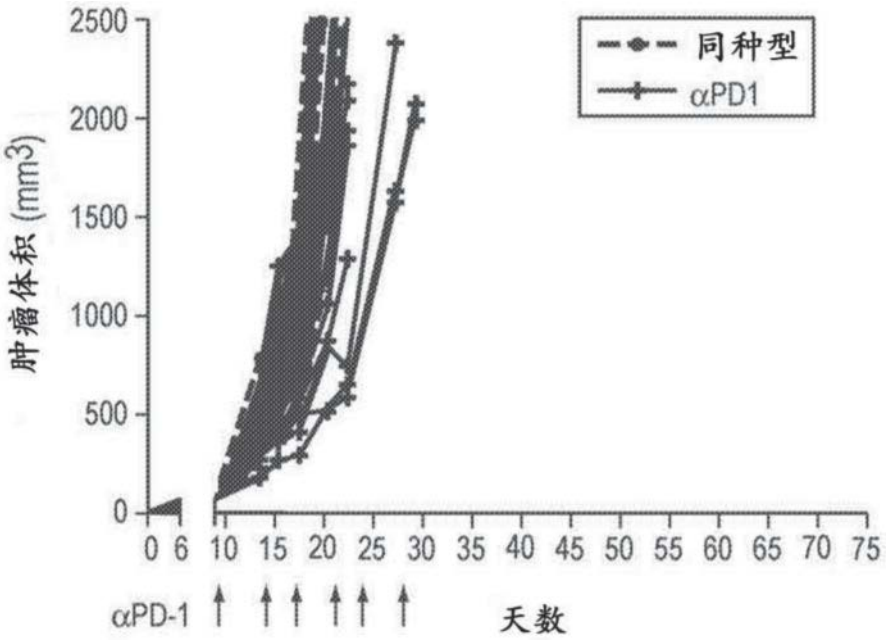

肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0 6 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
αPD-1
天数
同种型
αPD1

图31A

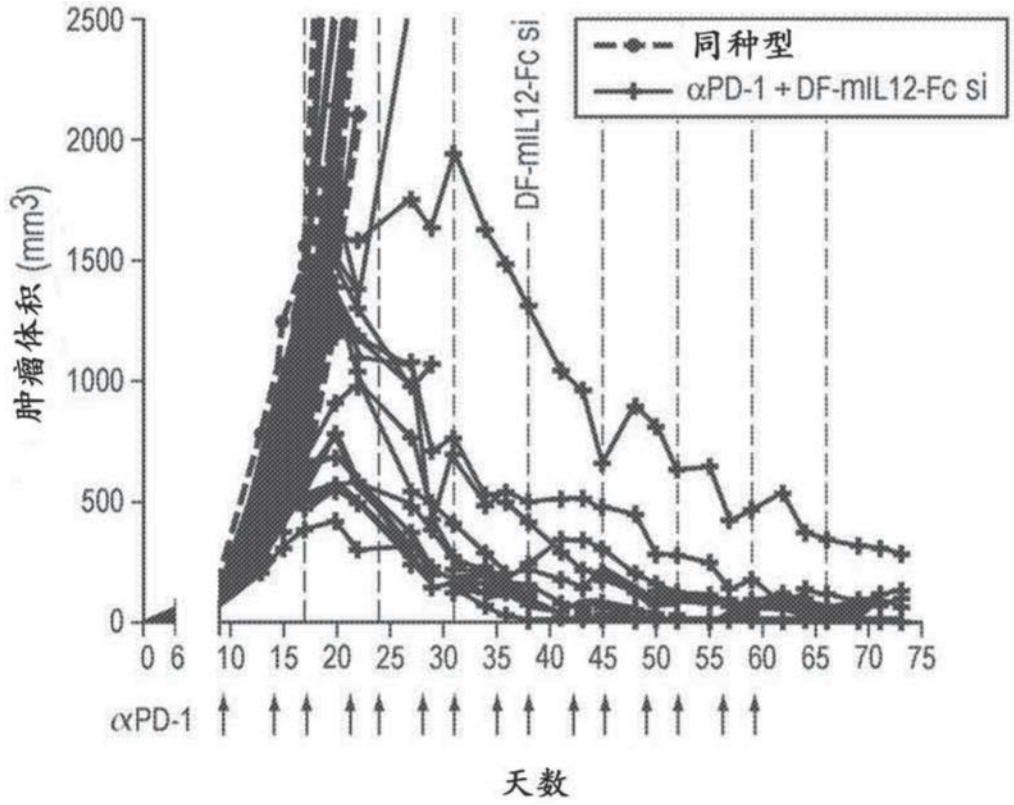

2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
同种型
αPD-1 + DF-mIL12-Fc si
DF-mIL12-Fc si
0 6 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
αPD-1
天数

