

一种基于单域抗体的 BCMA 嵌合抗原受体及应用

技术领域

本申请属于免疫细胞治疗领域，具体地，涉及一种基于单域抗体的 BCMA 嵌合抗原受体及应用。

背景技术

多发性骨髓瘤（MM）是一种发生于骨髓，以克隆性浆细胞的积累为特征的血液肿瘤。治疗方案主要聚焦在浆细胞凋亡及/或降低破骨细胞活性（例如化疗、沙利氮迈（thalidomide）、来那氮胺（lenalidomide）、双磷酸盐及/或蛋白酶体抑制剂，诸如硼替佐米（VELCADE®）或卡非佐米（carfilzomib））。多发性骨髓瘤目前还是一种难以治愈的疾病，只有大约 45% 的患者在确诊后能活过 5 年。许多患者暂停治疗之后病情还会反复复发，复发之后患者的 5 年内存活率不足 20%。

近年来，嵌合抗原受体 T 细胞疗法（Chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CART）成为目前最有发展前景的肿瘤免疫疗法之一。嵌合抗原受体由一个肿瘤相关抗原结合结构域、跨膜结构域、共刺激结构域以及胞内信号传导结构域组成。CART 细胞疗法一般通过基因转导技术，把识别肿瘤相关抗原的最小抗体结合片段（Single chain fragment variable 或，scFv）和 T 细胞活化序列的融合蛋白表达在 T 细胞表面。表达 CAR 分子的 T 细胞以抗原依赖、但非 MHC 限制的方式结合肿瘤抗原，特异性杀伤肿瘤细胞。

CART 细胞疗法的有效性依赖识别肿瘤相关抗原的抗体的特异性以及抗原结合的亲和力高低等性质。目前 CART 细胞胞内信号传导结构域的设计已经趋于成熟，抗原结合结构域的设计成为新型 CART 技术开发的重点和关键。羊驼源重链抗体（Heavy chain antibody, HCAb）中最小的、能完整结合抗原的单个功能域抗体片段，即没有轻链的重链抗体的可变区（又称为 VHH），结构简单，分子量约为普通抗体分子量的 1/10，可在体外表达系统（如大肠杆菌、酵母、真核细胞和植物）中高效表达和纯化。高特异性、高亲和力，免疫原性低，渗透性好，在进行肿瘤治疗时，具有接触到不能被常规抗体接触的较为隐

靶点的可能性。基于这些优点，利用单域抗体作为 CAR 的抗原结合区进行 CAR 修饰是 CART 细胞疗法的发展趋势之一。

就 B 细胞谱系恶性肿瘤而言，细胞成熟抗原（BCMA，B-cell maturation antigen）作为一种极为重要的 B 细胞生物标志物，它的 RNA 几乎总是在多发性骨髓瘤细胞中发现，并且该蛋白也被发现存在于多发性骨髓瘤患者恶性浆细胞表面。BCMA 由 185 个氨基酸残基组成的 III 型跨膜蛋白，属 TNF 受体超家族，其配体属于 TNF 超家族，如增殖诱导配体（APRIL）B 淋巴细胞刺激因子（BAFF），BCMA 与其配体结合后，可激活 B 细胞的增殖和存活。BCMA 特异高表达于浆细胞和多发性骨髓瘤细胞表面，而在造血干细胞和其他正常组织细胞中均不表达，因此，BCMA 可以作为 MM 的靶向性治疗的理想靶点。

发明内容

本申请利用基因工程手段设计了特异性单域抗体作为 CAR 的抗原结合区进行 CAR 修饰及 CART 细胞疗法，提出了一种基于单域抗体的特异性嵌合抗原受体（CAR），其包括靶点结合结构域、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域、以及胞内信号传导结构域，其中所述胞外结构域是能结合人 BCMA（B 细胞成熟抗原）的抗原结合片段。

一方面，本申请提供了一种嵌合抗原受体（CAR），所述 CAR 包含：BCMA 结合结构域、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域、以及胞内信号传导结构域；其中所述 BCMA 结合结构域包含重链互补决定区 1（HCDR1），重链互补决定区 2（HCDR2）和重链互补决定区 3（HCDR3），所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示且所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

在某些实施方式中，所述 BCMA 结合结构域为单域抗体。

在某些实施方式中，所述 BCMA 结合结构域包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

在某些实施方式中，所述跨膜结构域包含来自选自下述蛋白的多肽：T 细胞受体的 α ， β 或 ζ 链，CD28，CD3e，CD45，CD4，CD5，CD8a，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137 和 CD154。

在某些实施方式中，所述跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

在某些实施方式中，所述 BCMA 结合结构域通过铰链区与所述跨膜结构域相连接。

在某些实施方式中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

在某些实施方式中，所述一个或多个共刺激结构域来自选自下述的共刺激分子：CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54（ICAM）、CD83、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA4）、CD223（LAG3）、CD270（HVEM）、CD273（PD-L2）、CD274（PD-L1）、CD278（ICOS）、DAP10、LAT、NKG2C、SLP76、TRIM 以及 ZAP70。

在某些实施方式中，所述共刺激结构域包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

在某些实施方式中，所述胞内信号传导结构域包含 CD3 ζ 的信号传导结构域。

在某些实施方式中，所述胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

在某些实施方式中，所述的 CAR 还包含前导序列，所述前导序列包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

在某些实施方式中，所述的 CAR 包含 SEQ ID NO: 10-11 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

另一方面，本申请提供了分离的核酸分子，其编码所述的 CAR。

在某些实施方式中，所述核酸分子包含 SEQ ID NO: 12-13 所示的核酸序列或其功能性变体。

另一方面，本申请提供了一种载体，其包含所述的核酸分子。

在某些实施方式中，所述的载体选自 DNA 载体，RNA 载体，质粒，慢病毒载体，腺病毒载体和逆转录病毒载体。

在某些实施方式中，所述的载体还包含 EF1 启动子，该启动子包含 SEQ ID NO: 14 所示的序列。

另一方面，本申请提供了一种免疫效应细胞，其包含所述的 CAR，所述的核酸分子，或所述的载体。

在某些实施方式中，所述的免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞和自然杀伤（NK）细胞。

另一方面，本申请提供了一种制备免疫效应细胞的方法，其包括向免疫效应细胞中引入所述的载体。

在某些实施方式中，在所述的方法中，所述免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞和自然杀伤（NK）细胞。

