

## 靶向 BCMA-CD19 的双特异性嵌合抗原受体及其应用

### 技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体涉及一种靶向 BCMA-CD19 的双特异性嵌合抗原受体及其应用。

### 背景技术

多发性骨髓瘤被定义为骨髓中浆细胞的恶性增殖，它是第二大常见的血液恶性肿瘤，占有所有癌种的 1%。研究表明，多发性骨髓瘤在 60 岁以上老年人中高发且近年来发病率稳步上升。对于大多数患者而言，多发性骨髓瘤是不可治愈的，最终都会发展成为复发/难治性多发性骨髓瘤。现有多发性骨髓瘤治疗方法（例如免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂、抗体类药物）均无效的复发/难治性多发性骨髓瘤患者的存活期仅约为 13 个月。

B 细胞成熟抗原(B Cell Maturation Antigen, 缩写为 BCMA)是一个跨膜糖蛋白，它属于肿瘤坏死因子受体家族。BCMA 在多发性骨髓瘤细胞上高度表达，在大多数其他细胞上不表达。恶性的肿瘤浆细胞通常都比正常的浆细胞 BCMA 表达水平要高，BCMA 的上调促进了多发性骨髓瘤细胞的生长，而它的表达下调能够抑制多发性骨髓瘤细胞的生长。

另外，多发性骨髓瘤作为 B 细胞系肿瘤一般不表达 CD19 分子，因此 CD19 通常不作为多发性骨髓瘤治疗的靶点。但也有文献研究提示，一些微量的具有耐药性和复发性的多发性骨髓瘤克隆，也具有 CD19<sup>+</sup>表型。

嵌合抗原受体(Chimeric Antigen Receptor, CAR)是 CAR 细胞治疗药物的核心部件，其可包括靶向部分（例如，结合肿瘤相关抗原(Tumor-Associated Antigen, TAA)的部分）、铰链区、跨膜区和细胞内结构域。CAR-T 细胞免疫疗法，被认为是最有希望攻克肿瘤的手段之一。CAR-T 细胞就是利用基因改造的方法使 T 细胞表达 CAR 蛋白，这种 CAR 蛋白有能力在不依赖于抗原提呈的情况下识别膜表面的完整蛋白，进而引起 T 细胞的活化和功能效应。

2021 年百时美施贵宝与蓝鸟生物共同宣布美国食品药品监督管理局(FDA)已批准其靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞疗法(bb2121)，用于 4 线治疗后（包括免疫调节剂、蛋白酶体抑制剂以及抗体类药物治疗）的复发或难治性多发性骨髓瘤的成年患

者，这是全球首款靶向 BCMA 的 CAR-T 细胞疗法。开发更多的靶向 BCMA 的细胞治疗方法具有现实意义。

### 发明内容

5       本申请提供了一种靶向 BCMA-CD19 的双特异性嵌合抗原受体及其应用，发明人构建了多个靶向 BCMA-CD19 的双特异性嵌合抗原受体表达载体并制备了靶向 BCMA-CD19 的双特异性 CAR-T 细胞，还在细胞水平验证了 BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞具有良好的抑瘤功能。

一种靶向 BCMA-CD19 的双特异性嵌合抗原受体，其包含胞外抗原识别结构域、  
10    铰链区、跨膜区和细胞内结构域；其中：所述胞外抗原识别结构域包含抗 BCMA 胞外抗原识别结构域和抗 CD19 胞外抗原识别结构域；

所述抗 BCMA 胞外抗原识别结构域包括 BCMA VH 和 BCMA VL，其中 BCMA VH 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，BCMA VL 互补决定区 CDR1、CDR2、  
15    CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述抗 CD19 胞外抗原识别结构域包括 CD19 VH 和 CD19 VL，其中 CD19 VH 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序  
20    列，CD19 VL 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述 BCMA VH 序列包括如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列，所述 BCMA VL 序列包括如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列。

25       上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述 BCMA VH 序列包括如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，所述 BCMA VL 序列包括如 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述 CD19 VH 序列包括如 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列，所述 CD19 VL 序列包括如 SEQ ID NO:18 所示的氨基  
30    酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构包括选自以下结构中的任意一种：CD19 VL 序列-第 1 连接序列-CD19 VH 序列-第 2 连接序列-BCMA VL 序列-第 3 连接序列-BCMA VH 序列，BCMA VL 序列-第 4 连接序列-BCMA VH 序列-第 5 连接序列-CD19 VL 序列-第 6 连接序列-  
5 -CD19 VH 序列，BCMA VL 序列-第 7 连接序列-CD19 VL 序列-第 8 连接序列-CD19 VH 序列-第 9 连接序列-BCMA VH 序列，和 CD19 VL 序列-第 10 连接序列-BCMA VL 序列-第 11 连接序列-BCMA VH 序列-第 12 连接序列-CD19 VH 序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：BCMA VL 序列-第 7 连接序列-  
10 列-CD19 VL 序列-第 8 连接序列-CD19 VH 序列-第 9 连接序列-BCMA VH 序列，和 CD19 VL 序列-第 10 连接序列-BCMA VL 序列-第 11 连接序列-BCMA VH 序列-第 12 连接序列-CD19 VH 序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，第 1 连接序列、第 2 连接序列、第 3 连接序列、第 4 连接序列、第 5 连接序列、第 6 连接序列、第 7 连接序列、第 8  
15 连接序列、第 9 连接序列、第 10 连接序列、第 11 连接序列、第 12 连接序列相互独立得选自以下序列的一种或多种：SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:36。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括如 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述铰链区来源于 IgG1、IgG4、  
20 CD4、CD7、CD28、CD84、CD8 $\alpha$  中的一种或多种；可选地，所述铰链区的氨基酸来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述跨膜区来源于 CD3、CD4、CD7、CD8 $\alpha$ 、CD28、CD80、CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc70 中的一  
25 种或多种；可选地，所述跨膜区的氨基酸序列来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，其中所述细胞内结构域包含胞内信号传导区；可选地，还包括共刺激信号传导区。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，其中所述胞内信号传导区来源  
30 于 CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD66d、

DAPI10、DAPI12、Syk 中的一种或多种；可选地，所述胞内信号传导区来源于 CD3 $\zeta$ ；进一步可选地，所述胞内信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，其中所述共刺激信号传导区来源于 CD2、CD3、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD244、4-1BB、OX40、LFA-1、ICOS、LIGHT、NKG2C、NKG2D、DAPI10、B7-H3、MyD88 中的一种、两种或三种以上；可选地，所述共刺激信号传导区来源于 CD28 或 4-1BB；进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，还包含位于所述嵌合抗原受体氨基酸序列 N-末端的引导肽；可选地，其中所述引导肽来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述引导肽的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列。

上述双特异性嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述双特异性嵌合抗原受体包括如 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列。

本申请还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码上述双特异性嵌合抗原受体的核苷酸序列。

上述分离的核酸分子在某些实施方式中，编码所述双特异性嵌合抗原受体的核苷酸序列包含：

1) 编码如 SEQ ID NO:13 所示的 BCMA VH 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:37 所示；和编码如 SEQ ID NO:14 所示的 BCMA VL 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示；和/或

2) 编码如 SEQ ID NO:17 所示的 CD19 VH 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:39 所示；和编码如 SEQ ID NO:18 所示的 CD19 VL 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:40 所示。

本申请还提供了一种载体，其包含上述分离的核酸分子。

上述载体在某些实施方式中，为表达载体；在某些实施方式中，载体为病毒载体；在某些实施方式中，载体为慢病毒载体。

本申请还提供了一种经工程化的免疫效应细胞，其包含上述嵌合抗原受体、上述分离的核酸分子，或上述载体。

上述经工程化的免疫效应细胞在某些实施方式中，所述经工程化的免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞 (NK 细胞)、外周血单个核细胞 (PBMC 细胞)、

多能干细胞、多能干细胞分化成的 T 细胞、多能干细胞分化成的 NK 细胞、诱导性多能干细胞（Induced pluripotent stem cells, iPSC）、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞（iPSC-T）、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞（iPSC-NK）和胚胎干细胞中的一种或多种。

