(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2024 年 3 月 7 日 (07.03.2024)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2024/046301 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/115448

(22) 国际申请日: 2023 年 8 月 29 日 (29.08.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202211041405.0 2022年8月29日 (29.08.2022) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司(**JIANGSU HENGRUI PHARMACEUTICALS CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。 上海盛迪医药有限公司(**SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD**) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人:高焓(**GAO, Han**); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。 王欢(**WANG, Huan**); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。 章崇祺(**ZHANG, Chongqi**); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。 林源(**LIN, Yuan**); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。 林侃(**LIN, Kan**); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。 廖成(**LIAO, Cheng**); 中国上海市浦东新区张江镇海科路1288号, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (**GE CHENG & CO., LTD.**); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼10层, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,

(54) **Title:** FUSION PROTEIN COMPRISING TACI POLYPEPTIDE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 包含TACI多肽的融合蛋白及其用途

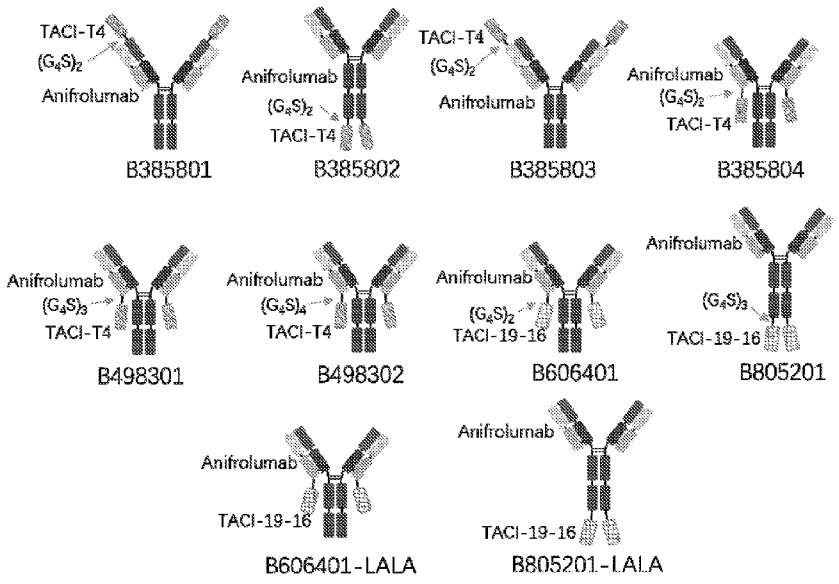


图 8

(57) **Abstract:** The present disclosure provides a fusion protein comprising a TACI polypeptide and a use thereof, particularly a use for preventing or treating autoimmune diseases.

(57) 摘要: 本公开提供包含TACI多肽的融合蛋白及其用途，特别是用于预防或治疗自身免疫疾病的用途。

WO 2024/046301 A1

[见续页]

IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

包含 TACI 多肽的融合蛋白及其用途

本公开要求如下专利申请的优先权：于 2022 年 08 月 29 日提交，申请号为 CN202211041405.0，发明名称为“包含 TACI 多肽的融合蛋白及其用途”的中国专利申请；上述专利申请的全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本公开涉及生物医药领域，具体而言，本公开涉及一种包含 TACI 多肽的融合蛋白及治疗疾病，特别是自身免疫疾病的用途。

背景技术

系统性红斑狼疮(Systemic Lupus Erythematosus，SLE)是一种危及多种人体组织和器官(如面部皮肤、肾脏等)的自身免疫性疾病，其明显的特征是患者会产生针对自身组织抗原的抗体(如抗核抗体 antinuclear antibody(ANA)等)。SLE 致病因素复杂，涉及基因遗传、环境、激素及自身抗体等诸多因素，病程长，临床症状因人而异，异质性高。此外，SLE 发病率高，仅在中国 SLE 患着总数就超过 100 万，全球患病率约为(30 至 50)/10 万人，其中女性患病率是男性 10 倍。

I 型干扰素通路的激活在 SLE 发病机理中起关键作用，能够促进浆细胞样树突状细胞(pDC)、B 细胞等与 SLE 发病紧密相关的多种类型免疫细胞活化，60%至 80%的 SLE 患者存在 I 型干扰素高表达的特征，而且 I 型干扰素水平与 SLE 患者疾病活动指数(SLEDAI)评分呈正相关。阿斯利康开发的 Anifrolumab 是一种靶向 I 型干扰素(IFN)受体亚基 1(IFNAR1)的单克隆抗体，拮抗所有 I 型干扰素(IFN-α、IFN-β和 IFN-ω 等)的相关活性，从而控制 SLE 疾病进展。在 TULIP-2 的 III 期临床试验中，接受 Anifrolumab 患者的狼疮综合评价指数(BICLA)出现改善的比例分别为 47.8%，而安慰剂治疗患者这一评价指标为 31.5%，提示患者所有累及器官的疾病活动程度都有所改善，且减少患者对糖皮质激素的用量。但在另一个以狼疮应答指数 SRI-4 作为考察终点的 III 期(TULIP-1)临床实验中，并没有看到疾病的评分的显著改善(36% vs 40%)。该结果体现了靶向 I 型干扰素通路治疗 SLE 的潜力，但仅靶向 IFNAR1 的疗效可能还不够。

B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator，BLyS，又叫 BAFF)和增殖诱导配体(A proliferation-inducing ligand，APRIL)均是 B 淋巴细胞分化成熟和促进浆细胞生存的关键因子，属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor，TNF)配体家族，这两个因子的过度表达是 SLE 等多种 B 淋巴细胞相关自身免疫疾病的重要驱动因素。TNF 配体家族成员通常被合成为跨膜蛋白，并且经常观察到膜锚定蛋白经蛋白酶水解后从细胞表面释放。BAFF 为 II 型跨膜蛋白，存在膜结合和可溶两种形式，膜结合 BAFF 经弗林蛋白酶转化酶(Furin convertase)酶切后，释放出三聚体形式的

BAFF 并具有生物学活性。BAFF 在各种细胞类型上均有表达，包括单核细胞，树突状细胞和骨髓基质细胞。APRIL 存在形式不同于 TNF 配体家族成员，其在高尔基体内被弗林蛋白酶转化酶加工后直接以可溶的三聚体形式分泌到细胞外。

现已发现 BAFF 和 APRIL 存在三个受体，即 B 细胞成熟抗原(B cell maturation antigen，BCMA)、穿膜蛋白活化物(transmembrane activitor and CAMEL interactor，TACI)和 BAFF 受体(BAFF receptor，BAFF-R，又叫 Br3)，他们均属于 TNF 受体家族成员，TNF 受体的胞外区含有多个半胱氨酸丰富区(cysteine-rich domain，CRD)，每个 CRD 有 6 个半胱氨酸形成 3 对二硫键，CRD 区域发挥和配体结合的功能。BAFF 和 APRIL 对这三个受体具有不同的结合能力，BAFF 对 TACI 的结合强于对 BCMA，APRIL 对 BCMA 的结合强于对 TACI，而 BAFF-R 是 BAFF 的独有高亲和力受体，不与 APRIL 结合。

TACI 为 III 型跨膜蛋白，人 TACI 是 293 个氨基酸的多肽，包含位于蛋白 N 端区域(氨基酸残基 1-165)，跨膜区域(氨基酸残基 166-186)和细胞内区域(氨基酸残基 187-293)。胞外区含有两个 CRD(CRD1、CRD2)，CRD1 对 BAFF 和 APRIL 的亲和力比 CRD2 弱。研究发现仅在人 TACI 中，会跳过外显子 2 产生缺少 CRD1 结构域的短形式的 TACI。这种短的 TACI 与长形式的一样可以有效结合 BAFF 和 APRIL。由于 TACI 与 BAFF 和 APRIL 具有较高的亲和力，使用胞外区 TACI 可溶部分，融合 IgG 的 Fc 片段，可以阻断 BAFF 和 APRIL 与细胞膜表面的 TACI、BCMA 和 BAFFR 受体结合，抑制 BAFF 和 APRIL 的生物学活性，从而治疗自身免疫疾病。阿塞西普(Atacicept)是 ZymoGenetics 公司研发的一款 BAFF/APRIL Trap，分子形式为天然的 TACI 胞外区融合 IgG1-Fc 片段(FcγR 结合活性缺失)，即 TACI-Fc。泰它西普(Telitacicept，RCT-18)则是荣昌生物开发的 TACI-Fc。泰它西普和阿塞西普均能同时靶向 BAFF 和 APRIL 两个细胞因子，相对于只抑制 BAFF 的 Belimumab，同时抑制 BAFF/APRIL 的 TACI-Fc 能更有效地降低机体免疫反应，达到治疗 SLE 的目的。II 期临床研究表明泰它西普高剂量组治疗组 48 周狼疮应答指数(SRI-4)显著高于安慰剂对照组(79.2% vs 32.0%)，到达主要终点，提示对于 APRIL 的抑制可能对于治疗红斑狼疮十分重要。

BCMA 为 III 型跨膜蛋白，人 BCMA 蛋白是 184 个氨基酸的多肽，包含位于蛋白 N 端区域(氨基酸残基 1-50)，跨膜区域(氨基酸残基 51-93)和细胞内区域(氨基酸残基 94-184)。BCMA 的胞外区含有一个 CRD，其对 APRIL 的结合强于 TACI。BCMA 能够促进浆细胞的存活，对自身免疫性疾病产生负面影响。BCMA 还参与体液免疫的发展(如产生抗体)以及免疫相关疾病。尚未有 BCMA 胞外区或其融合蛋白进入临床。

在 SLE 的常规治疗中，主要包括抗疟药、糖皮质激素和免疫抑制剂。几大类激素治疗是基础用药，临床医师据 SLE 患者的疾病活动度来调整激素用量，在此基础上加免疫抑制剂、生物药或其他治疗。与类风湿性关节炎、银屑病关节炎和

强直性脊柱炎相比，用于 SLE 的新疗法，尤其是生物药物的批准非常少。传统激素作为广泛使用的基础治疗用药，选择性差，长期服用存在副作用，贝利尤单抗(Belimumab)是近 50 年在我国唯一已经获批的靶向治疗新药。因此急需开发新的安全有效的靶向药物来满足 SLE 巨大的临床需求。

由于 BAFF/APRIL 的过量表达与自身免疫性疾病密切相关，以其为靶分子设法阻断其活性，可以减少疾病的发生，减轻发病的症状，从而达到缓解和治疗自身免疫疾病的目的。封闭 BAFF/APRIL 信号的相关受体可以特异地作用于靶细胞，有望成为治疗自身免疫疾病的新的生物制剂。因此，本领域迫切需要开发新的、可有效抑制或封闭 BAFF/APRIL 途径的化合物，本公开提供了含有 TACI 多肽的融合蛋白，有潜力成为临床上安全、有效治疗自身免疫疾病(例如 SLE)的药物。

发明内容

本公开提供了含有 TACI 多肽的新结构的融合蛋白、其编码核酸、载体、宿主细胞、药物组合物、其用于治疗或改善疾病(例如，B 细胞障碍或自身免疫性疾病)的方法，及其制药用途。

融合蛋白

本公开提供一种融合蛋白，所述融合蛋白选自如下结构：

(1)包含 TACI 多肽；

(2)包含 BCMA 多肽；

(3)包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽；

(4)包含 TACI 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)；

(5)包含 BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)；

(6)包含 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)。

关于融合蛋白中的 TACI 多肽：

一些实施方案中，所述 TACI 多肽包含 TACI 胞外区的 CRD1 和/或 CRD2，例如，包含 TACI 胞外区的 CRD2。

一些实施方案中，所述 TACI 多肽包含选自如下(1)-(6)任一项的多肽：

(1)SEQ ID NO：1 的第 68-105 位氨基酸残基或其变体

(2)SEQ ID NO：1 或与之具有至少 90%序列同一性的多肽；

(3)SEQ ID NO：1 的第 33-67 位氨基酸残基；

(4)SEQ ID NO：1 的第 70-104 位氨基酸残基或其变体；

(5)SEQ ID NO：1 的第 30-110、69-111、69-112、13-118、或 33-104 位氨基酸残基或其变体；

(6)SEQ ID NO：1 的第 68-106、68-107 或 68-108 位氨基酸残基或其变体。

一些具体实施方案中，所述变体具有选自第 69、72、73、77、85、102 和 103 位中的一个或多个氨基酸突变。

一些具体实施方案中，所述变体具有选自 69T 或 69R、72S、73E 或 73Q、77E、85T 或 85A、102A 或 102R、103Y 中的一个或多个氨基酸替换。

一些具体实施方案中，所述变体具有选自如下任一的氨基酸替换或替换组合：69T；72S；73E；73Q；77E；69R/85T；69R/85A；102A；69R/85T/102R；73E/77E；72S/73E/77E；69T/102A；69T/103Y；69T/102A、103Y；69T/73E/77E/102A。

一些具体实施方案中，本公开以“突变 1/突变 2”表示突变 1 和突变 2 共同存在于突变后的变体中。例如“69T/102A”表示突变体中包含 69T 和 102A 的氨基酸突变，“69T/73E/77E/102A”表示突变体中包含 69T、73E、77E 和 102A 的氨基酸突变。

一些具体实施方案中，所述变体具有 69T/73E/77E/102A 的氨基酸替换组合，例如，具有 L69T/K73E/K77E/Y102A 的氨基酸替换组合。

所述氨基酸突变的位点是相对于 TACI 胞外区(SEQ ID NO：1)的自然顺序编号的氨基酸残基位点，例如，“所述变体具有选自第 69 位的氨基酸突变”是指在对应于 SEQ ID NO：1 的第 69 位的氨基酸残基具有突变。

一些实施方案中，TACI 多肽的氨基酸序列包含选自 SEQ ID NO：1、2、6-29 任一所示的氨基酸序列。

本公开中，“至少 90%(序列)同一性”涵盖至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%(序列)同一性；“至少 80%(序列)同一性”涵盖至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或 100%(序列)同一性。

关于融合蛋白中的 BCMA 多肽：

一些实施方案中，所述 BCMA 多肽包含 BCMA 胞外区的 CRD1。

一些实施方案中，所述 BCMA 多肽包含 SEQ ID NO：30 的第 7-41 位氨基酸残基。

一些实施方案中，所述 BCMA 多肽包含 SEQ ID NO：30、67、68 任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

关于融合蛋白中的抗体：

一些实施方案中，所述融合蛋白中的抗体为抗 IFNAR1 抗体或其抗原结合片段。

一些实施方案中，所述抗 IFNAR1 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，其中，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：45-47 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：48-50 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

一些实施方案中，所述抗 IFNAR1 抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO：43 所示或与之具有至少 90%序列同一性，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID

NO：44 所示或与之具有至少 90%序列同一性。

一些实施方案中，所述抗 IFNAR1 抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 80%序列同一性，轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%序列同一性。

一些实施方案中，所述抗 IFNAR1 抗体的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：61 所示或与之具有至少 80%序列同一性，轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%序列同一性。

一些实施方案中，本公开引入 Anifrolumab、sifalimumab，以及全文引入 WO20062002177A 、 WO2009100309A(例 如 3F11 、 4G5 、 11E2 、 9D4) 、 WO2020156474A(例如，7G4、10C5 等)、WO2020057541A(例如 8G11H 和 485G10H)、CN201610634601.7(例 如 H19B7+L16C11 、 H19B7+L8C3 、 H15D10+L16C11 、 H15D10+L8C3 或抗 IFNAR1-C1)、CN201510685200.X、WO2012162367A 中抗 IFNAR1 抗体或其抗原结合片段作为本公开的抗 IFNAR1 抗体。

关于融合蛋白：

如前所述，本公开提供包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、包含 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体(或其抗原结合片段)的融合蛋白、包含 TACI 多肽、BCMA 多肽、抗 IFNAR1 抗体(或其抗原结合片段)的融合蛋白。

一些实施方案中，所述融合蛋白还含有免疫球蛋白的重链恒定区(Fc 区)。一些具体实施方案中，所述 Fc 区包含能够缔合的两个亚基。一些实施方案中，所述两个亚基是相同或不同的第一亚基和第二亚基。一些实施方案中，所述 Fc 区为 IgG、IgA、IgM、IgD 的 Fc 区；一些实施方案中，所述 Fc 区为人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 的 Fc 区，例如人 IgG1 的 Fc 区，又例如为 SEQ ID NO：3 所示的 Fc 区。

一些实施方案中，所述融合蛋白中的所述 Fc 区相比野生型 Fc 区包含一个或多个氨基酸取代，所述的氨基酸取代能够减少其与 Fc 受体(FcR)的结合；一些实施方案中，所述的氨基酸取代能够减少其与 Fcγ 受体(FcγR)的结合；一些实施方案中，所述 Fc 区具有 YTE 突变(M252Y、S254T 和 T256E)、S228P、L234F、L235E、L234F/L235E、L234A/L235A 或 L234F/L235E/P331S 突变，所述突变位点编号依据为 EU 索引。

一些实施方案中，所述融合蛋白中的所述 Fc 区包含能够彼此缔合的第一亚基与第二亚基，所述第一亚基和第二亚基具有一个或多个减少同源二聚化的氨基酸取代。一些实施方案中，所述第一亚基具有根据杵臼技术的凸起结构，所述第二亚基具有根据杵臼技术的孔结构，或者所述第一亚基具有根据杵臼技术的孔结构，所述第二亚基具有根据杵臼技术的凸起结构。一些实施方案中，所述第一亚基的氨基酸残基取代包括选自 354、356、358 和 366 的位点中的一个或多个氨基酸取代，所述第二亚基的氨基酸残基包括选自 349、356、358、366、368 和 407 的位点中的一个或多个氨基酸取代。一些实施方案中，所述第一亚基包括选自 354C、

356E、358M 和 366W 中的一个或多个氨基酸取代，所述第二亚基包括选自 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 中的一个或多个氨基酸取代。一些实施方案中，所述第一亚基包括 354C、356E、358M 和 366W 的氨基酸取代，所述第二亚基包括 349C、356E、358M、366S、368A 和 407V 的氨基酸取代。

第一方面，关于包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白：

一些实施方案中，所述 TACI 多肽为前述本公开提供的任一 TACI 多肽，所述 BCMA 多肽为前述本公开提供的任一 BCMA 多肽。

一些实施方案中，所述融合蛋白中的包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6 个)所述 TACI 多肽，和一个或多个(例如 2、3、4、5、6 个)所述 BCMA 多肽。一些实施方案中，所述融合蛋白中包含 1 个所述 TACI 多肽和 1 个所述 BCMA 多肽，或 2 个所述 TACI 多肽和 2 个所述 BCMA 多肽, 或 3 个所述 TACI 多肽和 3 个所述 BCMA 多肽，或 4 个所述 TACI 多肽和 4 个所述 BCMA 多肽，或 2 个所述 TACI 多肽和 1 个所述 BCMA 多肽，或 1 个所述 TACI 多肽和 2 个所述 BCMA 多肽，或 3 个所述 TACI 多肽和 1 个所述 BCMA 多肽，或 1 个所述 TACI 多肽和 3 个所述 BCMA 多肽；当包含 2 个及以上所述 TACI 多肽时，所述 TACI 多肽可以是所述本公开提供的序列相同的或不同的 TACI 多肽；当包含 2 个及以上所述 BCMA 多肽时，所述 BCMA 多肽可以是所述本公开提供的序列相同的或不同的 BCMA 多肽。

一些实施方案中，所述融合蛋白中，所述 TACI 多肽和 Fc 区的一个亚基是以任意顺序连接的，可选地，所述 TACI 多肽与 Fc 区的第一亚基或第二亚基通过连接子或直接连接。一些实施方案中，如前任一的融合蛋白，所述 BCMA 多肽和 Fc 区的一个亚基是以任意的顺序连接的，可选地，所述 BCMA 多肽与 Fc 区的第一亚基或第二亚基通过连接子或直接连接。一些实施方案中，所述 TACI 多肽的 C 端与 Fc 区的第一亚基或第二亚基的 N 端通过连接子或直接连接；或者所述 TACI 多肽的 N 端与 Fc 区的第一亚基或第二亚基的 C 端通过连接子或直接连接。一些实施方案中，所述 BCMA 多肽的 C 端与 Fc 区的第一亚基或第二亚基的 N 端通过连接子或直接连接；或者所述 BCMA 多肽的 N 端与 Fc 区的第一亚基或第二亚基的 C 端通过连接子或直接连接。

一些实施方案中，所述含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白，其包含如下(I)-(VIII)任一所示的多肽链：

(I)[TACI 多肽]-[连接子 1]a-[BCMA 多肽]-[连接子 2]b-[Fc 区]e；

(II)[BCMA 多肽] -[连接子 1]a-[TACI 多肽]-[连接子 2]b-[Fc 区]e；

(III)[Fc 区]e-[连接子 3]c-[TACI 多肽]-[连接子 4]d-[BCMA 多肽]；

(IV)[Fc 区]e-[连接子 3]c-[BCMA 多肽]-[连接子 4]d-[TACI 多肽]；

(V)[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[BCMA 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子 3]c-[TACI 多肽 2]-[连接子 4]d-[BCMA 多肽 2]；

(VI)[BCMA 多肽 1]-[连接子 1]a-[TACI 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子

3]c-[BCMA 多肽 2]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

(VII)[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[BCMA 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子 3]c-[BCMA 多肽 2]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

(VIII)[BCMA 多肽 1]-[连接子 1]a-[TACI 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子 3]c-[TACI 多肽 2]-[连接子 4]d-[BCMA 多肽 2]；

其中，-表示肽键，连接子为能够实现连接功能的多肽，连接子 1、连接子 2、连接子 3 和连接子 4 可以相同，也可以不同；TACI 多肽 1 和 TACI 多肽 2 选自本公开提供的 TACI 多肽，可以相同，也可以不同；BCMA 多肽 1 和 BCMA 多肽 2 选自本公开提供的 BCMA 多肽，可以相同，也可以不同；a、b、c、d、e 分别独立地为 0 或 1，例如，方案(I)或(II)中，a 和 b 均为 1，或 a 为 1、b 为 0，或 a 为 0、b 为 1，以及，e 为 0 或 1；例如，方案(III)或(IV)中，c 和 d 均为 1，或 c 为 1、d 为 0，或 c 为 0、d 为 1，以及，e 为 0 或 1；例如，方案(V)、(VI)、(VII)或(VIII)中，a、b、c、d 均为 1，或 a、b、c 均为 1 且 d 为 0，或 a、b 为 1 且 c、d 为 0，或 a 为 1 且 b、c、d 均为 0，或 a 为 0 且 b、c、d 均为 1，或 a、b 为 0 且 c、d 为 1，或 a、b、c 为 0 且 d 为 1，或 a、c 为 1 且 b、d 为 0，或 a、c 为 0 且 b、d 为 1，以及，e 为 0 或 1。

一些实施方案中，所述连接子为如$(G_mS_n)_h$ 或$(GGNGT)_h$(SEQ ID NO：75)或$(YGNGT)_h$(SEQ ID NO：76)或$(EPKSS)_h$(SEQ ID NO：77)所示的氨基酸序列，其中 m、n 各自独立地选自 1-8 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8)，h 独立地选自 1-20 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)。在一些具体实施方案中，所述连接子为$(GxS)_y$ 连接子，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 1-6 的整数，例如为 SEQ ID NO：39-41 任一所示的连接子。例如，所述连接子具有如$(G_4S)_y$(SEQ ID NO：78)所示的氨基酸序列，y 独立地选自 1-6 的整数(例如，y 为 1、2、3、4、5、6)。

一些实施方案中，提供包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白，其含有 SEQ ID NO：31-38、69、70 任一所示或与之具有至少 90%序列同一性的多肽。

一些实施方案中，所述融合蛋白为多聚体，例如为二聚体(例如为同二聚体或异二聚体)。

一些实施方案中，提供含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白，所述 TACI 多肽可以是变体，所述变体有 1 至 10 个(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变；一些实施方案中，提供含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白，所述 BCMA 多肽可以是变体，所述变体有 1 至 10 个(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变；所述氨基酸突变可以是保守的替换、取代或修饰，和/或不影响功能的缺失、添加。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，所述蛋白或分子与所述含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、所述 TACI 多肽、或所述 BCMA 多肽竞争结合 BAFF 和

/或 APRIL，或阻断所述含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、所述 TACI 多肽、或所述 BCMA 多肽结合 BAFF 和/或 APRIL。

第二方面，关于包含 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白：

一些实施方案中，所述 TACI 多肽为前述本公开提供的任一 TACI 多肽，所述抗 IFNAR1 抗体为前述本公开提供的任一抗 IFNAR1 抗体。

一些实施方案中，所述包含 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白中包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6 个)TACI 多肽。一些实施方案中，所述包含 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白中的包含一个或多个(例如 2、3、4 个)抗 IFNAR1 抗体。

一些实施方案中，所述含有 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白，其包含如下(I)-(VIII)任一所示的多肽链：

(I)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(II)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(III)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(IV)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽]；

(V)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

(VI)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽 1]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 2]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(VII)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽 2]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(VIII)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 1]-[连接子 3]c-[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

其中，-表示肽键，连接子为能够实现连接功能的多肽，连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4 可以相同，也可以不同；TACI 多肽 1 和 TACI 多肽 2 选自本公开前述任一 TACI 多肽，TACI 多肽 1 和 TACI 多肽 2 可以相同也可以不同，a、b、c、d 分别独立地为 0 或 1。方案(I)中，a 为 1 或 0。方案(II)中，b 为 1 或 0。方案(III)中，c 为 1 或 0。方案(IV)中，d 为 1 或 0。方案(V)中，a、d 可以同时为 0 或为 1，或 a 为 0、d 为 1，或 a 为 1、d 为 0；方案(VI)中，b、c 可以同时为 0 或为 1，或 b 为 0、c 为 1，或 b 为 1、c 为 0；方案(VII)中，a、b 可以同时为 0 或为

1，或 a 为 0、b 为 1，或 a 为 1、b 为 0；方案(VIII)中，c、d 可以同时为 0 或为 1，或 c 为 0、d 为 1，或 c 为 1、d 为 0。

一些实施方案中，所述连接子为如$(G_mS_n)_h$ 或$(GGNGT)_h$ 或$(YGNGT)_h$ 或$(EPKSS)_h$所示的氨基酸序列，其中 m、n 各自独立地选自 1-8 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8)，h 独立地选自 1-20 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)。在一些具体实施方案中，所述连接子为$(GxS)_y$连接子，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 1-6 的整数，例如为 SEQ ID NO：39-41 任一所示的连接子。例如，所述连接子具有如$(G_4S)_y$所示的氨基酸序列，y 独立地选自 1-6 的整数(例如，y 为 1、2、3、4、5、6)。

一些实施方案中，提供包含 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白，其包含如 SEQ ID NO：51-53、62 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第一多肽链，和如 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第二多肽链；

包含如 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第一多肽链，和如 SEQ ID NO：56-60 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第二多肽链；或

包含如 SEQ ID NO：61 所示的或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第一多肽链，和如 SEQ ID NO：56-60 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第二多肽链。

一些实施方案中，前述融合蛋白包含两条相同的第一多肽链，和两条相同的第二多肽链。

一些实施方案中，本公开提供含有 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白，所述 TACI 多肽可以是变体，所述变体有 1 至 10 个(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变；所述氨基酸突变可以是保守的替换、取代或修饰，和/或不影响功能的缺失、添加。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，所述蛋白或分子与前述含有 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白竞争结合 BAFF 和/或 APRIL，或阻断其结合 BAFF 和/或 APRIL。