图31B

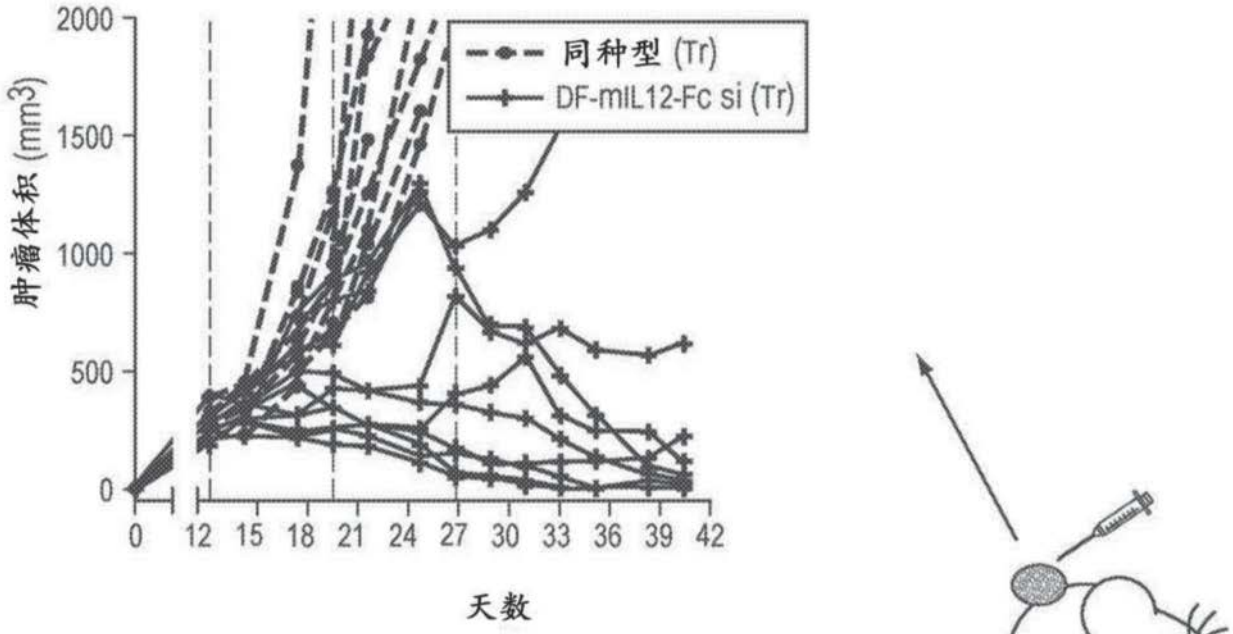

同种型 (Tr)
DF-mIL12-Fc si (Tr)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42
天数

图32A

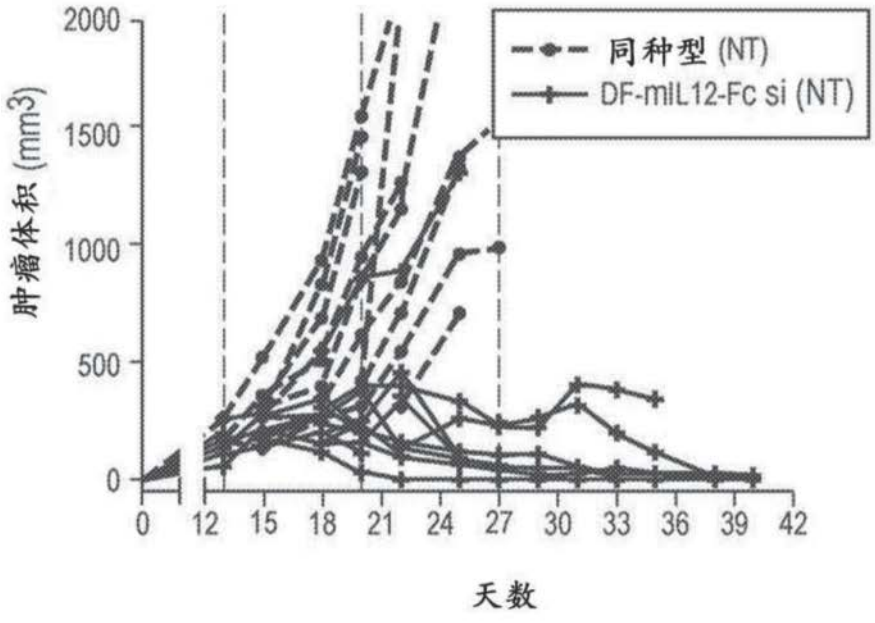

同种型 (NT)
DF-mIL12-Fc si (NT)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42
天数