另一方面，本申请提供了一种组合物，其包含所述的免疫效应细胞。

另一方面，本申请提供了所述的 CAR，所述的核酸分子，所述的载体，或所述的免疫效应细胞用于制备药物的用途，其中所述药物用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

另一方面，本申请提供了所述的 CAR，所述的核酸分子，所述的载体，或所述的免疫效应细胞，其治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

另一方面，本申请提供了治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括以下的步骤：向受试者施用所述的 CAR，所述的核酸分子，所述的载体，或所述的免疫效应细胞。

在某些实施方式中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症为癌症或恶性肿瘤。在某些实施方式中，所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症选自下组：B 细胞急性淋巴性白血病，T 细胞急性淋巴性白血病，急性淋巴性白血病，慢性髓性白血病，慢性淋巴细胞白血病，B 细胞幼淋巴细胞白血病，母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤，伯基特淋巴瘤，弥漫性大 B 细胞淋巴瘤，滤泡性淋巴瘤，毛细胞白血病，小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤，恶性淋巴增殖状况，MALT 淋巴瘤，外套细胞淋巴瘤，边缘区淋巴瘤，多发性骨髓瘤，脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征，非霍奇金淋巴瘤，浆母细胞淋巴瘤，浆细胞样树突状细胞瘤，瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症，前列腺癌，胰腺癌，肺癌，骨髓瘤，MGUS，浆细胞瘤，系统性淀粉样蛋白轻链淀粉样变性和 POEMS 综合征。

本申请的创新性及产生的有益技术效果：

申请人利用基因工程手段设计了包含特异性氨基酸序列的单域抗体，并以

此作为结合结构域（BCMA 结合结构域）构建嵌合抗原受体（CAR）。研究发现，包含该嵌合抗原受体的免疫细胞（如 CART 细胞）对相关肿瘤杀伤力强、特异性强。具体而言，所述 CAR 在体外高效地转导了健康人 T 淋巴细胞，对于 BCMA 阳性的靶细胞产生了强力的杀伤效果；并且在体内实验中，同样显示了很强的杀伤效果：利用转染有荧光素酶的 MM.1S 细胞建立原位骨髓瘤荷瘤鼠模型进行检测，用药 3 天后，荧光绝大部分消失，CART 细胞在体内有极好的治疗效果。

此外，本申请包含所述嵌合抗原受体所述免疫细胞在体外表现出很好的靶向性，其对 BCMA 阳性表达的细胞有极强的杀伤能力，而对不表达 BCMA 的细胞几乎没有任何杀伤作用；并且其在体内实验中，同样显示出很好的肿瘤靶向性。

附图说明

图 1 为本申请所述包含所述嵌合抗原受体的免疫细胞表达所述嵌合抗原受体的流式检测结果。

图 2 为多发性骨髓瘤 MM.1S 细胞（左图）、骨髓性白血病 K562 细胞（右图）表面的 BCMA 表达丰度的流式检测结果。

图 3A-3B 为肿瘤细胞和本申请所述包含所述嵌合抗原受体的免疫细胞共孵育后靶细胞杀伤率的结果。

图 4A-4B 肿瘤细胞和本申请所述包含所述嵌合抗原受体的免疫细胞共孵育后，ELISA 方法检测上清中的细胞因子含量的结果。

图 5 为本申请所述包含所述嵌合抗原受体的免疫细胞治疗荷瘤小鼠的检测结果。

图 6 为本申请所述包含所述嵌合抗原受体的免疫细胞治疗荷瘤小鼠的检测结果。

具体实施方式

申请人利用基因工程手段设计了特异性单域抗体作为 CAR 的抗原结合区进行 CAR 修饰及 CART 细胞疗法，提出了一种基于单域抗体的特异性嵌合抗原受体（CAR），其包括胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域，其中所述胞

外结构域是能结合人 BCMA (B 细胞成熟抗原) 的抗原结合片段, 选自羊驼单结构域抗体 (sdAb, 纳米抗体)。

本申请中, 术语“CDR”通常是指互补决定区, CDR 主要负责与抗原表位结合。重链的 CDR 通常被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 从 N-端开始顺序编号。在本申请中, 可以通过常规方法来限定或鉴定 CDR。例如, 根据 Kabat 等人 (Wu, TT 和 Kabat, E.A., J Exp Med. 132 (2) :211-50, (1970); Borden, P. 和 Kabat E.A., PNAS, 84:2440-2443 (1987) 的方法, 或者通过 Chothia 等人 (Chothia, C. 和 Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196 (4) :901-917 (1987) 的方法。

本申请中, 术语“单域抗体 (sdAb)”通常是指由抗体重链的可变区 (VH 结构域) 或抗体轻链的可变区 (VL 结构域) 组成的抗体片段 (Holt, L. 等人, Trends in Biotechnology, 21 (11) :484-490) 也称为纳体抗体 (Nanobody)。单域抗体大约只有 12—15kDa。第一个单域抗体是从羊驼的重链抗体中人工工程制作出来的, 又称为“VHH 区段”。在本申请中, 所述单域抗体可以为羊驼的单域抗体。例如, 所述 VHH 区段可以指重链抗体的最小的已知抗原结合单元 (Koch-Nolte 等人, FASEB J., 21:3490-3498 (2007))。

本申请中, 术语“跨膜结构域”可以与“跨膜区 (简称 TM)”互换使用, 指的是 CAR 的一部分, 其使胞外结合部分和胞内信号转导结构域融合, 并且使 CAR 锚定至免疫效应细胞的质膜上。跨膜区可以从天然蛋白质中获得, 也可以合成、半合成或重组获得。TM 结构域可以至少包括下述蛋白质的跨膜结构域: T 细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154 和 PD1。在本申请中, 所述跨膜结构域可以包含来自选自下述蛋白的多肽: T 细胞受体的 α , β 或 ζ 链, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 和 CD154。

