202300520

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202300520 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：111118769 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 05 月 19 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/18 (2006.01)* *C07K16/28 (2006.01)*
A61K39/395 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2021/05/19 世界智慧財產權組織 PCT/CN2021/094605

(71)申請人：大陸商上海詩健生物科技有限公司 (中國大陸) SHANGHAI ESCUGEN BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (CN)
中國大陸
大陸商廣州茵諾萊生物科技有限公司 (中國大陸) GUANGZHOU YINNUOLAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：張新敏 ZHANG, XIN-MIN (CN) ；粘偉紅 NIAN, WEI-HONG (CN) ；許傳營 XU, CHUAN-YING (CN) ；何峰 HE, FENG (CN) ；周 清 ZHOU, QING (US) ；張 劍冰 ZHANG, JIAN-BING (CA)

(74)代理人：李文賢；盧建川

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：8 共 97 頁

(54)名稱

特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子及其應用

(57)摘要

本申請公開了一種特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，編碼所述受體分子的核酸、包含所述受體分子的工程化免疫效應細胞、藥物組合物，及其用途。所述受體分子包含特異性識別 BAFF-R 的結構域及活化刺激結構域，可在特異性識別並結合 BAFF-R 後啟動下游訊號通路，引起、促進或提升針對 BAFF-R 的免疫應答反應，最終達到治療或預防由 B 細胞 BAFF-BAFF-R 訊號通路失衡引起的疾病的目的。

The present application discloses a chimeric antigen receptor molecule specifically recognizing BAFF-R, a nucleic acid encoding the receptor molecule, and an engineered immune effector cell and a pharmaceutical composition comprising the receptor molecule, and the uses thereof. The receptor molecule comprises a domain that specifically recognizes BAFF-R and an activation-stimulating domain, activates a downstream signaling pathway upon specific recognition and binding of BAFF-R to induce, promote, or elevate an immune response against BAFF-R for the ultimate purpose of treating or preventing diseases caused by imbalance in the BAFF-BAFF-R signaling pathway in B cells.

指定代表圖：

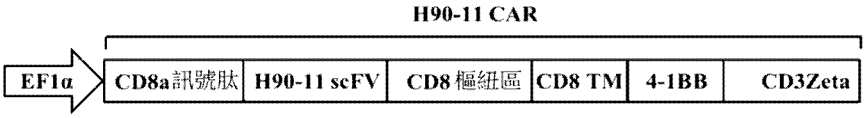

H90-11 CAR
EF1α
CD8a訊號肽
H90-11 scFV
CD8 樞紐區
CD8 TM
4-1BB
CD3Zeta

圖1

20230525
20230525
專利案號：111118769

【發明摘要】

【中文發明名稱】特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子及其應用

【英文發明名稱】Chimeric antigen receptor molecule specifically recognizing BAFF-R and the application thereof

【中文】

本申請公開了一種特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，編碼所述受體分子的核酸、包含所述受體分子的工程化免疫效應細胞、藥物組合物，及其用途。所述受體分子包含特異性識別BAFF-R的結構域及活化刺激結構域，可在特異性識別並結合BAFF-R後啟動下游訊號通路，引起、促進或提升針對BAFF-R的免疫應答反應，最終達到治療或預防由B細胞BAFF-BAFF-R訊號通路失衡引起的疾病的目的。

【英文】

The present application discloses a chimeric antigen receptor molecule specifically recognizing BAFF-R, a nucleic acid encoding the receptor molecule, and an engineered immune effector cell and a pharmaceutical composition comprising the receptor molecule, and the uses thereof. The receptor molecule comprises a domain that specifically recognizes BAFF-R and an activation-stimulating domain, activates a downstream signaling pathway upon specific recognition and binding of BAFF-R to induce, promote, or elevate an immune response against

BAFF-R for the ultimate purpose of treating or preventing diseases caused by imbalance in the BAFF-BAFF-R signaling pathway in B cells.

【指定代表圖】　　圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】　　無

【發明說明書】

【中文發明名稱】特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子及其應用

【英文發明名稱】Chimeric antigen receptor molecule specifically recognizing BAFF-R and the application thereof

【技術領域】

【0001】 本申請涉及一種工程化的特異性抗原識別受體分子及包含所述受體分子的工程化免疫效應細胞。

[對ASCII文本形式序列表的提交]

以下ASCII文字檔提交內容的全部內容通過引用併入本文：序列表的電腦可讀形式（CRF）（檔案名：TPF02324-sequence listing.txt，記錄日期：2022年5月12日，大小：12 KB）。

【先前技術】

【0002】 最近幾十年來，傳統的腫瘤治療方法(外科手術、化學治療、放射治療等) 取得了很大的進步，但是在生存率、復發和轉移等方面仍存在巨大的挑戰。隨著腫瘤生物學和免疫學研究的快速發展，近年來，免疫治療逐步成為腫瘤治療的新星。其中，嵌合抗原受體T細胞（Chimeric Antigen Receptor T-cell，CAR-T）療法成為目前最有發展前景的腫瘤免疫療法之一。

【0003】 T淋巴細胞在腫瘤免疫應答中起主要作用，對腫瘤細胞有極強的殺傷能力，但其作用的發揮具有MHC限制性。利用基因工程的方法將非MHC限制性方式識別目標抗原的單鏈抗體與樞紐區、跨膜結構域和T細胞的活化基序等連接組裝成CAR結構，並借助病毒等載體將CAR結構

整合入T細胞，最終使T細胞能特異性結合腫瘤細胞表面相關抗原而被啟動，即為CAR-T。CAR-T一方面通過釋放穿孔素、顆粒酶素B等直接殺傷腫瘤細胞；另一方面，活化的CAR-T進一步釋放細胞因子募集人體內源性免疫細胞殺傷腫瘤細胞，達到有效抑制腫瘤的目的；同時，還可形成免疫記憶T細胞，獲得特異性的抗腫瘤長效機制。