第三方面，关于包含 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白：

一些实施方案中，所述 TACI 多肽为前述本公开提供的任一 TACI 多肽，所述 BCMA 多肽为前述本公开提供的任一 BCMA 多肽，所述抗 IFNAR1 抗体为前述本公开提供的任一抗 IFNAR1 抗体。

一些实施方案中，所述包含 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的抗体融合蛋白中的包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6 个)TACI 多肽。一些实施方案中，所述包含 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的抗体融合蛋白中的包含一个或多个(例如 2、3、4、5、6 个)BCMA 多肽。一些实施方案中，所述包含

TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的抗体融合蛋白中的包含一个或多个(例如 2、3、4 个)抗 IFNAR1 抗体。一些实施方案中，前述包含 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的抗体融合蛋白中包含 1 个前述 TACI 多肽和 1 个前述 BCMA 多肽，或 2 个前述 TACI 多肽和 2 个前述 BCMA 多肽, 或 3 个前述 TACI 多肽和 3 个前述 BCMA 多肽，或 4 个前述 TACI 多肽和 4 个前述 BCMA 多肽，或 2 个前述 TACI 多肽和 1 个前述 BCMA 多肽，或 1 个前述 TACI 多肽和 2 个前述 BCMA 多肽，或 3 个前述 TACI 多肽和 1 个前述 BCMA 多肽，或 1 个前述 TACI 多肽和 3 个前述 BCMA 多肽，和一个抗 IFNAR1 抗体；当包含 2 个及以上前述 TACI 多肽时，所述 TACI 多肽可以是本公开提供的序列相同或不同的 TACI 多肽；当包含 2 个及以上前述 BCMA 多肽时，所述 BCMA 多肽可以是本公开提供的序列相同或不同的 BCMA 多肽。

一些实施方案中，如前任一项含有 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白，其包含如下(I)-(VIII)任一所示的多肽链：

(I)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(II)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域],和第二多肽链，其为抗体轻链；

(III)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(IV)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]；

(V)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]；

(VI)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(VII)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]-[连接子 1]a-[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(VIII)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]-[连接子 3]c-[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]；

其中，[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]”、[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]”、[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]”从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽]-[连接子 5]e-[BCMA 多肽]，或为：[BCMA 多肽]-[连接子 5]e-[TACI 多肽]，“TACI 多

肽和 BCMA 多肽结构域 1”和“TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2”中的 TACI 可以相同也可以不同，BCMA 可以相同也可以不同；

其中，-表示肽键，连接子为能够实现连接功能的多肽，连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5 可以相同，也可以不同；a、b、c、d、e 分别独立地为 0 或 1。a、b、c、d 分别独立地为 0 或 1。方案(I)中，a 为 1 或 0。方案(II)中，b 为 1 或 0。方案(III)中，c 为 1 或 0。方案(IV)中，d 为 1 或 0。方案(V)中，a、d 可以同时为 0 或为 1，或 a 为 0、d 为 1，或 a 为 1、d 为 0；方案(VI)中，b、c 可以同时为 0 或为 1，或 b 为 0、c 为 1，或 b 为 1、c 为 0；方案(VII)中，a、b 可以同时为 0 或为 1，或 a 为 0、b 为 1，或 a 为 1、b 为 0；方案(VIII)中，c、d 可以同时为 0 或为 1，或 c 为 0、d 为 1，或 c 为 1、d 为 0；以上方案中，e 可以独立地为 0 或 1。

一些实施方案中，连接子为如$(G_mS_n)_h$或$(GGNGT)_h$或$(YGNGT)_h$或$(EPKSS)_h$所示的氨基酸序列，其中 m、n 各自独立地选自 1-8 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7 或 8)，h 独立地选自 1-20 的整数(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)。在一些具体实施方案中，所述连接子为$(GxS)_y$连接子，其中，x 选自 1-5 的整数，y 选自 1-6 的整数，例如为 SEQ ID NO：39-41 任一所示的连接子。例如，所述连接子具有如$(G_4S)_y$所示的氨基酸序列，y 独立地选自 1-6 的整数(例如，y 为 1、2、3、4、5、6)。

一些实施方案中，提供包含 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白，其包含如 SEQ ID NO：55 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第一多肽链，和如 SEQ ID NO：63-66、71、72 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第二多肽链；

包含如 SEQ ID NO：61 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第一多肽链，和如 SEQ ID NO：63-66、71、72 任一所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第二多肽链；或

包含如 SEQ ID NO：73 或 74 所示的或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第一多肽链，和如 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 80%、至少 90%序列同一性的第二多肽链。

一些实施方案中，前述融合蛋白包含两条相同的第一多肽链，和两条相同的第二多肽链。

一些实施方案中，本公开提供含有 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白，所述 TACI 多肽可以是变体，所述变体有 1 至 10 个(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个)氨基酸突变；所述氨基酸突变可以是保守的替换、取代或修饰，和/或不影响功能的缺失、添加。

一些实施方案中，提供蛋白或分子，所述蛋白或分子与前述含有 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白竞争结合 BAFF 和/或 APRIL，或阻断其

结合 BAFF 和/或 APRIL。

关于前述第一方面至第三方面的融合蛋白：

一些实施方案中，所述含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽，含有 TACI 多肽和 IFNAR1 抗体的融合蛋白，含有 TACI 多肽、BCMA 多肽和 IFNAR1 抗体的融合蛋白具有以下一种或多种性质或功能：

(a)结合于 BAFF 的活性；

(b)结合于 APRIL 的活性；

(c)降低血清免疫球蛋白(例如 IgE 或 IgM)的浓度；

(d)降低脾脏重量；

(e)抑制或封闭 BAFF/APRIL 途径；

(f)减少 B 细胞数量。

一些实施方案中，所述本公开提供的包含 TACI 多肽的蛋白(例如 TACI-Fc)具有以下一个或多个功能活性：

a．不容易发生 TACI 多肽的断裂片段；在一些实施方案中，所述断裂可通过质谱分析检测，例如实施例 2 中的 TACI 断裂分析方法；

b．阻断 BAFF 与 BAFF-R 结合；在一些实施方案中，TACI-Fc 阻断 BAFF 与 BAFF-R 结合的 IC_{50} 值小于 23 nM、小于 10nM、小于 6nM、小于 5nM、小于 4nM、小于 3nM、小于 2nM、小于 1nM 或更小；所述 IC_{50} 值通过 ELISA 方法检测；在一些实施方案中，所述 IC_{50} 值测试方法见实施例 1；

c．与 BAFF 结合的能力；在一些实施方案中，所述 TACI-Fc 结合 BAFF 的 EC_{50} 值小于 5nM、1 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1nM 或更小，所述 EC_{50} 值通过 ELISA 方法检测，例如实施例 2 的 ELISA 结合实验(包被抗原蛋白)；

d．抑制 BAFF 诱导 B 细胞增殖；在一些实施方案中，TACI-Fc 抑制 BAFF 诱导 B 细胞增殖的 IC_{50} 值小于 0.3nM、小于 0.2nM、小于 0.1nM、0.06nM、小于 0.05nM、小于 0.01 nM 或更小。所述 IC_{50} 值通过 ELISA 方法检测，例如实施例 17 中的 ELISA 实验；

e．抑制 APRIL 诱导 B 细胞增殖；在一些实施方案中，TACI-Fc 抑制 APRIL 诱导 B 细胞增殖的 IC_{50} 值小于 3 nM、小于 2nM、小于 1 nM、小于 0.5nM、小于 0.4nM、小于 0.3nM、0.2nM、小于 0.1nM、小于 0.05 或更小；所述 IC_{50} 值通过 ELISA 方法检测；

f．高亲和力与人 BAFF 和/或人 APRIL 结合；在一些实施方案中，所述亲和力通过 Biacore 方法检测；在一些实施方案中，所述 TACI-Fc 融合蛋白与人 BAFF 结合的 KD 值小于 1E-10 M、小于 9E-11 M、8E-11 M 或更小；在一些实施方案中，所述 TACI-Fc 融合蛋白与人 APRIL 结合的 KD 值小于 2.3E-11 M、小于 2.0E-11 M、1.9E-11 M、1.3E-11 M 或更小；

g．良好的体内药代动力；在一些实施方案中，TACI-Fc 大鼠体内半衰期大于 4

天；和/或

h．良好的稳定性；在一些实施方案中，所述 TACI-Fc 在 40°C恒温条件下存放四周，TACI-Fc 融合蛋白纯度依然能保持在 94%以上(SEC%)；在一些实施方案中，所述 TACI-Fc 的 pI 值小于 9、小于 8、小于 7、小于 6 或更小，所述 pI 值通过“18cProt/TrEMBL”系统分析测定。

一些实施方案中，前述本公开提供的含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白具有以下一个或多个功能活性：

a．不容易发生 TACI 多肽的断裂片段；在一些实施方案中，所述断裂可通过质谱分析检测，例如实施例 2 中的 TACI 断裂分析方法；

b．与 BAFF 结合的能力；在一些实施方案中，所述述融合蛋白结合 BAFF 的 EC_{50} 值小于 1 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1nM 或更小，所述 EC_{50} 值通过 ELISA 方法检测，例如实施例 5 的 ELISA 实验；

c.与APRIL结合的能力;在一些实施方案中,所述融合蛋白结合APRIL的 EC_{50} 值小于 1 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1nM 或更小，所述 EC_{50} 值通过 ELISA 方法检测，例如实施例 5 的 ELISA 实验；

d.良好的体内药代动力；

e.良好的稳定性。

一些实施方案中,前述本公开提供的包含 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的抗体融合蛋白具有以下一个或多个功能活性：

a．不容易发生 TACI 多肽的断裂片段；在一些实施方案中，所述断裂可通过质谱分析检测，例如实施例 2 中的 TACI 断裂分析方法；

b. 对 I 型干扰素的活性抑制；在一些实施方案中，所述融合蛋白具有与抗 IFNAR1 抗体(例如 Anifrolumab)一致或相近似的对 IFN 的活性的抑制率，所述抑制率在体外通过对 IFN-α/β 报告基因的方法检测，例如实施例 10 中的实验；所述抑制率在体内通过检测 PBMC 中 IFN-α 下游基因 ISG 的 mRNA 表达，例如实施例 21 中的实验；

c. 与 BAFF 结合的能力;在一些实施方案中,所述融合蛋白结合 BAFF 的 EC_{50} 值小于 1.5nM、1nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2nM、0.1nM 或更小，所述 EC_{50} 值通过 ELISA 方法检测，例如实施例 11 的 ELISA 实验；

d．与 APRIL 结合的能力；在一些实施方案中，所述融合蛋白结合 APRIL 的 EC_{50} 值小于 0.5 nM、0.4nM、0.3 nM、0.2nM、0.1nM 或更小，所述 EC_{50} 值通过 ELISA 方法检测，例如实施例 11 的 ELISA 实验；

e. 抑制 IFN-α 分泌;一些实施方案中,所述融合蛋白具有与抗 IFNAR1 抗体(例如 Anifrolumab)一致或相近似的对浆细胞样树突状细胞(pDC)的 IFN-α 细胞因子分泌的抑制能力，所述抑制能力检测使用例如实施例 15 中的检测方法；一些实施方案中，所述融合蛋白具有与抗 IFNAR1 抗体(例如 Anifrolumab)一致或相近似的抑

制 IFN-α 诱导的 B 细胞向浆细胞的体外分化的能力，所述抑制能力检测使用例如实施例 16 中的检测方法；

f. 抑制浆细胞的分化，抑制 BAFF 诱导的 B 细胞增殖；一些实施方案中，所述融合蛋白抑制 BAFF 诱导的 B 细胞增殖的抑制率为至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%，所述抑制率是加入抗体融合蛋白后的 B 细胞数与加入同等浓度的 IgG1 的 B 细胞数的比值，是通过 FACS 检测，例如实施例 17 中的方法；

g.抑制 APRIL 诱导的 B 细胞增殖；一些实施方案中，所述融合蛋白抑制 APRIL 诱导的 B 细胞增殖的抑制率为至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%、至少 10%，所述抑制率是加入抗体融合蛋白后的 B 细胞数与加入同等浓度的 IgG1 的 B 细胞数的比值，所述抑制率是通过 FACS 检测，例如实施例 18 中的方法；

h. 抑制 BAFF 和 APRIL 诱导的浆细胞生成；一些实施方案中，所述融合蛋白抑制 BAFF 和 APRIL 诱导的浆细胞生成，抑制率为至少 90%、至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%、至少 20%，所述抑制率是加入抗体融合蛋白后的 B 细胞数与加入同等浓度的 IgG1 的 B 细胞数的比值，所述抑制是通过 FACS 检测，例如实施例 19 中的方法；

i. 抑制体内 IgA 的生成；一些实施方案中，所述融合蛋白抑制体内 IgA 的生成的抑制率为至少 80%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 40%、至少 30%，所述抑制率是与同等浓度的 PBS 相比，所述抑制是通过 ELISA 检测，例如实施例 22 中的方法；

j.良好的体内药代动力；

k.良好的稳定性。

此外，一些实施方案中，提供一种产品或组合，其包含前述本公开任一的含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白，还包含抗体。一些实施方案中，提供一种产品或组合，其包含前述本公开任一的含有 TACI 多肽，还包含抗体。一些实施方案中，所述抗体为抗 IFNAR1 抗体，例如为 Anifrolumab。

一些实施方案中，提供一种复合物，其含有前述本公开任一的 TACI 多肽和前述本公开任一的 BCMA 多肽。可选地，所述 TACI 多肽和 BCMA 多肽可以是直接或通过前述本公开任一的连接子可操作地相连接的，也可以是不相连接的。

一些实施方案中，提供一种复合物，其含有前述本公开任一的 TACI 多肽和前述本公开任一的 BCMA 多肽；或含有前述本公开任一的 TACI 多肽和前述本公开任一的抗 IFNAR1 抗体；或含有前述本公开任一的 BCMA 多肽和前述本公开任一的抗 IFNAR1 抗体；或含有前述本公开任一的 TACI 多肽和前述本公开任一的抗 IFNAR1 抗体和前述本公开任一的 BCMA 多肽。可选地，所述 TACI 多肽、BCMA 多肽、抗 IFNAR1 抗体可以是直接或通过前述本公开任一的连接子可操作地相连接的，也可以是不相连接的。

多核苷酸和载体

本公开提供(经分离的)多核苷酸，其编码前述本公开任一的TACI多肽、BCMA多肽、包含TACI多肽和BCMA多肽的融合蛋白、包含TACI多肽和抗体(例如，抗IFNAR1抗体)的融合蛋白、包含TACI多肽和BCMA多肽和抗体(例如，抗IFNAR1抗体)的融合蛋白、产品、组合或复合物。所述多核苷酸可以是DNA或RNA(例如mRNA)。

本公开的核酸也可呈载体形式，可存在于载体中和/或可为载体的一部分，该载体例如质粒、粘端质粒、YAC或病毒载体。载体可尤其为表达载体，即可提供CD40结合分子体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本公开的核酸，其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本公开的TACI多肽、BCMA多肽、包含TACI多肽和BCMA多肽的融合蛋白、包含TACI多肽和抗体(例如，抗IFNAR1抗体)的融合蛋白、包含TACI多肽和BCMA多肽和抗体(例如，抗IFNAR1抗体)的融合蛋白、产品、组合或复合物的表达有用或必需的调控元件及其它元件例如为启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

本公开的核酸可基于本公开的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动DNA合成和/或重组DNA技术)制备或获得，和/或可从适合的天然来源加以分离。

宿主细胞

本公开提供表达或能够表达一种或多种本公开的TACI多肽、BCMA多肽、包含TACI多肽和BCMA多肽的融合蛋白、包含TACI多肽和抗体(例如，抗IFNAR1抗体)的融合蛋白、包含TACI多肽和BCMA多肽和抗体(例如，抗IFNAR1抗体)的融合蛋白、产品、组合或复合物，和/或含有本公开的核酸或载体的重组宿主细胞。

一些实施方案中，宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

细菌细胞例如包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

真菌细胞例如包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞；或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*))及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的

细胞。

哺乳动物细胞例如包括例如 HEK293 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HeLa 细胞、COS 细胞等。

然而，本公开也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其它细胞。

本公开的细胞不能发育成完成的植株或动物个体。

制备方法

本公开提供一种用于制备 TACI 多肽、BCMA 多肽、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、包含 TACI 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、产品、组合或复合物的方法，包括：在如前所述的宿主细胞中表达前述多肽、融合蛋白、产品、组合或复合物，并自该宿主细胞中分离所述多肽、融合蛋白、产品、组合或复合物。可选地，还可以包含纯化步骤。可选地，还可以包含过滤、浓缩步骤。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如-70°C，或者冻干。

所述多肽、融合蛋白、产品、组合或复合物可用常规方法制备和纯化。比如，编码含有所述融合蛋白的 cDNA 序列，可以克隆并重组至表达载体。重组的表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。哺乳动物类表达系统会导致蛋白的糖基化(例如，在 Fc 区的高度保守 N 端)。获得阳性的克隆在生物反应器的培养基中扩大培养以生产蛋白。分泌了蛋白的培养液可以用常规技术纯化、收集、过滤、浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛，离子交换。然而，本公开的多肽、融合蛋白、产品、组合或复合物也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得，例如化学合成，包括固相或液相合成。

组合物

本公开提供组合物，例如药物组合物，其含有治疗有效量的 TACI 多肽、BCMA 多肽、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、包含 TACI 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、产品、组合、复合物或多核苷酸，和一种或多种可药用的赋形剂、稀释或载体。

在一些具体实施方案中，所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的前述任一的多肽、融合蛋白、产品、组合、复合物或多核苷酸。在一些具体实施方案中，所述药物组合物单位剂量中含前述任一的多肽、融合蛋白、产品、组合、复合物或多核苷酸的量为 0.1-2000mg，在一些具体实施方案中为 1-1000mg。

试剂盒

本公开提供试剂盒，包含本公开的 TACI 多肽、BCMA 多肽、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、包含 TACI 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合

蛋白、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、产品、组合、复合物或多核苷酸。一些实施方案中，还提供包含上述多核苷酸的诊断试剂，以及提供相关诊断用途。

治疗疾病的方法和制药用途

一些实施方案中，本公开提供一种治疗或改善疾病或病症的方法，包括向有需要的受试者施用治疗有效量的前述本公开任一的 TACI 多肽、BCMA 多肽、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、包含 TACI 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、产品、组合、复合物、多核苷酸，或药物组合物。一些实施方案中，所述疾病或病症是与 TACI、BCMA 和/或 IFN 表达相关的疾病或病症。

一些实施方案中，提供前述本公开任一的 TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体联合治疗疾病或病症的方法或制药用途。一些实施方案中，提供前述本公开任一的 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体联合治疗疾病或病症的方法或制药用途。一些具体实施方案中，进一步包括与 BCMA 多肽的联用。一些实施方案中，提供前述本公开任一的含有 BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白治疗疾病或病症的方法或制药用途。一些具体实施方案中，进一步包括与 TACI 多肽的联用。所述抗 IFNAR1 抗体例如为 Anifrolumab。

一些实施方案中，提供一种治疗或改善 B 细胞障碍或自身免疫性疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开的 TACI 多肽、BCMA 多肽、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、包含 TACI 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、产品、组合、复合物、多核苷酸，或药物组合物的步骤。

一些实施方案中，提供本公开的 TACI 多肽、BCMA 多肽、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白、包含 TACI 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗体(例如，抗 IFNAR1 抗体)的融合蛋白、产品、组合、复合物、多核苷酸，或药物组合物在制备治疗或预防疾病的药物中的用途。

一些实施方案中，所述疾病或病症为 B 细胞障碍或自身免疫性疾病。

一些实施方案中，所述疾病或病症是与 TACI 表达相关的，或与 BCMA 表达相关的，或与 IFN 表达相关的，或与 TACI、BCMA、IFN 中的任意两者或三者表达相关的。所述表达例如是超量或异常表达。

一些实施方案中，所述自身免疫性疾病选自：系统性红斑狼疮、重症肌无力、多发性硬化、胰岛素依赖性糖尿病、克罗恩氏病、类风湿关节炎、多关节型青少年类风湿关节炎和银屑病性关节炎。一些实施方案中，所述 B 细胞障碍选自：肿瘤、慢性白细胞性白血病、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、移植后淋巴组织增

生病以及轻链丙球蛋白病。一些实施方案中，所述自身免疫性疾病为系统性红斑狼疮。

术语定义

为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem，243，p3558(1968)中所述。

本公开所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指代，除非上下文清楚表明并非如此。

除非上下文另外清楚要求，否则在专利说明书和权利要求书中，应将词语“包含”、“具有”、“包括”等理解为“包括但不仅限于”的意义，而不是排他性或穷举性意义。

术语“细胞因子”是由一个细胞群体释放的、作为细胞间介质作用于其它细胞的蛋白质的一般术语。这样的细胞因子的例子包括淋巴因子、单核因子、趋化因子和传统的多肽激素。示例性的细胞因子包括：IL-2、IFN-γ、IL-6、TNFα、IL-17和 IL-5。

本公开所述的 TACI(transmembrane activator and calcium modulator andcyclophilinligand-interactor)是一种膜结合受体，人 TACI 属于 TNFR 超家族，是 293 个氨基酸的多肽，包含位于蛋白 N 端区域(氨基酸残基 1-165，参见本公开的 SEQ ID NO：1)，跨膜区域(氨基酸残基 166-186)和细胞内区域(氨基酸残基 187-293)。胞外区含有两个富含半胱氨酸的重复区 CRD(cysteine-rich pseudo-repeats)(CRD1、CRD2)。本公开中 TACI 的“CRD1”涵盖野生型的人 TACI 的 CRD1(例如，SEQ ID NO：1 的第 33-67 位氨基酸)及其变体。本公开中 TACI 的“CRD2”涵盖野生型的人 TACI 的 CRD2(例如，SEQ ID NO：1 的第 70-104 位、或第 69-104 位氨基酸)及其变体(包括但不限于本公开的 SEQ ID NO：1 的第 69、72、73、77、85、102 和 103 位中的一个或多个氨基酸的变体，例如 SEQ ID NO：6-29 所示变体)。所述 TACI 的 CRD1、CRD2 及其变体均能够与 APRIL 和/或 BAFF 结合，例如，同时与 APRIL 和 BAFF 结合，所述结合的检测方法是本领域公知的，例如可参见本公开实施例中所提供的。

本公开所述的 BCMA(B cell maturation antigen)是一种膜结合受体，人 BCMA 蛋白是 184 个氨基酸的多肽，包含位于蛋白 N 端区域(氨基酸残基 1-50，参见本公开 SEQ ID NO：30 的第 1-50 位氨基酸)，跨膜区域(氨基酸残基 51-93)和细胞内区域(氨基酸残基 94-184)。BCMA 的胞外区含有一个 CRD(或称 CRD1)。本公开中 BCMA 的“CRD1”涵盖野生型的人 BCMA 的 CRD1(例如，本公开 SEQ ID NO：30 的第 7-41 位氨基酸)及其变体。所述 BCMA 的 CRD1 或其变体均能够与 APRIL 和

/或 BAFF 结合，例如，同时与 APRIL 和 BAFF 结合，所述结合的检测方法是本领域公知的，例如可参见本公开实施例中所提供的。

本公开中的“TACI 胞外区”与“TACI 胞外结构域”可相互替换，“BCMA 胞外区”与“BCMA 胞外结构域”可相互替换。

术语“干扰素 α”、“IFNα”、“IFNa”、“IFNA”和“IFN alpha”可互换使用，应指干扰素 α 基因座的功能性基因编码的 IFNα 蛋白质，其与 IFNα1(GenBank 登录号 NP_076918 或 GenBank 登录号 NM_024013 编码的蛋白)具有 75%或以上的序列相同性。IFNα 亚型的例子包括 IFNα1，α2a，α2b，α4，α4b α5，α6，α7，α8，α10，α13，α14，α16，α17 和 α21。“干扰素 α”、“IFNα”应包括各种 IFNα 亚型的重组形式，以及天然存在的制备物，其包含 IFNα 蛋白，例如白细胞 IFN 和淋巴母细胞 IFN。

术语“干扰素 α 受体-1”、“IFNAR1”、“IFNAR-1”和"IFNAR-1 抗原”可互换使用，包括人 IFNAR-1 的变体、同工型、种系同源物，以及与 IFNAR-1 具有至少一个共同表位的类似物。因此，本发明的人抗体在一些实施方案中可与来自除人以外的其它物种的 IFNAR-1，或与人 IFNAR-1 结构相关的其它蛋白质(例如人 IFNAR-1 同源物)交叉反应。在其它实施方案中，抗体可以对人 IFNAR-1 完全特异，不显示物种或其它类型的交叉反应性。人 IFNAR-1 的完整 cDNA 序列具有 GenBank 登录号 NM_000629。

术语“和/或”，意指包含“和”与“或”两种含义。例如短语“A、B 和/或 C”旨在涵盖以下方面中的每一个：A、B 和 C；A、B 或 C；A 或 C；A 或 B；B 或 C；A 和 C；A 和 B；B 和 C；A(单独)；B(单独)；和 C(单独)。

术语“抗体”以最广义使用，涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体；单特异性抗体，多特异性抗体(例如双特异性抗体)，全长抗体和抗体片段(或抗原结合片段，或抗原结合部分)，只要它们展现出期望的抗原结合活性。抗体可以指免疫球蛋白，是由两重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、δ 链、γ 链、α 链和 ε 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中第每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区(V 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区(C 区)。可变区包括 3 个高变区(CDR)和 4 个序列相对保守的骨架区(FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由 3 个 CDR 区 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

本公开中的“抗体”涵盖“抗原结合片段”，所述“抗原结合片段”包括：单链抗体(即全长重链和轻链)；Fab、修饰的 Fab、Fab’、修饰的 Fab’、F(ab’)2、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体(例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价或三价或四价抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一种的表位结合片段(参见例如 Holliger and Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136；Adair and Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。

对于 CDR 的确定或定义，能够通过分辨抗体的结构和/或分辨抗体-配体复合物的结构来完成 CDR 的确定性描绘和包含抗体的结合位点的残基的鉴定。这可通过本领域技术人员已知的各种技术中的任一种，例如 X 射线晶体学来实现。多种分析方法可用于鉴定 CDR，包括但不限于 Kabat 编号系统、Chothia 编号系统、AbM 编号系统、IMGT 编号系统、接触定义、构象定义。