本申请中, 术语“胞内信号传导结构域”通常是 CAR 的一部分, 其参与将有效的抗 BCMA CAR 结合人 BCMA 多肽的信息转导进免疫效应细胞的内部, 以引发效应细胞的功能, 例如活化、细胞因子的产生、增殖和细胞毒性, 包括细胞毒性因子至 CAR 结合的靶细胞的释放或者用与胞外 CAR 结构域结合的

抗原引发的其它细胞应答。在本申请中，所述胞内信号传导结构域可以包含CD3 ζ 的信号传导结构域。

本申请中，术语“BCMA”通常是指细胞成熟抗原，其属于肿瘤坏死因子受体超家族成员（参见Thompson等，*J.Exp.Medicine*, 192（1）:129-135, 2000）。BCMA能结合B细胞活化因子（BAFF）和增殖诱导配体（APRIL）（参见Kalled等，*Immunological Reviews*, 204:43-54, 2005）。在非恶性细胞中，已报道BCMA主要在浆细胞以及成熟B细胞中亚集中表达（参见Laabi等，*EMBO J.*, 77

（1）:3897-3904, 1992；Laabi等，*Nucleic Acids Res.*, 22（7）:1147-1154, 1994；Kalled等，2005；O'Connor等，*J.Exp.Medicine*, 199（1）:91-97, 2004；以及Ng等，*J.Immunol.*, 73（2）:807-817, 2004）。BCMA RNA在多发性骨髓瘤细胞和其它淋巴瘤中普遍被检测到，并且一些研究者在来自多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面上检测到了BCMA蛋白（参见Novak等，*Blood*, 103

（2）:689-694, 2004；Neri等，*Clinical Cancer Research*, 73（19）:5903-5909, 2007；Bellucci等，*Blood*, 105（10）:3945-3950, 2005；以及Moreaux等，*Blood*, 703（8）:3148-3157, 2004），因此BCMA可以作为恶性肿瘤（如多发性骨髓瘤）的潜在治疗靶点。

本申请中，术语“BCMA结合结构域”通常是指包含能特异性结合B细胞上表达的BCMA多肽的人源化的抗BCMA抗体或者其抗原结合片段。在本申请中，所述结合结构域可以源自天然来源、合成来源、半合成来源或者重组来源。在本申请中，所述胞外结合结构域可以包含针对BCMA的抗体或其抗原结合片段。其中，所述“抗体”可以为至少包含轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽，所述免疫球蛋白可变区特异性识别并结合抗原（例如BCMA）的表位，所述抗原如含有抗原决定簇（如由免疫细胞所识别的那些）的肽、脂质、多糖或核酸。

本申请中，术语“共刺激结构域”通常是指共刺激分子的胞内信号转导结构域。例如，共刺激分子可以是抗原受体或Fc受体之外的细胞表面分子，其在抗原结合时可提供T淋巴细胞的高效活化和功能所需的第二信号。例如，所述共刺激结构域可以选自以下组：CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54（ICAM）、CD83、CD134（OX40）、CD137（4-1BB）、CD150（SLAMF1）、CD152（CTLA4）、CD223（LAG3）、CD270（HVEM）、

CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C SLP76、TRIM和ZAP70。

本申请中，术语“铰链区”通常是指在嵌合抗原受体中，将所述结合结构域定位于远离效应细胞表面以能够进行适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化方面发挥作用的结合域。在本申请中，所述铰链区可以位于所述结合结构域和所述跨膜结构域之间。所述铰链区可以源自天然来源、合成来源、半合成来源或重组来源。铰链结构域可以包含天然存在的免疫球蛋白铰链区或人工修饰（包括缺失、替换或插入）的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

本申请中，术语“前导序列”通常是指能够被转录但不能被翻译的、位于结构基因编码区之前的一段序列。在本申请中，所述前导序列可以自5'端起至编码所述嵌合抗原受体的基因的第一编码子为止。在本申请中，所述前导序列包含SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列或其功能性变体。

本申请中，术语“功能性变体”通常是指包括与其具有基本上相同的功能（例如，可以具备所述嵌合抗原受体的性质），且与其具有至少85%（例如，至少85%，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%，或至少100%）序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述氨基酸序列的变体为与其具有基本上相同的功能（例如，可以具备所述嵌合抗原受体的性质），且在其基础上包含一个或多个（例如，1-2个、1-3个、1-4个、1-5个、1-6个、1-7个、1-8个、1-9个、1-10个或更多）氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列。

本申请中，术语“慢病毒载体”通常是指以病毒为基础发展起来的基因治疗载体。在本申请中，所述病毒可以为人类免疫缺陷病毒（HIV）、猴免疫缺陷病毒（SIV）、马传染性贫血（EIA）或猫免疫缺陷病毒（FIV）。所述慢病毒载体对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力，可以有效地感染包括神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等几乎所有的哺乳动物细胞，并且感染效率高。

本申请中，术语“EF1启动子”通常是指一种能够持续地使所调控的目的基因的转录水平维持在一定的水平上的启动子。在本申请中，所述EF1启动子可包含SEQ ID NO: 14所示的序列。在本申请中，所述EF1启动子所调控的所述嵌

合抗原受体的表达水平可以上调或下调至多5%、至多4%、至多3%、至多2%、至多1%、至多0.5%、至多0.1%、至多0.01%或更少。在本申请中，所述EF1启动子可以位于编码所述嵌合抗原受体的核酸的上游。

本申请中，术语“T淋巴细胞”通常是指包括胸腺细胞、未成熟的T淋巴细胞、成熟的T淋巴细胞、静止的T淋巴细胞或活化的T淋巴细胞。T细胞可以是辅助性T（Th）细胞，例如辅助性T1（Th1）细胞或者辅助性T2（Th2）细胞。T细胞可以是辅助性T细胞（HTL；CD4⁺T细胞）CD4⁺T细胞、细胞毒性T细胞（CTL；CD8⁺T细胞）、CD4⁺CD8⁺T细胞或CD4⁻CD8⁺T细胞。或者，所述T淋巴细胞可以包括初始T细胞和记忆T细胞。