图32B

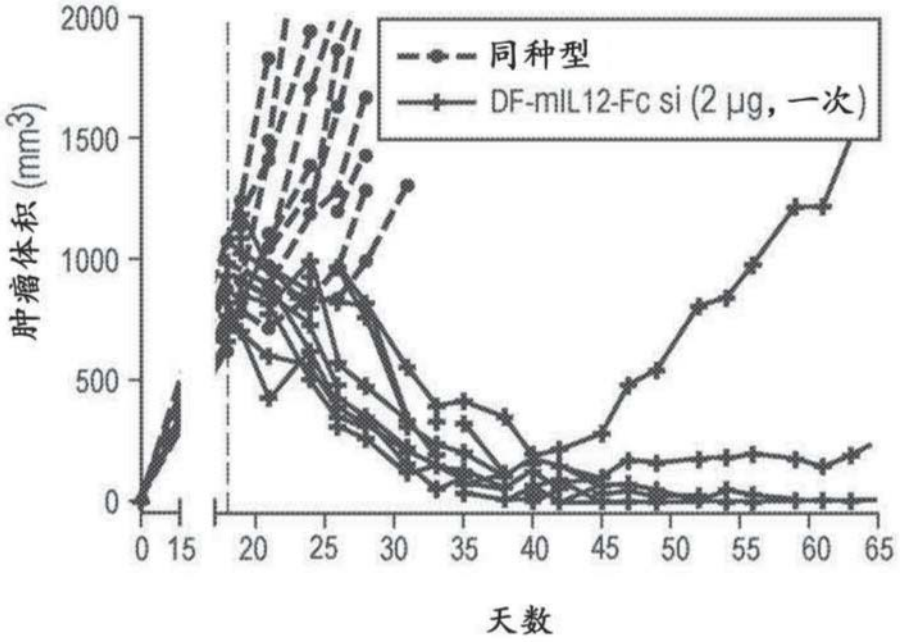

同种型
DF-mIL12-Fc si (2 μg, 一次)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
天数

图33A

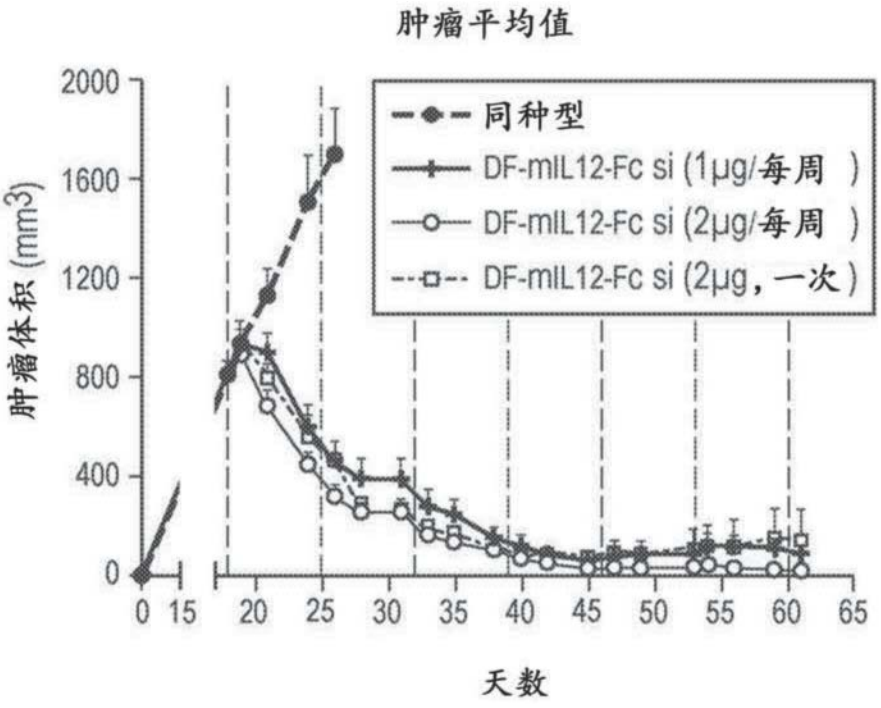

肿瘤平均值
同种型
DF-mIL12-Fc si (1μg/每周)
DF-mIL12-Fc si (2μg/每周)
DF-mIL12-Fc si (2μg, 一次)
肿瘤体积 (mm3)
2000
1600
1200
800
400
0
0 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
天数