【0004】 一般而言，嵌合抗原受體由胞外結構域、跨膜結構域和活化刺激結構域組成。通常，胞外結構域由抗原識別結構域及一段起連接作用的樞紐區（Hinge）構成。抗原識別結構域是CAR特異性結合腫瘤抗原的基礎，其主要結構是scFv，通常由單克隆抗體的輕鏈（VL）和重鏈（VH）通過多肽連接而成，保留有抗體對抗原的特異性和親和力。樞紐區連接scFv和跨膜結構域，大多數CAR的樞紐區由IgG的鉸鏈或CD8α/CD28胞外區衍變而來。跨膜結構域將CAR的胞外結構域與胞內的活化刺激結構域連接，並將受體錨定到T細胞膜上，常用的跨膜結構域包括來源於CD4，CD8α，CD28和CD3ζ的跨膜結構域。活化刺激結構域由胞內共刺激結構域和訊號轉導結構域組成，共刺激結構域通常來自CD28受體家族(CD28，ICOS)或腫瘤壞死因子受體家族(4-1BB、OX40、CD27)，而訊號轉導結構域通常為T細胞受體TCR/CD3ζ鏈，含有免疫受體酪氨酸活化基序（immunoreceptor tyrosine-based activation motifs，ITAMs）。活化刺激結構域在介導T細胞訊號傳遞直至T細胞活化增殖從而最終完成殺傷腫瘤的過程中起著關鍵作用。

【0005】 B細胞惡性腫瘤為高發惡性腫瘤，全球每年新病發患者約30萬人，年增長率5%-7%。嵌合抗原受體T細胞（CAR-T）已廣泛應用於治

療B細胞惡性腫瘤，以CD19為靶點的CAR-T細胞療法對難治性B細胞惡性腫瘤有很好的療效，在急性淋巴細胞性白血病（ALL）和各種非霍奇金淋巴瘤亞型患者中的應答率高達80%-90%。然而，只有大約40%到50%的患者具有長期療效，大約30%的患者中會發生CD19表達下調/陰性復發。不管是基因修飾造成的CD19表達量下調，甚至完全丟失，或者剪切成其它形式，造成CD19 CAR-T細胞的無法識別等都給CD19 CAR-T治療帶來了極大挑戰。雖然近年來伴隨著免疫治療和靶向藥的突破，B細胞惡性腫瘤的臨床預後得到了巨大的改善，但是高復發率仍舊是個難題。因此，探索高表達於B細胞表面的其他抗原靶點，是目前解決復發及難治型B細胞惡性腫瘤的重要研究方向。

【0006】 腫瘤壞死因子（Tumor necrosis factor, TNF）超家族成員之一的B淋巴細胞刺激因子（B lymphocyte stimulator,簡稱BLyS），又名TNF及凋亡配體相關白細胞表達配體1 (TNF- and ApoL related leukocyte-expressed ligand 1, TALL-1)，啟動細胞凋亡，核因子κB和c-Jun氨基端激酶的TNF同源因子(TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-κB and c-Jun NH2-terminal kinase，THANK)，腫瘤超家族成員13B (TNF superfamily member 13B, TNFSF13B)，B細胞刺激因子（B cell-activating factor, BAFF）以及zTNF4，屬於II型跨膜蛋白，能特異地與B細胞結合，對B細胞的存活、增殖、發育和分化等起著關鍵的作用。BAFF有三種受體，分別是BAFF受體（BAFF receptor，BAFF-R）、B細胞成熟抗原（B cell maturation antigen，BCMA）和跨膜啟動、鈣調和親環素配基相互作用因子（TNFR homology

transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand intergrator，TACI），均為III型跨膜蛋白。BCMA和TACI不僅能與BAFF相結合，也能與TNF配體家族的另一成員增殖誘導配體（a proliferation-inducing ligand, APRIL）相結合，而BAFF-R是BAFF的特異性受體，在B淋巴細胞的調控方面比其他兩種受體發揮著更重要的作用。

【0007】 BAFF-R（B-cell activating factor receptor，B細胞活化因子受體），又名腫瘤壞死因子超家族成員13C（tumor necrosis factor receptor superfamily member 13C，TNFRSF13C），是B細胞膜上的TNF受體超家族（tumor necrosis factor receptors, TNFR）成員之一，是缺少訊號肽的III型跨膜蛋白。已公開的人BAFF-R氨基酸序列全長184個氨基酸，其中1-78位氨基酸為胞外區，79-99位元氨基酸為跨膜結構域，100-184位氨基酸為胞內區，其編碼基因位於染色體22q13.1區。BAFF-R主要表達於B細胞，通過啟動NF-κB通路促進B細胞存活和增殖，在多種B細胞惡性腫瘤細胞表面高表達。

【0008】 BAFF-BAFF-R訊號通路的失衡會引起機體免疫失衡，包括由BAFF-R在異常或正常細胞異常高表達引起的一系列病變，比如自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病和腫瘤等。該靶點覆蓋在B細胞成熟過程中較廣泛的階段，可以靶向除漿細胞病變（多發性骨髓瘤）以外的所有B細胞惡性疾病，適用範圍廣，且該靶點不表達在幹細胞和B祖細胞，因此不會永久傷害正常B細胞的恢復和功能重建，具有良好的安全性。

【0009】 伴隨著免疫治療和靶向藥物的突破，B細胞惡性腫瘤的臨床預後得到了巨大的改善，但是高復發率仍舊是個難題。因此，需要探索高

表達於B細胞表面的其他抗原靶點和治療藥物，以期解決復發及難治型B細胞惡性腫瘤。

【發明內容】

【0010】 本申請針對由B細胞BAFF-BAFF-R訊號通路失衡引起的疾病，例如B細胞惡性腫瘤，提供了一種特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子（CAR分子）和工程化免疫效應細胞（例如嵌合抗原受體T細胞（CAR-T））。通過研究證明，本申請的靶向BAFF-R的嵌合抗原受體T細胞對腫瘤細胞有極強的殺傷作用和體內抑瘤作用，具有開發潛力。

【0011】 具體地，本申請涉及：

1. 一種特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，包含特異性識別結構域及活化刺激結構域，以及位於所述特異性識別結構域和活化刺激結構域之間的跨膜結構域，其中，所述特異性識別結構域包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與它們具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