- 5 上述经工程化的免疫效应细胞在某些实施方式中，所述经工程化的免疫效应细胞是 T 淋巴细胞；可选地，所述 T 淋巴细胞的来源为自体 T 淋巴细胞或同种异体 T 淋巴细胞。

本申请还提供了一种药物组合物，其包括上述经工程化的免疫效应细胞和药学上可接受的辅料。

- 10 上述药物组合物在某些实施方式中，药学上可接受的辅料包括保护剂。

上述药物组合物在某些实施方式中，药学上可接受的辅料包括细胞冻存液。

上述药物组合物在某些实施方式中，所述药物组合物为静脉注射剂。

本申请还提供上述嵌合抗原受体、分离的核酸分子、载体或经工程化的免疫效应细胞在制备药物中的应用，所述药物用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

- 15 上述应用在某些实施方式中，与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

上述应用在某些实施方式中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病。

- 20 上述应用在某些实施方式中，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。

本申请还提供了一种治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症的方法，包括以下步骤：将有效量的上述经工程化的免疫效应细胞或药物组合物施用于具有治疗与

- 25 BCMA 的表达相关的疾病或病症的需求的受试者。

上述方法在某些实施方式中，与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

- 30 上述方法在某些实施方式中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病。

上述方法在某些实施方式中，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。

上述方法在某些实施方式中，所述施用的方式为静脉注射。

- 5 上述方法在某些实施方式中，所述施用的方式为将有效量的经工程化的免疫效应细胞或药物组合物以单次注射的方式施用于受试者。

上述方法在某些实施方式中，有效量的经工程化的免疫效应细胞或药物组合物为  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^7$  个细胞/kg 的剂量。

- 10 本申请还提供了上述经工程化的免疫效应细胞或上述药物组合物，用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

上述经工程化的免疫效应细胞或上述药物组合物在某些实施方式中，与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

- 15 上述经工程化的免疫效应细胞或上述药物组合物在某些实施方式中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病。

上述经工程化的免疫效应细胞或上述药物组合物在某些实施方式中，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。

## 20 附图说明

图 1 表示了本申请实施例 1 中各种 BCMA-CD19 双特异性 CAR、CD19 CAR、BCMA CAR 的结构示意图。

- 25 图 2A 表示了本申请实施例 2 中自裂解多肽 T2A 连接的两个完整 CAR（即 CD19-2A-BCMA 和 BCMA-2A-CD19）在 CAR-T 细胞表面的 CAR 表达情况（感染后 6 天）；其中：图 2A 左图是 CD19-2A-BCMA 组、图 2A 中图是 BCMA-2A-CD19 组、图 2A 右图是 UTD 组（未转导 CAR 的 T 细胞）；图 2B-图 2E 表示了本申请实施例 2 中 4 种双特异性 CAR-T 细胞（即 Tan CD19-BCMA 细胞、Tan BCMA-CD19 细胞、Loop CD19-BCMA 细胞、Loop BCMA-CD19 细胞）表面的 CAR 表达情况（感染后 6 天）；其中：图 2B 是 Tan CD19-BCMA 组、图 2C 是 Tan BCMA-CD19 组、图 2D 是 Loop CD19-BCMA 组、图 2E 是 Loop BCMA-CD19 细胞组。
- 30

图 3A-图 3C 表示了本申请实施例 4 中各种 BCMA-CD19 双特异性 CAR、CD19 CAR、BCMA CAR 被阳性靶细胞激活后的细胞因子释放情况；其中：图 3A 是各组 IL-2 的释放情况、图 3B 是各组 IFN- $\gamma$  的释放情况、图 3C 是各组 TNF- $\alpha$  的释放情况。其中，在图 3A、图 3B 和图 3C 中均包含两个虚线框，在图 3A、图 3B 和图 3C 中的第一个虚线框中，从左到右 5 个柱依次代表 UTD 细胞、TanCD19-BCMA 细胞、TanBCMA-CD19 细胞、LoopCD19-BCMA 细胞、LoopBCMA-CD19 细胞和 BCMA 细胞被 K562-BCMA 细胞激活后的细胞因子释放情况；在图 3A、图 3B 和图 3C 中的第二个虚线框中，从左到右 5 个柱依次代表 UTD 细胞、TanCD19-BCMA 细胞、TanBCMA-CD19 细胞、LoopCD19-BCMA 细胞、LoopBCMA-CD19 细胞和 CD19 细胞被 K562-CD19 细胞激活后的细胞因子释放情况。

图 4A-图 4C 表示了本申请实施例 5 中各种 BCMA-CD19 双特异性 CAR、CD19 CAR、BCMA CAR 细胞对不同靶细胞的杀伤效果；其中：图 4A 是 NALM6 组，NALM6 是 CD19+BCMA-靶细胞；图 4B 是 MM.1S 组，MM.1S 是 BCMA+CD19-靶细胞；图 4C 是 NALM6-KO CD19 组，NALM6-KO CD19 是敲除 CD19 同时也不表达 BCMA 的阴性靶细胞对照。

图 5A-图 5D 表示了本申请实施例 6 中抗原多轮刺激之后各组 CAR-T 细胞的持续增殖情况；其中：图 5A 是用 MM.1S 细胞刺激的 CD3+细胞的增殖情况，图 5B 是用 NALM6 细胞刺激的 CD3+细胞的增殖情况，图 5C 是用 MM.1S 细胞刺激的 CAR+细胞的增殖情况，图 5D 是用 NALM6 细胞刺激的 CAR+细胞的增殖情况。

### 具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

以下对本申请做进一步描述：在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

在本申请中，术语“嵌合抗原受体”（Chimeric Antigen Receptor, CAR）是 CAR 细胞治疗药物的核心部件，其可包括胞外抗原识别结构域（例如，结合肿瘤相关抗原

(Tumor-Associated Antigen, TAA) 的部分)、铰链区、跨膜区和细胞内结构域。CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T) 细胞免疫疗法,被认为是最有希望攻克肿瘤的手段之一。CAR-T 细胞就是利用基因改造的方法使 T 细胞表达 CAR 蛋白,这种 CAR 蛋白有能力在不依赖于抗原提呈的情况下识别膜表面的完整蛋白,进而引起 T 细胞的活化和功能效应。

- 5 在本申请中,术语“胞外抗原识别结构域”是指抗原识别结构域 (Antigen Recognition Domain, ARD)。CAR 细胞治疗产品 (如 CAR-T 细胞) 之所以能特异性识别和/或结合到肿瘤细胞表达的靶抗原,依赖于胞外抗原识别结构域,到目前为止,抗原识别结构域从抗体的单链可变区 (Single Chain Variable Fragment, 缩写为 scFv)、或者从受体配体相互作用、TCR 模拟物、可变的淋巴细胞受体 (Variable Lymphocyte Receptors, VLR) 衍
- 10 生而来。到目前为止,最为常见的来源就是抗体的 scFv 段,scFv 包括抗体重链可变区 (VH 区) 和轻链可变区 (VL 区),他们之间由一段肽链连接,如:由 18 个氨基酸组成的连接序列 GSTSGSGKPGSGEGSTKG。针对二个或大于二个靶点的 scFv 抗体中包括针对不同靶点的 VH 区和 VL 区,不同区域之间通过连接序列直接连接或间接连接,其排列方式可以通过以下形式的任意一种:靶点 1 VL-靶点 1 VH-靶点 2 VL-靶点 2 VH,靶点 2 VL-
- 15 靶点 2 VH-靶点 1 VL-靶点 1 VH,靶点 1 VL-靶点 2 VL-靶点 2 VH-靶点 1 VH,靶点 2 VL-靶点 1 VL-靶点 1 VH-靶点 2 VH,上述“-”代表通过连接序列连接。

本申请中,术语“特异性识别和/或结合”是指 CAR 和特异性靶标之间的识别和/或结合,是以比 CAR 结合其它靶标更大的亲和性、亲合力、更容易、和/或以更大的持续时间结合该靶标。