本申请中，术语“自然杀伤细胞”通常是指白细胞的一种亚型，它是先天免疫系统的组成部分。NK细胞在肿瘤和病毒感染细胞的宿主排斥中起主要作用。NK细胞具有细胞毒性，诱导细胞凋亡。NK细胞可用于抑制病毒感染，通过适应性免疫应答产生抗原特异性细胞毒性T细胞从而清除感染。

本申请中，术语“癌症”通常是指机体在各种致癌因素作用下，局部组织的某一个细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，导致其克隆性异常增生而形成的新生物，因为这种新生物多呈占位性块状突起，也称赘生物(neoplasm)。在本申请中，所述癌症可以包括鳞状细胞癌、肺癌（包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌）、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃癌（包括胃肠癌）、胰腺癌、胶质母细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾或肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、头颈癌、B细胞淋巴瘤（包括低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤NHL）、小淋巴细胞性（SL）NHL、中级/滤泡型NHL、中等级弥漫性NHL、高级免疫母细胞NHL、高级淋巴细胞性NHL、高级小型非切割细胞NHL、艾滋病相关淋巴瘤、Waldenstrom的巨球蛋白血症）、慢性淋巴细胞白血病（CLL）、急性淋巴细胞白血病（ALL）、毛细胞白血病慢性髓细胞白血病和移植后淋巴增生性疾病（PTLD））。在本申请中，所述癌症可以包括与BCMA的表达相关的癌症或恶性肿瘤。例如，所述癌症可以选自下组：B细胞急性淋巴性白血病，T细胞急性淋巴性白血病，急性淋巴性白血病，慢性髓性白血病，慢性淋巴细胞白血病，B细胞幼淋巴细胞白血病，母细

胞性浆细胞样树突状细胞瘤，伯基特淋巴瘤，弥漫性大B细胞淋巴瘤，滤泡性淋巴瘤，毛细胞白血病，小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤，恶性淋巴增殖状况，MALT淋巴瘤，外套细胞淋巴瘤，边缘区淋巴瘤，多发性骨髓瘤，脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征，非霍奇金淋巴瘤，浆母细胞淋巴瘤，浆细胞样树突状细胞瘤，瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症，前列腺癌，胰腺癌，肺癌，骨髓瘤，MGUS，浆细胞瘤，系统性淀粉样蛋白轻链淀粉样变性和POEMS综合征。

本申请提供了一种嵌合抗原受体（CAR），所述 CAR 可包含：BCMA 结合结构域、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域、以及胞内信号传导结构域；其中所述 BCMA 结合结构域包含重链互补决定区 1（HCDR1），重链互补决定区 2（HCDR2）和重链互补决定区 3（HCDR3），所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示且所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

在本申请中，所述 BCMA 结合结构域可以大于或等于约 10^5M^{-1} （例如，大于或等于约 10^5M^{-1} 、大于或等于约 10^6M^{-1} 、大于或等于约 10^7M^{-1} 、大于或等于约 10^8M^{-1} 、大于或等于约 10^9M^{-1} 、大于或等于约 10^{10}M^{-1} 、大于或等于约 10^{11}M^{-1} 、大于或等于约 10^{12}M^{-1} 、大于或等于约 10^{13}M^{-1} 或更高）的 K_a （即结合相互作用的平衡缔合常数，数值为 $1/\text{M}$ ）；或者，以小于或等于约 10^{-5}M （例如，小于或等于约 10^{-5}M 、小于或等于约 10^{-6}M 、小于或等于约 10^{-7}M 、小于或等于约 10^{-8}M 、小于或等于约 10^{-9}M 、小于或等于约 10^{-10}M 、小于或等于约 10^{-11}M 、小于或等于约 10^{-12}M 、小于或等于约 10^{-13}M 或更小）的平衡解离常数 K_d 与 BCMA 结合或缔合。

在本申请中，可以使用本领域的常规技术测定所述 BCMA 结合结构域和 BCMA 的亲合力，例如，通过竞争性 ELISA（酶联免疫吸附分析），或通过结合缔合，或利用标记配体的位移分析（displacement assay），或者使用表面等离子共振装置（如 BiacoreT100，其可获自 Biacore, Inc., Piscataway, NJ）或光学生物传感器技术来测定。

在本申请中，所述 BCMA 结合结构域可以为单域抗体。适于构建本申请所述嵌合抗原受体的所述 BCMA 结合结构域包含但不限于 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或其功能性变体。其中所述功能性变体选自以下组：在所述

BCMA 结合结构域中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述 BCMA 结合结构域具有 90%以上（例如，具有至少约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述跨膜结构域可以包含来自选自下述蛋白的多肽：T 细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链，CD28，CD3 ζ ，CD45，CD4，CD5，CD8 α ，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137 和 CD154。在本申请中，所述跨膜结构域可以源自 CD8 α 的跨膜结构域。在本申请中，所述跨膜结构域可以包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或其功能性变体。其中所述功能性变体选自以下组：在所述跨膜结构域中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述跨膜结构域具有 90%以上（例如，具有至少约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述 BCMA 结合结构域可以通过铰链区与所述跨膜结构域相连接。在本申请中，所述 CAR 可以在所述 BCMA 结合结构域和所述跨膜结构域之间包含一个或多个所述铰链区。所述铰链区可以包含一些氨基酸的突变或替换，例如，可以包含脯氨酸残基被其他氨基酸残基（例如，丝氨酸残基）的突变或替换。在本申请中，所述铰链区可以包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或其功能性变体。其中所述功能性变体选自以下组：在所述铰链区中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述铰链区具有 90%以上（例如，具有至少约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99% 或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述共刺激结构域可以以抗原非依赖（例如，BCMA 非依赖）的方式起作用以提供次级或共刺激信号。在本申请中，所述 CAR 可以含有一个或多个所述共刺激结构域。多个所述共刺激结构域可以增强表达所述 CAR 的免疫细胞（如 T 细胞和 NK 细胞）的效力和增殖能力。例如，所述共刺激结构域可以连接至所述跨膜结构域的 C 端。在本申请中，所述一个或多个共刺激结构域可以来自选自下述的共刺激分子：CARD11、CD2、CD7、CD27、

CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKG2C、SLP76、TRIM 以及 ZAP70。在本申请中，所述共刺激结构域可以来自 CD137。在本申请中，所述共刺激结构域可以包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其功能性变体。其中所述功能性变体选自以下组：在所述共刺激结构域中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述共刺激结构域具有 90%以上（例如，具有至少约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述胞内信号转导结构域可以通过 TCR（例如，TCR/CD3 复合物）其抗原依赖性的初级活化。在本申请中，所述胞内信号转导结构域可以源自 TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d。在本申请中，所述胞内信号转导结构域可以包含 CD3 ζ 的信号转导结构域。例如，所述胞内信号转导结构域包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或其功能性变体。其中所述功能性变体选自以下组：在所述胞内信号转导结构域中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述胞内信号转导结构域具有 90%以上（例如，具有至少约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述的 CAR 还可以包含前导序列。例如，所述前导序列可以包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或其功能性变体。其中所述功能性变体选自以下组：在所述前导序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与所述前导序列具有 90%以上（例如，具有至少约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述的 CAR 在各结构域之间可以包含连接子。例如，为了各结构域之间的适当间隔和构象而添加的连接子。例如，所述连接子可以连接所述跨膜结构域和所述胞内信号转导结构域。在本申请中，所述连接子可以包

含以下的氨基酸序列：GGG、(GGGGS)_n和 GGRRGGGS。

在本申请的所述 CAR 中，所述跨膜结构域可以来自 CD8 α ，所述共刺激结构域可以来自 CD137 且所述胞内信号传导结构域可以来自 CD3 ζ 。

在本申请中，所述 CAR 可包含含有如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 HCDR1，如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的 HCDR2 和如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 HCDR3 的 BCMA 结合结构域、含有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列的跨膜结构域、含有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列的铰链区、含有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的共刺激结构域、含有如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的胞内信号转导结构域和含有如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的前导序列。

在本申请中，所述 CAR 可包含含有如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的 BCMA 结合结构域、含有如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列的跨膜结构域、含有如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列的铰链区、含有如 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列的共刺激结构域、含有如 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列的胞内信号转导结构域、含有如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列的前导序列。

在本申请中，所述 CAR 包含 SEQ ID NO: 10-11 所示的氨基酸序列或其功能性变体。其中所述功能性变体选自以下组：在所述 CAR 中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽；和与 CAR 具有 90%以上（例如，具有至少约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

本申请提供了分离的核酸分子，其可以编码所述的 CAR。

在本申请中，所述核酸分子可以包含 SEQ ID NO: 12-13 所示的核酸序列或其功能性变体。例如，所述功能性变体可以包含与 SEQ ID NO: 12-13 相比具有至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性的多核苷酸或变体，只要仍可以编码所述 CAR 即可。

本申请提供了一种载体，其可以包含所述的核酸分子。

在本申请中，所述载体可以包含复制起点、选择盒、启动子、增强子、翻译起始信号（Shine Dalgarno 序列或 Kozak 序列）、内含子、聚腺苷酸化序列、

5'和 3'非翻译区中的一种或多种。例如，所述的载体可以包含 EF1 启动子，该启动子可以包含 SEQ ID NO: 14 所示的序列。在本申请中，所述的载体可以选自质粒、噬菌体、人工染色体（例如酵母人工染色体 YAC）和动物病毒。例如，所述载体可以选自 DNA 载体，RNA 载体，质粒，慢病毒载体，腺病毒载体和逆转录病毒载体。

本申请提供了一种免疫效应细胞，其可以包含所述的 CAR，所述的核酸分子，或所述的载体。

在本申请中，所述的免疫效应细胞可以选自 T 淋巴细胞和自然杀伤（NK）细胞。

在本申请中，

本申请提供了一种制备免疫效应细胞的方法，其可以包括向免疫效应细胞中引入所述的载体。例如，将所述的 CAR 引入所述免疫细胞，并在其中表达，以将其特异性地重新定向至靶标抗原（例如，BCMA）。在本申请中，在所述的方法中所述免疫效应细胞可以选自 T 淋巴细胞和自然杀伤（NK）细胞。在本申请中，所述方法可以包括从对象中获得所述免疫效应细胞的步骤。例如，可以从外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾组织以及肿瘤获得所述 T 淋巴细胞。此外，所述方法可以进一步包括从所述免疫效应细胞中选择特定的细胞亚群的步骤。例如，可以通过 CD3、CD28、CD4、CD8、CD45RA 和 CD45RO 的特定表达的情况，选择特定的 T 细胞亚群。

本申请提供了一种组合物，其可以包含所述的免疫效应细胞。

在本申请中，所述组合物可以包含药学上可接受的载体。所述药学上可接受的载体可以选自以下组：赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等张剂、溶剂、表面活性剂和乳化剂。

在本申请中，所述组合物也可以进一步包含其他活性成分，如细胞因子、生长因子、激素、小分子化学药活性成分、前药和抗体中的一种或多种。

在本申请中，所述组合物中所述免疫效应细胞的量可以为有效量。所述有效量可以为达到有益的或期望的预防性或治疗性效果所需的最低的剂量。例

如，所述有效量可以被受试者的疾病程度、年龄、体重、性别等因素所影响。

本申请提供了所述的 CAR，所述的核酸分子，所述的载体，或所述的免疫效应细胞用于制备药物的用途，其中所述药物用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

本申请提供了所述的 CAR，所述的核酸分子，所述的载体，或所述的免疫效应细胞，其治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

本申请提供了治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症的方法，其包括以下的步骤：向受试者施用所述的 CAR，所述的核酸分子，所述的载体，或所述的免疫效应细胞。

在本申请中，所述与BCMA的表达相关的疾病或病症为癌症或恶性肿瘤。在本申请中，所述与BCMA的表达相关的疾病或病症选自下组：B细胞急性淋巴性白血病，T细胞急性淋巴性白血病，急性淋巴性白血病，慢性髓性白血病，慢性淋巴细胞白血病，B细胞幼淋巴细胞白血病，母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤，伯基特淋巴瘤，弥漫性大B细胞淋巴瘤，滤泡性淋巴瘤，毛细胞白血病，小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤，恶性淋巴增殖状况，MALT淋巴瘤，外套细胞淋巴瘤，边缘区淋巴瘤，多发性骨髓瘤，脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征，非霍奇金淋巴瘤，浆母细胞淋巴瘤，浆细胞样树突细胞瘤，瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症，前列腺癌，胰腺癌，肺癌，骨髓瘤，MGUS，浆细胞瘤，系统性淀粉样蛋白轻链淀粉样变性和POEMS综合征。