Kabat 编号系统是用于编号抗体中残基的标准并且通常用于鉴定 CDR 区域(参见例如 Johnson&Wu，2000，Nucleic Acids Res.，28：214-8)。Chothia 编号系统与 Kabat 编号系统类似，但 Chothia 编号系统考虑了某些结构环区域的位置。(参见例如 Chothia 等，1986，J.Mol.Biol.，196：901-17；Chothia 等人，1989，Nature，342：877-83)。AbM 编号系统使用建模抗体结构的由 Oxford Molecular Group 生产的计算机程序集成套件(参见例如 Martin 等，1989，ProcNatl Acad Sci(USA)，86：9268-9272；“AbMTM，A Computer Program for ModelingVariable Regions of Antibodies，”Oxford，UK；Oxford Molecular，Ltd)。AbM 编号系统使用知识数据库和从头开始方法的组合，从基本序列建模抗体的三级结构(参见 Samudrala 等，1999，在 PROTEINS，Structure，Function and Genetics Suppl.，3：194-198 中的“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined HierarchicalApproach”描述的那些)。接触定义基于可用复杂晶体结构的分析(参见例如 MacCallum 等，1996，J.Mol.Biol.，5：732-45)。构象定义中，CDR 的位置可鉴定为对抗原结合做出贡献的残基(参见例如 Makabe 等，2008，Journal ofBiological Chemistry，283：1156-1166)。另外其它的 CDR 边界定义可能不严格遵循上述方法之一，但仍然与 Kabat CDR 的至少一部分重叠，尽管根据特定残基或残基组不显著影响抗原结合的预测或实验结果，它们可缩短或延长。如本公开使用的，CDR 可指通过本领域已知的任何方法(包括方法的组合)定义的 CDR。各种编号系统之间的对应关系是本领域技术人员熟知的，示例性的，如下表 1 中所示。

表 1. CDR 编号系统之间的关系

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55

LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

除非另有说明，本公开中的可变区和 CDR 序列均适用 Kabat 编号系统。

术语“Fc 区”或“片段可结晶区”用于定义抗体重链的 C 末端区域，包括天然 Fc 区和改造的 Fc 区。一些实施方案中，Fc 区包含了相同或不同的两个亚基。一些实施方案中，人 IgG 重链的 Fc 区定义为从 Cys226 位置处的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。用于本文所述抗体的合适 Fc 区包括人 IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3 和 IgG4 的 Fc 区。一些实施方案中，Fc 区的边界还可以变化，例如缺失 Fc 区的 C 末端赖氨酸(根据 EU 编号系统的残基 447)或缺失 Fc 区的 C 末端甘氨酸和赖氨酸(根据 EU 编号系统的残基 446 和 447)。除非另有说明，Fc 区的编号规则为 EU 编号系统，又称作 EU 索引。

术语“同源性”或“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同核苷酸或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被相同核苷酸占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100%的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源。一般而言，当比对两个序列而得到最大的同源性百分率时进行比较。

术语“氨基酸突变”包括氨基酸取代(也称氨基酸替换)、缺失、插入和修饰。可以进行取代、缺失、插入和修饰的任意组合来实现最终构建体，只要最终构建体拥有期望的特性，例如降低或对 Fc 受体的结合。氨基酸序列缺失和插入包括在多肽链的氨基端和/或羧基端的缺失和插入。具体的氨基酸突变可以是氨基酸取代。在一个实施方案中，氨基酸突变是非保守性的氨基酸取代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种天然氨基酸的衍生物(例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸)替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变。遗传方法可以包括定点诱变、PCR，基因合成等。预计基因工程以外的改变氨基酸侧链基团的方法，如化学修饰也可能是可用的。本文中可使用各种名称来指示同一氨基酸突变。本文中，可采用位置+氨基酸残基的方式表示特定位点的氨基酸残基，例如 366W，表示在 366 位点上的氨基酸残基为 W。T366W 则表示第 366 位点上的氨基酸残基由原来的 T 突变为了 W。

应当理解，当权利要求中以位置+残基的方式限定氨基酸序列时，该位点突变前的氨基酸不对技术方案构成限制。

术语“保守性置换”指置换为具有与原始氨基酸残基相似的特性的另一个氨基酸残基。例如，赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有碱性侧链，并且天冬氨酸和谷氨酸具有相似的特性，在于它们具有酸性侧链。此外，甘

氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸具有相似的特性，在于它们具有不带电荷极性侧链，并且丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甲硫氨酸具有相似的特性，在于它们具有非极性侧链。另外，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸具有相似的特性，在于它们具有芳族侧链。因此，本领域技术人员将显而易见，甚至当置换如上文所述的显示相似特性的组中的氨基酸残基时，它将不显示特性的特定变化。

术语“多肽”、“蛋白”或“蛋白质”在本文中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明，否则特定的多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体。

术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用，并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸，所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的，具有与参考核酸相似的结合特性，并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的多核苷酸。分离的核酸包括在下述细胞中含有的多核苷酸，所述细胞通常含有该多核苷酸，但该多核苷酸存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。编码多肽或融合蛋白的分离的核酸指编码多肽或融合蛋白的一个或更多个多核苷酸，包括在单一载体或分开的载体中的这样的一个或更多个多核苷酸，和存在于宿主细胞中一个或更多个位置的这样的一个或更多个多核苷酸。除非另有说明，否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如，简并密码子取代)和互补序列以及明确指明的序列。具体地，如下详述，简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得，在这些序列中，一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代。

术语“效应子功能”指那些可归于抗体 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列突变的 Fc 区)且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应子功能的例子包括但不限于：C1q 结合和补体依赖性细胞毒性、Fc 受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体(例如 B 细胞受体)下调；和 B 细胞活化。

术语“结合亲和力”或“亲和力”在本公开中用作两个分子(例如抗体或其部分与抗原、配体与受体)之间的非共价相互作用的强度量度。两个分子之间的结合亲和力可通过确定解离常数(KD)来量化。可通过使用例如表面等离子共振(SPR)方法(Biacore)测量复合物形成和解离的动力学来确定 K_D。对应于单价复合物的结合和解离的速率常数分别被称为结合速率常数 ka(或 kon)和解离速率常数 kd(或 koff)。K_D 通过方程 K_D=kd/ka 与 ka 和 kd 有关。解离常数的值可通过众所周知的方法直接确定，并且可通过方法例如 Caceci 等人(1984，Byte 9：340-362)中所述的那些甚

至对于复杂混合物进行计算。例如，可使用双重过滤硝化纤维素滤器结合测定如Wong&Lohman(1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90：5428-5432)中公开的那种来确定K_D。评估抗体针对靶抗原的结合能力的其它标准测定是本领域已知的，包括例如ELISA、蛋白质印迹、RIA 和流式细胞术分析、以及本公开其它地方例举的其它测定。抗体的结合动力学和结合亲和力也可通过本领域已知的标准测定，例如表面等离子共振(SPR)，例如通过使用 Biacore™ 系统或 KinExA 来评价。可通过比较各个抗体/抗原复合物的 K_D 值来比较与不同分子相互作用相关的结合亲和力，例如，不同抗体对于给定抗原的结合亲和力的比较。类似地，相互作用的特异性可通过确定和比较目的相互作用(例如抗体和抗原之间的特异性相互作用)的 K_D 值与非目的相互作用(例如已知不结合目的抗原的对照抗体)的 K_D 值进行评价。

术语“连接子”、 “Linker”或“接头”指连接两个多肽片段的连接单元，通常具有一定的柔性，接头的使用不会使蛋白质结构域原有的功能丧失。在本文中，同一结构中出现的连接子可以是相同或不同的。连接子可以是肽连接子，其包含一个或多个氨基酸，典型的约 1-30 个、2-24 个或 3-15 个氨基酸。应用于本公开的连接子可以是相同或不同的。

术语“融合”或“连接”是指部件(例如 TACI 多肽和 BCMA 多肽)直接地或经由一个或多个连接子而通过共价键连接。当连接子是肽连接子时，所述共价键是肽键。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”、“施用”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，诸如包含本公开的任一种抗体或其抗原结合片段或其融合蛋白的组合物，所述受试者已经患有、疑似患有、倾向于患有一种或多种疾病或其症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床右测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽本公开的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解某个受试者中目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney

的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验(H 检验)、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用，并且指已经导入外源核酸的细胞，包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代，而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同，而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。宿主细胞包括原核和真核宿主细胞，其中真核宿主细胞包括但不限于哺乳动物细胞、昆虫细胞系植物细胞和真菌细胞。哺乳动物宿主细胞包括人、小鼠、大鼠、犬、猴、猪、山羊、牛、马和仓鼠细胞，包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NSO、SP2 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如，Hep G2)、A549 细胞、3T3 细胞和 HEK-293 细胞。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

本公开的“包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白”涵盖所有含本公开 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白的分子。

“包含 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白”涵盖所有含本公开 TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体(或其抗原结合片段)的融合蛋白的分子。

“包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体的融合蛋白”涵盖所有含本公开 TACI 多肽和 BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体(或其抗原结合片段)的融合蛋白的分子。例如，所述融合蛋白可以包含一个或多个效应分子，以例如缀和的方式。

所述“效应分子”单独可以具有治疗活性(例如具有抗肿瘤活性或免疫激活或抑制活性)或具有检测功能，其可以是任何形式，例如生物活性蛋白(例如酶)、其它抗体或抗体片段、合成或天然存在的聚合物、核酸及其片段例如 DNA、RNA 及其片段、放射性核素(特别地放射性碘化物)、放射性同位素、螯合金属、纳米颗粒和报道基团(例如荧光化合物)、或可通过 NMR 或 ESR 光谱分析检测的化合物。效应分子与本公开的融合蛋白的缀和方式可以通过常规方法实现。

附图说明

图 1. TACI 与 Fc 的融合蛋白结构示意图。

图 2. 配体 BAFF 和 APRIL 与受体 BAFF-R、TACI 和 BCMA 相互作用示意图。

BAFF 为膜表达蛋白，经蛋白酶切后以可溶三聚体形式发挥功能，BAFF 可以与 BAFF-R、TACI 和 BCMA 结合。APRIL 为可溶三聚体蛋白，可以与 TACI 和 BCMA 结合。黑色箭头越粗代表相互作用越强，黑色箭头越细代表相互作用越弱。

图 3. 不同 TACI 和 BCMA 蛋白结构域示意图，包括 TACI-ECD、TACI-d2、TACI-T2、TACI-T4、BCMA-ECD。

图 4. TACI-BCMA 融合蛋白结构示意图，包括 B575701、B575702、B575703、B575704。

图 5. TACI-BCMA 融合蛋白(B575701、B575702、B575703、B575704)与 BAFF 结合能力 ELISA 测定结果，使用 Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。

图 6. TACI-BCMA 融合蛋白(B575701、B575702、B575703、B575704)与 APRIL 结合能力 ELISA 测定结果，使用 Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。

图 7. TACI-CRD2 和 TACI-19-16 结构域示意图，包括 TACI-CRD2、TACI-19-16。

图 8. Anifrolumab 与 TACI-T4 的融合蛋白(B385801、B385802、B385803、B385804、B498301、B498302)、Anifrolumab 与 TACI-19-16 融合蛋白(B606401、B606401-LALA、B805201、B805201-LALA，所述 LALA 突变为 Fc 的 L234A/L235A 突变，下同)结构示意图。

图 9. Anifrolumab 与 TACI-T4 的融合蛋白对 IFN-β 活性抑制检测结果，其中，图 9 的 A 为 B385801、B385802、B385803、B385804 对 IFN-β 活性抑制结果；图 9 的 B 为 B385804、B498301、B498302 对 IFN-β 活性抑制结果；图 9 的 C 为 B606401 对 IFN-β 活性抑制结果，使用 Anifrolumab 和 IgG1 同种型作为对照。

图 10. Anifrolumab 与 TACI-T4 的融合蛋白与 BAFF 结合能力 ELISA 测定结果，其中图 10 的 A 为 B385801、B385802、B385803、B385804 与 BAFF 结合能力结果，使用 Atacicept、Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。图 10 的 B 为 B385804、B498301、B498302 与 BAFF 结合能力结果；图 10 的 C 为 B606401 与 BAFF 结合能力结果，使用 Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。

图 11. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 融合蛋白结构示意图，包括 B613301、B613302、B613303、B613304。

图 12. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 融合蛋白(B613301、B613302、B613303)对 IFN-β 活性抑制检测结果，使用 Anifrolumab 和 IgG1 同种型作为对照。

图 13. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 融合蛋白(B613301、B613302、B613303)与 BAFF 结合能力 ELISA 测定结果，使用 Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。

图 14. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 融合蛋白(B613301、B613302、B613303)与 APRIL 结合能力 ELISA 测定结果，使用 Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。

图 15. Anifrolumab 与 TACI-19-16 和 BCMA-ECD-1 的融合蛋白(B637301)，Anifrolumab 与 TACI-19-16 融合蛋白和 BCMA-ECD-2 融合蛋白(B637302、B637302-LALA、B746201、B746201-LALA)结构示意图。

图 16. Anifrolumab 与 TACI-19-16 和 BCMA 的融合蛋白(B637302、B746201)、Anifrolumab 与 TACI-19-16 的融合蛋白(B606401、B805201)对 IFN-β 活性抑制检测结果，使用 Anifrolumab 和 IgG1 同种型作为对照。

图 17. B637302、B746201、B606401、B805201 与 BAFF 结合能力 ELISA 测定结果，使用 Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。

图 18. B637302、B746201、B606401、B805201 与 APRIL 结合能力 ELISA 测定结果，使用 Telitacicept 和 IgG1 同种型作为对照。

图 19. PBMC 中 pDC 功能实验结果。利用 CpG-A 刺激体外培养的人 PBMC 细胞，加梯度浓度的 B637302、B606401 处理，使用 Anifrolumab、IgG1 同种型作为对照，24 小时后检测上清中分泌的 IFN-α 水平。

图 20. 浆细胞体外分化实验结果。包括利用从人 PBMC 中分选出的 B 细胞，进行体外培养，加 CpG-B 和 IFN-α，加梯度浓度的 B637302、B746201、B606401、B805201 处理，使用 Anifrolumab、IgG1 同种型作为对照，4 天后流式检测浆细胞(CD27+CD38+)分化比例。

图 21. BAFF 诱导 B 细胞体外增殖实验结果。 包括利用从人 PBMC 中分选出的 B 细胞，进行 CTV 标记，然后进行体外培养，加 IL-4、anti-IgM、CD40L、IL-17 作为基础刺激信号，在此基础条件上，加 BAFF 诱导 B 细胞增殖，加梯度浓度的 B637302、B606401、B805201 处理，使用 Telitacicept、IgG1 同种型作为对照，第 5 天流式检测 B 细胞增殖信号，药物浓度为 100nM、300nM、1000nM。

图 22. APRIL 诱导 B 细胞体外增殖实验。包括利用从人 PBMC 中分选出的 B 细胞，进行 CTV 标记，然后进行体外培养，加 IL-4、anti-IgM、CD40L、IL-17 作为基础刺激信号，在此基础条件上，加 APRIL 诱导 B 细胞增殖，加梯度浓度的 B637302、B606401 处理，使用 Telitacicept、IgG1 同种型作为对照，第 5 天流式检测 B 细胞增殖信号，药物浓度为 100nM、300nM、1000nM。

图 23. BAFF 与 APRIL 共同诱导浆细胞体外生成实验。包括从人 PBMC 中分选出的 B 细胞，进行体外培养，第 1 至 4 天加 CpG-B 刺激，第 4 至 10 天移除 CpG-B，加 IL-6 + IL-10 + IL-21 继续培养。在此基础条件上，第 4 至 7 天加 500 ng/mL BAFF 和 50 ng/mL APRIL，第 7 至 10 天加 50 ng/mL BAFF 和 500 ng/mL APRIL 诱导浆细胞体外生成。在第 4 至 10 天加 10、100、1000 nM 不同浓度的药物 B637302、B606401、B606401、B805201 处理，使用 Telitacicept、IgG1 同种型作为对照，第 10 天流式检测浆细胞数目。

图 24. IFN-α 和 BAFF、APRIL 三因子共同诱导浆细胞体外生成实验。图 24 的 A 为实验过程示意图，利用从人 PBMC 中分选出的 B 细胞，进行体外培养，第 1 至 4 天加 CpG-B 和 IFN-α 刺激，第 4 至 10 天移除 CpG-B，加 IL-6 + IL-10 + IL-21 继续培养。在此基础条件上，第 4 至 7 天加 500 ng/mL BAFF 和 50 ng/mL APRIL，第 7 至 10 天加 50 ng/mL BAFF 和 500 ng/mL APRIL 诱导浆细胞体外生成。在第 0

至 10 天加 10、100、1000 nM 不同浓度的药物 B637302、B606401 处理，使用 Telitacicept、IgG1 同种型作为对照，第 10 天流式检测浆细胞数目；图 24 的 B、C、D 分别为药物 10nM、100nM、1000nM 检测结果图。

图 25. PEG-IFN-α 诱导 PBMC 人源化小鼠 PD 实验结果。图 25 的 A 为实验过程示意图，利用 B-NDG 免疫缺陷小鼠，尾静脉注射 PBMC 进行人源化，腹腔注射 PEG-IFN-α 进行诱导，在该模型中腹腔注射不同浓度的药物 B637302、B606401 处理小鼠，使用 Anifrolumab、PBS 作为对照；图 25 的 B 为 IFN-α 诱导下游信号通路示意图；图 25 的 C 为第 2 小时取 PBMC 检测 pSTAT1 水平结果；图 25 的 D、E、F 分别为第 1、3、7 天时间点取 PBMC，通过 QPCR 检测 IFN-α 下游基因 mRNA 表达水平。

图 26. BAFF 和 APRIL 共同诱导小鼠 PD 实验结果。图 26 的 A 为实验过程示意图，利用 C57/B6 小鼠，腹腔注射 BAFF + APRIL 进行诱导，在该模型中腹腔注射不同浓度的药物 B637302、B606401 处理小鼠，使用 Telitacicept、PBS 作为对照，第 4、7 天取外周血，通过 ELISA 检测血浆中 IgA 水平；图 26 的 B、C 分别为第 4、第 7 天取血检测血浆 IgA 结果图。

其中，图 21-图 26 中，统计学方法 Student' t-test， * $p< 0.05$，** $p< 0.01$，*** $p< 0.001$，**** $p< 0.0001$。

具体实施方式

以下结合实施例用于进一步描述本公开，但这些实施例并非限制本公开的范围。

本公开实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience，NY。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1. TACI 序列分析和改造

由于 TACI 的序列上存在多个蛋白酶切位点，导致全长的 TACI 表达后容易发生断裂。本实验设计不同长度的 TACI 序列片段，将 TACI-ECD 或其片段的 C 端与人 IgG1 的 Fc(SEQ ID NO：3)的 N 端直接融合，构建 TACI-Fc 融合蛋白(包括全长 TACI-ECD-Fc、TACI-9-Fc)，在 293E(EBNA1 基因修饰的人胚肾细胞)中转染表达，纯化获得含两条相同多肽链的 TACI-Fc 融合蛋白(结构参见图 1)。采用 RCT-18(Telitacicept)作为阳性对照。

序列如下所示：

> TACI-ECD(野生型人 TACI 的第 1 至 165 位氨基酸残基)

MSGLGRSRRGGRSRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENK

LRSPVNLPPELRRQRSGEVENNSDNSGRYQGLEHRGSEASPALPGLKLSADQVA
LVYS

SEQ ID NO：1

>TACI-9 (人 TACI-ECD 按自然计数的第 68 至 108 位)

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL

SEQ ID NO：2

>人 IgG1 的 Fc 序列

DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：3

> Telitacicept(RCT-18)

SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAF
CRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPEL<u>DK
THTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK</u>

SEQ ID NO：4

> Atacicept

AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHL
LRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS*EPKSS*<u>DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

SEQ ID NO：5

备注：Telitacicept(RCT-18)序列中，无下划线部分为 TACI 序列(人 TACI 胞外区按自然计数的第 13 至 118 位)，下划线部分为 Fc 序列。Atacicept 序列中，无下划线部分为 TACI 序列(人 TACI 胞外区按自然计数的第 30 至 110 位)和接头 EPKSS(斜体示出)，下划线部分为 Fc 序列。

对获得的 TACI-Fc 融合蛋白进行质谱分析，实验结果表明，TACI-9-Fc 无断裂片段，但阳性对照 RCT-18 以及全长 TACI-ECD-Fc 均检测到 TACI 断裂片段(结果未示出)。

进一步检测上述 TACI-Fc 融合蛋白阻断 BAFF 与 BAFF-R 结合功能，方法如下：用 pH7.4 的 PBS(源培生物，B320)缓冲液将受体蛋白稀释至 2 μg/mL，以 100 μL/

孔的体积加入 96 孔酶标板(Corning，3590)中，4℃过夜孵育。弃去液体后，每孔加入 200 μL 1% Casein 封闭液(Thermo，37528)进行封闭，37℃孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液(pH7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次后备用。将固定浓度的生物素(Biotin)标记的配体蛋白与梯度稀释的抗体或融合蛋白混合后 37℃预孵育 30 分钟后加入封闭好的酶标板中，37℃孵育 1.5 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μL streptavidin-HRP(Invitrogen，434323，1:4000 稀释)，37℃孵育 1 小时。去上清，用 PBST 洗板 3 次后每孔加入 100 μL TMB 显色底物(KPL，5120-0077)，室温孵育 10~15 分钟，每孔加入 50 μl 1 M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，用软件拟合出抑制配体和受体结合的曲线，计算出 IC_{50} 值。所用配体和受体蛋白的来源信息如下：BAFF(Sino biological，10056-HNCH)，BAFF-R(Sino biological，16079-H02H)。

结果显示，TACI-9-Fc 和 RCT-18 阻断 BAFF 与 BAFF-R 结合的 IC_{50} 值分别为 5.02 nM 和 27.48 nM。TACI-9-Fc 的功能活性显著强于对照 RCT-18。因此，认为 TACI-9 为有潜力的候选分子。

实施例 2. TACI 截短片段的分析

在 TACI-9 的基础上，进一步截短 TACI 的序列长度，检测截短的 TACI 片段的功能活性。进一步截短的 TACI 片段的序列如下所示：

> TACI-10(TACI-9 的 C 末端截短 1 个氨基酸“L”)(人 TACI-ECD 按自然计数的第 68 至 107 位)

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENK (SEQ ID NO：6)

> TACI-11(TACI-9 的 C 末端截短 2 个氨基酸“KL”)(人 TACI-ECD 按自然计数的第 68 至 106 位)

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCEN (SEQ ID NO：7)

> TACI-12(TACI-9 的 C 末端截短 3 个氨基酸“NKL”)(人 TACI-ECD 按自然计数的第 68 至 105 位)

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCE (SEQ ID NO：8)

将上述截短的 TACI 片段的 C 端与人 IgG 的 Fc(SEQ ID NO：3)的 N 端融合，构建 TACI-Fc 融合蛋白，在 293E 中转染表达，纯化获得含两条相同多肽的 TACI-Fc 融合蛋白(结构参见图 1)。

对上述构建的 TACI-Fc 融合蛋白进行质谱分析，实验结果见表 2，实验结果表明，TACI-9 截短片段构建的 TACI-Fc 融合蛋白均没有发生 TACI 多肽断裂。

另外，检测构建的 TACI-Fc 融合蛋白结合 BAFF 的活性，以及，检测 TACI-Fc 融合蛋白阻断 BAFF 与 BAFF-R 结合功能活性(实验方法见实施例 1)。

检测 TACI-Fc 融合蛋白结合 BAFF 的活性方法如下：用 pH 7.4 的 PBS(源培生物，B320)缓冲液将 BAFF(Sino biological，10056-HNCH)蛋白稀释至 1 μg/mL，以

100 μL/孔的体积加入 96 孔酶标板(Corning，3590)中，4℃过夜孵育。弃去液体后，每孔加入 300 μL 用 PBS 稀释的 5%脱脂牛奶(BD，232100)进行封闭，37℃孵育 2 小时。封闭结束后，弃去封闭液，并用 PBST 缓冲液(pH 7.4 PBS 含 0.1% tween-20)洗板 3 次后，每孔加入 100 μL 梯度稀释的待测抗体或融合蛋白溶液，于 37℃孵育 1 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次，每孔加入 100 μL 小鼠抗人 IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch，209-035-088，1:8000 稀释)，37℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后，每孔加入 100 μL TMB 显色底物(KPL，5120-0077)，室温孵育 10~15 分钟，每孔加入 50 μL 1 M H_2SO_4 终止反应，用酶标仪读取在 450 nm 处的吸收值，用软件拟合出抗体与抗原的结合曲线，计算出 EC_{50} 值。

表 2 结果表明，TACI-9 的截短片段 TACI-10、TACI-11、TACI-12 构建的 TACI-10-Fc、TACI-11-Fc、TACI-12-Fc 融合蛋白对 BAFF 的结合活性以及阻断 BAFF 与 BAFF-R 结合的功能活性与 TACI-9-Fc 融合蛋白在相同的水平。

表 2. TACI-Fc 融合蛋白功能活性及质谱断裂情况检测结果

融合蛋白	TACI 断裂分析	TACI-Fc 与 BAFF 结合的 EC_{50}(nM)	TACI-Fc 阻断 BAFF 与 BAFF-R 结合的 IC_{50}(nM)
TACI-9-Fc	无断裂	0.4903	2.09
TACI-10-Fc	无断裂	0.5606	2.7
TACI-11-Fc	无断裂	0.5841	2.621
TACI-12-Fc	无断裂	0.8944	3.862

实施例 3. TACI 截短片段的序列改造

TACI 蛋白在中性溶液中容易发生聚集，为了进一步提高 TACI 的稳定性，使用 MOE(Molecular Operating Environment)软件，基于 TACI 的晶体结构(PDB ID: 1XU1)，分析 TACI 片段中的疏水基团和离子基团，对 TACI-9 的多个氨基酸残基进行氨基酸替换，减少 TACI 蛋白暴露的疏水基团和离子基团的面积，降低 TACI 的聚集性，提高 TACI 的稳定性，但仍基本保留 TACI 的功能活性。改造的 TACI 片段的氨基酸序列如下：

>TACI-9-1(TACI-9 含 L69T 替换)

STSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：9)

>TACI-9-2(TACI-9 含 R72S 突变)

SLSCSKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：10)

>TACI-9-3(TACI-9 含 K73E 突变)

SLSCREEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：11)

>TACI-9-4(TACI-9 含 K73Q 突变)

SLSCRQEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：12)

>TACI-9-5(TACI-9 含 K77E 突变)

SLSCRKEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：13)

>TACI-9-6(TACI-9 含 L69R，D85T 突变)

SRSCRKEQGKFYDHLLRTCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：14)

>TACI-9-7(TACI-9 含 L69R，D85A 突变)

SRSCRKEQGKFYDHLLRACISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：15)

>TACI-9-8(TACI-9 含 Y102A 突变)

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCENKL (SEQ ID NO：16)

>TACI-9-9(TACI-9 含 L69R，D85T，Y102R 突变)

SRSCRKEQGKFYDHLLRTCISCASICGQHPKQCARFCENKL (SEQ ID NO：17)

>TACI-9-10(TACI-9 含 K73E，K77E 突变)

SLSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：18)

>TACI-9-11(TACI-9 含 R72S，K73E，K77E 突变)

SLSCSEEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKL (SEQ ID NO：19)

>TACI-9-12(TACI-9 含 L69T，Y102A 突变)

STSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCENKL (SEQ ID NO：20)

>TACI-9-13(TACI-9 含 L69T，F103Y 突变)

STSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYYCENKL (SEQ ID NO：21)

>TACI-9-14(TACI-9 含 L69T，Y102A，F103Y 突变)

STSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAYCENKL (SEQ ID NO：22)

>TACI-9-15(TACI-9 含 L69T，K73E，K77E，Y102A 突变)

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCENKL (SEQ ID NO：23)