2. 項1的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，所述特異性識別結構域包含：

重鏈可變區，所述重鏈可變區包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列；以及

輕鏈可變區，所述輕鏈可變區包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

在一些實施方案中，本申請涉及一種特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，包含特異性識別結構域及活化刺激結構域，以及位於所述特異性識別結構域和活化刺激結構域之間的跨膜結構域，其中，所述特異性識別結構域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，所述重鏈可變區包含三個互補決定區CDR H1、CDR H2和CDR H3，並且所述CDR H1包含SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列，所述CDR H2包含SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列，所述CDR H3包含SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列；所述輕鏈可變區包含CDR L1、CDR L2和CDR L3，並且所述所述CDR L1包含SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列，所述CDR L2包含SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列，所述CDR L3包含SEQ ID NO: 12所示的氨基酸序列。所述CDR H1、CDR H2、CDR H3以及CDR L1、CDR L2、CDR L3是依照Kabat等(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3)確定的。

3. 根據項2的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述重鏈可變區和輕鏈可變區還進一步包含人抗體骨架區。在一些實施方案中，所述人抗體骨架區為人通用骨架區。在一些實施方案中，所述人通用骨架區包含VL的kappa I 亞組（κ I subgroup）骨架區序列和VH的III亞組（VH

III subgroup）骨架區序列。所述骨架區序列是依照Kabat等(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3)確定的。在一些實施方案中，所述人通用骨架區包含1-15, 1-10, 2-9, 3-8, 4-7或5-6個氨基酸的變化。

4. 根據項2或3的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO: 5中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列；以及所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

5. 根據項4的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述重鏈可變區與所述輕鏈可變區相連接（例如通過肽鏈連接，所述肽鏈例如由(G)n(S)m組成的連接子或接頭，其中n或m可為1-10之間的任一整數）形成scFv，所述scFv包含如SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

6. 根據項1-5中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述活化刺激結構域包含含有免疫受體酪氨酸活化基序的訊號轉導結構域。

7. 根據項6中所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中

所述訊號轉導結構域源自CD3ζ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、FcεRIγ、FcεR1β、CD79α、CD79β、FcγRIIa、DAP10、或DAP12分子的胞內區。在一些實施方案中，所述訊號轉導結構域包含CD3ζ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、FcεRIγ、FcεR1β、CD79α、CD79β、FcγRIIa、DAP10或DAP12分子胞內區的訊號轉導結構域，或保有其相同功能的變體。在一些實施方案中，所述訊號轉導結構域包含CD3ζ或FcεRIγ的胞內區的訊號轉導結構域，或保有其相同功能的變體。

8. 根據項7中所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述訊號轉導結構域包含如SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

9. 根據項6-8中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述活化刺激結構域進一步包含一個、兩個或更多個共刺激結構域。在一些實施方案中，所述共刺激結構域源自CD28受體家族或腫瘤壞死因子受體家族的共刺激結構域。

10. 根據項9中所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述共刺激結構域包含如下的一種或多種分子的胞內區：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD2、LFA-1、LIGHT、NKG2C、B7-H3、PD-1、ICOS、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHTR、SLAMF7、CD7、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、

LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1、SLAMF4、CD84、CD96、CEACAM1、CRTAM、CD229、CD160、PSGL1、CD100、CD69、SLAMF6、SLAMF1、SLAMF8、CD162、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、與CD83特異性結合的配體，及它們保有相同功能的變體；優選地為4-1BB胞內區、CD28胞內區、OX40胞內區的共刺激結構域，或它們保有相同功能的變體。

11. 根據項10中所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述共刺激結構域包含如SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

12. 根據項1-11中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述跨膜結構域包含選自下組分子的跨膜結構域或其保有相同功能的變體：TCRα、TCRβ、TCRγ、CD3ζ、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1、ICOS (CD278)、4-1BB、CTLA-4、GITR、CD40、BAFFR、LIGHTR、SLAMF7、NKp80、CD160、CD19、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA1、VLA1、CD49α、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、TNFR2、CD226、SLAMF4、CD84、CD96、CEACAM1、CRT AM、CD229、CD160、PSGL1、CDIOO、

SLAMF6、SLAMF1、SLAMF8、CD162、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、NKG2C；優選地為CD4、CD8α、CD28、CD3ζ、PD1、或4-1BB的跨膜結構域或其保有相同功能的變體。

13. 根據項12所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述跨膜結構域包含CD8α的跨膜結構域或其保有相同功能的變體。在一些實施方案中，所述跨膜結構域包含如SEQ ID NO: 16中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

14. 根據項1-13中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述跨膜結構域與所述特異性識別結構域直接連接。

15. 根據項1-13中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述跨膜結構域與所述特異性識別結構域之間通過樞紐區相連接。在一些實施方案中，所述樞紐區包含選自下組的氨基酸序列：人CD8α或抗體的Fc片段或其功能等效物、片段或衍生物，人CD8α或抗體的樞紐區或其功能等效物、片段或衍生物，抗體的CH2區，抗體的CH3區，人工間隔序列以及它們的組合。在一些實施方案中，所述樞紐區包含IgG、IgD、CD8α或CD28的樞紐區氨基酸序列，或其保有相同功能的變體。

16. 根據項15所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述樞紐區包含如SEQ ID NO: 14中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

17. 根據項1-16中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其進一步包含一段訊號肽，所述訊號肽選自任意分泌蛋白或膜蛋白的訊號肽序列。在一些實施方案中，所述訊號肽序列為CD8α的訊號肽。

18. 根據項17中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中所述訊號肽序列包含如SEQ ID NO:2中的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%以上序列同一性的氨基酸序列。

19. 編碼如項1-18中任一項所述特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子的核酸分子。

20. 根據項19所述的核酸分子，其包含如SEQ ID NO:3所示的多核苷酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的多核苷酸序列。在一些實施方案中，所述核酸分子包含由SEQ ID NO: 3中的核苷酸序列針對特定細胞或組織進行密碼子優化後得到的核苷酸序列。

21. 根據項要求19或20所述的核酸分子，其包含膜定位訊號肽分子的編碼序列。在一些實施方案中，所述膜定位訊號肽分子的編碼序列包含如SEQ ID NO: 1所示的多核苷酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的多核苷酸序列。