在本申请中，所述药物的给药方式可以包括气雾剂吸入、注射、摄取、输注、植入或者移植。例如，所述注射可以包括血管内、静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、瘤内、心脏内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射，或者可以直接注射至肿瘤或淋巴结。

下面通过详细的实施例对本申请进行进一步的阐述，应该理解，下述实施例仅是为了用于说明本申请，并不对发明内容进行限定。

实施例

实施例1 BCMA单域抗体VHH基因获取

1) BCMA单域抗体文库构建

利用购自北京义翘神州的 BCMA 抗原对成年健康的羊驼在颈背部皮下多点注射免疫。免疫时，加入抗原和等体积福氏佐剂，分 4-6 次免疫，跟踪观察注射部位包块吸收情况，以确认免疫正确。免疫间隔时间为 7-15 天，第 4 次免疫后，采血测定抗原免疫效价，当效价达到 1 万倍以上时（ELISA 方法），采血 100ml 左右，分离淋巴细胞，提取 RNA，并反转录成 cDNA，通过两次 PCR 扩增羊驼重链抗体的可变区片段 VHH。将 VHH 片段构建入噬菌体展示库中，并通过转化将携带有单域抗体的基因片段的产物转入感受态细胞中，从而获得单域抗体免疫文库。

2) BCMA 单域抗体筛选

利用噬菌体展示技术将单域抗体分子展示于噬菌体表面，进而筛选出抗原特异性的单域抗体。通过噬菌体酶联免疫吸附 ELISA 方法，将抗原用 100mM NaHCO₃ (pH8.0) 稀释至终浓度为 100μg/mL，包被 100μL 至 96 孔板中，4℃ 过夜。经过 PBS 冲洗、1% 脱脂牛奶封闭后，加入噬菌体孵育 1~2h，然后将抗原特异性的噬菌体洗脱并侵染 TG1 细胞，在含有氨苄青霉素的 LB 培养板上涂布培养，经过多轮筛选逐步达到富集。挑选大量阳性克隆进行 ELISA 检测并对阳性克隆进行测序，根据序列比对，确定独特的克隆并将其序列分为框架区 FR 和互补决定区 CDR。

将测序正确的克隆接种在 5mL 含有氨苄青霉素的 LB 培养液中，37℃ 摇床培养过夜；接种 1mL 的菌液至 300mL LB 培养液中，37℃ 摇床培养至 OD_{600nm} = 0.6~0.9 时，加入 1M IPTG，28℃ 摇床培养过夜；离心，收菌；利用渗透法，获得抗体粗提液；通过 ProteinL 标记并利用亲和层析法纯化出单域抗体，其产量均在 10mg/L 以上。利用 SPR 技术检测抗体的亲和力，进一步筛选出特异性高的单域抗体。通过以上实施方式，共获得 6 株 BCMA 单域抗体，选择亲和力较高的单域抗体。

其中一株 BCMA 单域抗体命名为 BCMA sdAb I。测序发现，BCMA sdAb I 的 HCDR1-3 的氨基酸序列依次如 SEQ ID NO: 1-3 所示。

实施例 2 嵌合抗原受体基因载体构建

由中美泰和公司合成 2 段基因，一段实施例 1 制备的 BCMA sdAb I 包含的核苷酸序列 SEQ ID NO:15；一段为设计的 2 代 CAR 结构基因（CD8a 铰链区、跨膜结构域+4-1BB 共刺激结构域+CD3 ζ 胞内信号传导结构域，编码包含这些结构域的 2 代 CAR 结构基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示）。得到合成基因后，进行分子克隆，进行 BCMA CAR 的构建，通过 PCR 得到 SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16 的 PCR 产物，进行重叠 PCR，得到两个片段连接在一起的 BCMA CAR 基因（其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示）；酶切慢病毒 Pre 载体和 BCMA CAR 基因，连接，转化，挑克隆，提质粒，测序，得到序列正确慢病毒载体 Pre-Lenti-EF1-BCMA

1) SEQ ID NO:15:

atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccggaagtccaact
ccaggcttccgggtggcgggttgacacagcctggagggtccctgcccgtctcctgcccagcaagtggcaggactttcag
tacctactttatggcctggttcagacagccacctggcaaaggcctcgaatacgtcggagggttaggtggtctgacggt
gtccctcactacgtgacagtgtgaagggtcggttcaccattagcagagacaacgtaagaatacagtgtacctgcaaa
tgaactcactgagagctgaggatactgctgtgtactctgcgcattctgcggaatcgtgacgggtcagactttggctcct
atggacagggcaccaggtgactgtgagttcc

2) SEQ ID NO:16:

ccagcgaagcccaccacgacgccagcgcgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcgcagcccc
tgtccctgcgcccagagggtgccggccagcggcgggggggcgagtgacacagaggggggtgacttcgcctgtg
atatctacatctggcgcccttgccgggacttggtgggtccttctcctgtcactggttatcaccctttactgaaacgggg
cagaaagaaactcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagct
gccgatttcagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgta
ccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagac
gtggccgggaccctgagatggggggaaagccgcagagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgc
agaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcgaggggcaaggggcacgat
ggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccctcacatgcaggccctgcccc tcgctaa

实施例 3 BCMA 嵌合抗原受体慢病毒制备

包装病毒前一天，胰酶消化 293T 细胞（购自 ATCC）， 1×10^7 个细胞/皿种

植 10cm 培养皿。转染细胞时，除了实施例 2 制备的 Pre-Lenti-EF1-BCMA 质粒外，每种质粒需和包装质粒 psPAX2、pMD2.0G 共转染。其中 Pre-Lenti-EF1-BCMA 使用 5 μ g，psPAX2 质粒使用 3.75 μ g，pMD2.0G 质粒使用 1.25 μ g。转染时，将以上三种质粒的混合物加入 500 μ l MEM 培养基内，在另一个微型离心管内将 25 μ l Lipofectamine（脂质体）2000 试剂加入 500 μ l MEM 培养基内，然后，将稀释的转染试剂逐滴加入稀释的质粒上方，混匀，离心，室温静置 20 分钟，最后将质粒和转染试剂形成的混合物加入 10cm 培养皿内，轻晃 10 次、混匀，放入孵箱。细胞转染 3 天后，收获病毒，将 10ml 含病毒培养上清转入 50ml 离心管内，4 $^{\circ}$ C，1250rpm，5 分钟，去除死亡的 293T 细胞，然后，将含病毒上清过滤，浓缩，分装，-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