备注：上述序列中，下划线部分为突变后氨基酸残基。

将上述由 TACI-9 改造的 TACI 片段的 C 端与人 IgG 的 Fc(SEQ ID NO：3)的 N 端融合，构建 TACI-Fc 融合蛋白(结构见图 1)，在 293E 中转染表达，然后通过 Protein A 亲和纯化，获得含两条相同多肽链的 TACI-Fc 融合蛋白。

检测构建的 TACI-Fc 融合蛋白结合 BAFF 的活性(实验方法参见实施例 2)，实验结果见表 3：

表 3. TACI-Fc 融合蛋白与 BAFF 结合活性

TACI-Fc 融合蛋白	TACI 序列突变位点	TACI-Fc 融合蛋白与 BAFF 结合的 EC_{50}(nM)
TACI-9-Fc	无	0.4181
TACI-9-1-Fc	L69T	0.3820
TACI-9-2-Fc	R72S	0.2785
TACI-9-3-Fc	K73E	0.2654
TACI-9-4-Fc	K73Q	0.4695
TACI-9-5-Fc	K77E	0.1456
TACI-9-6-Fc	L69R，D85T	0.3672
TACI-9-7-Fc	L69R，D85A	0.7273
TACI-9-8-Fc	Y102A	0.1999

TACI-9-9-Fc	L69R，D85T，Y102R	0.9368
TACI-9-10-Fc	K73E，K77E	0.1199
TACI-9-11-Fc	R72S，K73E，K77E	0.1950
TACI-9-12-Fc	L69T，Y102A	0.1223
TACI-9-13-Fc	L69T，F103Y	0.4327
TACI-9-14-Fc	L69T，Y102A，F103Y	0.2233
TACI-9-15-Fc	L69T，K73E，K77E，Y102A	0.0869

备注：表中突变位点为相对于 TACI-ECD(SEQ ID NO：1)的氨基酸残基位点(自然顺序编号)，例如“L69T”表示序列 SEQ ID NO：1 的第 69 位(自然顺序编号)氨基酸残基由 L 突变为 T。

另外，将部分纯化获得的 TACI-Fc 融合蛋白用超滤管置换到 PBS 溶液中，通过溶液外观观察 TACI-Fc 融合蛋白溶液中是否存在沉淀。实验结果表明，改造的 TACI 片段构建的 TACI-Fc 融合蛋白的溶液中没有沉淀，而 RCT-18 的 PBS 溶液中有沉淀产生(结果未示出)。

进一步提供 TACI-9-15 的截短形式(TACI-9-15a，TACI-9-15b，TACI-9-15c)，氨基酸序列如下：

> TACI-9-15a

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCENK (SEQ ID NO：24)

> TACI-9-15b

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCEN (SEQ ID NO：25)

> TACI-9-15c(即 TACI-19-16)

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCE (SEQ ID NO：26)。

实施例 4. TACI-BCMA 融合蛋白的构建、表达及纯化

如前，阿塞西普(Atacicept)和泰它西普(Telitacicept)均为 TACI-Fc 分子形式的 BAFF/APRIL 拮抗剂。如图 2 所示，TACI 与 BCMA 均能结合 BAFF 和 APRIL，TACI 与 BAFF 的结合能力较强而与 APRIL 的结合能力较弱，BCMA 对 APRIL 的结合能力较强。我们将 BCMA 与 TACI 设计成融合蛋白，以期提高对 APRIL 的中和活性。

如图 3 所示，TACI-ECD 为含有氨基酸残基 1-165 的 TACI 胞外区，TACI-d2 为含有氨基酸残基 69-111 的 CRD2 配体结合结构域，TACI-T2 为含有氨基酸残基 13-118 的 CRD1 和 CRD2 配体结合结构域，TACI-T4 为含有氨基酸残基 30-110 的 CRD1 和 CRD2 配体结合结构域，BCMA-ECD 为含有氨基酸残基 1-54 的 BCMA 胞外区。

如图 4 所示，设计 4 种形式的含有 TACI 多肽和 BCMA 多肽的融合蛋白，其中，融合蛋白 B575701 和 B575702 是将 TACI-d2 和 BCMA-ECD 序列连接，并与人野生型 IgG1-Fc 融合；融合蛋白 B575703 和 B575704 是将 TACI-T2 和 BCMA-ECD

序列连接，并与人野生型 IgG1-Fc 融合。

TACI-ECD 的序列如 SEQ ID NO：1 所示。其余序列如下，其中，下划线为人 IgG1 Fc。其中，SEQ ID NO：27 最后一位的 G 也可以不存在。

> TACI-d2(SEQ ID NO：27)

LSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPG

> TACI-T2(SEQ ID NO：28)

SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAF
CRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPEL

> TACI-T4(SEQ ID NO：29)

AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHL
LRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

> BCMA-ECD(SEQ ID NO：30)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTN
A

>TACI-d2-BCMA-ECD(SEQ ID NO：31)

LSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPGMLQMAGQCS
QNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

> BCMA-ECD-TACI-d2(SEQ ID NO：32)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTN
ALSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPG

> TACI-T2-BCMA-ECD(SEQ ID NO：33)

SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAF
CRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELM
LQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

> BCMA-ECD-TACI-T2(SEQ ID NO：34)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTN
ASRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAA
FCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPEL。

B575701、B575702、B575703、B575704 分别是在 TACI-d2-BCMA-ECD、BCMA-ECD-TACI-d2、TACI-T2-BCMA-ECD、BCMA-ECD-TACI-T2 的 C 末端连接人 IgG1 的 Fc(SEQ ID NO：3)。以下序列中，下划线为 Fc。

> B575701(SEQ ID NO：35)

LSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPGMLQMAGQCS
QNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNADKTHTCPPCP
APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

> B575702(SEQ ID NO：36)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTN
ALSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPGDKTHTCPPC
PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

> B575703(SEQ ID NO：37)

SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAF
CRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELM
LQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAD
KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

> B575704(SEQ ID NO：38)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTN
ASRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAA
FCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNLPPELD
KTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK。

合成上述蛋白的编码基因序列，亚克隆至 pcDNA3.4。使用培养液稀释 50 μg 表达质粒并混匀，使用培养液稀释 200 μL 转染试剂并混匀，二者合并混匀后 37°C 孵育 15 分钟，将混合液逐滴加入 HEK293 细胞液中，细胞液 37°C摇床培养一周后，8000 rpm 离心 5 分钟收集上清。使用 20 mL 1×PBS，以 1mL/min 流速平衡 Protein A 亲和层析柱；蛋白上清液以 1mL/min 流速上样；再次使用 20 mL 1×PBS，以 1mL/min 流速冲洗非特异结合蛋白；最后使用 pH 3.4 的柠檬酸缓冲液，以 1 mL/min 流速洗脱，并将洗脱蛋白转移至透析袋于 1×PBS 中透析，置换为 PBS 存储缓冲液。经检测，获得目的蛋白。

实施例 5. TACI-BCMA 融合蛋白对 BAFF 和 APRIL 的体外结合实验

使用 ELISA 分别检测 TACI-BCMA 融合蛋白(B575701、B575702、B575703、B575704)对 BAFF 和 APRIL 的结合能力。

方法如下：将 BAFF(PeproTech，Cat: 310-13)或 ARPIL(Acro Biosystems，Cat:

APL-H52D1)用 PBS 稀释到 1μg/mL，96 孔板(Costar，Cat:3590)4℃包被过夜。PBST 洗板，用 Blocking Buffer(含 1%BSA 的 PBST)37℃封闭 1 小时。拍板，用 Blocking Buffer 稀释待测抗体，37℃孵育 1.5 小时。PBST 洗板，用 Blocking Buffer 稀释 HRP-小鼠抗人 Fc 抗体(GenScript，Cat: A01854-200)，37℃孵育 40 分钟。PBST 洗板，加入 100 μL TMB 显色液(Biopanda，Cat: TMB-S-003)37℃显色 3 分钟，加入 100 μL ELISA 终止液(Solarbio，Cat: C1058)，检测 OD450。

结果如表 4 和图 5 所示，4 种融合蛋白均可以明显结合 BAFF，且结合能力均强于 Telitacicept，其中 B575702 和 B575704 结合 BAFF 能力一致，相比 Telitacicept，EC_{50} 降低至其 1/4 的水平；B575701 和 B575703 结合 BAFF 的能力一致，相比 Telitacicept，EC_{50} 降低至其 1/2 的水平。

表 4. TACI-BCMA 融合蛋白与 BAFF 的结合

BAFF 结合	Telitacicept	B575701	B575702	B575703	B575704
Emax(nM)	2.279	2.313	2.236	2.431	2.290
EC_{50}(nM)	0.7132	0.3240	0.1664	0.3523	0.1867

如表 5 和图 6 所示，4 种融合蛋白可以明显结合 APRIL，且结合能力基本一致；4 种融合蛋白对 APRIL 的结合能力均强于 Telitacicept，EC_{50} 降低至其 1/4 至 1/3 的水平。

表 5. TACI-BCMA 融合蛋白与 APRIL 的结合

APRIL 结合	Telitacicept	B575701	B575702	B575703	B575704
Emax(nM)	2.625	2.695	2.640	2.777	2.684
EC_{50}(nM)	0.7106	0.2046	0.1712	0.2643	0.1887

实施例 6. Anifrolumab 与 TACI 的融合蛋白的构建、表达及纯化

Anifrolumab 是靶向 IFNAR1 的拮抗剂，阻断 I 型干扰素通过 IFNAR1 对细胞进行活化，用于治疗系统性红斑狼疮的药物。如图 7 所示，TACI-CRD2 为含有氨基酸残基 68-105 的 CRD2 配体结合结构域，TACI-19-16 为 TACI-CRD2 带有若干氨基酸突变(L69T，K73E，K77E，Y102A)的多肽。

如图 8 所示，将 TACI-T4 或 TACI-19-16 通过不同长度的连接子分别连接在 Anifrolumab 重链或轻链的 N 端或 C 端。其中，B385801 将 TACI-T4 通过$(G_4S)_2$的连接子 1 连接在 Anifrolumab 重链 N 端；B385802 将 TACI-T4 通过连接子 1 连接在 Anifrolumab 重链 C 端；B385803 将 TACI-T4 通过连接子 1 连接在 Anifrolumab 轻链 N 端；B385804 将 TACI-T4 通过连接子 1 连接在 Anifrolumab 轻链 C 端；B498301 将 TACI-T4 通过$(G_4S)_3$的连接子 2 连接在 Anifrolumab 轻链 C 端；B498302 将 TACI-T4 通过$(G_4S)_4$的连接子 3 连接在 Anifrolumab 轻链 C 端。B606401 将 TACI-19-16 通过连接子 1 连接在 Anifrolumab 轻链 C 端；B805201 将 TACI-19-16 通过连接子 2 连接在 Anifrolumab 重链 C 端。B606401-LALA 将 TACI-19-16 通过

连接子 1 连接在 Anifrolumab 轻链 C 端，且 Fc 部分为带有 L234A 和 L235A 突变的人 IgG1 Fc。B805201-LALA 将 TACI-19-16 通过连接子 2 连接在 Anifrolumab 重链 C 端，且 Fc 部分为带有 L234A 和 L235A 突变的人 IgG1 Fc。

TACI-19-16 如 SEQ ID NO：26 所示，其他序列如下：

>连接子 1(SEQ ID NO：39)

GGGGSGGGGS

>连接子 2(SEQ ID NO：40)

GGGGSGGGGSGGGGS

>连接子 3(SEQ ID NO：41)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

> TACI-CRD2(SEQ ID NO：42，同 SEQ ID NO：8)

SLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCE

>Anifrolumab 的 VH(SEQ ID NO：43)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG
DSDIRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSS

> Anifrolumab 的 VL(SEQ ID NO：44)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIK

>Anifrolumab 的 HCDR1(SEQ ID NO：45)

NYWIA

>Anifrolumab 的 HCDR2(SEQ ID NO：46)

IIYPGDSDIRYSPSFQG

>Anifrolumab 的 HCDR3(SEQ ID NO：47)

HDIEGFDY

>Anifrolumab 的 LCDR1(SEQ ID NO：48)

RASQSVSSSFFA

>Anifrolumab 的 LCDR2(SEQ ID NO：49)

GASSRAT

>Anifrolumab 的 LCDR3(SEQ ID NO：50)

QQYDSSAIT

> B385801 的重链(SEQ ID NO：51)

AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHL
LRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLR*GGGGSGGGGS*EVQLVQSGAEVKKPGE
SLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPGDSDIRYSPSFQGQVTIS
ADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWGRGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEF
EGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> B385802 的重链(SEQ ID NO：52)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG
DSDIRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGS*AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQS
QRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

>B805201 的重链(SEQ ID NO：53)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG
DSDIRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGS*STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASI
CGQHPKQCAAFCE

> B385801、B385802、B805201、B805201-LALA 的轻链(SEQ ID NO：54)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> B385803、B385804、B498301、B498302、B606401 的重链(SEQ ID NO：55)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG
DSDIRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

> B385803 的轻链(SEQ ID NO：56)

AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHL
LRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS*GGGGSGGGGS*EIVLTQSPGTLSLSPGER
ATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRLSGSGSGTDFTL
TITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> B385804 的轻链(SEQ ID NO：57)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLS5CRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS*
*GGGGS*AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCRKEQGK
FYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

> B498301 的轻链(SEQ ID NO：58)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS*
*GGGGSGGGGS*AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFCRSLSCR
KEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

> B498302 的轻链(SEQ ID NO：59)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS*
*GGGGSGGGGSGGGGS*AMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQRTCAAFC
RSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRS

> B606401、B606401-LALA 的轻链(SEQ ID NO：60)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS*
*GGGGS*STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCE

> B606401-LALA 的重链(SEQ ID NO：61)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG
DSDIRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

>B805201-LALA 的重链(SEQ ID NO：62)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG
DSDIRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGS*STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASI
CGQHPKQCAAFCE

重链的下划线为 IgG 的 Fc 区，轻链的下划线为 CH1，斜体为连接子。

使用实施例 1 中提供的蛋白制备方法，通过瞬时转染、蛋白表达，将蛋白经 Protein A 亲和层析柱、洗脱。经检测，获得目的蛋白。

实施例 7. Anifrolumab 与 TACI 的融合蛋白对 I 型干扰素的活性抑制实验

使用 HEK-Blue IFN-α/β 细胞(InvivoGen，Cat：hkb-ifnab)试剂盒检测所述 Anifrolumab 与 TACI 的融合蛋白 B385801、B385802、B385803、B385804、B498301、B498302、B606401 对 IFN-α/β 的活性抑制效果。

方法为：消化 HEK-Blue™ IFN-α/β 细胞，用含 10%FBS、1%P/S 的 DMEM 培养基(Gibco，Cat: 11995065)重悬至 2.8 E5/mL 并接种到 96 孔板。加入待测蛋白，37℃培养 30 分钟。加入终浓度为 0.01 ng/mL 的 IFN-β(Sino biological，Cat: 10704-HNAS)，37℃培养 24 小时。取 20 μL 培养上清，在新的 96 孔板中与 180μL Quanti-Blue(InvivoGen，Cat: rep-qbs)混合，37℃孵育 1 小时，检测 OD655。

结果显示，上述 7 种融合蛋白均对 IFN-α/β 的活性具有抑制效果，其中，B385801 和 B385803 的活性较弱，B385802 活性次之，B385804、B498301、B498302 和 B606401 活性和 Anifrolumab 基本相当(图 9 的 A、图 9 的 B、图 9 的 C)。

实施例 8. Anifrolumab 与 TACI 的融合蛋白对 BAFF 的体外结合实验

使用 ELISA 检测 Anifrolumab 与 TACI 的融合蛋白 B385801、B385802、B385803、B385804、B498301、B498302、B606401 对 BAFF 的结合能力。

方法为：将 BAFF(PeproTech，Cat: 310-13)用 PBS 稀释到 1μg/mL，96 孔板 4℃包被过夜。PBST 洗板，用 Blocking Buffer(含 1%BSA 的 PBST)37℃封闭 1 小时。拍板，用 Blocking Buffer 稀释待测抗体，37℃孵育 1.5 小时。PBST 洗板，用 Blocking

Buffer 稀释 HRP-小鼠抗人 Fc 抗体(GenScript，Cat: A01854-200)，37°C孵育 40 分钟。PBST 洗板，加入 100μLTMB 显色液(Biopanda，Cat: TMB-S-003)37°C显色 3 分钟，加入 100μL ELISA 终止液(Solarbio，Cat: C1058)，检测 OD450。

结果参见图 10 的 A 至图 10 的 C 和表 6，显示 7 种融合蛋白可以明显结合 BAFF。B385801、B385803 和 B606401 结合 BAFF 能力最强，且强于 Telitacicept 和 Atacicept；B385802 结合 BAFF 能力较弱，B385804、B498301 和 B498302 结合 BAFF 能力一致，稍弱于 Telitacicept。连接子的长度不会影响 TACI 与 BAFF 的结合能力。

表 6. Anifrolumab 与 TACI 的融合蛋白与 BAFF 的结合

BAFF 结合	Telitacicept	B606401
Emax(nM)	2.236	1.484
EC_{50}(nM)	0.8006	0.1138

实施例 9. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 的融合蛋白构建、表达及纯化

参见图 11，将实施例 4 中所述 TACI-BCMA 融合蛋白分别以连接子 1 连接在 Anifrolumab 抗体轻链 C 端。其中，B613301 和 B613302 为 TACI-d2 和 BCMA-ECD 的融合蛋白以连接子 1 连接在 Anifrolumab 抗体轻链 C 端；B613303 和 B613304 为 TACI-T2 和 BCMA-ECD 的融合蛋白以连接子 1 连接在 Anifrolumab 抗体轻链 C 端。

B613301、B613302、B613303、B613304 的重链均为 Anifrolumab 的重链全长(SEQ ID NO：55)，轻链的具体序列如下，下划线为轻链恒定区：

> B613301 的轻链(SEQ ID NO：63)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGSGGGGS*LSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPGMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA

> B613302 的轻链(SEQ ID NO：64)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS GGGGS*MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNALSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPG

> B613303 的轻链(SEQ ID NO：65)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS*

*GGGGS*SRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQSQR TCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPVNL PPELMLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVK GTNA

> B613304 的轻链(SEQ ID NO：66)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS GGGGS*MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNS VKGTNASRVDQEERFPQGLWTGVAMRSCPEEQYWDPLLGTCMSCKTICNHQS QRTCAAFCRSLSCRKEQGKFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAYFCENKLRSPV NLPPEL

使用实施例 4 中提供的蛋白制备方法，通过瞬时转染、蛋白表达，将蛋白经 Protein A 亲和层析柱、洗脱。经检测，获得目的蛋白。

实施例 10. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 的融合蛋白对 I 型干扰素的活性抑制实验

使用 HEK-Blue IFN-α/β 细胞(InvivoGen，Cat：hkb-ifnab)试剂盒检测实施例 9 中的 Anifrolumab 与 TACI-BCMA 的融合蛋白 B613301、B613302、B613303 对 IFN-α/β 的活性抑制效果。

方法为：消化 HEK-Blue™ IFN-α/β 细胞，用含 10% FBS、1% P/S 的 DMEM 培养基(Gibco，Cat: 11995065)重悬至 2.8E5/mL 并接种到 96 孔板(Costar，Cat: 3599)。加入待测抗体，37°C培养 30 分钟。加入终浓度为 0.01 ng/mL 的 IFN-β(Sino biological，Cat: 10704-HNAS)，37°C培养 24 小时。取 20 μL 培养上清，在新的 96 孔板中与 180μLQuanti-Blue(InvivoGen，Cat: rep-qbs)混合，37°C孵育 1 小时，检测 OD655。

结果参见图 12，显示 3 种融合蛋白均能够抑制 IFN-α/β 的活性，3 种融合蛋白活性相当且和 Anifrolumab 一致。说明 TACI-BCMA 融合在 Anifrolumab，特别是轻链 C 端基本不影响 Anifrolumab 的活性。

实施例 11. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 的融合蛋白对 BAFF 和 APRIL 的体外结合实验

使用 ELISA 检测 Anifrolumab 与 TACI-BCMA 的融合蛋白 B613301、B613302、B613303 对 BAFF 和 APRIL 的结合能力。

方法为：将 BAFF(PeproTech，Cat: 310-13)或 ARPIL(Acro Biosystems，Cat: APL-H52D1)用 PBS 稀释到 1μg/mL，96 孔板(Costar，Cat:3590)4°C包被过夜。PBST 洗板，用 Blocking Buffer(含 1%BSA 的 PBST)37°C封闭 1 小时。拍板，用 Blocking

Buffer 稀释待测抗体，37°C孵育 1.5 小时。PBST 洗板，用 Blocking Buffer 稀释 HRP-小鼠抗人 Fc 抗体(GenScript，Cat: A01854-200)，37°C孵育 40 分钟。PBST 洗板，加入 100μL TMB 显色液(Biopanda，Cat: TMB-S-003)37°C显色 3 分钟，加入 100μL ELISA 终止液(Solarbio，Cat: C1058)，检测 OD450。

参见图 13 和表 7，结果显示，3 种融合蛋白均明显结合 BAFF。B613302 结合 BAFF 能力显著强于 Telitacicept，EC_{50} 降低至其 1/8 至 1/7 的水平。说明 TACI 置于 BCMA 的 C 端(比如 B613302 的情况)可能更有利于保持对 BAFF 的结合能力。

表 7. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 的融合蛋白与 BAFF 的结合

BAFF 结合	Telitacicept	B613301	B613302	B613303
Emax(nM)	2.236	1.647	1.780	1.763
EC_{50}(nM)	0.8006	1.294	0.1042	0.4483

参见图 14 和表 8，结果显示，3 种融合蛋白均明显结合 APRIL。B613301、B613302 和 B613303 结合 APRIL 基本一致，相比 Telitacicept，EC_{50} 降低至其 1/10 至 1/6 的水平。结果说明，融合了 BCMA 的融合蛋白的确增强了对 APRIL 的结合。

表 8. Anifrolumab 与 TACI-BCMA 的融合蛋白与 APRIL 的结合

APRIL 结合	Telitacicept	B613301	B613302	B613303
Emax(nM)	2.498	2.489	2.515	2.328
EC_{50}(nM)	1.255	0.2009	0.1236	0.1506

实施例 12. Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白构建、表达及纯化

BCMA-ECD-1(氨基酸残基 1-43)和 BCMA-ECD-2(氨基酸残基 1-41)去除了 BCMA 非 CRD 结构域中可能存在的糖基化位点(氨基酸残基 42-44，NAS)和脱酰胺位点(氨基酸残基 47-48，NS)等风险点，去除风险点可以使得融合蛋白更均一。

如图 15，B637301 将 TACI-19-16 融合在 BCMA-ECD-1 的 N 端，然后再将 TACI-19-16-BCMA-ECD-1 通过连接子 1 连接在 Anifrolumab 抗体轻链 C 端；B637302 将 TACI-19-16 融合在 BCMA-ECD-2 的 C 端，然后再将 BCMA-ECD-2-TACI-19-16 通过连接子 1 连接在 Anifrolumab 抗体轻链 C 端；B746201 将 TACI-19-16 融合在 BCMA-ECD-2 的 C 端，然后再将 BCMA-ECD-2-TACI-19-16 通过连接子 2 连接在 Anifrolumab 抗体重链 C 端。B637302-LALA 将 TACI-19-16 融合在 BCMA-ECD-2 的 C 端，然后再将 BCMA-ECD-2-TACI-19-16 通过连接子 1 连接在抗体 Anifrolumab 轻链 C 端，且 Anifrolumab 抗体 Fc 部分为带有 L234A 和 L235A 突变的人 IgG1 Fc。B746201-LALA 将 TACI-19-16 融合在 BCMA-ECD-2 的 C 端，然后再将 BCMA-ECD-2-TACI-19-16 通过连接子 2 连接在抗体 Anifrolumab 重链 C 端，且 Anifrolumab 抗体 Fc 部分为带有 L234A 和 L235A 突变的人 IgG1 Fc，见图 15。

>BCMA-ECD-1(SEQ ID NO：67)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNA

>BCMA-ECD-2(SEQ ID NO：68)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYC

> TACI-19-16-BCMA-ECD-1(SEQ ID NO：69)

STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCEMLQMAGQCSQNEYFDS
LLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNA

>BCMA-ECD-2-TACI-19-16(SEQ ID NO：70)

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCSTSCREEQGEFYD
HLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCE

B637301、B637302 的重链均为 Anifrolumab 的重链 SEQ ID NO：55，轻链的序列如下：

> B637301 的轻链(SEQ ID NO：71)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS*
*GGGGS*STSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCEMLQMAGQCSQ
NEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNA

> B637302、B637302-LALA 的轻链(SEQ ID NO：72)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFFAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
TGIPDRLSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYDSSAITFGQGTRLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*GGGGS*
*GGGGS*MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCSTSCREEQ
GEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCE

B637302-LALA 重链为 SEQ ID NO：61。

>B746201 的重链(SEQ ID NO：73)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG
DSDIRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGS*MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPC
QLRCSSNTPPLTCQRYCSTSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCE

B746201、B746201-LALA 的轻链为 Anifrolumab 的轻链 SEQ ID NO：54。

>B746201-LALA 的重链(SEQ ID NO：74)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYIFTNYWIAWVRQMPGKGLESMGIIYPG

DSDIRYSPSFQGGQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHDIEGFDYWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK*GGGGSGGGGSGGGGS*MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPC
QLRCSSNTPPLTCQRYCSTSCREEQGEFYDHLLRDCISCASICGQHPKQCAAFCE

B637301、B637302 和 B746201 融合蛋白经表达纯化，SDS-PAGE 检测发现连接有 TACI-BCMA 的抗体重链、轻链均为单一条带(结果未示出)。结果说明对 BCMA 蛋白序列糖基化风险点的去除可以使得融合蛋白更均一。

实施例 13. Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白对 I 型干扰素的活性抑制实验

使用 HEK-Blue IFN-α/β 细胞(InvivoGen，Cat：hkb-ifnab)试剂盒检测 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白(B606401、B637302、B746201 和 B805201)对 IFN-α/β 的活性抑制效果。

方法为：消化 HEK-Blue™ IFN-α/β 细胞，用含 10%FBS、1%P/S 的 DMEM 培养基(Gibco，Cat: 11995065)重悬至 2.8E5/mL 并接种到 96 孔板(Costar，Cat: 3599)。加入待测抗体，37°C培养 30 分钟。加入终浓度为 0.01ng/mL 的 IFN-β(Sino biological，Cat: 10704-HNAS)，37°C培养 24 小时。取 20μL 培养上清，在新的 96 孔板中与 180μLQuanti-Blue(InvivoGen，Cat: rep-qbs)混合，37°C孵育 1 小时，检测 OD655。

参见图 16 和表 9，结果显示，这 4 种融合蛋白均能够抑制 IFN-α/β 的活性，4 种融合蛋白活性相当且和 Anifrolumab 一致。

表 9. Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白
对 I 型干扰素的活性抑制结果

抗体药物	Anifrolumab	B637302	B746201	B606401	B805201
IC_{50}(nM)	1.53	1.59	1.64	1.94	1.63

实施例 14. Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白对 BAFF 和 APRIL 的体外结合实验