- 20 在本申请中,术语“铰链区”是指作用于胞外抗原识别结构域与跨膜结构域之间的连接段,这个区域通过给予抗原识别结构域一定的活动范围,允许 CAR 识别抗原。目前使用的铰链区主要来源于 IgG1、IgG4、CD4、CD7、CD28、CD84、CD8 $\alpha$  中的一种或多种。此外,典型的铰链区还包含一些残基,这些残基参与 CAR 二聚化,有助于增强抗原的敏感性。

- 25 在本申请中,“跨膜区”是指连接着 CAR 结构的细胞内和细胞外成分的跨膜结构域。不同的跨膜结构域可以一定程度上影响 CAR 的表达和稳定性,但是并不直接参与信号传递,通过相互作用可以提高下游信号传递。所述跨膜区可以来源于 CD3、CD4、CD7、CD8 $\alpha$ 、CD28、CD80、CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc $\gamma$ 70 中的一种或多种。

- 30 在本申请内,术语“细胞内结构域”包括胞内信号传导区,还可以包括共刺激信号传导区。

在本申请中，术语“胞内信号传导区”是指负责表达 CAR 的免疫效应细胞的至少一种正常效应子功能的活化。所述胞内信号传导区可以来源于 CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD66d、DAP10、DAP12、Syk 中的一种或多种。

- 5       在本申请中，术语“共刺激信号传导区”之所以存在，是因为除了抗原特异性信号的刺激之外，很多免疫效应细胞还需要共刺激来促进细胞增殖、分化和存活，以及活化细胞的效应子功能。在一些实施例中，CAR 还可以包括一个或多个共刺激信号传导区，其中，共刺激信号传导区可以来源于 CD2、CD3、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD244、4-1BB、OX40、LFA-1、ICOS、LIGHT、NKG2C、NKG2D、DAP10、B7-H3、  
10   MyD88 中的一种、两种或三种以上。

- 在本申请中，术语“分离的”通常指从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷  
15   酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”不排除从天然状态下经人工手段获得后，经过人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

      在本申请中，术语“引导肽”，是指胞外抗原识别结构域（如 scFv 序列）前的短肽，其作用是引导细胞内合成的重组蛋白质输出到细胞外。常用的引导肽有人 CD8 $\alpha$  信号肽，或者人 GM-CSF 受体  $\alpha$  信号肽。

- 20       在本申请中，决定 CAR-免疫细胞治疗效果的关键因素之一是对肿瘤靶抗原的选择。在本申请中，术语“BCMA”是指 B 细胞成熟抗原，是肿瘤坏死因子受体超家族成员。人 BCMA 几乎排他性地在浆细胞和多发性骨髓瘤细胞中表达。BCMA 可以是针对多发性骨髓瘤的免疫治疗剂的合适肿瘤抗原靶标。但由于多发性骨髓瘤细胞表面的特异性抗原具有异质性，对其抗原靶点的选择不一定是单一的。通过选择合适的靶点，能优化 CAR-T  
25   细胞的抗肿瘤活性。“CD19”分子目前是治疗 B 淋巴细胞来源血液系统肿瘤的主要靶点，也是 CAR-T 细胞治疗研究的热点。大部分 B 细胞来源的恶性肿瘤细胞表面都表达 CD19 分子，多发性骨髓瘤作为 B 细胞系肿瘤一般不表达 CD19 分子，因此 CD19 通常不作为多发性骨髓瘤治疗的靶点。但也有文献研究提示，一些微量的具有耐药性和复发性的多发性骨髓瘤克隆，也具有 CD19<sup>+</sup>表型。使用这种双靶点 CAR-T 产品，只要有一个肿瘤抗  
30   原靶点被识别，CAR-T 细胞就可被活化，防止肿瘤抗原逃逸现象。同时，相较于分别制

备针对不同靶点的 CAR-免疫细胞并共同使用，双靶点的 CAR 免疫细胞具有如下优点：

1.需要更少的免疫细胞，制备方便、节约成本；2、从用药方面，施用一种产品的安全性、可操作性要大大高于施用两种产品。

5 在本申请中，术语“连接序列”通常是指长度为约 1 至 100 个氨基酸的寡肽或多肽区，其将本发明的嵌合抗原受体的任何结构/区域连接在一起。连接序列可由不同的氨基酸残基(如甘氨酸和丝氨酸)组成，以便相邻的蛋白质结构域相对于彼此自由移动。当期望确保两个相邻结构域在空间上不相互干扰时，可使用较长的连接序列。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”通常指任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，其可以是从其天然环境分离的或人工合成的类似物。

10 在本申请中，CAR 基因转导/转染和靶基因表达时，基因转导/转染方法主要包括病毒和非病毒的方法。如：通过  $\gamma$  反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒相关病毒载体、质粒 DNA 依赖的载体、转座子依赖的基因转移、mRNA 介导的基因转导。

术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内得以表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 来源的人工染色体 (PAC)；噬菌体如  $\lambda$  噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒 (如 SV40)。一种载体可能含有多种控制表达的元件，  
15 包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。术语“转座子”是指不连续的 DNA 片段，具有在染色体位点之间迁移和携带基因信息的能力，如：睡美人 SB 系统和来源于鳞翅目昆虫的 PB 系统。在一些实施例中，还可以使用电转的方法将 mRNA 转导进 T 细胞。

25 在本申请中，术语“免疫效应细胞”通常是指参与免疫应答，例如促进免疫效应应答的细胞。免疫效应细胞可以选自以下组：T 淋巴细胞、自然杀伤细胞 (NK 细胞)、外周血单个核细胞 (PBMC 细胞)、多能干细胞、多能干细胞分化成的 T 淋巴细胞、多能干细胞分化成的 NK 细胞、诱导性多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSC)、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞 (iPSC-T)、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞 (iPSC-NK)  
30 和胚胎干细胞中的一种或多种。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指适合施用于患者的药物组合物，其可以包含本申请所述的免疫效应细胞，还可以包含一种或多种药学上可接受的辅料，如：载剂、保护剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂、防腐剂中的一种或多种。在一些实施例中，药学上可接受的辅料包括保护剂，如：细胞冻存液。在一些实  
5 施例中，本申请的药物组合物为细胞悬液或其冻存细胞。

在本申请中，术语“受试者”通常指人类或非人类动物，包括但不限于小鼠、大鼠、猫、狗、兔、马、猪、牛、羊或猴。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下本领域技术人员可接受的波动范围，如：在 $\pm 0.5\%$ -10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、  
10 2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%或 10%的范围内变动。

#### 嵌合抗原受体、核酸、载体、免疫效应细胞、药物组合物

一方面，本申请提供一种靶向 BCMA-CD19 的双特异性嵌合抗原受体，其包含  
15 胞外抗原识别结构域、铰链区、跨膜区和细胞内结构域；其中：所述胞外抗原识别结构域包含抗 BCMA 胞外抗原识别结构域和抗 CD19 胞外抗原识别结构域；

所述抗 BCMA 胞外抗原识别结构域包括 BCMA VH 和 BCMA VL，其中 BCMA VH 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，BCMA VL 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基  
20 酸序列分别包括如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

抗体中，常见的划分 CDR 规则有 Kabat、AbM、Chothia、Contact、IMGT，这些规则为本领域技术人员熟知的，当应用执行这些规则的网站时，只要将 VH 和 VL 序列输入并选择相应规则，即可得到依据不同规则的 CDR 序列。本申请中，采用 IMGT 规则划分 CDR，但本领域技术人员应当理解，本申请的保护范围涵盖了通过采用不同规则分析  
25 获得的 CDR 序列的组合。

在一些实施例中，所述抗 CD19 胞外抗原识别结构域包括 CD19 VH 和 CD19 VL，其中 CD19 VH 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列，CD19 VL 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 所示的氨基  
30 酸序列。

在一些实施例中，所述 BCMA VH 序列包括如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列，所述 BCMA VL 序列包括如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述 BCMA VH 序列包括如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，所述 BCMA VL 序列包括如 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列。