22. 根據項21中所述的核酸分子，其從5’端到3’端依次包含如下所述的多核苷酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如

與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%以上序列同一性的多核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 19。

23. 一種工程化免疫效應細胞，其包含如項1-18中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子或如項19-22中任一項所述的核酸分子。

24. 根據項23中所述的工程化免疫效應細胞，其中所述工程化免疫效應細胞為CAR-T和/或CAR-NK細胞。

25. 一種特異性識別BAFF-R的工程化T細胞受體，其包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與它們具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

26. 根據項25中所述的T細胞受體，其包含α鏈可變區（Vα）和β鏈可變區（Vβ），其中：

所述Vα包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，且所述Vβ包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；

或所述Vβ包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，且所述Vα包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO: 12的氨

基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

27. 編碼如項25或26所述T細胞受體的核酸分子。

28. 一種工程化免疫效應細胞，其包含如項25或26的T細胞受體和/或如項27所述的核酸分子。

29. 根據項28中所述的工程化免疫效應細胞，其中所述工程化免疫效應細胞為TCR-T細胞。

30. 一種藥物組合物，其包含治療有效量的如項1-18中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子或如項25或26所述的T細胞受體、如項19-22或項27中任一項所述的核酸分子、或如項23、24、28或29中所述的工程化免疫效應細胞。

31. 一種治療或預防有需要的受試者的疾病的方法，所述方法包括向受試者施用如項30所述的藥物組合物，所述疾病選自由B細胞BAFF-BAFF-R訊號通路失衡引起的疾病。

32. 項31的方法，其中所述疾病包括：自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病和腫瘤。

【0012】 本申請的示例性實施方案還包含：

1. 一種特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，包含特異性識別結構域及活化刺激結構域，以及位於所述特異性識別結構域和活化刺激結構域之間的跨膜結構域，其中，所述特異性識別結構域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

所述重鏈可變區包含三個互補決定區CDR H1、CDR H2和CDR H3，並且CDR H1包含SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列，CDR H2包含SEQ ID

NO: 7所示的氨基酸序列，CDR H3包含SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列；

所述輕鏈可變區包含 CDR L1、CDR L2 和 CDR L3，並且所述 CDR L1 包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，CDR L2 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列，CDR L3 包含 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。

2. 根據項 1 的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述重鏈可變區和輕鏈可變區還進一步包含人抗體骨架區。

3. 根據項 1 或 2 的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述重鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的氨基酸序列；以及所述輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的氨基酸序列。

4. 根據項 3 的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述重鏈可變區與所述輕鏈可變區連接形成 scFv，所述 scFv 包含如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的氨基酸序列。

5. 根據項 1-4 中任一項所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述活化刺激結構域包含訊號轉導結構域，所述訊號轉導結構域含有免疫受體酪氨酸活化基序。

6. 根據項 5 中所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述訊號轉導結構域包含 CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ε 、Fc ε RI γ 、Fc ε R1 β 、CD79 α 、CD79 β 、Fc γ RIIa、DAP10 或 DAP12 分子胞內區的訊號轉導結構域，或保有其相同功能的變體。

7. 根據項 6 中所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述訊號轉導結構域包含如 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列或與其具

有約 70%以上序列同一性的氨基酸序列。

8. 根據項 5-7 中任一項所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述活化刺激結構域進一步包含一個、兩個、三個或更多個共刺激結構域。

9. 根據項 8 中所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述共刺激結構域來自如下的一種或多種分子的胞內區：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD2、LFA-1、LIGHT、NKG2C、B7-H3、PD-l、ICOS、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHTR、SLAMF7、CD7、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8 α 、CD8 β 、IL2R β 、IL2R γ 、IL7R α 、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-l、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-l、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1、SLAMF4、CD84、CD96、CEACAM1、CRTAM、CD229、CD160、PSGL1、CD100、CD69、SLAMF6、SLAMF1、SLAMF8、CD162、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、及與 CD83 特異性結合的配體。

10. 根據項 9 中所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述共刺激結構域包含如 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的氨基酸序列。

11. 根據項 1-10 中任一項所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述跨膜結構域包含選自下組的跨膜結構域或其保有相同功能

的變體：CD4、CD8α、CD28 或 CD3ζ的跨膜結構域。

12. 根據項 11 所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述跨膜結構域包含如 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的氨基酸序列。

13. 根據項 1-12 中任一項所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述跨膜結構域與所述特異性識別結構域之間通過樞紐區相連接，所述樞紐區選自 IgG、IgD、或 CD8α/CD28 的樞紐區。

14. 根據項 13 所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子，其中所述樞紐區包含如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的氨基酸序列。

15. 編碼如項 1-14 中任一項所述特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子的核酸分子。

16. 根據項 15 所述的核酸分子，其包含如 SEQ ID NO:3 所示的多核苷酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的多核苷酸序列。

17. 根據項要求 15 或 16 所述的核酸分子，其進一步包含膜定位訊號肽分子的編碼序列。

18. 根據項 17 中所述的核酸分子，其中所述膜定位訊號肽分子的編碼序列包含如 SEQ ID NO: 1 所示的多核苷酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的多核苷酸序列。

19. 根據項 18 中所述的核酸分子，其從 5’端到 3’端依次包含如下所述的多核苷酸序列或與其具有約 70%以上序列同一性的多核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、

SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 19。

20. 一種工程化免疫效應細胞，其包含如項 1-14 中任一項所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子和/或如項 15-19 中任一項所述的核酸分子。

21. 根據項 20 中所述的工程化免疫效應細胞，其中所述工程化免疫效應細胞為 CAR-T 細胞。

22. 一種藥物組合物，其包含治療有效量的如項 1-14 中任一項所述的特異性識別 BAFF-R 的嵌合抗原受體分子、如項 15-19 中任一項所述的核酸分子、和/或如項 20 或 21 中所述的工程化免疫效應細胞。

23. 一種治療或預防有需要的受試者的疾病的方法，所述方法包括向受試者施用如項 22 所述的藥物組合物，其中，所述疾病選自由 B 細胞 BAFF-BAFF-R 訊號通路失衡引起的疾病。