使用 ELISA 检测 B606401、B637302、B746201 和 B805201 融合蛋白对 BAFF 和 APRIL 的结合能力。

方法为：将 BAFF(PeproTech，Cat: 310-13)或 ARPIL(Acro Biosystems，Cat: APL-H52D1)用 PBS 稀释到 1μg/mL，96 孔板 4°C包被过夜。PBST 洗板，用 Blocking Buffer(含 1%BSA 的 PBST)37°C封闭 1 小时。拍板，用 Blocking Buffer 稀释待测抗

体，37℃孵育 1.5 小时。PBST 洗板，用 Blocking Buffer 稀释 HRP-小鼠抗人 Fc 抗体(GenScript，Cat: A01854-200)，37℃孵育 40 分钟。PBST 洗板，加入 100 μL TMB 显色液(Biopanda，Cat: TMB-S-003)37℃显色 3 分钟，加入 100 μL ELISA 终止液(Solarbio，Cat: C1058)，检测 OD450。

参见图 17 和表 10，4 种融合蛋白均明显结合 BAFF，4 种融合蛋白结合 BAFF 的能力均强于 Telitacicept。B606401 和 B637302 结合 BAFF 能力相当，相比 Telitacicept，EC_{50} 均降低至其 1/4 至 1/3 的水平；B746201 和 B805201 结合 BAFF 能力相当，相比 Telitacicept，EC_{50} 均降低至其 1/2 的水平。

表 10. Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白与 BAFF 的结合

BAFF 结合	Telitacicept	B637302	B746201	B606401	B805201
Emax(nM)	2.792	2.609	2.353	2.621	2.218
EC_{50}(nM)	0.2555	0.0772	0.1290	0.0823	0.1169

参见图 18 和表 11，4 种融合蛋白均明显结合 APRIL，B637302 结合 APRIL 的能力相比 Telitacicept 的 EC_{50} 降低至其 1/7 至 1/6 的水平，B746201 和 B805201 结合 APRIL 能力相当，相比 Telitacicept 的 EC_{50} 降低至其 1/3 的水平，B606401 结合 APRIL 的能力和 Telitacicept 相当。

表 11. Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白与 APRIL 的结合

APRIL 结合	Telitacicept	B637302	B746201	B606401	B805201
Emax(nM)	2.984	2.899	2.798	2.814	2.855
EC_{50}(nM)	0.5356	0.0819	0.1794	0.6072	0.1820

实施例 15. 浆细胞样树突状细胞(pDC)功能实验

为评估 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 融合蛋白的体外药效，我们建立了体外测试 IFNAR1 拮抗剂生物活性分子的方法。检测 pDC 的功能实验如下：利用新鲜分离的健康人 PBMC，在 1640 GlutaMAX(糖浓度=11 mM)的基础培养基中进行体外培养，PBMC 以 3 x 10^6/mL 密度接种在 96 孔板中，加 0.5 μM CpG-A ODN 2216(InvivoGen cat:tlrl-2216)刺激，加梯度浓度的 Anifrolumab、B637302、B606401、IgG1 isotype 处理，24h 后通过人 IFN-α 试剂盒(Cisbio cat:62HIFNAPEG)检测细胞培养上清中的 IFN-α 细胞因子分泌水平。

结果显示， B637302、B606401 与对照抗体 Anifrolumab 均能够以剂量依赖的方式抑制 IFN-α 的产生，而且三者的抑制活性相当(图 19)。

实施例 16. IFN-α 诱导的浆细胞体外分化功能实验

为评估 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 融合蛋白对 IFNAR1 的拮抗性生物活性，我们建立了浆细胞体外分化的功能实验方法，具体如下：利用 B 细胞分选试剂盒(Stemcell cat: 17954)从新鲜健康人 PBMC 分离人 B 细胞，在 1640 GlutaMAX(Gibco cat:72400-47)的基础培养基中进行体外培养，B 细胞以 1 ×10^5/孔

的密度接种在 96 孔板中，加 2 μg/mL CpG-B 2006(InvivoGen cat: tlrl-2006)以及 250 U/mL IFN-α(Biolegend cat:592704)刺激，外加梯度浓度的 Anifrolumab、B637302、B746201、B606401、B805201、IgG1 isotype 对照处理，4 天后流式检测浆细胞($CD27^+CD38^+$)分化比例。

参见图 20，结果显示，B637302、B746201、B606401、B805201 与对照抗体 Anifrolumab 均能够以剂量依赖的方式有效抑制 IFN-α 诱导的 B 细胞向浆细胞的体外分化，IC_{50} 分别为 10.75 nM、1.895 nM、17.45 nM、6.208 nM、12.66 nM, 提示融合蛋白与对照抗体 Anifrolumab 的抑制活性相当。

实施例 17. BAFF 诱导 B 细胞增殖功能实验

为评估 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 融合蛋白的体外药效，我们建立了体外测试 TACI-BCMA 生物活性分子的方法。BAFF 诱导 B 细胞体外增殖实验步骤如下：利用 B 细胞分选试剂盒(Stemcell cat: 17954)从新鲜健康人 PBMC 分离人 B 细胞，使用 CTV(Invitrogen cat:C34557)标记 B 细胞。在 1640 GlutaMAX(Gibco cat:72400-47)的基础培养基中进行体外培养，B 细胞以 1×10^5/孔的密度接种在 96 孔板中，加 20 μg/mL 抗人 IgM 抗体(Jacksonimmuno cat: 109-006-129)、10 ng/mL 重组人 IL-4(PeproTech cat:AF-200-04-20)、100 ng/mL CD40L(R&D cat:2706-CL-025/CF)、1.5 μg/mL 抗 His 抗体(R&D cat:MAB050-500)、1 ng/mL 重组人 IL-17(SinoBiological cat:12047-HNAS)，外加 200ng/mL 重组人 BAFF(R&D cat:7537-BF-025/CF)刺激，在此条件上，加梯度浓度的 Telitacicept、B637302、B606401、B80521、IgG1 isotype 处理，5 天后流式检测 B 细胞增殖信号。

结果显示，参见表 12，B637302、B606401、B805201 与对照 Telitacicept 均能够以剂量依赖的方式有效抑制 BAFF 诱导的 B 细胞体外增殖。参见图 21，B637302、B805201 的抑制效果明显强于 Telitacicept；在 10 nM 低浓度药物处理条件下，Telitacicept 没有体现出抑制活性，而 B637302、B606401、B805201 均体现出明显的抑制浆细胞分化的活性。

表 12. BAFF 诱导 B 细胞增殖结果

药物浓度(nM)	流式检测增殖 B 细胞比例(%)									
	IgG1		Telitacicept		B637302		B606401		B805201	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
10	40.15	0.21	36.00	2.69	23.75	0.21	28.13	1.46	20.37	2.42
100	40.60	0.44	30.73	0.87	22.20	1.13	25.27	0.59	24.33	0.12
1000	33.97	3.52	24.33	0.81	10.93	0.70	17.87	0.31	14.97	1.16

实施例 18. APRIL 诱导 B 细胞增殖功能实验

为评估 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 融合蛋白的体外药效，我们建立了体外测试 TACI-BCMA 生物活性分子的方法。APRIL 诱导 B 细胞体外增殖实验步

骤如下：利用 B 细胞分选试剂盒(Stemcell cat: 17954)从新鲜健康人 PBMC 分离人 B 细胞，使用 CTV(Invitrogen cat:C34557)标记 B 细胞，在 1640 GlutaMAX(Gibco cat:72400-47)的基础培养基中进行体外培养，B 细胞以 1×10^5/孔的密度接种在 96 孔板中，加 20 μg/mL 抗人 IgM 抗体(Jacksonimmuno cat: 109-006-129)、10 ng/mL 重组人 IL-4(PeproTech cat:AF-200-04-20)、100 ng/mL CD40L(R&D cat:2706-CL-025/CF)、1.5 μg/mL 抗 His 抗体(R&D cat:MAB050-500)、1 ng/mL 重组人 IL-17(SinoBiological cat:12047-HNAS)，外加 20 ng/mL 重组人 ARPIL(R&D cat: 5860-AP-010/CF)刺激，在此条件上，加梯度浓度的 Telitacicept、B637302、B606401、IgG1 isotype 处理，5 天后流式检测 B 细胞增殖信号。

结果显示，参见表 13 和图 22，B637302、B606401 与对照 Telitacicept 均能够以剂量依赖的方式有效抑制 APRIL 诱导的 B 细胞体外增殖，而且 B637302 药效明显优于 Telitacicept；在 1000 nM 药物处理条件下，B606401 药效也明显优于对照 Telitacicept。

表 13. APRIL 诱导 B 细胞增殖结果

药物浓度(nM)	流式检测增殖 B 细胞比例(%)							
	IgG1		Telitacicept		B637302		B606401	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
4.12	55.30		48.07	0.42	50.60	1.23	52.00	1.56
12.35	54.80	1.61	49.23	0.21	50.70	1.57	52.87	1.80
37.04	56.63	1.42	50.07	1.26	53.63	0.49	53.63	0.98
111.11	55.83	0.72	50.33	0.98	51.53	0.90	53.07	0.74
333.33	56.27	1.06	49.13	0.49	47.97	1.36	50.57	0.74
1000.00	53.27	1.10	46.30	1.01	33.60	0.30	40.33	1.74

实施例 19. BAFF + APRIL 诱导浆细胞生成功能实验

为评估 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白中 TACI-BCMA 生物活性，我们建立 BAFF + APRIL 诱导浆细胞体外生成实验方法，具体过程如下：利用 B 细胞分选试剂盒(Stemcell cat: 17954)从新鲜健康人 PBMC 分离人 B 细胞，在 1640 GlutaMAX(Gibco cat:72400-47)的基础培养基中进行体外培养，B 细胞以 1×10^5/孔的密度接种在 96 孔板中，加 2 μg/mL CpG-B 2006(InvivoGen cat: tlrl-2006)刺激。第 4 天替换培养基，加入 10 ng/mL 重组人 IL-6、50 ng/mL 重组人 IL-10(Peprotech cat:200-10)、50 ng/mL 重组人 IL-21(Peprotech cat:AF-200-21-10)、500 ng/mL 重组人 BAFF(R&D cat:7537-BF-025/CF)以及 50 ng/mL 重组人 ARPIL(R&D cat: 5860-AP-010/CF)刺激。7 天后替换一半培养基，BAFF 和 ARPIL 浓度调整为 50 ng/mL 和 500 ng/mL，其余刺激信号的浓度不变。在此过程中，第 4 至 10 天加梯度浓度的 Telitacicept、B637302、B746201、B606401、B805201、IgG1 isotype 处理，第 10 天流式检测浆细胞($CD27^+CD38^+$)数目。

参见表 14，第 10 天流式检测浆细胞数目的实验结果显示，BAFF 和 ARPIL 能

够有效诱导浆细胞的体外生成。参见图 23，在 10 nM 药物处理条件下，Telitacicept 不能抑制浆细胞生成，而 B637302、B746201、B606401、B805201 能够明显抑制浆细胞生成，说明 B637302、B746201、B606401、B805201 抑制 BAFF 和 ARPIL 的活性优于 Telitacicept；在 100 nM 药物处理条件下，4 种测试药物和 Telitacicept 都能明显抑制浆细胞生成；在 1000 nM 药物处理条件下，B637302 抑制浆细胞生成的活性最强，优于 Telitacicept。

表 14. BAFF + APRIL 诱导浆细胞生成结果

药物浓度(nM)	CD27+CD38+浆细胞数目											
	IgG1		Telitacicept		B637302		B746201		B606401		B805201	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
10	2687	432	2451	110	563	76	575	112	654	34	434	107
100	2496	256	510	80	482	60	520	0	549	29	426	32
1000	2279	379	230	82	137	30	410	101	426	27	438	106

实施例 20. IFN-α + BAFF + APRIL 诱导浆细胞生成功能实验

为评估 Anifrolumab 和 TACI-19-16-BCMA 的融合蛋白中 Anifrolumab 和 TACI-BCMA 在 B 细胞向浆细胞分化和生成过程中的协同生物活性，我们建立 IFN-α + BAFF + APRIL 诱导浆细胞体外生成实验方法。具体过程如下：利用 B 细胞分选试剂盒(Stemcell cat: 17954)从新鲜健康人 PBMC 分离人 B 细胞，在 1640 GlutaMAX(Gibco cat:72400-47)的基础培养基中进行体外培养，B 细胞以 1 x 10^5/well 密度接种在 96 孔板中，加 2 μg/mL CpG-B 2006(InvivoGen cat: tlrl-2006)和 250 U/mL IFN-α(Biolegend cat:592704)刺激。第 4 天替换培养基，加入 10 ng/mL 重组人 IL-6、50 ng/mL 重组人 IL-10(Peprotech cat:200-10)、15 ng/mL 重组人 IL-21(Peprotech cat:AF-200-21-10) 、500ng/mL 重组人 BAFF(R&D cat:7537-BF-025/CF)以及 50 ng/mL 重组人 ARPIL(R&D cat: 5860-AP-010/CF)刺激。7 天后替换一半培养基，BAFF 和 ARPIL 浓度调整为 50 ng/mL 和 500 ng/mL，其余刺激信号的浓度不变。在此过程中，第 0 至 10 天加梯度浓度的 Anifrolumab、Telitacicept、B637302、B606401、IgG1 isotype 处理，第 10 天流式检测浆细胞($CD27^+CD38^+$)数目(图 24 的 A)。

在浆细胞体外生成协同实验中，经过实验条件的优化，我们发现在 IL-21 15 ng/mL 条件下，IFN-α 与 BAFF+APRIL 能协同促进浆细胞分化与生成，而且两者的促进作用相当。因此，我们选择在该条件下比较不同浓度的各蛋白药物的抑制活性，结果发现：B637302、B606401、Telitacicept 与 Anifrolumab 均能够以剂量依赖的方式抑制浆细胞的生成，参见表 15、图 24 的 B 至 D。在 10 nM 低浓度药物处理的条件下，Telitacicept 或 Anifrolumab 单药对浆细胞的生成都没有明显的抑制活性，而 B637302、B606401 有明显的抑制活性，参见图 24 的 B。

在 100 nM 浓度药物处理的条件下，Anifrolumab 单药无明显的抑制活性，

Telitacicept 单药有一定的活性，而 B637302 的活性也明显优于 Telitacicept，参见图 24 的 C。在 1000 nM 浓度药物处理的条件下，Anifrolumab 单药有一定的活性，而 B637302、B606401 融合蛋白的活性也明显优于 Anifrolumab，参见图 24 的 D。

表 15. IFN-α + BAFF + APRIL 诱导浆细胞生成结果

药物浓度(nM)	$CD27^+CD38^+$浆细胞数目									
	IgG1		Anifrolumab		Telitacicept		B637302		B606401	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
10	3370	297	4312	546	3906	230	1754	308	2275	416
100	3964	111	3703	198	2056	142	1391	259	1457	714
1000	3918	111	1633	297	1015	113	704	416	1054	136

实施例 21. PEG-IFN-α 诱导 PBMC 人源化小鼠 PD 实验

为检测 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 融合蛋白中 Anifrolumab 端的体内药效，我们利用 B-NDG 免疫缺陷小鼠，尾静脉注射 2×10^7 个 PBMC 细胞进行人源化，腹腔注射 0.6 μg PEG-IFN-α(PEGASYS®，Roche)进行诱导，在该模型中腹腔注射不同浓度的药物 Anifrolumab、B637302、B606401 以及 PBS 处理小鼠。第 2 h 取 PBMC，通过流式检测 pSTAT1(#9167, Cell Signaling Technology)水平，第 1、3 天时间点收集外周血分离 PBMC，通过 QPCR 检测 IFN-α 下游基因(如 ISG-15、IFI13、MX-1、HERC5 等)mRNA 表达水平，如图 25 的 A、图 25 的 B。

参见图 25 的 C，诱导后第 2 h 收集 PBMC 流式检测 pSTAT1 结果发现，B637302、B606401 与 Anifrolumab 抑制 hIFN-α 的活性相当。参见图 25 的 D 和 E，第 1、3、7 天 QPCR 检测 ISG 的 mRNA 表达水平也显示类似的结果，与前面体外的报告分子测试以及生物学活性实验结果一致。

实施例 22. BAFF + APRIL 诱导小鼠 PD 实验

为检测 Anifrolumab 与 TACI-19-16-BCMA 融合蛋白中 TACI-19-16-BCMA 端的体内药效，我们利用 C57/B6 小鼠，腹腔注射 3 μg BAFF(BAF-H52D4-1mg，AcroBio)和 0.5 μg APRIL(APL-H52D1-1mg, AcroBio)进行诱导，在该模型中腹腔注射不同浓度的药物 Telitacicept、B637302、B606401 以及 PBS 处理小鼠，第 4、7 天取外周血，通过 ELISA 检测血浆中 IgA 水平(图 26 的 A)。

结果显示，第 0、2 天 PBS 与给药组 IgA 差异尚不明显(结果未示出)，而第 4、7 天时 B637302、B606401 和 Telitacicept 与 PBS 对照组相比能够明显抑制 IgA 的产生，参见图 26 的 B 和图 26 的 C。并且，第 7 天的结果还显示在等摩尔给药的条件下，药效 B637302 > B606401 > Telitacicept，参见图 26 的 C，这与之前体外 BAFF 和 APRIL 的 ELISA 结合实验、体外生物学活性实验结果一致。

权利要求书

1. 融合蛋白，其包含：

(a) TACI 多肽和抗 IFNAR1 抗体或其抗原结合片段，或，

(b) TACI 多肽、BCMA 多肽和抗 IFNAR1 抗体或其抗原结合片段；

其中，所述 TACI 多肽包含 TACI 胞外区的 CRD1 和/或 CRD2；

优选地，所述 BCMA 多肽包含 BCMA 胞外区的 CRD1。

2. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中，

所述 TACI 多肽包含选自如下(1)-(6)任一项的多肽：

(1)SEQ ID NO：1 的第 68-105 位氨基酸残基或其变体；

(2)SEQ ID NO：1 或与其具有至少 95%序列同一性的多肽；

(3)SEQ ID NO：1 的第 33-67 位氨基酸残基；

(4)SEQ ID NO：1 的第 70-104 位氨基酸残基或其变体；

(5)SEQ ID NO：1 的第 30-110、69-111、69-112、13-118、或 33-104 位氨基酸残基或其变体；

(6)SEQ ID NO：1 的第 68-106、68-107 或 68-108 位氨基酸残基或其变体；

优选地，所述变体具有选自第 69、72、73、77、85、102 和 103 位中的一个或多个氨基酸突变；

更优选地，所述变体具有选自 69T 或 69R、72S、73E 或 73Q、77E、85T 或 85A、102A 或 102R、103Y 中的一个或多个氨基酸替换；

最优选地，所述变体具有选自如下任一的氨基酸替换或氨基酸替换的组合：

69T；72S；73E；73Q；77E；69R 和 85T；69R 和 85A；102A；69R，85T 和 102R；73E 和 77E；72S，73E 和 77E；69T 和 102A；69T 和 103Y；69T，102A 和 103Y；69T，73E，77E 和 102A；

氨基酸残基的编号是按照 SEQ ID NO：1 所示序列的自然顺序编号。

3. 根据权利要求 1-2 任一项所述的融合蛋白，其中所述 TACI 多肽包含选自 SEQ ID NO：1、2、6-29 任一所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 IFNAR1 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中，

所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：45-47 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，

所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO：48-50 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

5. 根据权利要求 4 所述的融合蛋白，其中：

所述重链可变区包含如 SEQ ID NO：43 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，

所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO：44 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

6. 根据前述权利要求任一项所述的融合蛋白，其含有免疫球蛋白的 Fc 区，优选为 IgG1 的 Fc 区，更优选为 SEQ ID NO：3 所示的 Fc 区。

7. 根据权利要求 6 所述的融合蛋白，所述 Fc 区包含一个或多个氨基酸突变，所述的氨基酸突变能够减少 Fc 与 FcR 的结合，优选能够减少 Fc 与 FcγR 的结合的突变，更优选为如下任一的氨基酸突变或氨基酸突变的组合：234A；235A；234F；235E；234F 和 235E；234A 和 235A；234F，235E 和 331S；

突变位点是根据 EU 编号系统定义。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的融合蛋白，其中所述抗 IFNAR1 抗体包含重链和轻链，所述重链包含如 SEQ ID NO：55 或 61 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列，所述轻链包含如 SEQ ID NO：54 所示或与之具有至少 90%序列同一性的氨基酸序列。

9. 根据前述权利要求任一项所述的融合蛋白，其包含如下(I)-(VIII)任一所示的多肽链：

(I)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(II)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(III)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(IV)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽]；

(V)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

(VI)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽 1]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 2]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(VII)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[抗体

重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽 2]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(VIII)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽 1]-[连接子 3]c-[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

其中，

-表示肽键，

连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4 可以相同，也可以不同；

所述 TACI 多肽、所述 TACI 多肽 1 和所述 TACI 多肽 2 各自独立地选自权利要求 1-3 中任一项所限定的 TACI 多肽，TACI 多肽 1 和 TACI 多肽 2 可以相同也可以不同；

a、b、c、d 分别独立地为 0 或 1；

所述抗体是指权利要求 4-5 中任一项所限定的抗 IFNAR1 抗体；

优选地，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4 各自独立地为$(GxS)_y$，其中，x 是 1-5 的整数，y 是 1-6 的整数；

更优选地，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4 的氨基酸序列各自独立地如 SEQ ID NO：39-41 任一所示。

10. 根据前述权利要求任一项所述的融合蛋白，其包含：

两条相同的如 SEQ ID NO：51-53、62 任一所示的第一多肽链，和两条相同的如 SEQ ID NO：54 所示的第二多肽链； 或

两条相同的如 SEQ ID NO：55 所示的第一多肽链，和两条相同的如 SEQ ID NO：56-60 任一所示的第二多肽链；或

两条相同的如 SEQ ID NO：61 所示的第一多肽链，和两条相同的如 SEQ ID NO：56-60 任一所示的第二多肽链。

11. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其中所述 BCMA 多肽包含 SEQ ID NO：30 的第 7-41 位所示的氨基酸残基；

优选地，所述 BCMA 多肽的氨基酸序列包含选自 SEQ ID NO：30、67、68 任一所示的序列。

12. 根据权利要求 1-11 任一项所述的融合蛋白，其包含如下(i)-(viii)任一所示的多肽链：

(i)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(ii)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(iii)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI

多肽和 BCMA 多肽结构域]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(iv)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]；

(v)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]-[连接子 1]a-[抗体重链]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]；

(vi)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]-[连接子 3]c-[抗体轻链]；

(vii)第一多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]-[连接子 1]a-[抗体重链]-[连接子 2]b-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]，和第二多肽链，其为抗体轻链；

(viii)第一多肽链，其为抗体重链，和第二多肽链，其从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]-[连接子 3]c-[抗体轻链]-[连接子 4]d-[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]；

其中，

所述[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域]、所述[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]和所述[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]从 N 端到 C 端依次为：[TACI 多肽]-[连接子 5]e-[BCMA 多肽]，或为：[BCMA 多肽]-[连接子 5]e-[TACI 多肽]，

所述[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 1]和所述[TACI 多肽和 BCMA 多肽结构域 2]中的 TACI 多肽可以相同也可以不同，所述 BCMA 多肽结构域 1 和所述 BCMA 多肽结构域 2 可以相同也可以不同；

所述 TACI 多肽选自权利要求 1-3 中任一项所限定的 TACI 多肽，所述 BCMA 多肽选自权利要求 1 或 11 中所限定的 BCMA 多肽，所述抗体选自权利要求 4-8 中任一项所限定的抗 IFNAR1 抗体；

其中：

-表示肽键，

所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5 可以相同，也可以不同；a、b、c、d、e 分别独立地为 0 或 1；

优选地，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5 各自独立地为$(GxS)_y$，其中，x 是 1-5 的整数，y 是 1-6 的整数；

更优选地，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5 的氨基酸序列各自独立地如 SEQ ID NO：39-41 任一所示。

13. 根据权利要求 1-12 任一项所述的融合蛋白，其包含两条相同的如 SEQ ID NO：55 所示的第一多肽链，和两条相同的如 SEQ ID NO：63-66、71、72 任一所

示的第二多肽链；

其包含两条相同的如 SEQ ID NO：61 所示的第一多肽链，和两条相同的如 SEQ ID NO：63-66、71、72 任一所示的第二多肽链；或

其包含两条相同的如 SEQ ID NO：73 或 74 所示的第一多肽链，和两条相同的如 SEQ ID NO：54 任一所示的第二多肽链。

14. 融合蛋白，其包含 TACI 多肽和 BCMA 多肽，其中：

所述 TACI 多肽包含 TACI 胞外结构域的 CRD1 和/或 CRD2，

所述 BCMA 多肽包含 BCMA 胞外结构域的 CRD1；

优选地，所述 TACI 多肽和所述 BCMA 多肽直接地或通过连接子相连接。

15. 根据权利要求 14 所述的融合蛋白，其中，所述 TACI 多肽包含选自如下(1)-(6)任一项的多肽：

(1)SEQ ID NO：1 的第 68-105 位氨基酸残基或其变体；

(2)SEQ ID NO：1 或与其具有至少 95%序列同一性的多肽；

(3)SEQ ID NO：1 的第 33-67 位氨基酸残基；

(4)SEQ ID NO：1 的第 70-104 位氨基酸残基或其变体；

(5)SEQ ID NO：1 的第 30-110、69-111、69-112、13-118 或 33-104 位氨基酸残基或其变体；

(6)SEQ ID NO：1 的第 68-106、68-107 或 68-108 位氨基酸残基或其变体；

优选地，所述变体具有选自第 69、72、73、77、85、102 和 103 位中的一个或多个氨基酸突变；

更优选地，所述变体具有选自 69T 或 69R、72S、73E 或 73Q、77E、85T 或 85A、102A 或 102R、103Y 中的一个或多个氨基酸替换；

最优选地，所述变体具有选自如下任一的氨基酸替换或氨基酸替换的组合：69T；72S；73E；73Q；77E；69R 和 85T；69R 和 85A；102A；69R，85T 和 102R；73E 和 77E；72S，73E 和 77E；69T 和 102A；69T 和 103Y；69T，102A 和 103Y；69T，73E，77E 和 102A；

氨基酸残基的编号是按照 SEQ ID NO：1 所示序列的自然顺序编号。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的融合蛋白，其中所述 TACI 多肽包含选自 SEQ ID NO：1、2、6-29 任一所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求 14-16 任一项所述的融合蛋白，其中所述 BCMA 多肽包含 SEQ ID NO：30 的第 7-41 位所示的氨基酸残基。

18. 根据权利要求 17 所述的融合蛋白，其中，所述 BCMA 多肽的氨基酸序列

包含选自 SEQ ID NO：30、67、68 任一所示的序列。

19. 根据权利要求 14-18 任一项所述的融合蛋白，其还含有免疫球蛋白的 Fc 区，优选为 IgG1 的 Fc 区，更优选为 SEQ ID NO：3 所示的 Fc 区。

20. 根据权利要求 19 所述的融合蛋白，所述 Fc 区包含一个或多个氨基酸突变，所述的氨基酸突变能够减少 Fc 与 FcR 的结合，优选能够减少 Fc 与 FcγR 的结合的突变，更优选为如下任一的氨基酸突变或氨基酸突变的组合：234A；235A；234F；235E；234F 和 235E；234A 和 235A；234F，235E 和 331S；