5 在一些实施例中，所述 CD19 VH 序列包括如 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列，所述 CD19 VL 序列包括如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，本申请还包含了上述任一项双特异性嵌合抗原受体的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸被取代、缺失、添加和/或插入，且其具有相当于上述任一项嵌合抗原受体的活性。本领域技术人员知晓，在人源化改造的过程中，VH 和  
10 VL 序列中 FR 区中的氨基酸可被取代使得经过改造的抗体的 CDR 区仍能保有合适的抗原结合位点，因此本申请当然包括在基于本申请上述 CDR 的情况下，对 VH 和 VL 序列中的 FR 区进行人源化改造所获得的不同的氨基酸序列。并且本领域技术人员还知晓，在人源化改造的过程中为了使得经过改造的抗体的 CDR 区能保有合适的抗原结合位点，如果必要，CDR 中的 1 个、2 个、3 个或不超过 10% 的氨基酸序列可能被  
15 取代、缺失、添加和/或插入，这些内容也被包含在本申请中。

在一些实施例中，所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：CD19 VL 序列-第 1 连接序列-CD19 VH 序列-第 2 连接序列-BCMA VL 序列-第 3 连接序列-BCMA VH 序列，BCMA VL 序列-第 4 连接序列-BCMA VH 序列-第 5  
20 连接序列-CD19 VL 序列-第 6 连接序列-CD19 VH 序列，BCMA VL 序列-第 7 连接序列-CD19 VL 序列-第 8 连接序列-CD19 VH 序列-第 9 连接序列-BCMA VH 序列，和 CD19 VL 序列-第 10 连接序列-BCMA VL 序列-第 11 连接序列-BCMA VH 序列-第 12 连接序列-CD19 VH 序列。

在一些实施例中，所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：BCMA VL 序列-第 7 连接序列-CD19 VL 序列-第 8 连接序列-CD19 VH  
25 序列-第 9 连接序列-BCMA VH 序列，和 CD19 VL 序列-第 10 连接序列-BCMA VL 序列-第 11 连接序列-BCMA VH 序列-第 12 连接序列-CD19 VH 序列。

在一些实施例中，第 1 连接序列、第 2 连接序列、第 3 连接序列、第 4 连接序列、第 5 连接序列、第 6 连接序列、第 7 连接序列、第 8 连接序列、第 9 连接序列、第 10 连接  
30 序列、第 11 连接序列、第 12 连接序列相互独立得选自以下序列的一种或多种：SEQ ID

NO:34、SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:36。

在一些实施例中，所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括如 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述铰链区来源于 IgG1、IgG4、CD4、CD7、CD28、CD84、  
5 CD8 $\alpha$  中的一种或多种；可选地，所述铰链区的氨基酸序列来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述跨膜区来源于 CD3、CD4、CD7、CD8 $\alpha$ 、CD28、CD80、  
CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc70 中的一种或多种；可选地，所述跨膜区的氨基酸序列来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列包含如 SEQ ID  
10 NO:22 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，其中所述细胞内结构域包含胞内信号传导区；可选地，还包括共刺激信号传导区；进一步可选地，其中所述胞内信号传导区来源于 CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、  
CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD66d、DAP10、DAP12、  
Syk 中的一种或多种；再更进一步可选地，所述胞内信号传导区来源于 CD3 $\zeta$ ，如：  
15 所述胞内信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，其中所述共刺激信号传导区来源于 CD2、CD3、CD7、CD27、  
CD28、CD30、CD40、CD83、CD244、4-1BB、OX40、LFA-1、ICOS、LIGHT、NKG2C、  
NKG2D、DAP10、B7-H3、MyD88 中的一种、两种或三种以上；可选地，共刺激信号传导区来源于 CD28 或 4-1BB；进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序  
20 列包含如 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，还包含位于所述嵌合抗原受体氨基酸序列 N-末端的引导肽；  
可选地，其中所述引导肽来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述引导肽的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述双特异性嵌合抗原受体包括如 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID  
25 NO:29 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码上述双特异性嵌合抗原受体的核苷酸序列。

在一些实施例中，编码所述双特异性嵌合抗原受体的核苷酸序列包含：

1) 编码如 SEQ ID NO:13 所示的 BCMA VH 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ  
30 ID NO:37 所示；和编码如 SEQ ID NO:14 所示的 BCMA VL 氨基酸序列的核苷酸序列，

其如 SEQ ID NO:38 所示；和/或

2) 编码如 SEQ ID NO:17 所示的 CD19 VH 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:39 所示；和编码如 SEQ ID NO:18 所示的 CD19 VL 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:40 所示。

- 5 另一方面，本申请还提供了一种载体，其包含上述分离的核酸分子。载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如  $\lambda$  噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头
- 10 多瘤空泡病毒（如 SV40）。

在一些实施例中，载体为表达载体；可选地，载体为病毒载体；进一步可选地，载体为慢病毒载体。

另一方面，本申请还提供了一种经工程化的免疫效应细胞，其包含上述嵌合抗原受体、上述分离的核酸分子，或上述载体。

- 15 在一些实施例中，所述经工程化的免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK 细胞）、外周血单个核细胞（PBMC 细胞）、多能干细胞、多能干细胞分化成的 T 细胞、多能干细胞分化成的 NK 细胞、诱导性多能干细胞（Induced pluripotent stem cells, iPSC）、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞（iPSC-T）、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞（iPSC-NK）和胚胎干细胞中的一种或多种。

- 20 在一些实施例中，所述经工程化的免疫效应细胞是 T 淋巴细胞；可选地，所述 T 淋巴细胞的来源为自体 T 淋巴细胞或同种异体 T 淋巴细胞。

在一些实施例中，所述经工程化的免疫效应细胞的表面可以表达或表达有本申请所述的嵌合抗原受体。

- 25 另一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包括上述经工程化的免疫效应细胞和药学上可接受的辅料。药学上可接受的辅料包括：载剂、保护剂、稳定剂、稀释剂、中的一种或多种。

在一些实施例中，药学上可接受的辅料包括保护剂，如：细胞冻存液。

在一些实施例中，药物组合物为细胞悬液或其冻存细胞。

在一些实施例中，药物组合物为静脉注射剂。

- 30 制备方法

另一方面，本申请还提供了制备经工程化的免疫效应细胞的方法，其包括以下的步骤：向免疫效应细胞中转导本申请所述的载体。

5 在一些实施例中，所述经工程化的免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK 细胞）、外周血单个核细胞（PBMC 细胞）、多能干细胞、多能干细胞分化成的 T 细胞、多能干细胞分化成的 NK 细胞、诱导性多能干细胞（Induced pluripotent stem cells, iPSC）、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞（iPSC-T）、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞（iPSC-NK）和胚胎干细胞中的一种或多种。

在一些实施例中，所述经工程化的免疫效应细胞是 T 淋巴细胞；可选地，所述 T 淋巴细胞的来源为自体 T 淋巴细胞或同种异体 T 淋巴细胞。

## 10 用途

另一方面，本申请还提供了本申请所述的双特异性嵌合抗原受体、所述的分离的核酸分子、所述的载体和/或所述的经工程化的免疫效应细胞在制备药物中的应用，其中所述药物用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

15 在一些实施例中，与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

在一些实施例中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病。

在一些实施例中，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。

20 另一方面，本申请还提供了治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症的方法，所述方法包括以下步骤：向有治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症需要的受试者施用有效剂量的本申请所述的嵌合抗原受体、所述的分离的核酸分子、所述的载体和/或所述的经工程化的免疫效应细胞。

在一些实施例中，与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

25 在一些实施例中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病。

在一些实施例中，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。

30 在一些实施例中，所述施用可以通过不同的方式进行，例如静脉内、瘤内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。例如，施用的方式可以通过静脉注射的方式施用于受试者。在一些实施例中，有效剂量的经工程化的免疫效应细胞或药物

组合物可以单次施用于受试者，也可以在一定期间内分次施用于受试者，如：每周施用一次、两周一次、三周一次、四周一次、一个月一次、3个月一次、或3-6个月一次。

5 在一些实施例中，针对不同的适应症，给药剂量可以不同；针对病情严重程度不同的患者，给药剂量也可以不同。施用剂量范围可以是  $1 \times 10^5$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg 至  $1 \times 10^7$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg，例如， $1 \times 10^5$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg 至  $1 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg 至  $1 \times 10^7$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $0.5 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $0.6 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $0.7 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $0.8 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $0.9 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.0 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.1 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.2 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.3 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.4 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.5 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.6 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.7 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.8 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $1.9 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg、 $2.0 \times 10^6$  个 CAR 阳性 T 细胞/kg。