24. 項23的方法，其中所述疾病包括：自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病和腫瘤。

【0013】 本申請提供的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，可特異性識別並結合BAFF-R後啟動下游訊號通路，引起、促進或提升針對BAFF-R的免疫應答反應，例如在體外或體內特異性殺傷表達BAFF-R的靶細胞，最終達到治療或預防由B細胞BAFF-BAFF-R訊號通路失衡引起的疾病的目的。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖1為本發明BAFF-R的嵌合抗原受體的結構示例。

圖2為示例性的抗BAFF-R的嵌合抗原受體慢病毒表達載體pCDH-EF1a-H90-11CAR-4-1BB-EGFRt的質粒圖譜。

圖3為作為對照的慢病毒表達載體pCDH-EF1a-EGFRt-AT-Free(delete T2A)的質粒圖譜。

圖4為使用FITC-EGFRt抗體檢測CAR陽性率的流式檢測結果。

圖5為使用BAFF-R蛋白檢測CAR陽性率的流式檢測結果。

圖6為H90-11 CAR-T細胞特異性殺傷Nalm6-螢光素酶靶細胞的結果圖。

圖7A至圖7B為H90-11 CAR-T細胞與Nalm6-螢光素酶靶細胞共培養後上清中IL-2（圖A）和IFN-γ（圖B）的分泌結果圖。

圖8A至圖8C為H90-11 CAR-T在小鼠體內的抗腫瘤效果圖。其中圖8A為在不同時間點小鼠體內活體成像結果圖；圖8B為繪製的在不同時間點小鼠體內絕對發光量曲線圖；圖8C為繪製的在22天時間內小鼠體重變化曲線圖。

【實施方式】

【0015】 為進一步改善和提升B細胞惡性腫瘤的治療效果，本申請針對在B細胞表面特異性高表達的BAFF-R蛋白設計了一種新型的識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，並提供了編碼所述受體的核酸分子、包含所述受體的工程化免疫效應細胞、藥物組合物，及其用途，用於治療或預防由B細胞BAFF-BAFF-R訊號通路失衡引起的疾病例如B細胞惡性腫瘤的目的。

【0016】 [定義]

為了解釋本說明書的目的，將應用以下定義，並且在適當時，單數形式使用的術語也將包括複數形式，反之亦然。如果以下提出的任何定義與通過引用併入本文的任何檔相衝突，則以提出的定義為准。

如本文所用，“受體”是指能夠同激素、神經遞質、藥物或細胞內訊號分子等結合並能引起細胞功能變化的生物大分子。根據受體在細胞中的位置，受體可分為細胞膜受體和細胞內受體兩大類。受體本身至少含有兩個活性部位：一個是識別並結合配體的活性部位（在本申請中稱為“特異性識別結構域”）；另一個是負責產生應答反應的功能活性部位（在本文中稱為“活化刺激結構域”）。所述活化刺激結構域只有在所述受體與配體結合形成二元複合物並變構後才能產生應答反應，由此啟動一系列的生化反應，最終導致所述受體所在的效應細胞產生生物效應。如本文所用，所述“活化刺激結構域”包含訊號轉導結構域，或包含一個或多個訊號轉導結構域和一個或多個共刺激結構域。在本文中，如非特別指出，“訊號轉導結構域”提供活化淋巴細胞，例如活化T細胞或NK細胞的第一訊號，而“共刺激結構域”提供活化淋巴細胞的第二訊號。在一些實施方案中，在所述抗原識別區與所述活化刺激結構域之間還進一步包含跨膜結構域。在一些實施方案中，所述抗原識別區與跨膜結構域之間通過樞紐區相連接。

如本文所用，“胞內結構域”與“胞內區”可互換使用，可指受體分子位於胞內並在受體與配體結合後起訊號轉導作用的結構域。

如本文所用，“嵌合抗原受體(CAR)”是一類工程化的細胞表面受體，一般表達在免疫細胞上，介導工程化免疫細胞針對特定靶點腫瘤細胞或其他病變細胞的殺傷。作為一種受體，CAR同樣也包含了特異性識別結構域

和活化刺激結構域。CAR的特異性識別結構域可特異性識別抗原，因此又稱為抗原識別區。通常CAR的抗原識別區位於細胞膜外。在一些實施方案中，所述抗原識別區是Ig的單鏈可變片段（scFv），“scFv”包含Ig的一個重鏈可變區（VH）和一個輕鏈可變區（VL）。在一些特定的實施方案中，所述VL和VH區通過一條肽鏈連接在一起。

術語“重鏈”（“CH”）、“輕鏈”（“CL”）、“輕鏈可變區”（“VL”）、“重鏈可變區”（“VH”）、“骨架區”（“Framework Region，FR”）是指天然存在的免疫球蛋白中的結構域和合成的（例如重組的）結合蛋白（例如人源化抗體）的相應結構域。天然存在的免疫球蛋白（例如IgG）的基本結構單元是具有兩個輕鏈和兩個重鏈的四聚體。每條鏈的氨基端（“N”）部分包括約100至110或更多個氨基酸的可變區，主要負責抗原識別。每條鏈的羧基端（“C”部分）定義一個恒定區，輕鏈具有單個恒定結構域，重鏈通常具有三個恒定結構域和一個樞紐區。因此，天然存在的輕鏈結構IgG分子是N-VL-CL-C，IgG重鏈的結構是N-VH-CH1-H-CH2-CH3-C（其中H是樞紐區）。其中CH1，CH2和CH3是抗體重鏈恒定區的組成部分，CH3區域涉及到細胞膜表面受體結合，CH2涉及補體啟動途徑，是補體結合位點，CH1具有Ig同種異型遺傳標誌。IgG的可變區由互補決定區（CDR）和非CDR片段（稱為骨架區）組成。其中，CDR包含與抗原接觸的殘基，骨架區用於維持可變區結構並決定CDR環的位置。因此，VL和VH結構域具有以下結構：N-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C。