实施例 4 BCMA 特异性嵌合抗原受体修饰的 T 细胞的制备

1) T 淋巴细胞的制备

在无菌环境，抽取志愿者静脉血 10ml。在 50ml 离心管中加入 10ml 人淋巴细胞分离液（达科为生物工程有限公司）。用电动移液枪将血液贴壁缓慢加入离心管中。放入离心机中，700g，22 $^{\circ}$ C 离心 25 分钟。离心结束后，PBMC 在上层血浆层和分离液之间的白膜层中。用巴氏吸管尽量将白膜层吸到另一支离心管中（加入 30ml 1640 培养基），注意不要吸到分离液。250g，22 $^{\circ}$ C，10 分钟。弃掉上层液体，用 3ml 1640 培养基重悬计数，用于 T 细胞纯化。

取 1×10^7 个细胞于微型离心管中。250g，22 $^{\circ}$ C，10 分钟离心。弃掉上层液体，80 μ L 磁珠分离缓冲液重悬细胞沉淀，加入 20 μ l 的 CD3 MicroBeads（美天旎）。冰箱 4 $^{\circ}$ C 区放置 1 小时，保证充分结合。1 小时后，在微型离心管中加入 1mL 的磁珠分离缓冲液，250g，4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟。期间准备过滤柱子，将过滤柱安放在磁铁上，用 500 μ l 的缓冲液润洗（缓冲液随着重力留下）。离心后细胞弃上清，500 μ l 的缓冲液重悬，加入柱子，缓冲液随着重力向下，细胞悬液流出后，柱子用 500 μ l 的缓冲液洗四次。将柱子从磁铁上卸掉，用 1mL 缓冲液将 T 细胞冲出，至 1.5ml 微型离心管。250g，4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟。含 IL2 的 X-vivo 15 培养基（Lonza）重悬，计数后按照 2×10^6 个 T 细胞/孔（6 孔板）种植。

2) 慢病毒感染 T 细胞

培养过夜后,加入 MOI 为 2 的实施例 3 制备的 Pre-Lenti-EF1-BCMA 病毒液,感染过夜。第二天,补加 1ml 新鲜培养基。第三天,T 细胞已充分活化,增殖旺盛,此时将 T 细胞转入 25cm² 培养瓶。感染 5 天后,使用生物素标记的 BCMA Fc 蛋白测定 BCMA CAR 分子在 T 细胞表面表达效率,产生定 BCMA CART 细胞。利用流式细胞仪检测细胞膜表面 CAR 的表达,BCMA CART 细胞表面 BCMA CAR 分子表达的流式检测结果见图 1。图 1 的结果显示,实施例 4 制备的 BCMA CART 细胞中,CAR 表达效率在 50%以上。

实施例 5 BCMA 嵌合抗原受体修饰 T 细胞功能评价

1) 体外功能评价

对多发性骨髓瘤 MM.1S 细胞、骨髓性白血病 K562 细胞(购自 ATCC 进行流式细胞术检测,结果参见图 2。图 2 的结果显示,BCMA 分子在 MM.1S 细胞中高效表达,在 K562 细胞中不表达。

体外细胞杀伤实验采用 LDH 检测试剂盒(Promega)进行检测。将实施例 4 制备的 BCMA CART 细胞和靶细胞(如 MM.1S 细胞或 K562 细胞)按照两者的个数比(即效靶比)为 0.5:1、1:1、2:1、4:1 设置四个梯度。其中靶细胞 3×10⁴ 个/孔,用含 X-VIVO 培养基/1640 培养基将其余所有孔的体系补足 200μL。将 96 孔板放置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。17 小时后,在最大释放的孔内加入 20 μL 的裂解液,混匀使细胞完全破裂,将 96 孔板放入 CO₂ 培养箱中孵育 2 小时。2 小时后,观察最大释放的孔,靶细胞全部裂解后从每个孔吸出 50μL 上清液到平底 96 孔板中,再在各个孔中加入 50μL 底物液,避光显色 30min。30min 之后观察颜色变化,其中最大释放 MM.1S 孔和含有 BCMA CART 细胞的孔的颜色比较深。酶标仪进行测量,测量波长为 490 nm。用 LDH 检测试剂盒获得杀伤力的检测结果。

结果如图 3 所示,其中对 K562 细胞的杀伤作用参见图 3A;对 MM.1S 细胞的杀伤作用参见图 3B。图 3 的结果说明,实施例 4 制备的 BCMA CART 细胞可以特异性杀伤 BCMA 阳性的细胞,且杀伤活性很高,均在 40%以上;同时这些 BCMA CART 细胞对 BCMA 阴性的细胞不具杀伤效应。

将 MM.1S 肿瘤细胞和实施例 4 制备的 BCMA CART 细胞共孵育，ELISA 方法检测上清中的 IFN- γ 、TNF α 含量。结果如图 4 所示，其中 IFN- γ 的含量如图 4A 所示，TNF α 的含量如图 4B 所示。图 4 的结果说明，不同的效靶比都能够上调具备肿瘤杀伤作用的细胞因子 IFN- γ 、TNF α 的表达量。这从另一个角度验证了 BCMA CART 细胞的特异性杀伤作用。