15 在一些实施例中，所述受试者可以包括人类和非人类动物。例如，所述受试者可以包括但不限于小鼠、大鼠、猫、狗、马、猪、牛、羊、兔或猴。

另一方面，本申请还提供了所述的嵌合抗原受体、所述的分离的核酸分子、所述的载体和/或所述的经工程化的免疫效应细胞，其可以用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

20 在一些实施例中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以包括非实体瘤，可选地，所述非实体瘤为血液瘤。

在一些实施例中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以包括多发性骨髓瘤。

在一些实施例中，所述多发性骨髓瘤为复发性或难治性多发性骨髓瘤。

25 不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的嵌合抗原受体、经工程化的免疫效应细胞、制备方法和用途等，而不适用于限制本申请发明的范围。实施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包括 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

### 实施例 1、BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞的获得

我们已有 1 条 BCMA 特异性的人源化抗体(其 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示, 其 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:37 所示, 其 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示, 其 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:38 所示, 其 VH CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示, 其 VL CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示) 和 1 条 CD19 特异性的抗体(其 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示, 其 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:39 所示, 其 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:18 所示, 其 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:40 所示, 其 VH CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示, 其 VL CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 所示), 希望获得较优的双特异性 CAR 结构。考虑到靶点 BCMA 和 CD19 的前后顺序、每个靶点胞外抗原识别结构域中 VH 和 VL 的前后顺序等变化, BCMA-CD19 双特异性 CAR 的结构设计有多种选择。我们选择在二代 CAR 结构上对候选 BCMA-CD19 双特异性 CAR 结构进行筛选。

我们尝试了如图 1 所示的 6 种 BCMA-CD19 双特异性 CAR 结构, 并以 BCMA CAR 结构和 CD19 CAR 结构作为对照。在各个 CAR 结构中, 均采用了 CD8 $\alpha$  引导链为信号肽(如 SEQ ID NO:25 所示), 铰链区(如 SEQ ID NO:21 所示)和跨膜区(如 SEQ ID NO:22 所示)采用 CD8 $\alpha$  的结构, 以 4-1BB 为胞内共刺激信号(如 SEQ ID NO:24 所示), CD3 $\zeta$  为 T 细胞激活信号(如 SEQ ID NO:23 所示)。

#### 1、慢病毒载体的构建

分别人工合成如图 1 所示的 6 种 BCMA-CD19 双特异性 CAR 结构以及 BCMA CAR 结构和 CD19 CAR 结构作为对照, Tan CD19-BCMA 结构、Tan BCMA-CD19 结构、Loop CD19-BCMA 结构、Loop BCMA-CD19 结构、CD19-2A-BCMA 结构、BCMA-2A-CD19 结构、CD19 CAR 结构、BCMA CAR 结构的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 所示。如下文字表述仅为简单概要的展示 CAR 结构主要区别部分, 未全面展示信号肽、连接序列、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号区、T 细胞激活信号区, 各结构的顺序从图 1 中可以看出: SP 表示信号肽区,

Hinge 代表铰链区, TM 代表跨膜区, VL、VH 之间的是连接序列。

- 1) Tan CD19-BCMA 结构: CD19 VL-CD19 VH-BCMA VL-BCMA VH;
- 2) Tan BCMA-CD19 结构: BCMA VL-BCMA VH-CD19 VL-CD19 VH;
- 3) Loop CD19-BCMA 结构: BCMA VL-CD19 VL-CD19 VH-BCMA VH;
- 5 4) Loop BCMA-CD19 结构: CD19 VL-BCMA VL-BCMA VH-CD19 VH;
- 5) CD19-2A-BCMA 结构: CD19 CAR-T2A-BCMA CAR (该结构的自裂解多肽 T2A 前后, 分别有一个完整的 CD19 CAR 结构和 BCMA CAR 结构, 完整的 CAR 结构指包括与其他组相同的信号肽、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号区、T 细胞激活信号区);
- 10 6) BCMA-2A-CD19 结构: BCMA CAR-T2A-CD19 CAR (该结构的自裂解多肽 T2A 前后, 分别有一个完整的 BCMA CAR 结构和 CD19 CAR 结构, 完整的 CAR 结构指包括与其他组相同的信号肽、铰链区、跨膜区、胞内共刺激信号区、T 细胞激活信号区);
- 7) CD19 CAR 结构: CD19 VL-CD19 VH;
- 15 8) BCMA CAR 结构: BCMA VL-CD19 VH。

将上述 6 种 BCMA-CD19 双特异性 CAR 结构、1 种 CD19 CAR 结构、1 种 BCMA CAR 结构分别构建到经过改造的空慢病毒载体 (厂家: SBI 公司, 货号: CD500-CD800, 如 WO2021/121227 实施例 1 中记载的进行常规抗性改造) 中获得 CAR 表达载体, 随后将 CAR 表达载体和三种包装质粒一起转染 293T 细胞, 经过收集纯化之后得到有功能性的慢病毒载体。三种包装质粒分别是 pMD2.G (购自 Biovector 公司, 产品号 Biovector012259), pMDLg/pRRE (购自 Biovector 公司, 产品号 Biovector012251), pRSV-Rev (购自 Biovector 公司, 产品号 Biovector012253)。

2、通过慢病毒转导的方式制备相应 6 种 BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞、1 种 CD19 CAR-T 细胞、1 种 BCMA CAR-T 细胞。

25 转导实验按照本领域技术人员已知的常规方法进行, 简述转导步骤如下:

1) 分选 T 细胞

从人单采血细胞中分离获得外周血单个核细胞 (PBMC), 然后从 PBMC 细胞中分选获得 T 细胞。

2) 对 T 细胞进行激活处理

30 将分离的 T 细胞用完全淋巴细胞培养液 (X-VIVO15 培养基 + 5% FBS + 300IU/ml

IL-2 或 X-VIVO15 培养基 + 5% FBS + 5ng/ml IL-15 + 10ng/ml IL-7) 进行重悬, 使终浓度为  $(1\sim2) \times 10^6$  个细胞/ml, 并加入 5~10 $\mu$ l 的 CD3/CD28 磁珠刺激, 混匀后置于培养箱培养, 培养条件为 37°C + 5% CO<sub>2</sub>, 培养时间至少 24 小时。

### 3) 慢病毒转导 T 细胞

- 5 取出激活培养的 T 细胞, 加入终浓度为 8 $\mu$ g/ml 的聚凝胺 (polybrene), 混匀, 并按 MOI=2 缓慢加入慢病毒载体, 混匀后将其置于离心机中, 1500rpm, 离心 1.5 小时。然后将其置于培养箱培养, 培养条件为 37°C + 5% CO<sub>2</sub>, 培养时间至少 24 小时。

### 4) 转导后 T 细胞的扩增培养

- 取出转导后的细胞, 监测细胞密度, 使细胞维持在  $(0.5\sim1) \times 10^6$  个细胞/ml, 以备后  
10 续实施例使用。

- 使用分别包含有 Tan CD19-BCMA 结构、Tan BCMA-CD19 结构、Loop CD19-BCMA 结构、Loop BCMA-CD19 结构、CD19-2A-BCMA 结构、BCMA-2A-CD19 结构、CD19 CAR、BCMA CAR 的慢病毒分别感染 T 细胞后, 获得的 T 细胞分别命名为 Tan CD19-BCMA 细胞、Tan BCMA-CD19 细胞、Loop CD19-BCMA 细胞、Loop BCMA-CD19 细胞、  
15 CD19-2A-BCMA 细胞、BCMA-2A-CD19 细胞、CD19 细胞和 BCMA 细胞。接下来, 我们在细胞水平对 6 条双特异性 CAR 结构进行筛选, 以确定各个 CAR 结构的特点并选出较优的双特异性 CAR 结构。