【0017】 在一些實施方案中，所述特異性識別結構域為scFv以外的多肽或蛋白配體，例如經修飾白細胞介素-13(IL-13)分子可用于製備特異性

識別結構域，從而得到用於治療膠質母細胞瘤的IL-13Rα2特異性的CAR。

在本文中，術語“單鏈可變片段”、“單鏈抗體可變片段”或“scFv”抗體是指包含僅重鏈(VH)和輕鏈(VL)的可變區的抗體形式，通過接頭肽連接。scFv能夠被表達為單鏈多肽。scFv保留了其所源自的完整抗體的特異性。輕鏈和重鏈可以為任何順序，例如，VH-接頭-VL或VL-接頭-VH，只要保留scFv對靶抗原的特異性即可。在一些特殊的實施方案中，也可以省去接頭。

如本文所用，術語“接頭”是指長度為約1至100個氨基酸的寡肽或多肽區，其將本發明的CAR的任何結構域/區連接在一起。接頭可由柔性殘基(如甘氨酸和絲氨酸)組成，以便相鄰的蛋白質結構域相對于彼此自由移動。當期望確保兩個相鄰結構域在空間上不相互干擾時，可使用較長的接頭。可選的接頭是本領域技術人員已知的，可以結合本發明的替代性實施方案使用。

如本文所用，術語“抗體”是指完整的免疫球蛋白或具有Fc(可結晶的片段)區或Fc區的FcRn結合片段(在本文中稱為“Fc片段”或“Fc結構域”)的單克隆或多克隆抗原結合片段。抗原結合片段可以通過重組DNA技術或通過完整抗體的酶促切割或化學切割產生。抗原結合片段尤其包括Fab、Fab’、$F(ab')_2$、FV、dAb和互補決定區(CDR)片段、單鏈抗體(scFv)、單結構域抗體、嵌合抗體、雙抗體和這樣的多肽，其至少含有免疫球蛋白足以賦予該多肽特異性抗原結合的部分。Fc結構域包括兩條重鏈的CH2和CH3部分，可以通過重組DNA技術或通過完整抗體的酶促(例如木瓜蛋白酶切割)或通過完整抗體的化學切割來產生。術語“抗體片段”是指僅包含

完整抗體的一部分的蛋白質片段，通常包括完整抗體的抗原結合位點，因此保留結合抗原的能力。本文所述的抗體片段實例包括但不限於：(i)具有VL、CL、VH和CH1結構域的Fab片段；(ii)Fab'片段，即在CH1結構域的C末端具有一個或多個半胱氨酸殘基的Fab片段；(iii)具有VH和CH1結構域的Fd片段；(iv)具有VH和CH1結構域以及在CH1結構域的C-末端的一個或多個半胱氨酸殘基的Fd'片段；(v)具有抗體單臂的VL和VH結構域的Fv片段；(vi)由VH結構域組成的dAb片段(Ward等，Nature 341，544-546(1989))；(vii)分離的CDR區；(viii)$F(ab')_2$片段，包含在樞紐區通過二硫鍵橋接的兩個Fab'片段的二價片段；(ix)單鏈抗體分子(例如，單鏈Fv；scFv) (Bird等，Science 242：423-426(1988)；和Huston等，PNAS(USA)85：5879-5883(1988))；(x)具有兩個抗原結合位點的"雙抗體"，其包含與同一多肽鏈中的輕鏈可變結構域(VL)連接的重鏈可變結構域(VH)(參見，例如，EP404,097；WO93/11161；和Hollinger等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90：6444-6448(1993))；(xi)"線性抗體"，其包含一對串聯Fd區段(VH-CH1-VH-CH1)，所述Fd區段與互補的輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區(Zapata等，Protein Eng .8(10)：1057-1062(1995)；和美國專利No .5 ,641 ,870)。

如本文所用，術語"特異性結合"是指抗體與特定抗原相結合，而不與所述特定抗原以外的其它抗原結合。其中所述特定抗原可以是一種或多種，在一些實施方式中，所述特定抗原包含相同或相近的抗原表位。在一些實施方案中，所述特異性結合的結合親和力為至少10^{-6}M的抗體與抗原之間的接觸。在某些實施方案中，所述抗體以至少約10^{-7}M，優選10^{-8}M、

10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或10^{-12}M的親和力結合。

本申請中，術語“多核苷酸”或“核酸”、“核酸分子”可互換使用，包括但不限於DNA、RNA、cDNA(互補DNA)、mRNA(信使RNA)、rRNA(核糖體RNA)、shRNA(小髮夾RNA)、snRNA(小核RNA)、snoRNA(短核仁RNA)、miRNA(微小RNA)、基因組DNA、合成DNA、合成RNA和/或tRNA。

如本文所用，“載體”、“克隆載體”和“表達載體”是指通過其可以將多核苷酸序列(例如外來基因)引入宿主細胞中，以轉化宿主並促進引入序列的表達(例如轉錄和翻譯)的載體。所述載體包括質粒、噬菌體、病毒等。

如本文所用，所述“訊號轉導結構域”通常包含免疫受體的酪氨酸活化基序(immune-receptor tyrosine-based activation motifs，ITAM)，其基本組成是：YXXL/V。其中Y為酪氨酸，L/V指亮氨酸或纈氨酸，X可為任意氨基酸。當受體與相應配體結合後，與其連接的ITMA中的酪氨酸在與細胞膜相連的一類蛋白酪氨酸激酶PTK的作用下，可被磷酸化，從而招募胞內游離的其他蛋白激酶或銜接蛋白，向細胞內傳導活化訊號。在一些實施方案中，所述“訊號轉導結構域”選用TCRζ(CD3ζ)或FcεRIγ的胞內訊號轉導結構域。

如本文所用，所述“共刺激結構域”又稱為“共刺激訊號域”，主要用於提供共刺激訊號來增強免疫細胞的能力，包括例如增強記憶細胞的增殖、存活和/或發育。在一些實施方案中，所述“共刺激結構域”選自CD28、4-1BB(CD137)、OX40（CD134）等。