突变位点是根据 EU 编号系统定义。

21. 根据权利要求 14-20 任一所述的融合蛋白，其包含如下(I)-(VIII)任一所示的多肽链：

(I)[TACI 多肽]-[连接子 1]a-[BCMA 多肽]-[连接子 2]b-[Fc 区]e；

(II)[BCMA 多肽]-[连接子 1]a-[TACI 多肽]-[连接子 2]b-[Fc 区]e；

(III)[Fc 区]e-[连接子 3]c-[TACI 多肽]-[连接子 4]d-[BCMA 多肽]；

(IV)[Fc 区]e-[连接子 3]c-[BCMA 多肽]-[连接子 4]d-[TACI 多肽]；

(V)[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[BCMA 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子 3]c-[TACI 多肽 2]-[连接子 4]d-[BCMA 多肽 2]；

(VI)[BCMA 多肽 1]-[连接子 1]a-[TACI 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子 3]c-[BCMA 多肽 2]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

(VII)[TACI 多肽 1]-[连接子 1]a-[BCMA 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子 3]c-[BCMA 多肽 2]-[连接子 4]d-[TACI 多肽 2]；

(VIII)[BCMA 多肽 1]-[连接子 1]a-[TACI 多肽 1]-[连接子 2]b-[Fc 区]e-[连接子 3]c-[TACI 多肽 2]-[连接子 4]d-[BCMA 多肽 2]；

其中，

-表示肽键，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3 和连接子 4 可以相同，也可以不同；

所述 TACI 多肽 1 和所述 TACI 多肽 2 选自权利要求 14-16 中任一项所限定的 TACI 多肽，所述 TACI 多肽 1 和所述 TACI 多肽 2 可以相同也可以不同；

所述 BCMA 多肽 1 和所述 BCMA 多肽 2 选自权利要求 14-18 中任一项所限定的 BCMA 多肽，所述 BCMA 多肽 1 和所述 BCMA 多肽 2 可以相同也可以不同；

a、b、c、d、e 分别独立地为 0 或 1；

优选地，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4 各自独立地为$(GxS)_y$，其中，x 是 1-5 的整数，y 是 1-6 的整数；

更优选地，所述连接子 1、连接子 2、连接子 3、连接子 4、连接子 5 的氨基

酸序列各自独立地如 SEQ ID NO：39-41 任一所示。

22. 根据权利要求 14-21 任一项所述的融合蛋白，其含有 SEQ ID NO：31-38、69、70 任一所示的氨基酸序列。

23. 根据权利要求 14-22 任一项所述的融合蛋白，其为二聚体。

24. 复合物，其含有：

权利要求 1-3 任一项中所限定的 TACI 多肽、权利要求 4-8 任一项中所限定的抗 IFNAR1 抗体，和权利要求 1 或 11 中所限定的 BCMA 多肽；或者，

其含有权利要求 14-23 中任一项所限定的 TACI 多肽，和权利要求 14-23 中任一项所限定的 BCMA 多肽。

25. 药物组合物，其含有：

权利要求 1-23 中任一项所述的融合蛋白，或权利要求 24 所述的复合物，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

26. 多核苷酸，其编码：

权利要求 1-23 中任一项所述的融合蛋白、或

权利要求 24 所述的复合物。

27. 宿主细胞，其包含或表达权利要求 26 所述的多核苷酸。

28. 治疗或改善疾病或病症的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1-23 中任一项所述的融合蛋白、权利要求 24 所述的复合物、权利要求 25 所述的药物组合物或权利要求 26 所述的多核苷酸的步骤；

优选地，所述疾病或病症为 B 细胞障碍或自身免疫性疾病；

更优选地，所述 B 细胞障碍或自身免疫性疾病是与 TACI 和/或 BCMA 表达相关的疾病或病症；

最优选地，所述自身免疫性疾病为系统性红斑狼疮。

29. 制备权利要求 1-23 中任一项所述的融合蛋白、或权利要求 24 所述的复合物的方法，包括培养权利要求 27 所述的宿主细胞，表达所述融合蛋白或复合物；可选地，包括分离或纯化所述融合蛋白或复合物。

说明书附图

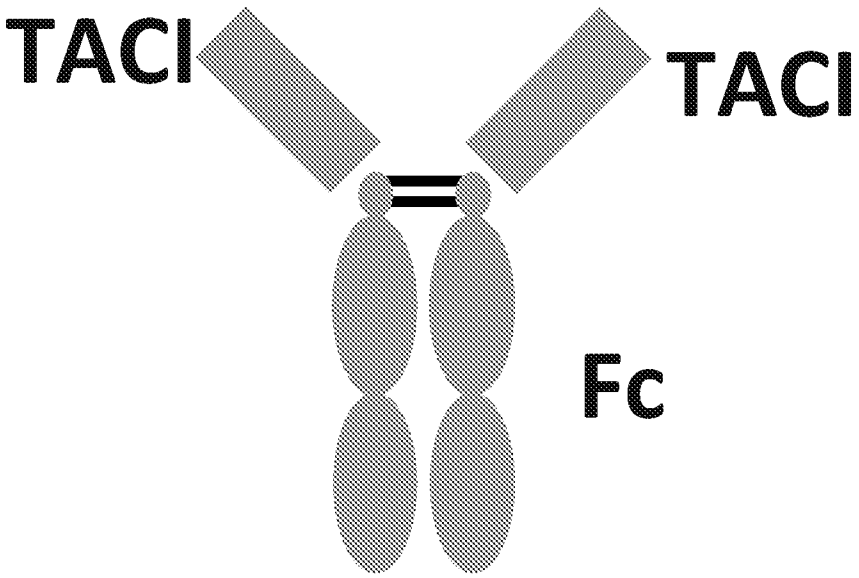


图 1

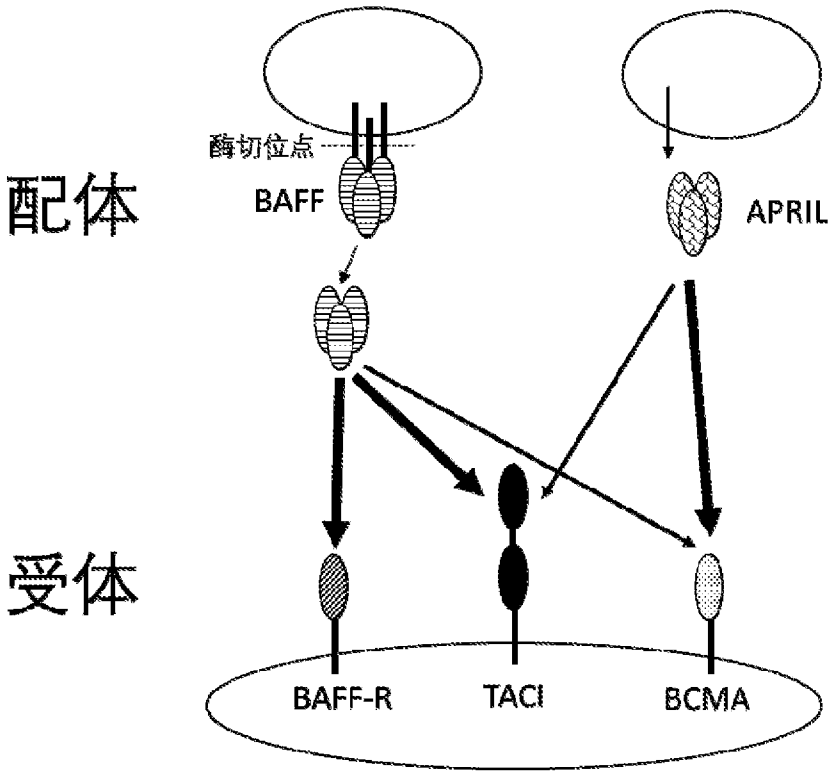


图 2

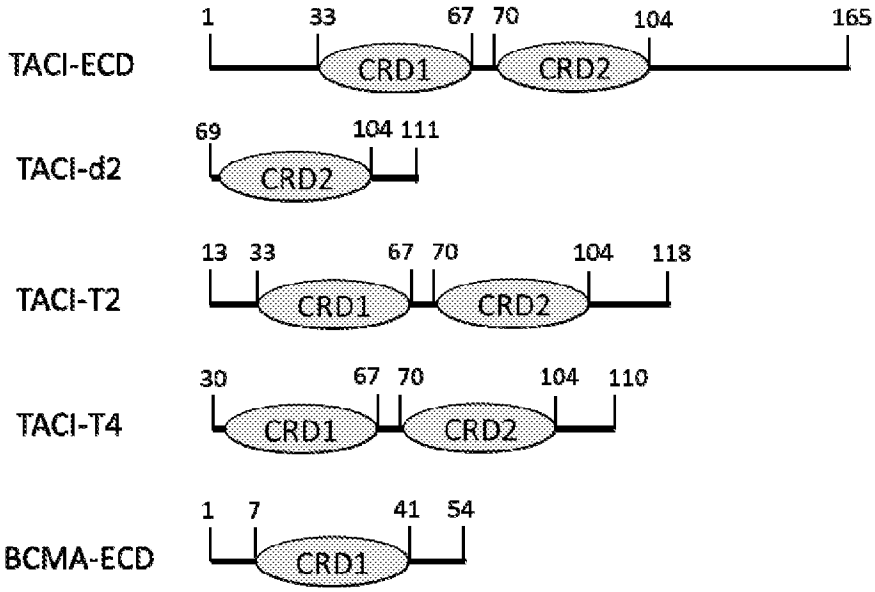

TACI-ECD
1
33
67
70
104
165
CRD1
CRD2
TACI-d2
69
104
111
CRD2
TACI-T2
13
33
67
70
104
118
CRD1
CRD2
TACI-T4
30
67
70
104
110
CRD1
CRD2
BCMA-ECD
1
7
41
54
CRD1

图 3

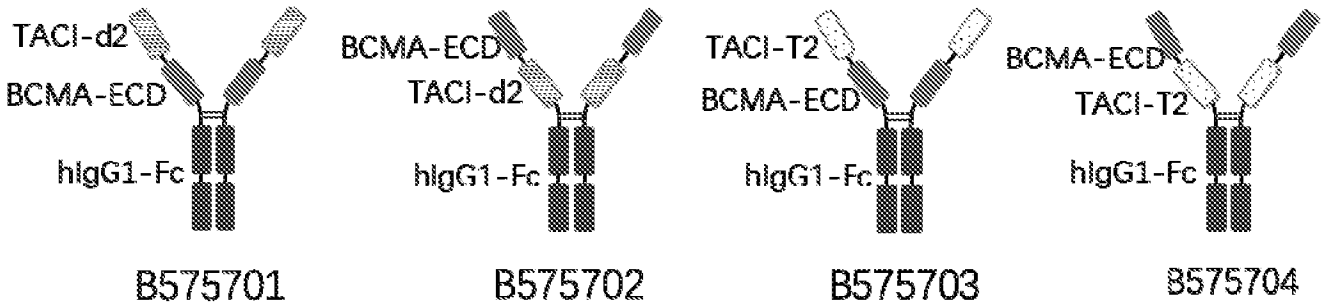

TACI-d2
BCMA-ECD
hIgG1-Fc
B575701
BCMA-ECD
TACI-d2
hIgG1-Fc
B575702
TACI-T2
BCMA-ECD
hIgG1-Fc
B575703
BCMA-ECD
TACI-T2
hIgG1-Fc
B575704

图 4

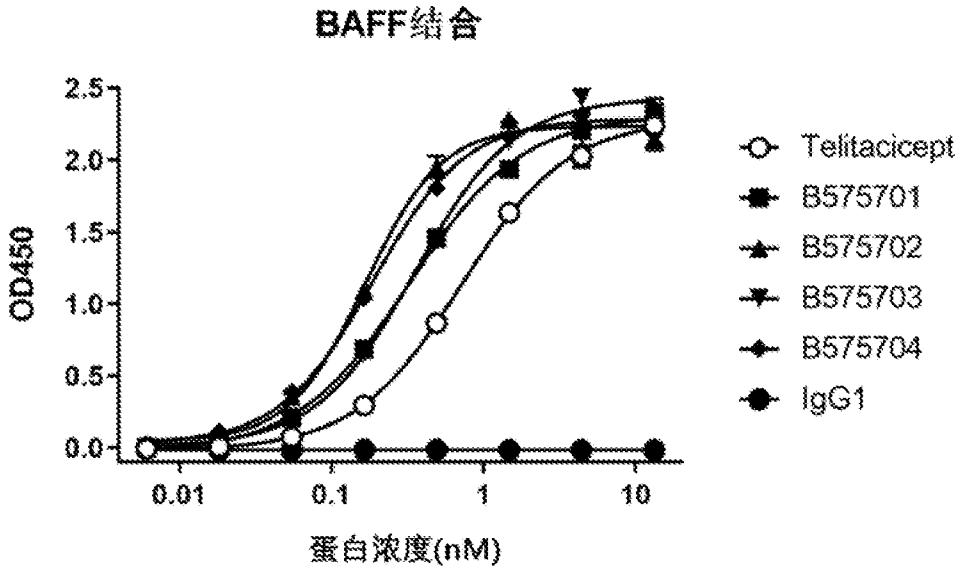

BAFF结合
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B575701
B575702
B575703
B575704
IgG1

图 5

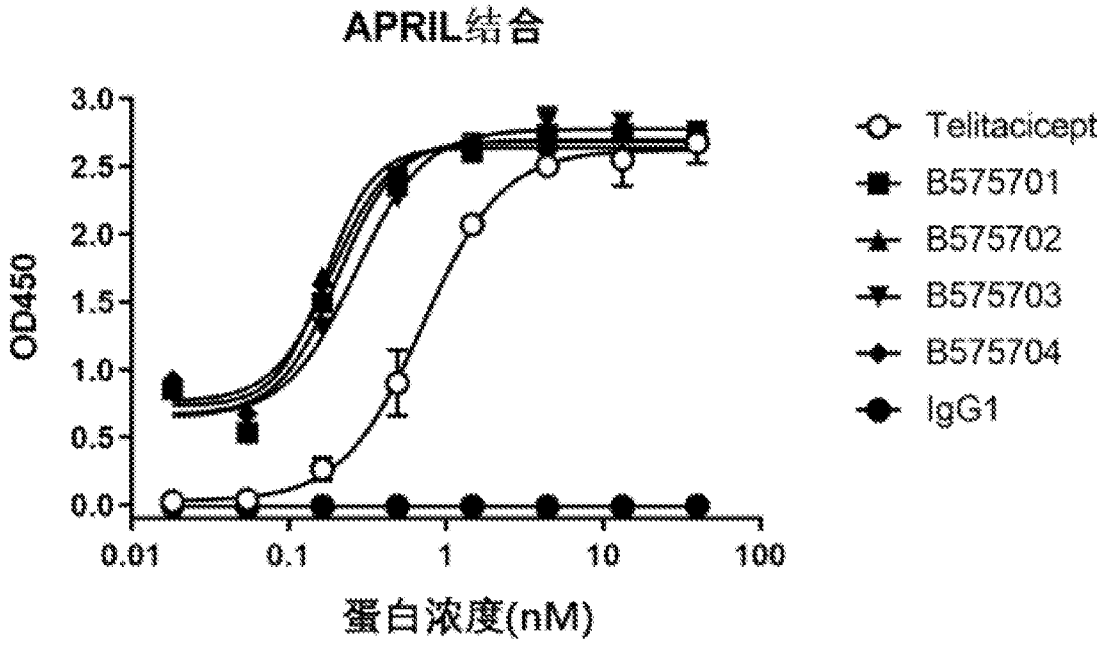

APRIL结合
OD450
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B575701
B575702
B575703
B575704
IgG1

图 6

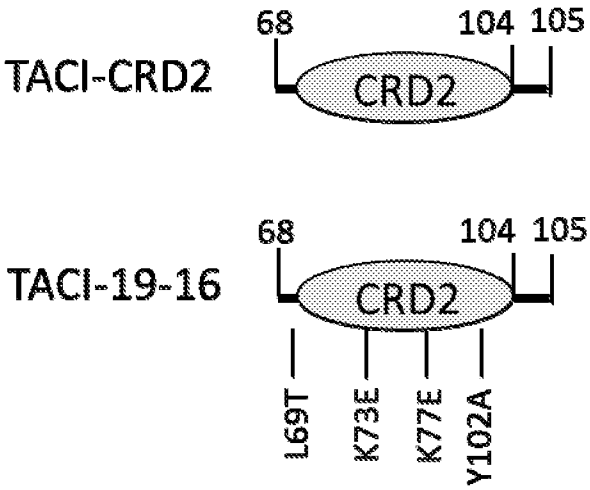

TACI-CRD2
68
104
105
CRD2
TACI-19-16
68
104
105
CRD2
L69T
K73E
K77E
Y102A

图 7

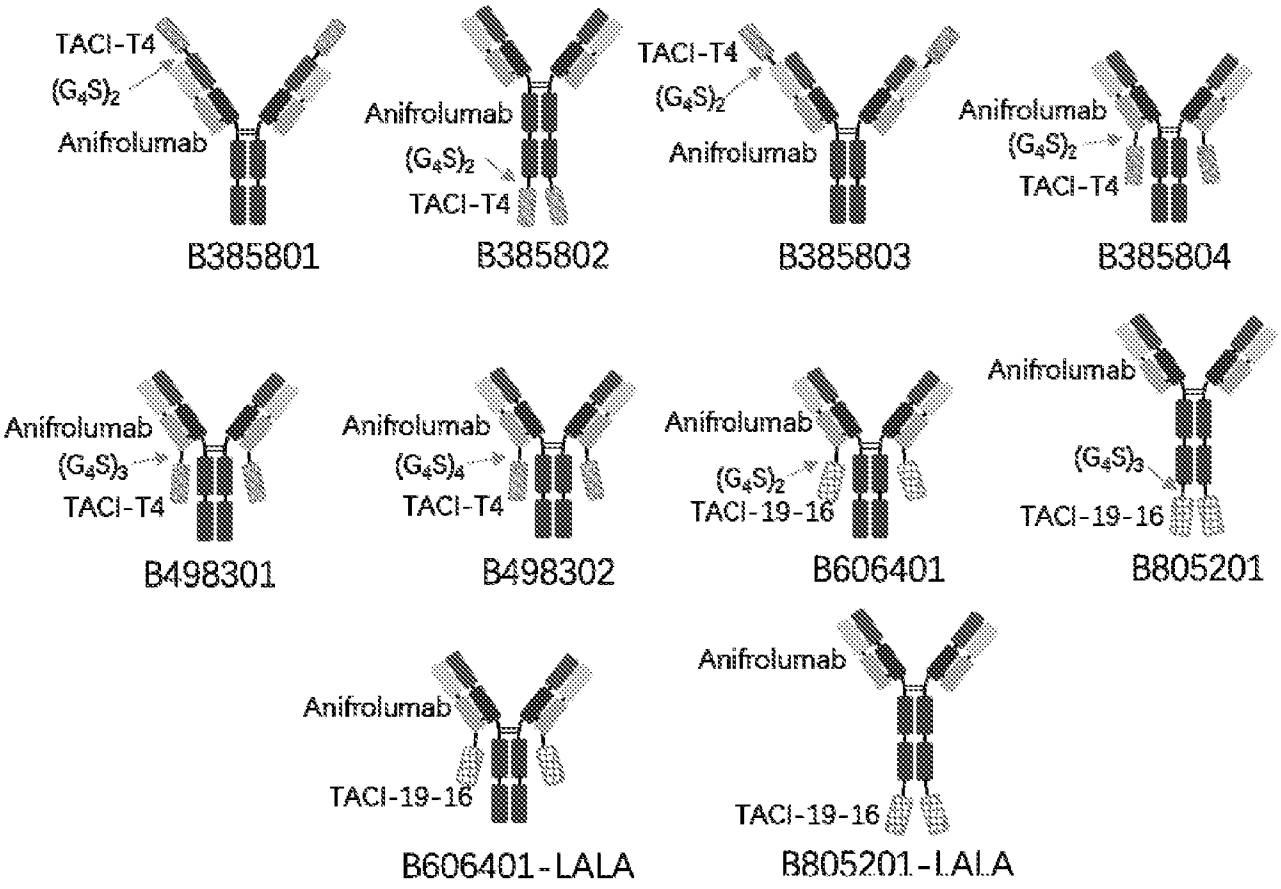

TACI-T4
(G4S)2
Anifrolumab
B385801
Anifrolumab
(G4S)2
TACI-T4
B385802
TACI-T4
(G4S)2
Anifrolumab
B385803
Anifrolumab
(G4S)2
TACI-T4
B385804
Anifrolumab
(G4S)3
TACI-T4
B498301
Anifrolumab
(G4S)4
TACI-T4
B498302
Anifrolumab
(G4S)2
TACI-19-16
B606401
Anifrolumab
(G4S)3
TACI-19-16
B805201
Anifrolumab
TACI-19-16
B606401-LALA
Anifrolumab
TACI-19-16
B805201-LALA

图 8

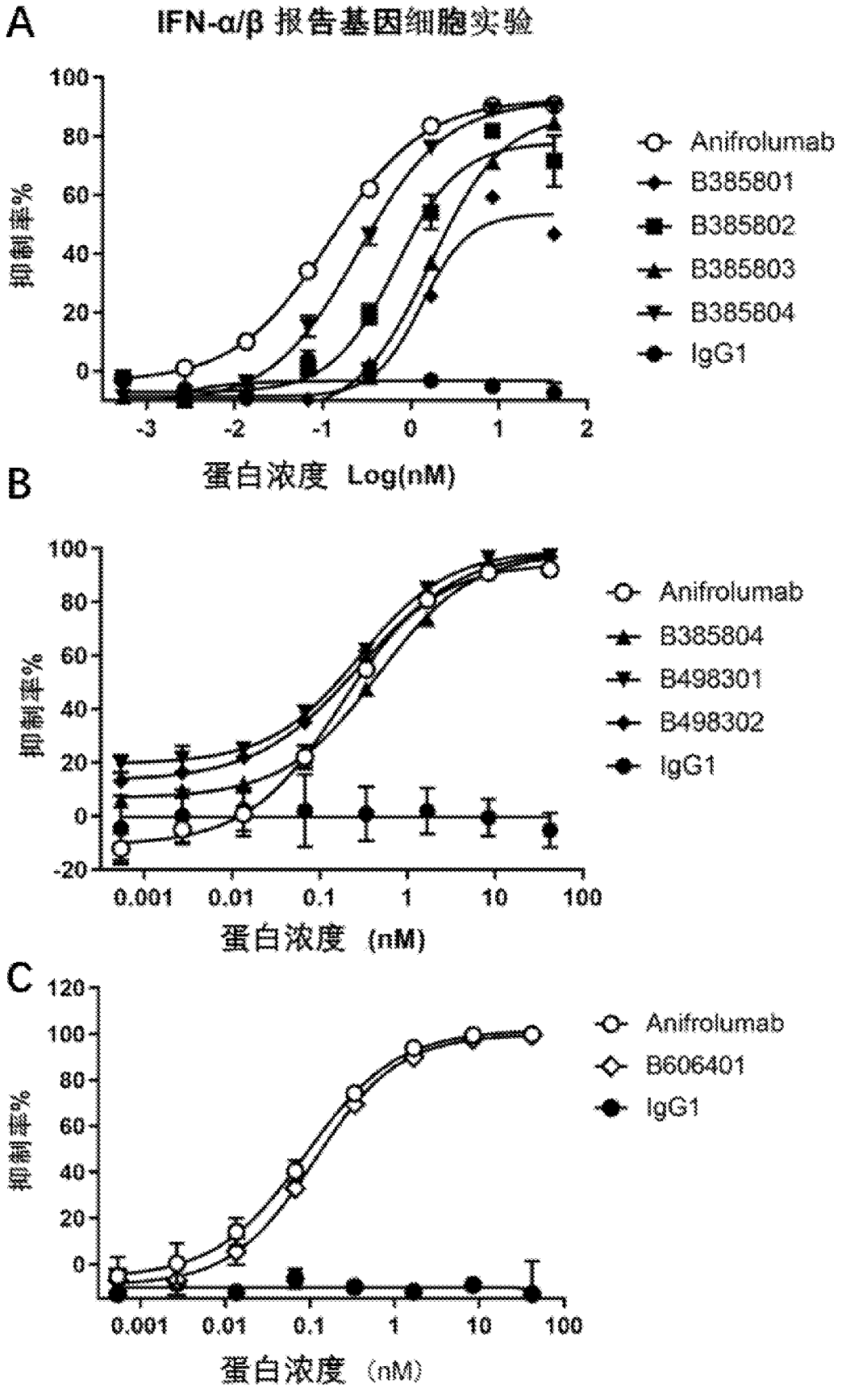

A
IFN-α/β 报告基因细胞实验
抑制率%
蛋白浓度 Log(nM)
Anifrolumab
B385801
B385802
B385803
B385804
IgG1
B
抑制率%
蛋白浓度 (nM)
Anifrolumab
B385804
B498301
B498302
IgG1
C
抑制率%
蛋白浓度 (nM)
Anifrolumab
B606401
IgG1

图 9

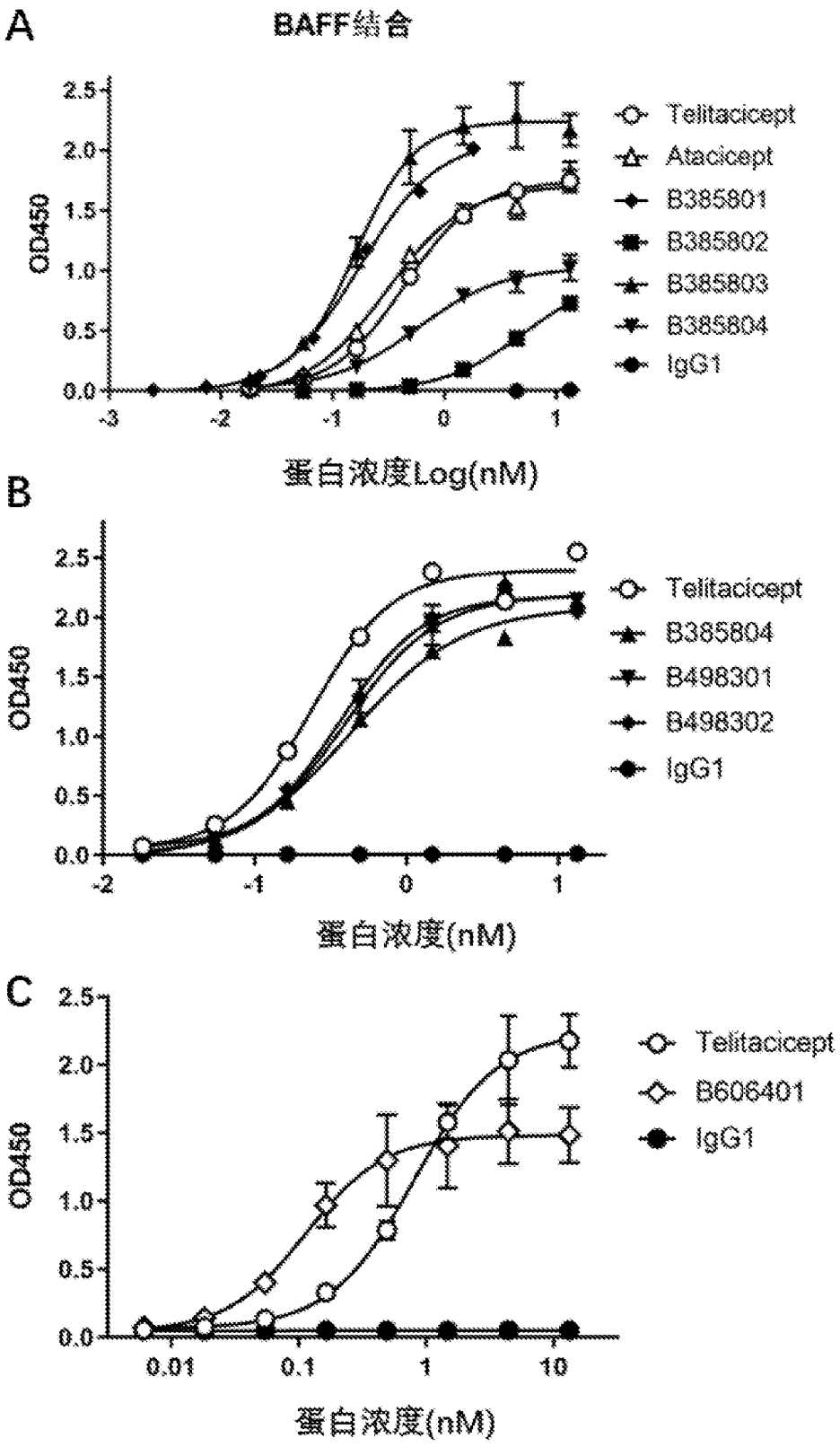

A
BAFF结合
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-3
-2
-1
0
1
蛋白浓度Log(nM)
Telitacicept
Atacicept
B385801
B385802
B385803
B385804
IgG1
B
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-2
-1
0
1
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B385804
B498301
B498302
IgG1
C
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B606401
IgG1