## 实施例 2、BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞表面表达的 CAR 分子的检测

- 对实施例 1 中获得的 6 种双特异性 CAR-T 细胞表面表达的 CAR 蛋白分子进行检测,  
20 我们用 PE 荧光标记的 CD19 抗原 (厂家: ACRO Biosystems, 货号: CD9-HP2H3) 和 FITC 荧光标记的 BCMA 抗原 (厂家: ACRO Biosystems, 货号: BCA-HF254) 对实施例 1 中获得的 6 种 BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞和 UTD 细胞 (未转导 CAR 的 T 细胞) 进行染色, 并通过流式细胞术进行 CAR 分子阳性比例检测分析。发明人首先发现: 如图 2A 所示, 对于 CD19-2A-BCMA 细胞和 BCMA-2A-CD19 细胞, 在感染 T 细胞 6 天后,  
25 T2A 后面所连接的 CAR 分子表达很差, 所以 CD19-2A-BCMA 细胞和 BCMA-2A-CD19 细胞中的这两种 CAR 结构首先被淘汰。如图 2B、图 2C、图 2D、图 2E 所示: 在感染 T 细胞 6 天后, 其他 4 种双特异性 CAR-T 细胞 Tan CD19-BCMA 细胞、Tan BCMA-CD19 细胞、Loop CD19-BCMA 细胞、Loop BCMA-CD19 细胞的 CAR 表达率分别为 42.98%、66.71%、53.46%、61.63% (以 BCMA 抗原染色后的结果计, 原因详见实施例 3)。

- 30 实施例 3、BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞表面 CAR 分子的检测

发明人尝试了对实施例 1 所得感染 T 细胞 11 天后的双特异性 CAR-T 细胞进行单独染色（单独染色是指双特异性 CAR-T 细胞只采用 FITC 荧光标记的 BCMA 抗原或 PE 荧光标记的 CD19 抗原单独进行染色）和共同染色（共同染色是指双特异性 CAR-T 细胞既被 FITC 荧光标记的 BCMA 抗原染色，也被 PE 荧光标记的 CD19 抗原染色），以选择染色方式。因为 BCMA 胞外部分和 CD19 胞外部分构建在一条 scFv 上，总是共同表达，所以理论上双特异性 CAR-T 细胞无论采用单独染色还是共同染色时，结果差异应该控制在误差范围内。但我们发现选用不同抗原进行染色对双特异性 CAR-T 细胞的 CAR+细胞计算时有较大影响，结果如表 1（尤其是阴影部分）所示：

表 1、单独染色方式和共同染色方式的考察

| CAR+ (%)       | 单独染色      | 单独染色    | 共同染色      |         |
|----------------|-----------|---------|-----------|---------|
|                | FITC-BCMA | PE-CD19 | FITC-BCMA | PE-CD19 |
| Tan CD19-BCMA  | 70.22%    | 62.24%  | 70.70%    | 57.67%  |
| Tan BCMA-CD19  | 83.91%    |         | 83.28%    |         |
| Loop CD19-BCMA | 80.28%    |         | 80.23%    |         |
| Loop BCMA-CD19 | 85.93%    |         | 86.15%    |         |

10 以对 Tan BCMA-CD19 细胞进行 CAR+细胞比例表征为例，采用 BCMA 抗原单独染色时和采用 BCMA 抗原+CD19 抗原共同染色时，通过 BCMA 抗原检测到的 CAR+比例都在误差范围内。但采用 CD19 抗原单独染色时和采用 BCMA 抗原+CD19 抗原共同染色时，通过 CD19 抗原检测到数值波动较大，已远远超出误差范围；并且通过 CD19 抗原检测到的 CAR+细胞比例既显著低于通过 BCMA 抗原检测到的 CAR+细胞比例，同时以  
15 CD19 抗原检测时，单独染色和共同染色时检测到的 CAR+细胞比例之间也具有显著差异。同时上述观察也不受 CAR 结构中 BCMA 胞外抗原识别结构域和 CD19 胞外抗原识别结构域相对位置的限制。我们推测：与 CD19 抗原相比，BCMA 抗原更小一些，更容易克服双特异性 CAR 结构中的空间位阻问题与 CAR 蛋白结合，所以本申请后续试验中用 BCMA 抗原检测的数据表征 BCMA-CD19 双特异性 CAR 的阳性比例；当然，用共同染色法中 BCMA 抗原检测的数据同样可以表征 BCMA-CD19 双特异性 CAR 的阳性比例，  
20 但单独染色法更为简单。

**实施例 4、BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞进行细胞因子释放实验**

细胞因子释放实验：将实施例 1 中获得的 4 种双特异性 CAR-T 细胞（Tan CD19-BCMA、Tan BCMA-CD19、Loop CD19-BCMA、Loop BCMA-CD19）、BCMA  
25 CAR-T 细胞、CD19 CAR-T 细胞以及 UTD 细胞分别与靶细胞按照效靶比 1:1 的条件在

X-VIVO15 培养基中共培养 24h 后, 通过 ELISA 方法检测细胞上清中 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  的浓度; 其中: K562 是 BCMA 和 CD19 的双阴性靶细胞、K562-BCMA 是外源表达 BCMA 但不表达 CD19 的阳性靶细胞, K562-CD19 是外源表达 CD19 但不表达 BCMA 的阳性靶细胞。由于 K562-BCMA 细胞不表达 CD19 抗原, 因此未使用其对 CD19 CAR-T 细胞进行检测, 同理由于 K562-CD19 细胞不表达 BCMA 抗原, 因此未使用其对 BCMA CAR-T 细胞进行检测(在图 3A、图 3B、图 3C 中 K562-BCMA 组和 K562-CD19 组各缺少 1 个 bar)。

细胞因子 IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  的释放实验结果分别如图 3A、图 3B、图 3C 所示, 图 3A、图 3B、图 3C 中箭头指向细胞因子释放水平较低的 CAR-T 细胞。从图中可以看出: 相对于 Tan CD19-BCMA 结构和 Tan BCMA-CD19 结构, Loop CD19-BCMA 结构和 Loop BCMA-CD19 结构的双特异性 CAR 释放各种细胞因子的水平整体较高。尤其是, 从 Tan CD19-BCMA 结构和 Tan BCMA-CD19 结构的细胞释放因子水平也能看出, Tan CD19-BCMA 结构和 Tan BCMA-CD19 结构中远离细胞膜的 scFv 受到抗原刺激时, CAR-T 细胞释放细胞因子的水平相对较低。

#### 15 实施例 5、BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞进行细胞杀伤实验

细胞杀伤实验: 将实施例 1 中获得的 4 种双特异性 CAR-T 细胞(Tan CD19-BCMA、Tan BCMA-CD19、Loop CD19-BCMA、Loop BCMA-CD19)、BCMA CAR-T 细胞、CD19 CAR-T 细胞以及 UTD 细胞分别与靶细胞按照效应细胞与靶细胞不同效靶比(0:1、1:1、3:1 或 9:1) 的条件在 X-VIVO15 培养基中共培养 4 小时后, 通过检测靶细胞中稳定表达的荧光素酶活性检测靶细胞杀伤比例, NALM6 (人急性淋巴细胞白血病细胞) 是 CD19+BCMA<sup>+</sup>靶细胞、MM.1S (人多发性骨髓瘤细胞) 是 BCMA+CD19<sup>+</sup>靶细胞, NALM6<sup>-</sup>KO CD19 是敲除 CD19 同时也不表达 BCMA 的阴性靶细胞对照。细胞杀伤结果如图 4A-图 4C 所示: 在图 4A 中, Tan CD19-BCMA 细胞、Tan BCMA-CD19 细胞、Loop CD19-BCMA 细胞、Loop BCMA-CD19 细胞、CD19 CAR-T 细胞都对内源表达 CD19 的阳性靶细胞 NALM6 具有较好的杀伤效果, BCMA CAR-T 细胞和 UTD 细胞对内源表达 CD19 的阳性靶细胞 NALM6 不具有杀伤效果; 在图 4B 中, Tan CD19-BCMA 细胞、Tan BCMA-CD19 细胞、Loop CD19-BCMA 细胞、Loop BCMA-CD19 细胞、BCMA CAR-T 细胞都对内源表达 BCMA 的阳性靶细胞 MM.1S 具有较好的杀伤效果, CD19 CAR-T 细胞和 UTD 细胞对内源表达 BCMA 的阳性靶细