如本文所用，所述“跨膜結構域”又稱“跨膜區”，是指錨定在細胞膜內

具有熱力學穩定的蛋白質結構區域。跨膜結構域可以從天然蛋白質中獲得，例如來源於T細胞受體（TCR）的跨膜結構域。在一些實施方案中，所述跨膜結構域選自CD4，CD8α，CD28和CD3ζ的跨膜結構域。

如本文所用，所述“樞紐區”是連接抗原識別區及跨膜結構域的一段肽鏈，通常具有彈性。在一些實施方案中，所述樞紐區由IgG的鉸鏈或CD8α/CD28的胞外區衍變而來。其中IgG的“鉸鏈”是指IgG的CH1和CH2功能區之間的區域，通常含大量脯氨酸。

如本文所用，“抗BAFF-R的嵌合抗原受體”是“特異性識別BAFF-R的受體”中的一種。其特指抗原識別區中含有抗BAFF-R抗體重鏈可變區和輕鏈可變區的嵌合抗原受體。所述嵌合抗原受體能特異性識別BAFF-R，並通過訊號傳導啟動所述受體所在細胞的下游通路。在一些實施方案中，所述抗BAFF-R的嵌合抗原受體位於選自NK細胞、巨噬細胞、中性粒細胞、T細胞等免疫細胞的表面，在特異性識別BAFF-R之後，啟動所述免疫效應細胞產生體液免疫、細胞免疫、和/或細胞毒性作用等免疫效應；或啟動所述免疫細胞進一步增殖等。

如本文所用，“免疫效應細胞”是指能夠針對靶抗原或靶細胞實現免疫效應和免疫反應，例如免疫殺傷效應、免疫應答效應的細胞，例如T細胞及自然殺傷(NK)細胞。

如本文所用，“CAR-T”即嵌合抗原受體T細胞，是在細胞表面表達有嵌合抗原受體分子的T細胞，可識別細胞表面的靶抗原。CAR-T目前已開發到第4代。其中第1代CAR-T的CAR分子由CD3ζ鏈或FcεRIγ的訊號轉導結構域與抗原識別區連接融合而成，不含有共刺激結構域。第1代CAR-T

在體內的增殖能力有限，容易凋亡。第2代CAR增加了1個共刺激結構域，例如CD28或4-1BB（CD137）。CD28具有較強的抗腫瘤活性，而4-1BB的優點是能延長T淋巴細胞的存活時間並維持其抗腫瘤作用。第2代CAR增殖能力較第1代強，且能分泌更多細胞因子、抗凋亡蛋白。第3代CAR-T不僅可以同時表達2個共刺激訊號分子，而且能夠分泌更多的IFN-γ，抗腫瘤細胞毒作用更高。第4代CAR-T還能夠在腫瘤中分泌特定的細胞因子(如IL-12），從而改變腫瘤微環境，並影響和啟動其他免疫細胞產生免疫反應。

如本文所用，所述“訊號肽”是指是引導新合成的蛋白質向分泌通路轉移的短肽鏈，長度通常為5-30個氨基酸。在一些實施方案中，所述訊號肽為膜定位訊號肽，即用於指導蛋白質的跨膜轉移（定位）的氨基酸序列。在多數情況下，訊號肽位於氨基酸序列的N端。在mRNA中，訊號肽的編碼序列通常位於起始密碼子後，是一段編碼疏水性氨基酸序列的RNA區域。在訊號肽引導蛋白質完成定位後，通常會在訊號肽酶的作用下被切除。

如本文所用，所述蛋白或核酸的“變體”是指與特定蛋白或核酸相比，具有相同功能，但序列存在一個或多個突變的蛋白或核酸。例如某一蛋白的“變體”即是指通過人為或天然突變，使所述某一蛋白的氨基酸序列發生一個或多個氨基酸的插入、缺失、替換等突變，獲得的與所述某一蛋白具有相同功能以及至少70%序列同一性的蛋白。

如本文所用序列的“同一性”是指氨基酸序列之間或核苷酸序列之間通過序列比對軟體，例如BLAST，確定的相似程度。

【0018】 本領域技術人員應當知曉BAFF-BAFF-R訊號通路失衡可

引起多種疾病，包括：自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病和腫瘤等。所述腫瘤包括除漿細胞病變（多發性骨髓瘤）以外的所有B細胞惡性疾病，例如套細胞淋巴瘤、濾泡淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、淋巴母細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病、毛細胞白血病等。所述自身免疫疾病包括例如：類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、多發性硬化症、腎小球腎炎、舍葛蘭綜合征或自身免疫性溶血性貧血等。

如本文所用，術語“有效量”或“治療有效量”是指包含一種或多種本申請公開的肽、蛋白、核酸或其突變型、變體、類似物或衍生物的藥物組合物的量，且接受所述“有效量”或“治療有效量”的藥物組合物的患者或受試者可獲得醫學治療的合理益處/風險比，從而減輕或預防疾病或病症的至少一種或更多種症狀，達到期望的治療或預防效果。

如本文所用，術語“約”是指本技術領域的技術人員容易知道的各個值的通常誤差範圍。提及“約”值或參數在本文中包括（及描述）針對該值或參數本身的實施方案。如本文所使用的，當術語“約”在數值之前時，表示該數值上或下10%的範圍內。例如，“約100”涵蓋90和110。

如本文所用，除非另外指出，否則單數形式“一個”，“一種”和“該”包括複數形式。

除非本文另外定義，否則本文使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬領域的普通技術人員通常所理解的相同含義。

【0019】 嵌合抗原受體

本申請提供了一種特異性識別BAFF-R的受體。在一些實施方案中，所述特異性識別BAFF-R的受體為嵌合抗原受體（CAR）。

當所述特異性識別BAFF-R的受體為嵌合抗原受體（CAR）時，其包含特異性識別結構域及活化刺激結構域，以及位於所述特異性識別結構域和活化刺激結構域之間的跨膜結構域，其中，所述特異性識別結構域是指CAR特異性結合靶細胞上的靶抗原的部分。在一些實施方案中，所述特異性識別結構域包含抗體或其功能等效物或其片段或其衍生物，例如可包含全長重鏈、Fab片段、單鏈Fv(scFv)片段、二價單鏈抗體或雙抗體，其各自對靶抗原是特異性的。然而，也存在許多替代物，例如細胞因子(其識別攜帶細胞因子受體的細胞)、親和體、來自天然存在的受體的配體結合結構域、受體的可溶性蛋白質/肽配體(例如在腫瘤細胞上)等，其可各自用於本發明的各種實施方案中。本領域技術人員應理解，以高親和力結合所述靶抗原的幾乎任何分子或結構域都可用作特異性識別結構域。在一些實施方案中，所述特異性識別結構域包含T細胞受體(TCR)或其抗原識別部分，例如單鏈TCR(scTCR)。製備此類TCR的方法是本領域已知的。例如，可以將scTCR改造成含有通過接頭(例如，柔性肽)連接的來自T細胞克隆的Vα1和Vβ基因。