2) 动物实验

将人多发性骨髓瘤 MM.1S 细胞株转导表达荧光素酶报告基因（荧光素酶（luciferase），得到 MM.1S-luc。用含 10%胎牛血清（FBS）的 1640 培养基，置于 5%二氧化碳，37℃培养箱中常规培养。MM.1S-luc 细胞系以 1.5×10^6 个细胞/200 μ l PBS 尾静脉注射（50 只小鼠，雌雄各半）NSG 小鼠 17 天后，对所有动物进行成像，荷瘤均一小鼠进入实验组，随机分为 5 组（雌雄各半，每组 8 只小鼠），分别作为细胞外液组，Mock T 组，BCMA CART 低中高剂量组。其中，细胞外液组尾静脉注射细胞外液，Mock T 组尾静脉注射 Mock T 细胞，BCMA CART 低中高剂量组尾静脉注射实施例 4 制备的 BCMA CART 细胞。

3 天后，麻醉小鼠，腹腔注射 Luciferase 底物，使用小动物体内成像系统观察对照组（细胞外液组和 Mock T 组）小鼠和 BCMA CART 治疗组的肿瘤负荷情况，治疗后第 3 天和第 7 天的结果分别如图 5 和图 6 所示。

图 5 的结果可知，BCMA CART 高中剂量治疗组中几乎无肿瘤细胞成像，而对照组小鼠肿瘤负荷严重，表明 BCMA CART 能够有效清除 BCMA 阳性的肿瘤细胞。BCMA CART 细胞静脉回输后，第 3 天小鼠体内的荧光信号强度相对于细胞外液组、MOCK T 组开始降低，表明肿瘤负荷在降低。由图 6 可知，第 7 天小鼠体内的荧光信号强度基本检测不到，可见 BCMA CART 在动物体内实验中也表现出强大的针对 BCMA 表达相关疾病的治疗效果。

至此，本领域技术人员应认识到，虽然本文已详尽示出和描述了本申请的多个示例性实施例，但是，在不脱离本申请精神和范围的情况下，仍可根据本申请公开的内容直接确定或推导出符合本申请原理的许多其他变型或修改。因此，本申请的范围应被理解和认定为覆盖了所有这些其他变型或修改。

权 利 要 求 书

1. 嵌合抗原受体 (CAR)，所述 CAR 包含：BCMA 结合结构域、跨膜结构域、一个或多个共刺激结构域、以及胞内信号传导结构域；其中所述 BCMA 结合结构域包含重链互补决定区 1 (HCDR1)，重链互补决定区 2 (HCDR2) 和重链互补决定区 3 (HCDR3)，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示且所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的 CAR，其中所述 BCMA 结合结构域为单域抗体。

3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 CAR，其中所述 BCMA 结合结构域包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的 CAR，其中所述跨膜结构域包含来自选自下述蛋白的多肽：T 细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链，CD28，CD3e，CD45，CD4，CD5，CD8a，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137 和 CD154。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的 CAR，其中所述跨膜结构域包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的 CAR，其中所述 BCMA 结合结构域通过铰链区与所述跨膜结构域相连接。

7. 根据权利要求 6 所述的 CAR，其中所述铰链区包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的 CAR，其中所述一个或多个共刺激结构域来自选自下述的共刺激分子：CD11、CD2、CD7、CD27、CD28、
21

CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD150 (SLAMF1)、CD152 (CTLA4)、CD223 (LAG3)、CD270 (HVEM)、CD273 (PD-L2)、CD274 (PD-L1)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKG2C、SLP76、TRIM 以及 ZAP70。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的 CAR，其中所述共刺激结构域包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的 CAR，其中所述胞内信号传导结构域包含 CD3 ζ 的信号传导结构域。

11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的 CAR，其中所述胞内信号传导结构域包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

12. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的 CAR，其还包含前导序列，所述前导序列包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的 CAR，其包含 SEQ ID NO: 10-11 所示的氨基酸序列或其功能性变体。

14. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-13 中任一项所述的 CAR。

15. 编码 CAR 的分离的核酸分子，其包含 SEQ ID NO: 12-13 所示的核酸序列或其功能性变体。

16. 一种载体，其包含权利要求 14-15 中任一项所述的核酸分子。

17. 根据权利要求 16 所述的载体，其选自 DNA 载体，RNA 载体，质粒，

慢病毒载体，腺病毒载体和逆转录病毒载体。

18. 根据权利要求 16-17 中任一项所述的载体，其还包含 EF1 启动子，该启动子包含 SEQ ID NO: 14 所示的序列。

19. 一种免疫效应细胞，其包含权利要求 1-13 中任一项所述的 CAR，权利要求 14-15 中任一项所述的核酸分子，或权利要求 16-18 中任一项所述的载体。

20. 根据权利要求 19 所述的免疫效应细胞，其选自 T 淋巴细胞和自然杀伤（NK）细胞。

21. 一种制备免疫效应细胞的方法，其包括向免疫效应细胞中引入权利要求 16-18 中任一项所述的载体。

22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中所述免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞和自然杀伤（NK）细胞。

23. 组合物，其包含权利要求 19-20 中任一项所述的免疫效应细胞。

24. 权利要求 1-13 中任一项所述的 CAR，权利要求 14-15 中任一项所述的核酸分子，权利要求 16-18 中任一项所述的载体，或权利要求 19-20 中任一项所述的免疫效应细胞用于制备药物的用途，其中所述药物用于治疗与 BCMA 的表达相关的疾病或病症。

25. 根据权利要求 24 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或恶性肿瘤。

26. 根据权利要求 24-25 中任一项所述的用途,其中所述与 BCMA 的表达相关的疾病或病症选自下组: B 细胞急性淋巴性白血病, T 细胞急性淋巴性白血病, 急性淋巴性白血病, 慢性髓性白血病, 慢性淋巴细胞白血病, B 细胞幼淋巴细胞白血病, 母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤, 伯基特淋巴瘤, 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤, 滤泡性淋巴瘤, 毛细胞白血病, 小细胞或大细胞滤泡性淋巴瘤, 恶性淋巴增殖状况, MALT 淋巴瘤, 外套细胞淋巴瘤, 边缘区淋巴瘤, 多发性骨髓瘤, 脊髓发育不良和骨髓增生异常综合征, 非霍奇金淋巴瘤, 浆母细胞淋巴瘤, 浆细胞样树突细胞瘤, 瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症, 前列腺癌, 胰腺癌, 肺癌, 骨髓瘤, MGUS, 浆细胞瘤, 系统性淀粉样蛋白轻链淀粉样变性和 POEMS 综合征。