胞 MM.1S 不具有杀伤效果；在图 4C 中，所有细胞均对敲除 CD19 同时也不表达 BCMA 的阴性靶细胞对照不具有杀伤效果。

#### 实施例 6、BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞的持续增殖性

5 抗原刺激可以激活 CAR-T 细胞使 CAR-T 细胞增殖，而 T 细胞的持续激活会导致细胞耗竭，耗竭的 T 细胞的增殖能力和效应功能都会有所下降，我们通过检测 BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞在多次抗原刺激实验后 CD3<sup>+</sup>细胞的增殖情况（即 T 细胞的增殖情况）、CAR<sup>+</sup>细胞的增殖情况以及 CAR<sup>+</sup>细胞的比例，验证 BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞的持续增殖性。

10 抗原刺激之前，将实施例 1 中获得的 4 种双特异性 CAR-T 细胞（Tan CD19-BCMA、Tan BCMA-CD19、Loop CD19-BCMA、Loop BCMA-CD19）、BCMA CAR-T 细胞、CD19 CAR-T 细胞的 CAR 阳性比例都利用 UTD 调整到了与 CAR 阳性比例最低的一组 CAR-T 细胞一致的水平，其中 Tan CD19-BCMA 细胞、Tan BCMA-CD19 细胞、Loop CD19-BCMA 细胞、Loop BCMA-CD19 细胞、BCMA CAR-T 细胞的 CAR 阳性比例以 BCMA 抗原检测的数据为准，CD19 CAR-T 细胞的 CAR 阳性比例以 CD19 抗原检测的数据为准。在多次  
15 抗原刺激实验中，将各组 CAR-T 细胞分别与阳性靶细胞按照效靶比 1:2 在 24 孔板中进行共培养，每孔 2ml X-VIVO15 培养基，每组细胞重复 3 孔。阳性靶细胞分别采用 MM.1S 和 NALM6，相当于分别用 BCMA 和 CD19 作为抗原进行多次刺激以检验不同抗原多次刺激对 BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞持续增殖性的影响。由于 MM.1S 细胞不表达 CD19 抗原，因此未使用其对 CD19 CAR-T 细胞进行检测，同理由 NALM6 细胞不表达  
20 BCMA 抗原，因此未使用其对 BCMA CAR-T 细胞进行检测。

CAR-T 细胞与阳性靶细胞共培养 3 天后取 500 $\mu$ l 细胞用荧光标记的 CD3 抗体（厂家：BioLegend，货号：300312）和 BCMA 抗原、CD19 抗原（同实施例 2）进行 CD3 和 CAR 染色（Tan CD19-BCMA 细胞、Tan BCMA-CD19 细胞、Loop CD19-BCMA 细胞、Loop BCMA-CD19 细胞、BCMA CAR-T 细胞用 BCMA 抗原染色，CD19 CAR-T 细胞用 CD19  
25 抗原染色），通过流式细胞术进行检测分析，显示 CD3 阳性细胞中 CAR 阳性细胞的比例和数量，还可以根据体积倍数的换算计算 CD3 阳性细胞中 CAR 阳性的细胞数（CD3 是区分是否为 T 细胞的标记物），然后根据计算结果各组再取出一定量 CAR-T 细胞按照效靶比 1:2 加入对应的阳性靶细胞进行新一轮刺激，如此重复进行 3-4 轮刺激。

30 多次抗原刺激实验后，分别用 MM.1S 和 NALM6 细胞刺激的 CD3<sup>+</sup>细胞的增殖情况（即 T 细胞的增殖情况）的结果如图 5A、图 5B 所示；分别用 MM.1S 和 NALM6 细胞

刺激的 CAR+细胞的增殖情况的结果如图 5C、图 5D 所示。如图 5A 和图 5C 所示，多轮抗原刺激实验后，用 MM.1S 细胞刺激的 Tan BCMA-CD19 细胞中 CD3+细胞数（即 T 细胞的增殖情况）和 CAR+细胞数显著低于其他各组 CAR-T 细胞；如图 5B 和图 5D 所示，多轮抗原刺激实验后，用 NALM6 细胞刺激的 Tan CD19-BCMA 细胞中 CD3+细胞数和 CAR+细胞数显著低于其他各组 CAR-T 细胞；图 5A 和图 5B 相比、图 5C 和图 5D 相比可以发现，CAR-T 细胞受到 MM.1S 细胞刺激的增殖能力强于受到 NALM6 细胞刺激的情况。以上说明，Tan 结构的 BCMA-CD19 双特异性 CAR-T 细胞中远离细胞膜的 scFv 受到抗原刺激时，CAR-T 细胞的持续增殖能力相对较差；而 Loop 结构 CAR-T 细胞的持续增殖能力整体强于 Tan 结构，受到 BCMA 和 CD19 两种抗原刺激时都具有持续增殖的能力，其中受到 BCMA 抗原刺激的增殖能力较强。

综上，在体外药效学检测表明，Tan CD19-BCMA、Tan BCMA-CD19、Loop CD19-BCMA、Loop BCMA-CD19 结构在 T 细胞表面的表达、在细胞因子释放、体外细胞杀伤都有较好的表现；在 CAR-T 持续增殖性方面，Loop CD19-BCMA、Loop BCMA-CD19 结构显著优于 Tan CD19-BCMA、Tan BCMA-CD19 结构，表现更佳。并且 Loop CD19-BCMA、Loop BCMA-CD19 结构在各种实验检测中与 BCMA CAR-T、CD19 CAR-T 的表现比较接近，具有针对双靶点的完整功能。

#### 序列描述

- SEQ ID NO:1: BCMA VH CDR1;
- 20 SEQ ID NO:2: BCMA VH CDR2;
- SEQ ID NO:3: BCMA VH CDR3;
- SEQ ID NO:4: BCMA VL CDR1;
- SEQ ID NO:5: BCMA VL CDR2 (ETS, Glu Thr Ser);
- SEQ ID NO:6: BCMA VL CDR3;
- 25 SEQ ID NO:7: CD19 VH CDR1;
- SEQ ID NO:8: CD19 VH CDR2;
- SEQ ID NO:9: CD19 VH CDR3;
- SEQ ID NO:10: CD19 VL CDR1;
- SEQ ID NO:11: CD19 VL CDR2 (SAT, Ser Ala Thr);
- 30 SEQ ID NO:12: CD19 VL CDR3;

- SEQ ID NO:13: BCMA VH 序列 (人源化);  
SEQ ID NO:14: BCMA VL 序列 (人源化);  
SEQ ID NO:15: BCMA VH 序列 (兔源);  
SEQ ID NO:16: BCMA VL 序列 (兔源);
- 5 SEQ ID NO:17: CD19 VH 序列;  
SEQ ID NO:18: CD19 VL 序列;  
SEQ ID NO:19: Loop CD19-BCMA 结构中 scFv 的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:20: Loop BCMA-CD19 结构中 scFv 的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:21: 铰链区的氨基酸序列;
- 10 SEQ ID NO:22: 跨膜区的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:23: 胞内信号传导区的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:24: 共刺激信号传导区的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:25: 引导肽的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:26: Tan CD19-BCMA 结构的氨基酸序列;
- 15 SEQ ID NO:27: Tan BCMA-CD19 结构的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:28: Loop CD19-BCMA 结构的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:29: Loop BCMA-CD19 结构的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:30: CD19-2A-BCMA 结构的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:31: BCMA-2A-CD19 结构的氨基酸序列;
- 20 SEQ ID NO:32: CD19 CAR 结构的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:33: BCMA CAR 结构的氨基酸序列;  
SEQ ID NO:34: 连接序列;  
SEQ ID NO:35: 连接序列;  
SEQ ID NO:36: 连接序列;
- 25 SEQ ID NO:37: 编码如 SEQ ID NO:13 所示的 BCMA VH 氨基酸序列的核苷酸序列;  
SEQ ID NO:38: 编码如 SEQ ID NO:14 所示的 BCMA VL 氨基酸序列的核苷酸序列;  
SEQ ID NO:39: 编码如 SEQ ID NO:17 所示的 CD19 VH 氨基酸序列的核苷酸序列;  
SEQ ID NO:40: 编码如 SEQ ID NO:18 所示的 CD19 VL 氨基酸序列的核苷酸序列。