图33B

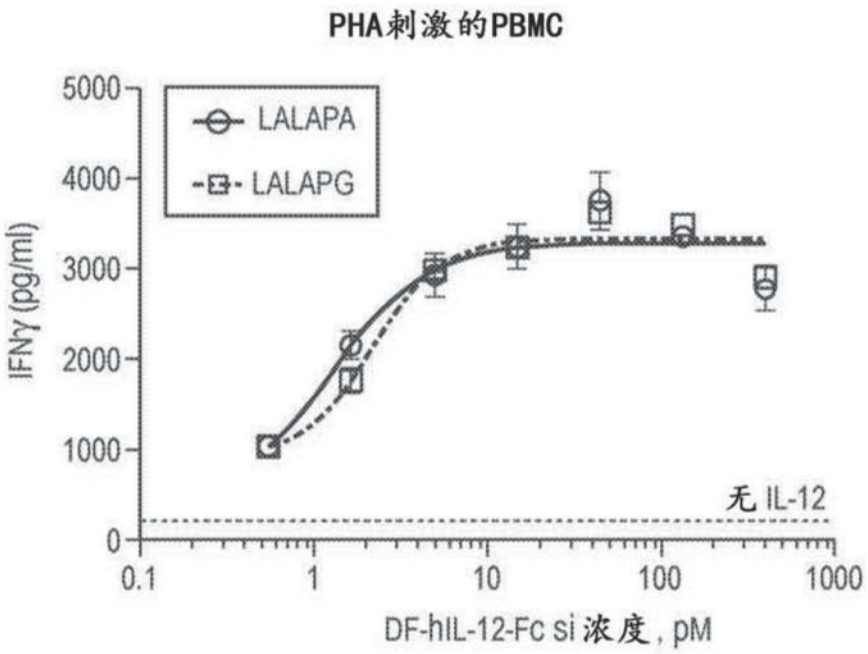

PHA刺激的PBMC
LALAPA
LALAPG
IFNγ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
无 IL-12
0.1
1
10
100
1000
DF-hIL-12-Fc si 浓度, pM

图34A

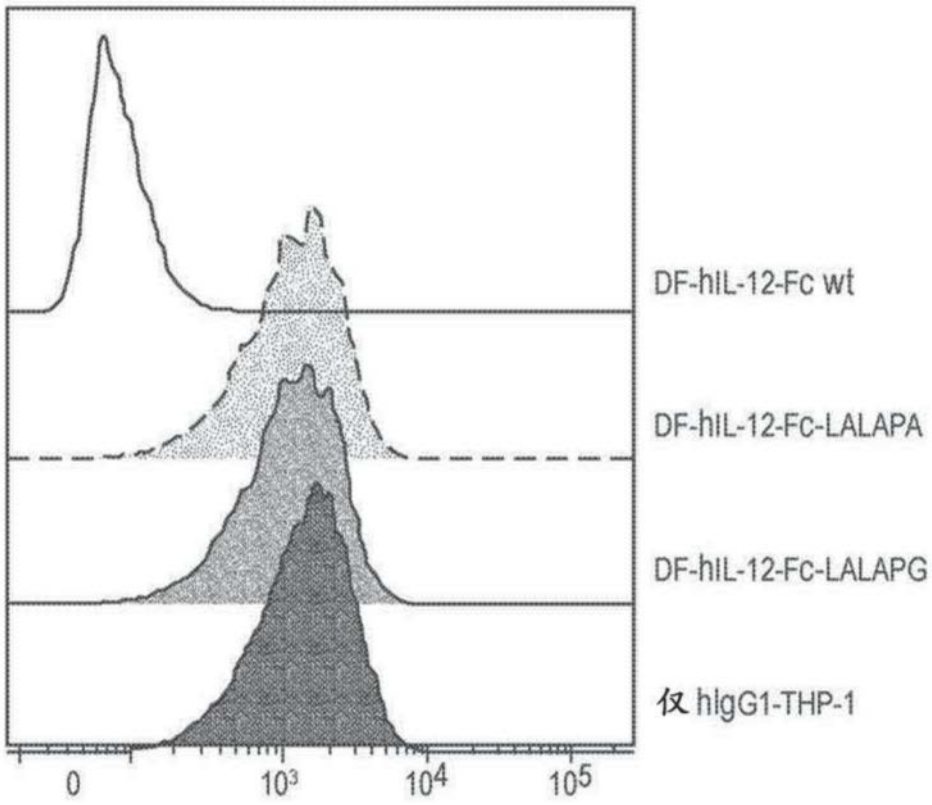

DF-hIL-12-Fc wt
DF-hIL-12-Fc-LALAPA
DF-hIL-12-Fc-LALAPG
仅 hIgG1-THP-1
0
10³
10⁴
10⁵

图34B