图 10

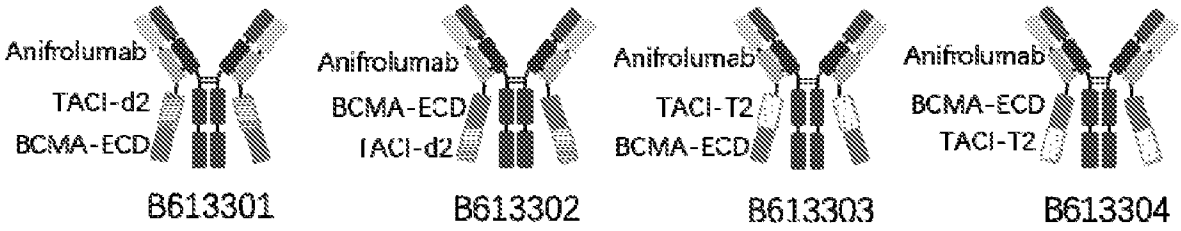

Anifrolumab
TACI-d2
BCMA-ECD
B613301
Anifrolumab
BCMA-ECD
TACI-d2
B613302
Anifrolumab
TACI-T2
BCMA-ECD
B613303
Anifrolumab
BCMA-ECD
TACI-T2
B613304

图 11

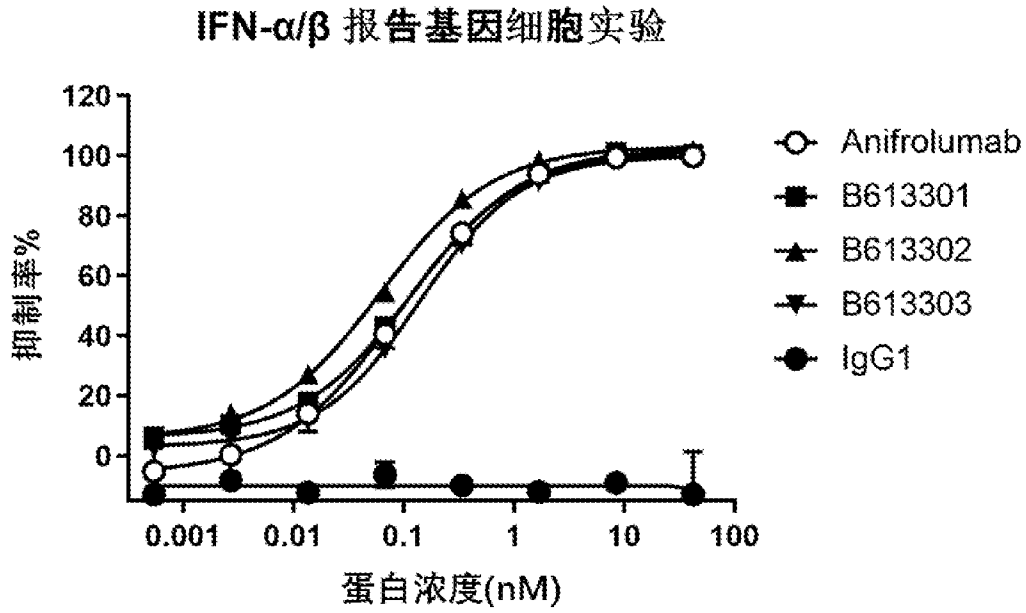

IFN-α/β 报告基因细胞实验
抑制率%
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
蛋白浓度(nM)
Anifrolumab
B613301
B613302
B613303
IgG1

图 12

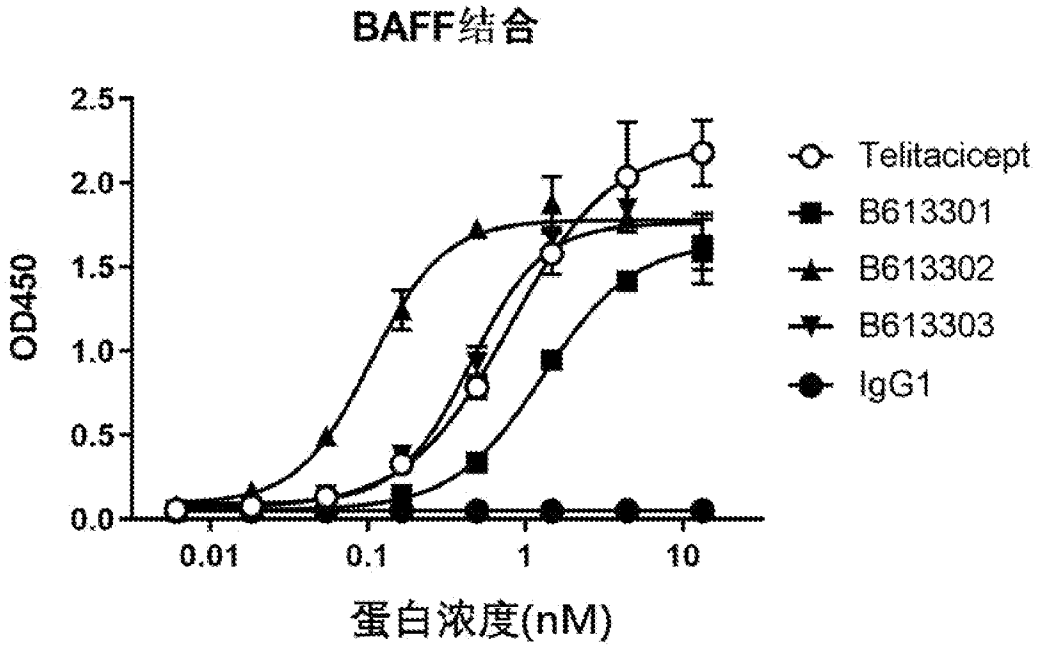

BAFF结合
OD450
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B613301
B613302
B613303
IgG1

图 13

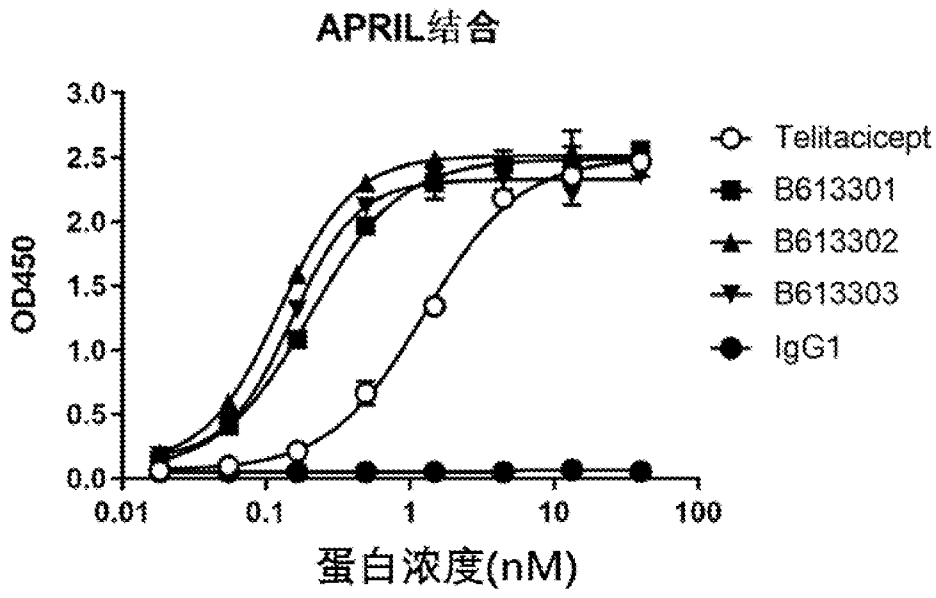

APRIL结合
OD450
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B613301
B613302
B613303
IgG1

图 14

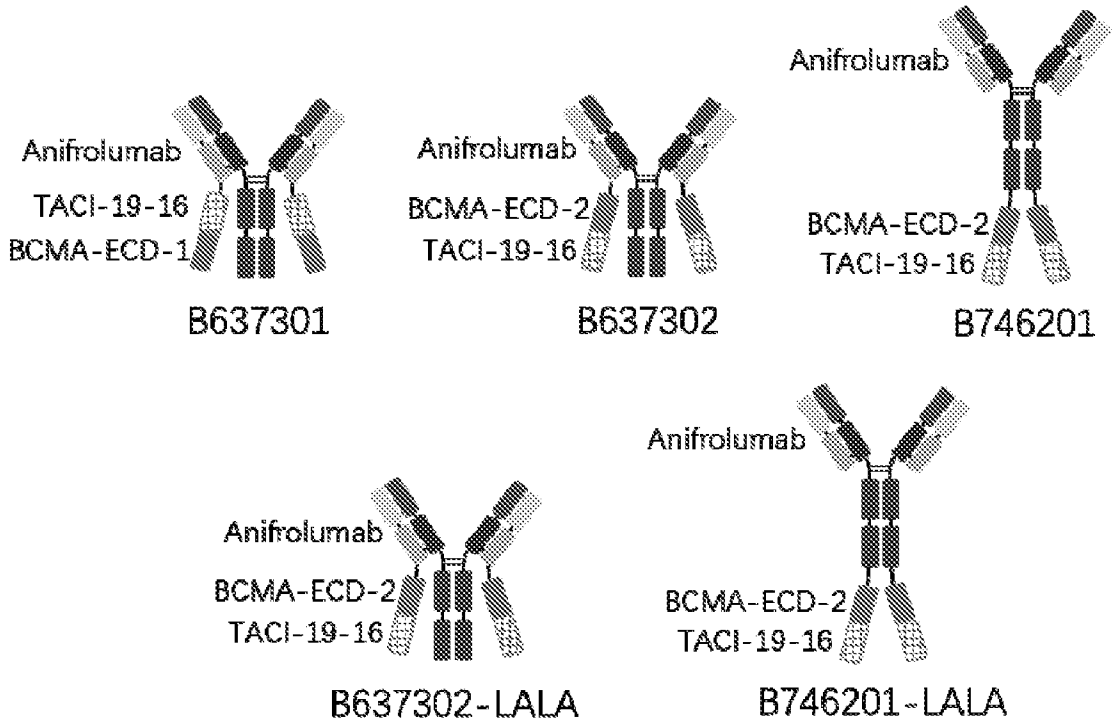

Anifrolumab
TACI-19-16
BCMA-ECD-1
B637301
Anifrolumab
BCMA-ECD-2
TACI-19-16
B637302
Anifrolumab
BCMA-ECD-2
TACI-19-16
B746201
Anifrolumab
BCMA-ECD-2
TACI-19-16
B637302-LALA
Anifrolumab
BCMA-ECD-2
TACI-19-16
B746201-LALA

图 15

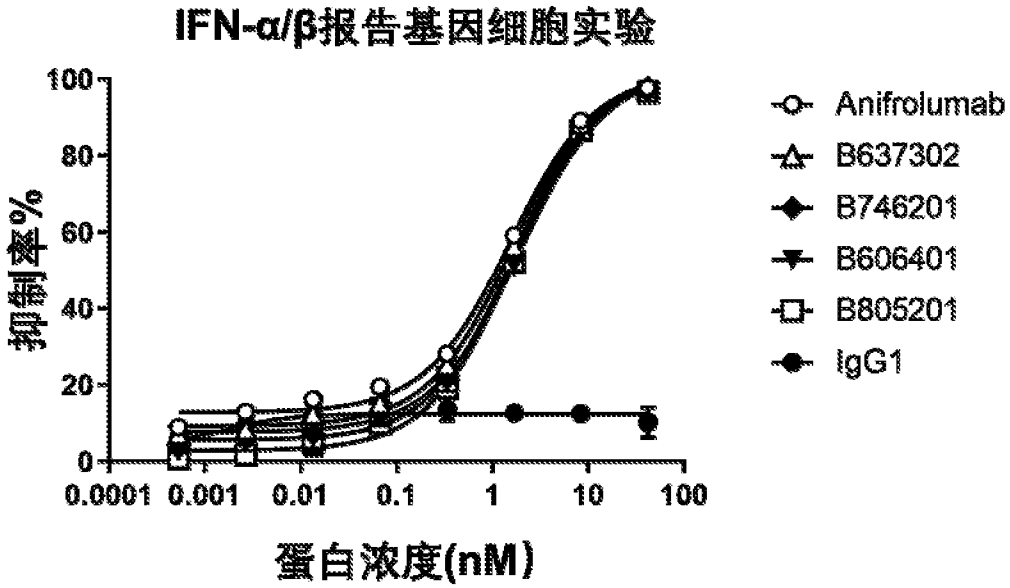

IFN-α/β报告基因细胞实验
抑制率%
100
80
60
40
20
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
蛋白浓度(nM)
Anifrolumab
B637302
B746201
B606401
B805201
IgG1

图 16

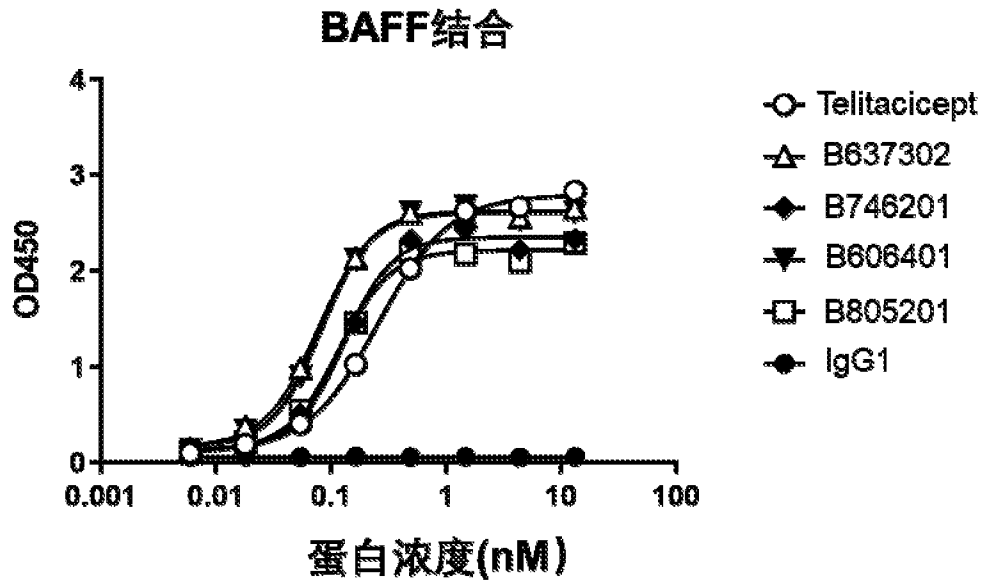

BAFF结合
OD450
0
1
2
3
4
0.001
0.01
0.1
1
10
100
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B637302
B746201
B606401
B805201
IgG1

图 17

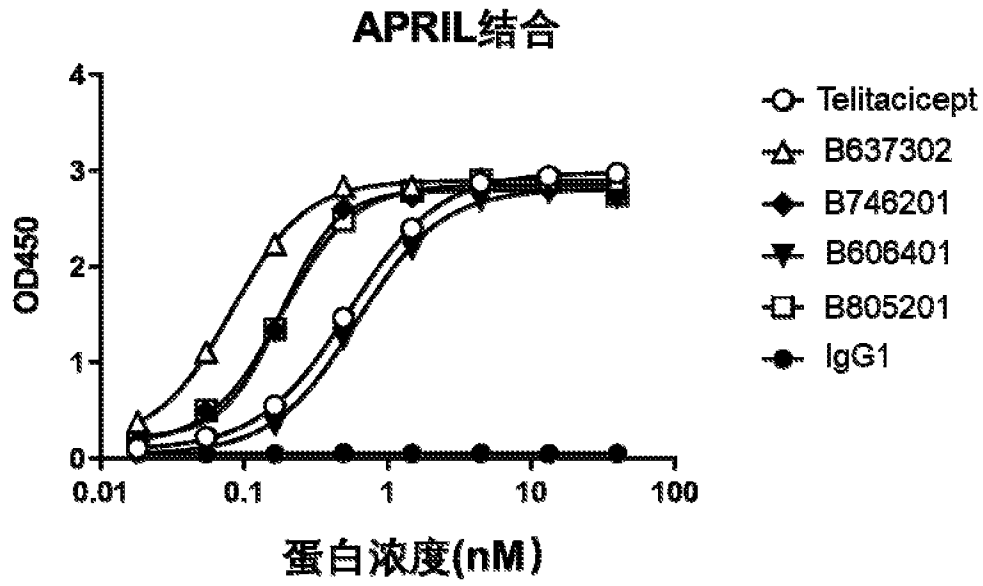

APRIL结合
OD450
0
1
2
3
4
0.01
0.1
1
10
100
蛋白浓度(nM)
Telitacicept
B637302
B746201
B606401
B805201
IgG1

图 18

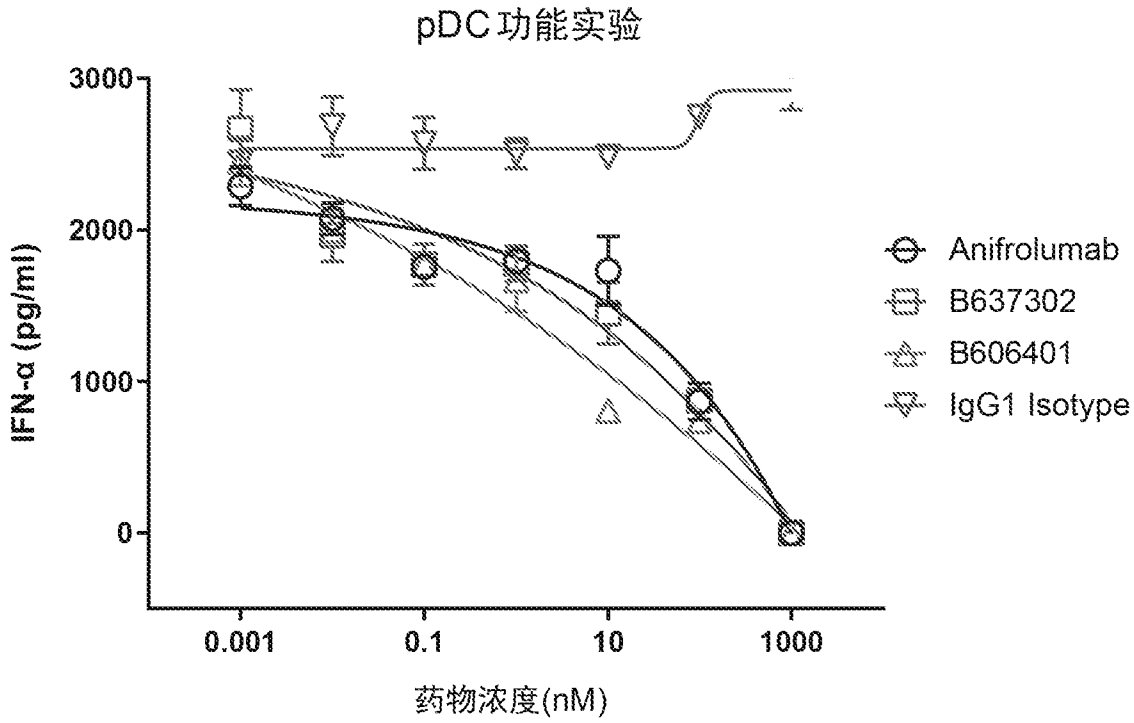

pDC功能实验
IFN-α (pg/ml)
3000
2000
1000
0
0.001
0.1
10
1000
药物浓度(nM)
Anifrolumab
B637302
B606401
IgG1 Isotype

图 19

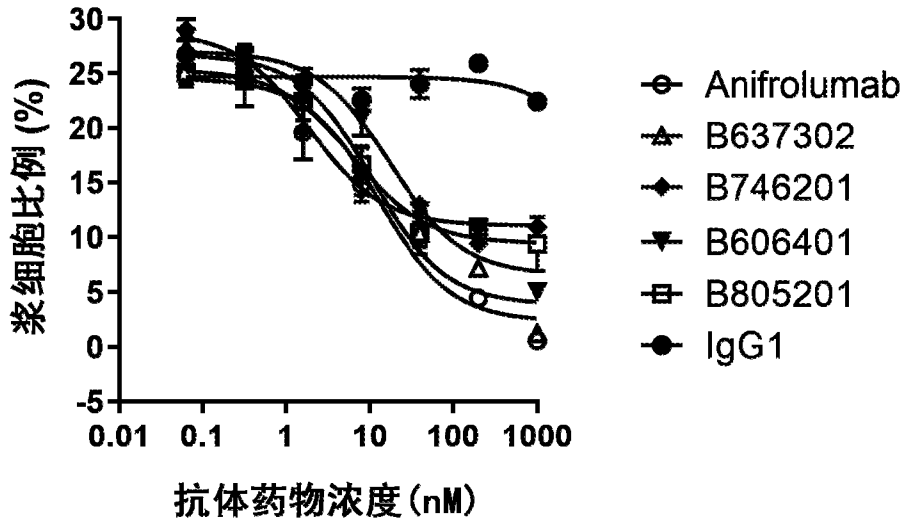

浆细胞比例 (%)
30
25
20
15
10
5
0
-5
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗体药物浓度(nM)
Anifrolumab
B637302
B746201
B606401
B805201
IgG1

图 20

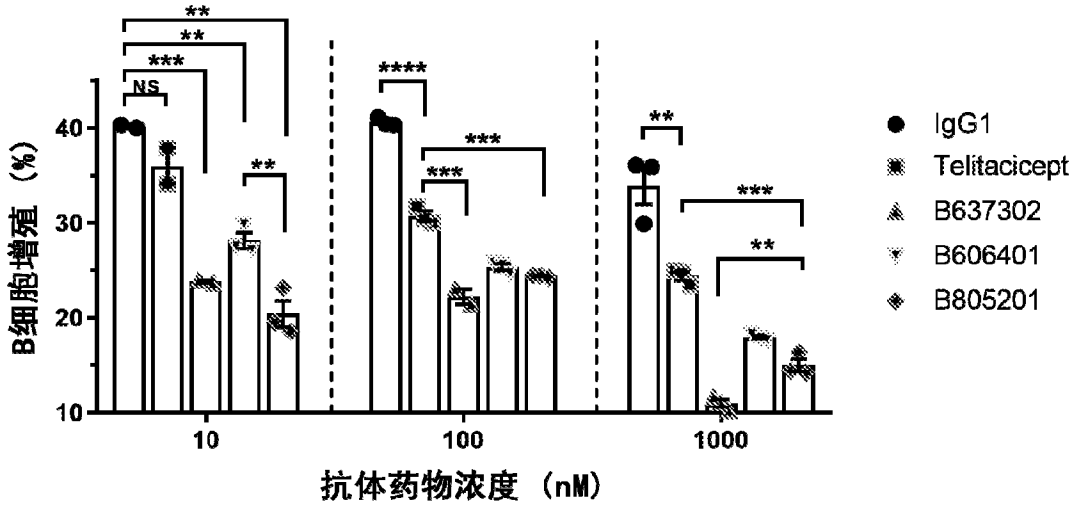

B细胞增殖（%）
40
30
20
10
NS
**
***
****
10
100
1000
抗体药物浓度（nM）
IgG1
Telitacicept
B637302
B606401
B805201