## 权利要求书

1. 一种靶向 BCMA-CD19 的双特异性嵌合抗原受体，其包含胞外抗原识别结构域、铰链区、跨膜区和细胞内结构域；其中：所述胞外抗原识别结构域包含抗 BCMA 胞外抗原识别结构域和抗 CD19 胞外抗原识别结构域；

所述抗 BCMA 胞外抗原识别结构域包括 BCMA VH 和 BCMA VL，其中 BCMA VH 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，BCMA VL 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述抗 CD19 胞外抗原识别结构域包括 CD19 VH 和 CD19 VL，其中 CD19 VH 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列，CD19 VL 互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列分别包括如 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述 BCMA VH 序列包括如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列，所述 BCMA VL 序列包括如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列；或者

所述 BCMA VH 序列包括如 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，所述 BCMA VL 序列包括如 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 2 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述 CD19 VH 序列包括如 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列，所述 CD19 VL 序列包括如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：CD19 VL 序列-第 1 连接序列-CD19 VH 序列-第 2 连接序列-BCMA VL 序列-第 3 连接序列-BCMA VH 序列，BCMA VL 序列-第 4 连接序列-BCMA VH 序列-第 5 连接序列-CD19 VL 序列-第 6 连接序列-CD19 VH 序列，BCMA VL 序列-第 7 连接序列-CD19 VL 序列-第 8 连接序列-CD19 VH 序列-第 9 连接序列-BCMA VH 序列，和 CD19 VL 序列-第 10 连接序列-BCMA VL 序列-第 11 连接序列-BCMA VH 序列-第 12 连接序列-CD19 VH 序列；

可选地，所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：BCMA VL 序列-第 7 连接序列-CD19 VL 序列-第 8 连接序列-CD19 VH 序列-第 9 连接序列-BCMA VH 序列，和 CD19 VL 序列-第 10 连接序列-BCMA VL 序列-第 11 连接序列-BCMA VH 序列-第 12 连接序列-CD19 VH 序列；

进一步可选地，第 1 连接序列、第 2 连接序列、第 3 连接序列、第 4 连接序列、第 5 连接序列、第 6 连接序列、第 7 连接序列、第 8 连接序列、第 9 连接序列、第 10 连接序列、第 11 连接序列、第 12 连接序列相互独立地选自以下序列的一种或多种：SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:36。

6. 根据权利要求 5 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述双特异性嵌合抗原受体的胞外抗原识别结构域包括如 SEQ ID NO:19 或 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述铰链区来源于 IgG1、IgG4、CD4、CD7、CD28、CD84、CD8 $\alpha$  中的一种或多种；可选地，所述铰链区的氨基酸序列来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列；和/或

所述跨膜区来源于 CD3、CD4、CD7、CD8 $\alpha$ 、CD28、CD80、CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc $\gamma$ 70 中的一种或多种；可选地，所述跨膜区的氨基酸序列来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述细胞内结构域包含胞内信号传导区；可选地，所述胞内信号传导区来源于 CD3 $\zeta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD66d、DAP10、DAP12、Syk 中的一种或多种；进一步可选地，所述胞内信号传导区来源于 CD3 $\zeta$ ；再更进一步可选地，所述胞内信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 1 所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述细胞内结构域还包括共刺激信号传导区；可选地，所述共刺激信号传导区来源于 CD2、CD3、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD244、4-1BB、OX40、LFA-1、ICOS、LIGHT、NKG2C、NKG2D、DAP10、B7-H3、MyD88 中的一种、两种或三种以上；进一步可选地，所述共刺激信号传导区来源于 CD28 或 4-1BB；再更进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的双特异性嵌合抗原受体，还包含位于所述嵌合抗原受体氨基酸序列 N-末端的引导肽；可选地，所述引导肽来源于 CD8 $\alpha$ ；进一步可选地，所述引导肽的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的双特异性嵌合抗原受体，其中所述双特异性嵌合抗原受体包括如 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列。

12. 一种分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1-11 中任一项所述的双特异性嵌合抗原受体的核苷酸序列；

可选地，编码所述双特异性嵌合抗原受体的核苷酸序列包含：

1) 编码如 SEQ ID NO:13 所示的 BCMA VH 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:37 所示；和编码如 SEQ ID NO:14 所示的 BCMA VL 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示；和/或

2) 编码如 SEQ ID NO:17 所示的 CD19 VH 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:39 所示；和编码如 SEQ ID NO:18 所示的 CD19 VL 氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:40 所示。

13. 一种载体，其包含权利要求 12 所述的分离的核酸分子；

可选地，所述载体为表达载体；

进一步可选地，所述载体为病毒载体；

再更进一步可选地，所述载体为慢病毒载体。

14. 一种经工程化的免疫效应细胞，其包含权利要求 1-11 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 12 所述的分离的核酸，或权利要求 13 所述的载体。

15. 根据权利要求 14 所述的经工程化的免疫效应细胞，其中所述经工程化的免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK 细胞）、外周血单个核细胞（PBMC 细胞）、多能干细胞、多能干细胞分化成的 T 细胞、多能干细胞分化成的 NK 细胞、诱导性多能干细胞（Induced pluripotent stem cells, iPSC）、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞（iPSC-T）、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞（iPSC-NK）和胚胎干细胞中的一种或多种；

可选地，所述经工程化的免疫效应细胞是 T 淋巴细胞；

进一步可选地，所述 T 淋巴细胞的来源为自体 T 淋巴细胞或同种异体 T 淋巴细胞。

16. 一种药物组合物，其包括权利要求 14 或 15 所述的经工程化的免疫效应细胞

和药学上可接受的辅料；可选地，药学上可接受的辅料包括保护剂；可选地，药学上可接受的辅料包括细胞冻存液。

17. 根据权利要求 16 所述的药物组合物，其中所述药物组合物为静脉注射剂。

18. 权利要求 1-11 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 12 所述的分离的核酸、权利要求 13 所述的载体或权利要求 14 或 15 所述的经工程化的免疫效应细胞在制备药物中的应用，所述药物用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

19. 根据权利要求 18 所述的用途，其中所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

20. 根据权利要求 18 所述的用途，其中所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病；可选地，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。

21. 一种治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括以下步骤：将有效量的权利要求 14 或 15 所述的经工程化的免疫效应细胞或权利要求 16 或 17 所述的药物组合物施用于具有治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症的需求的受试者。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

23. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病；可选地，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。

24. 根据权利要求 21-23 中任一项所述的方法，其中所述施用的方式为静脉注射；可选地，所述施用的方式为将有效量的权利要求 14 或 15 所述的经工程化的免疫效应细胞或权利要求 16 或 17 所述的药物组合物以单次注射的方式施用于受试者；

进一步可选地，有效量的权利要求 14 或 15 所述的经工程化的免疫效应细胞或权利要求 16 或 17 所述的药物组合物为  $1 \times 10^5$  至  $1 \times 10^7$  个细胞/kg 的剂量。

25. 权利要求 14 或 15 所述的经工程化的免疫效应细胞或权利要求 16 或 17 所述的药物组合物，用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

26. 根据权利要求 25 所述的经工程化的免疫效应细胞或药物组合物，其中与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症；可选地，所述癌症是多发性骨髓瘤；进一

步可选地，所述癌症是难治性或复发性的多发性骨髓瘤。

27. 根据权利要求 25 所述的经工程化的免疫效应细胞或药物组合物，其中所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症可以是自身免疫疾病；可选地，所述自身免疫疾病可以选自以下：全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力和自身免疫性溶血性贫血。