图 21

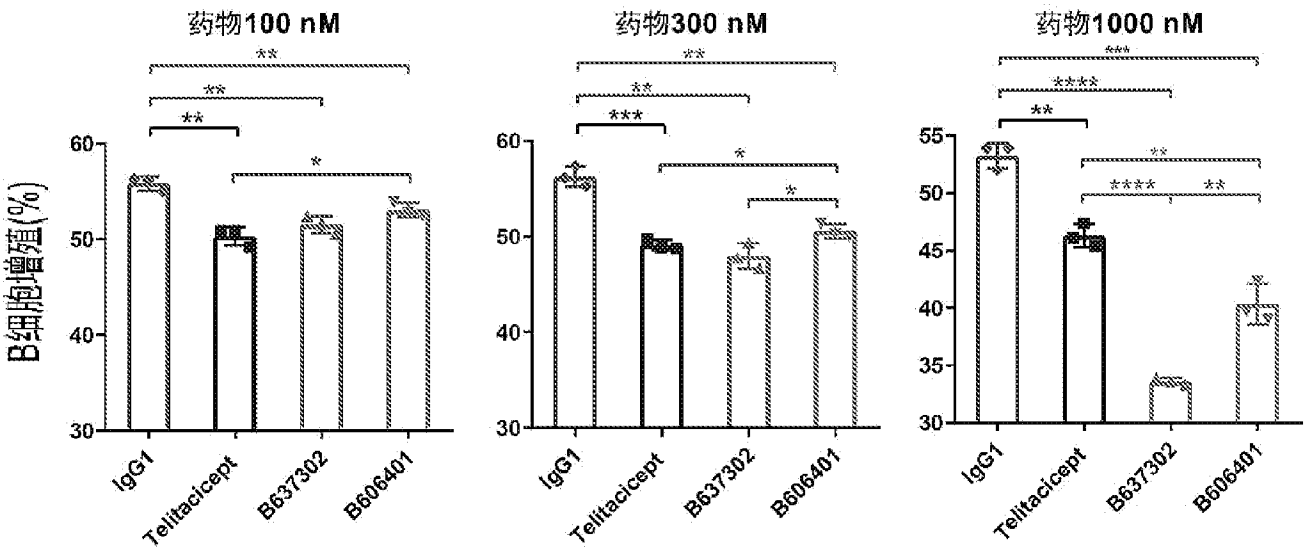

药物100 nM
药物300 nM
药物1000 nM
B细胞增殖(%)
IgG1
Telitacicept
B637302
B606401

图 22

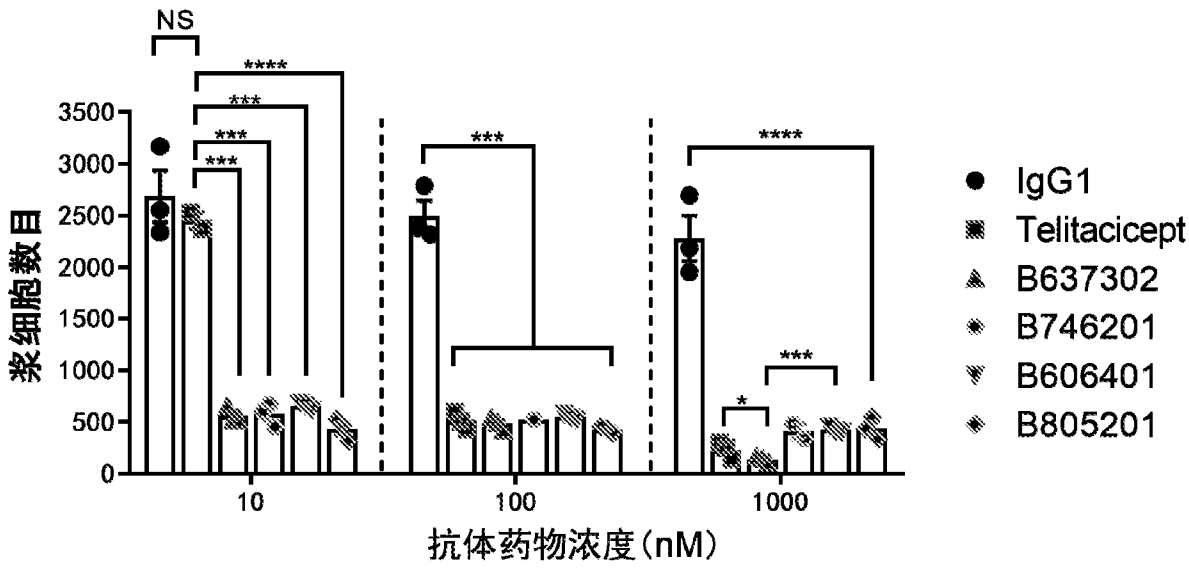

NS
****
***
***
***
***
****
***
*
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
浆细胞数目
10
100
1000
抗体药物浓度(nM)
IgG1
Telitacicept
B637302
B746201
B606401
B805201

图 23

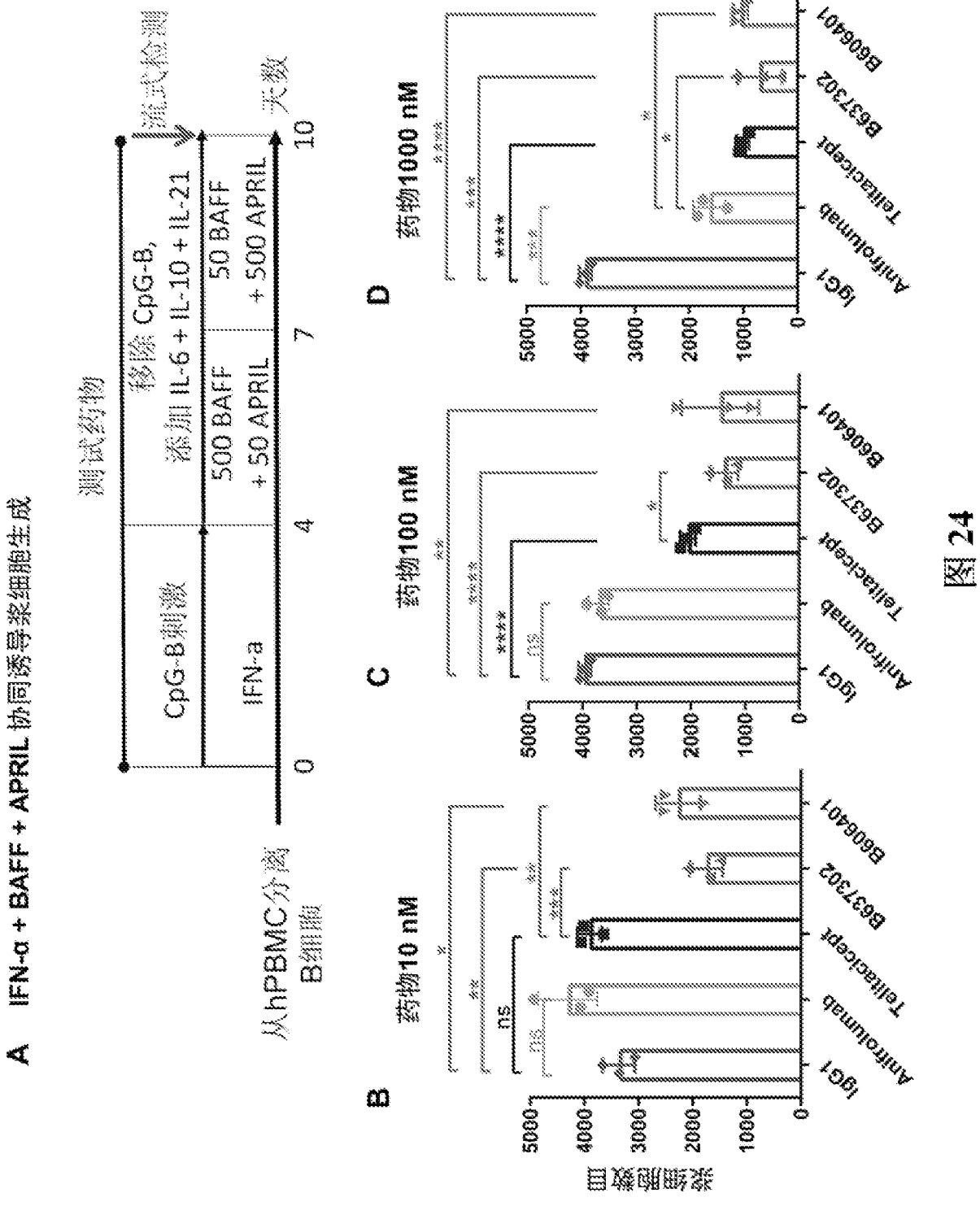

A IFN-α + BAFF + APRIL 协同诱导浆细胞生成
测试药物
流式检测
移除 CpG-B,
添加 IL-6 + IL-10 + IL-21
CpG-B刺激
IFN-a
500 BAFF
+ 50 APRIL
50 BAFF
+ 500 APRIL
天数
0
4
7
10
从hPBMC分离
B细胞
B
药物10 nM
C
药物100 nM
D
药物1000 nM
浆细胞数
IgG1
Anifrolumab
Telitacicept
B637302
B606401
ns
*
**
***
****

图 24

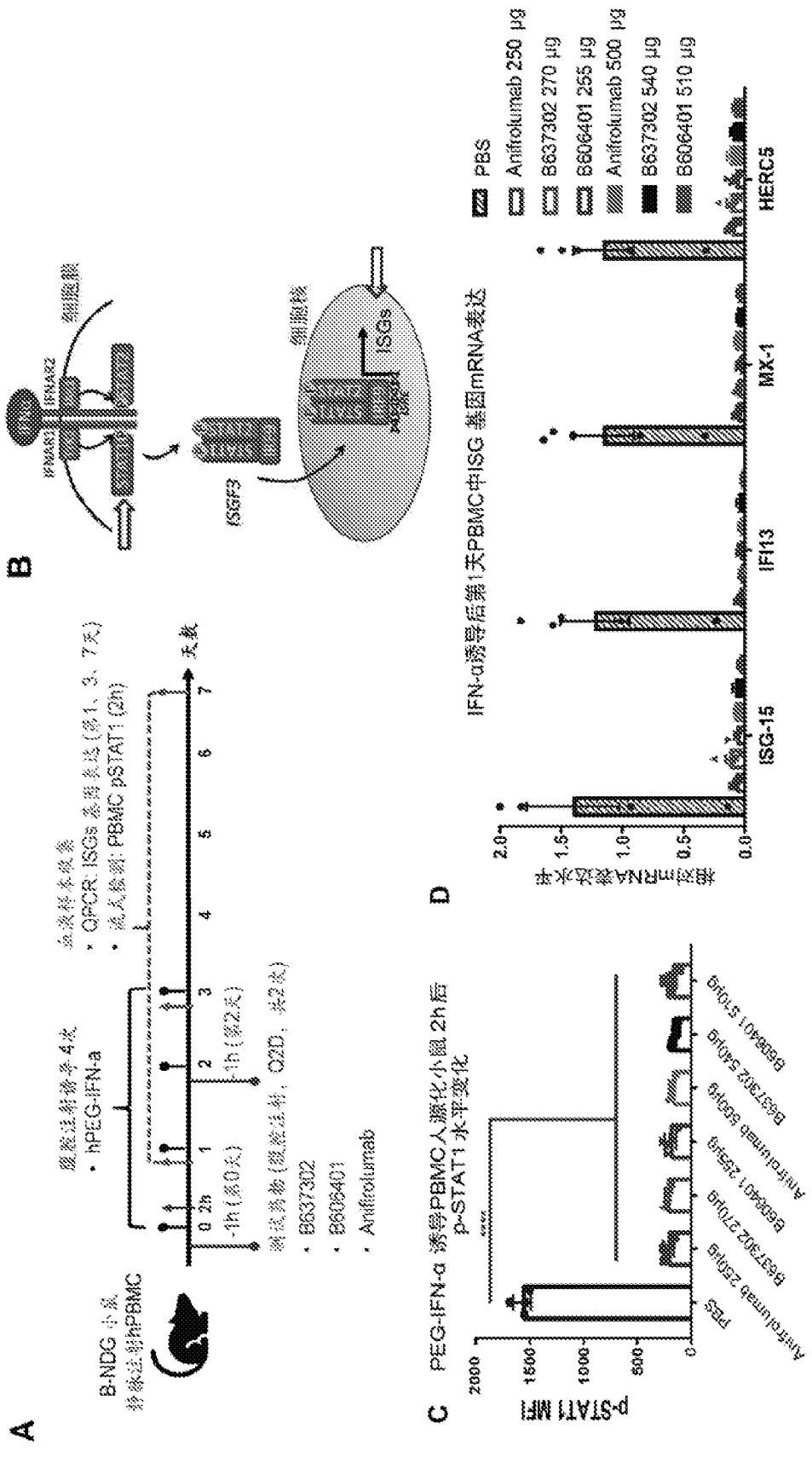

A
B-NDG 小鼠
移植注射hPBMC
皮下注射给予4次
• hPEG-IFN-a
血液样本收集
• QPCR: ISGs 基因表达（第1、3、7天）
• 流式检测: PBMC pSTAT1 (2h)
天数
0 2h 1 2 3 4 5 6 7
-1h（第0天）
1h（第2天）
测试药物（皮下注射，Q2D，共2次）
• B637302
• B606401
• Anifrolumab
B
IFNAR1
IFNAR2
细胞膜
ISGF3
细胞核
ISGs
JAK1
TYK2
C
PEG-IFN-α 诱导PBMC人源化小鼠 2h后
p-STAT1 水平变化
p-STAT1 MFI
2000
1500
1000
500
0
PBS
Anifrolumab 250μg
B637302 270μg
B606401 255μg
Anifrolumab 500μg
B637302 540μg
B606401 510μg
D
IFN-α诱导后第1天PBMC中ISG 基因mRNA表达
相对mRNA表达水平
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ISG-15
IFI13
MX-1
HERC5
PBS
Anifrolumab 250 μg
B637302 270 μg
B606401 255 μg
Anifrolumab 500 μg
B637302 540 μg
B606401 510 μg

图 25

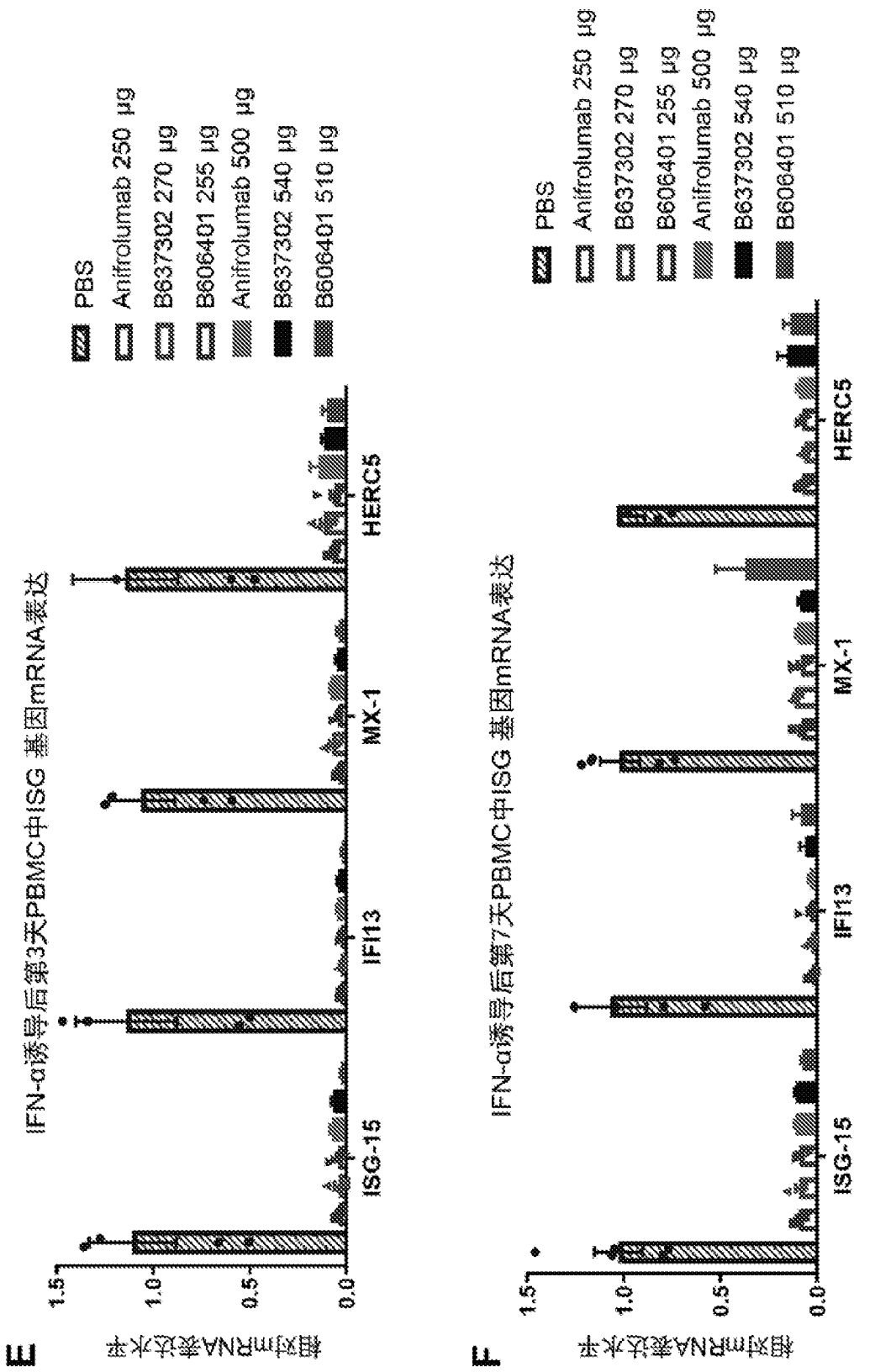

E
IFN-α诱导后第3天PBMC中ISG 基因mRNA表达
相对mRNA表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
ISG-15
IFI13
MX-1
HERC5
PBS
Anifrolumab 250 μg
B637302 270 μg
B606401 255 μg
Anifrolumab 500 μg
B637302 540 μg
B606401 510 μg
F
IFN-α诱导后第7天PBMC中ISG 基因mRNA表达
相对mRNA表达水平
1.5
1.0
0.5
0.0
ISG-15
IFI13
MX-1
HERC5
PBS
Anifrolumab 250 μg
B637302 270 μg
B606401 255 μg
Anifrolumab 500 μg
B637302 540 μg
B606401 510 μg

图 25（续）

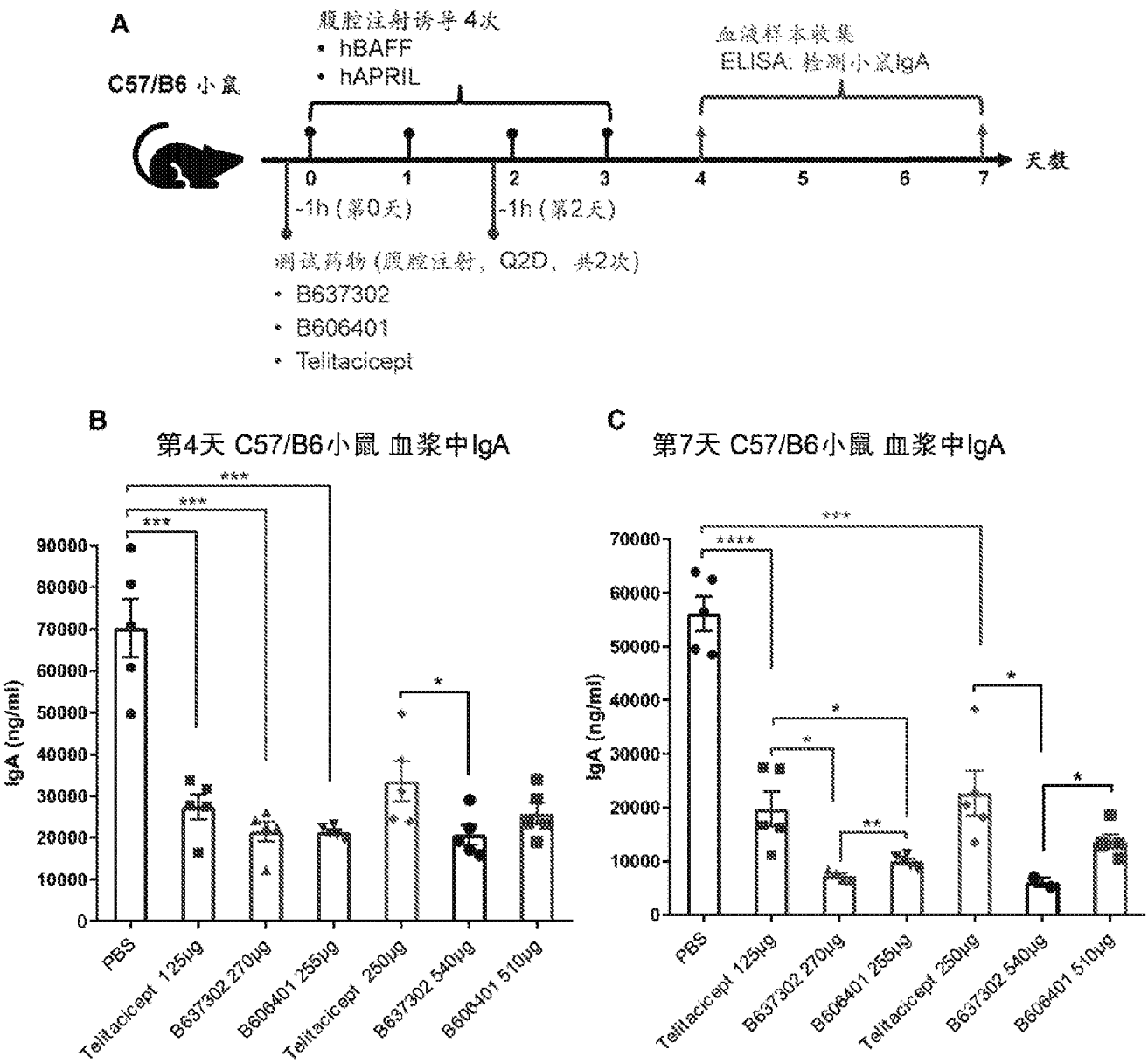

A
C57/B6 小鼠
腹腔注射诱导 4次
• hBAFF
• hAPRIL
血液样本收集
ELISA: 检测小鼠IgA
天数
0
1
2
3
4
5
6
7
-1h (第0天)
-1h (第2天)
测试药物 (腹腔注射，Q2D，共2次)
• B637302
• B606401
• Telitacicept
B
第4天 C57/B6小鼠 血浆中IgA
IgA (ng/ml)
C
第7天 C57/B6小鼠 血浆中IgA
IgA (ng/ml)
PBS
Telitacicept 125μg
B637302 270μg
B606401 255μg
Telitacicept 250μg
B637302 540μg
B606401 510μg

图 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/115448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K19/00(2006.01)i; C07K16/18(2006.01)i; C12N15/62(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; A61K38/16(2006.01)i; A61P37/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; WPABS; WPABSC; VEN; ENTXT; ENTXTC; CNKI; ISI Web of Science; STN; GenBank; 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System: 恒瑞医药, 盛迪医药, TACI, IFNAR1, type I interferon receptor subunit 1, I型干扰素受体亚基1, antibody, 抗体, Anifrolumab, BCMA, B细胞成熟抗原, 系统性红斑狼疮, Systemic Lupus Erythematosus, SLE, 序列1-74, sequences 1-74

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112041339 A (I MAB BIOPHARMA CO., LTD.) 04 December 2020 (2020-12-04) claims 23-35	1, 25-29
A	CN 101323643 A (YANTAI RONGCHANG BIOENGINEERING CO., LTD.) 17 December 2008 (2008-12-17) claims 1-10	1-29
A	US 2017081387 A1 (SHANGHAI KANDA BIOTECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 23 March 2017 (2017-03-23) claims 1-14	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 December 2023	**04 December 2023**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/115448

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/115448

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☑ Claims Nos.: **28**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The subject matter of claim 28 is a method for treating or ameliorating a disease or condition, which relates to a method for treatment of a living human or animal body, and falls within subject matter for which no search is required by the International Searching Authority as defined in PCT Rule 39.1(iv).

With regard to claim 28, the reasonably expected amendment is that the subject matter thereof is amended to the use for preparation of a drug for treating or ameliorating a disease or condition.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/115448

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112041339	A	04 December 2020	EP	3713955	A1	30 September 2020
				EP	3713955	A4	09 March 2022
				IL	281449	A	29 April 2021
				MX	2021003146	A	23 June 2021
				AU	2019344765	A1	18 March 2021
				BR	112021004979	A2	08 June 2021
				SG	11202101946	YA	29 April 2021
				JP	2021515538	A	24 June 2021
				JP	7013632	B2	01 February 2022
				KR	20210068463	A	09 June 2021
				US	2020399381	A1	24 December 2020
				US	11059897	B2	13 July 2021
				CA	3110423	A1	26 March 2020
				EA	202190378	A1	06 September 2021
				US	2021347903	A1	11 November 2021
				WO	2020057541	A1	26 March 2020
				WO	2020057541	A8	23 July 2020
CN	101323643	A	17 December 2008	WO	2008154814	A1	24 December 2008
				JP	2010529967	A	02 September 2010
				JP	5372917	B2	18 December 2013
				KR	20100009600	A	27 January 2010
				KR	101204229	B1	26 November 2012
				US	2010136008	A1	03 June 2010
				US	8193316	B2	05 June 2012
				BRPI	0811333	A2	16 June 2015
				BRPI	0811333	B1	15 September 2020
				BRPI	0811333	B8	25 May 2021
				EP	2161287	A1	10 March 2010
				EP	2161287	A4	11 August 2010
				EP	2161287	B1	04 March 2015
				RU	2009148020	A	10 July 2011
				RU	2433141	C2	10 November 2011
US	2017081387	A1	23 March 2017	WO	2015172305	A1	19 November 2015
				US	10562954	B2	18 February 2020

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/115448

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/115448

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项）

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☑ 权利要求： 28
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

权利要求28的主题是治疗或改善疾病或病症的方法，涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1（iv）定义的不要求国际检索单位检索的主题。

针对权利要求28合理预期的修改为将其主题修改为一种制备用于治疗或改善疾病或病症的药物的用途。

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/115448

A. 主题的分类

C07K19/00(2006.01)i；C07K16/18(2006.01)i；C12N15/62(2006.01)i；C12N15/63(2006.01)i；A61K38/16(2006.01)i；A61P37/06(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS;CNTXT;WPABS;WPABSC;VEN;ENTXT;ENTXTC;CNKI;ISI Web of Science;STN;GenBank;中国专利生物序列检索系统：恒瑞医药，盛迪医药，TACI，IFNAR1，type I interferon receptor subunit 1，I型干扰素受体亚基1，antibody，抗体，Anifrolumab，BCMA，B细胞成熟抗原，系统性红斑狼疮，Systemic Lupus Erythematosus，SLE，序列1-74

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 112041339 A (天境生物科技（上海）有限公司) 2020年12月4日 (2020 - 12 - 04) 权利要求23-35	1、25-29
A	CN 101323643 A (烟台荣昌生物工程有限公司) 2008年12月17日 (2008 - 12 - 17) 权利要求1-10	1-29
A	US 2017081387 A1 (SHANGHAI KANDA BIOTECHNOLOGY CO LTD 等) 2017年3月23日 (2017 - 03 - 23) 权利要求1-14	1-29

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“D” 申请人在国际申请中引证的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2023年12月1日	2023年12月4日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 王炜晨 电话号码 (+86) 0512-88996454

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/115448

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112041339	A	2020年12月4日	EP	3713955	A1	2020年9月30日
				EP	3713955	A4	2022年3月9日
				IL	281449	A	2021年4月29日
				MX	2021003146	A	2021年6月23日
				AU	2019344765	A1	2021年3月18日
				BR	112021004979	A2	2021年6月8日
				SG	11202101946	YA	2021年4月29日
				JP	2021515538	A	2021年6月24日
				JP	7013632	B2	2022年2月1日
				KR	20210068463	A	2021年6月9日
				US	2020399381	A1	2020年12月24日
				US	11059897	B2	2021年7月13日
				CA	3110423	A1	2020年3月26日
				EA	202190378	A1	2021年9月6日
				US	2021347903	A1	2021年11月11日
				WO	2020057541	A1	2020年3月26日
				WO	2020057541	A8	2020年7月23日
CN	101323643	A	2008年12月17日	WO	2008154814	A1	2008年12月24日
				JP	2010529967	A	2010年9月2日
				JP	5372917	B2	2013年12月18日
				KR	20100009600	A	2010年1月27日
				KR	101204229	B1	2012年11月26日
				US	2010136008	A1	2010年6月3日
				US	8193316	B2	2012年6月5日
				BR-PI	0811333	A2	2015年6月16日
				BR-PI	0811333	B1	2020年9月15日
				BR-PI	0811333	B8	2021年5月25日
				EP	2161287	A1	2010年3月10日
				EP	2161287	A4	2010年8月11日
				EP	2161287	B1	2015年3月4日
				RU	2009148020	A	2011年7月10日
				RU	2433141	C2	2011年11月10日
US	2017081387	A1	2017年3月23日	WO	2015172305	A1	2015年11月19日
				US	10562954	B2	2020年2月18日