【0020】 在一些實施方案中，所述特異性識別結構域包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與它們具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。在一些實施方案中，所述特異性識別結構域包含：

重鏈可變區，所述重鏈可變區包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO:

7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列；以及

輕鏈可變區，所述輕鏈可變區包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0021】 在一些實施方案中，所述重鏈可變區包含3個互補決定區，分別為CDR H1、CDR H2和CDR H3，且所述CDR H1、CDR H2和CDR H3分別包含SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列或分別與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列；並且所述輕鏈可變區也包含3個互補決定區，分別為CDR L1、CDR L2和CDR L3，且所述CDR L1、CDR L2和CDR L3分別包含SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列或分別與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0022】 在一些實施方案中，所述重鏈可變區和輕鏈可變區還進一步包含骨架區，優選的為人抗體骨架區。

【0023】 在一些實施方案中，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO: 5中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例

如與其具有約75%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列；以及所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0024】 在一些實施方案中，所述重鏈可變區與所述輕鏈可變區通過接頭連接，形成scFv，所述scFv包含如SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

CAR通常包括特異性識別結構域、活化刺激結構域，以及他們之間的跨膜結構域。而常規的CAR構造有三種，其區別主要在於活化刺激結構域的差異，包括：

第一代CAR，其活化刺激結構域包含細胞內訊號轉導結構域並且沒有共刺激結構域；

第二代CAR，其活化刺激結構域包含細胞內訊號轉導結構域和一個共刺激結構域。

第三代CAR，其活化刺激結構域包含細胞內訊號轉導結構域和兩個共刺激結構域。

因此，在本申請的一些實施方案中，所述CAR是第一代CAR，其中的訊號轉導結構域可以是細胞質的並且可以轉導效應子功能訊號並指導細胞執行其特化功能。所述訊號轉導結構域的實例包括但不限於T細胞受

體的ζ鏈或任何其同源物(例如，η鏈、FcεR1γ、β鏈、MB1(Igα)鏈、B29(Igβ)鏈等)，CD3多肽(γ、δ和ε)，syk家族酪氨酸激酶(Syk、ZAP 70等)，src家族酪氨酸激酶(Lck、Fyn、Lyn等)和參與T細胞轉導的其它分子，例如CD2、CD5和CD28。具體地，細胞內訊號轉導結構域可以是人CD3ζ鏈、FcγRIII、FcεRI、Fc受體的胞質尾區、帶有免疫受體酪氨酸啟動基序(ITAM)的細胞質受體或其組合。另外的細胞內訊號轉導結構域對於本領域技術人員而言是顯而易見的，並且可以結合本發明的替代性實施方案使用。在一些實施方案中，所述活化刺激結構域包含的訊號轉導結構域為含有免疫受體酪氨酸活化基序的訊號轉導結構域。在一些實施方案中，細胞內訊號轉導結構域包含選自以下之中的一種或多種的訊號轉導結構域：CD3ζ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、FcεRIγ、FcεR1β、CD79α、CD79β、FcγRIIa、DAP10、DAP12分子的胞內區，或保有其相同功能的變體。在一些優選的實施方案中，所述細胞內訊號轉導結構域包含CD3ζ或FcεRIγ的胞內區，或保有其相同功能的變體。在一些優選的實施方案中，所述細胞內訊號轉導結構域源自CD3ζ的胞內區。在一些實施方案中，所述胞內訊號轉導結構域包含如SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0025】 在本申請的一些實施方案中，所述CAR是第二代CAR，其中的訊號轉導結構域為如上所述的訊號轉導結構域，且其中進一步包含的共刺激結構域為以下分子胞內區中的任一個：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD2、LFA-1、LIGHT、NKG2C、B7-H3、PD-1、

ICOS、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHTR、SLAMF7、CD7、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1、SLAMF4、CD84、CD96、CEACAM1、CRTAM、CD229、CD160、PSGL1、CD100、CD69、SLAMF6、SLAMF1、SLAMF8、CD162、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、及與CD83特異性結合的配體，或與它們保有相同功能的變體。

【0026】 在本申請的一些實施方案中，所述CAR是第三代CAR，其中的訊號轉導結構域為如上所述的訊號轉導結構域，且其中進一步包含的共刺激結構域為以下分子胞內區中的任意兩個、三個或更多個：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD2、LFA-1、LIGHT、NKG2C、B7-H3、PD-1、ICOS、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHTR、SLAMF7、CD7、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1、SLAMF4、CD84、CD96、CEACAM1、CRTAM、CD229、CD160、PSGL1、CD100、CD69、SLAMF6、SLAMF1、SLAMF8、CD162、LTBR、LAT、GADS、

SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、及與CD83特異性結合的配體，或與它們保有相同功能的變體。

【0027】 在一些優選的實施方案中，所述共刺激結構域優選地為4-1BB胞內區、CD28胞內區、OX40胞內區，或與它們保有相同功能的變體。在一些特定的實施方案中，所述共刺激結構域包含源自4-1BB的胞內區。在一些特定的實施方案中，所述共刺激結構域包含如SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0028】 本領域技術人員應當知曉，經過所述訊號轉導結構域以及所述共刺激結構域以合適的方式排列組合，可在CAR與配體結合時，使所述CAR所在的效應細胞獲得適當的活化訊號。

【0029】 在一些實施方案中，所述特異性識別結構域和活化刺激結構域之間的跨膜結構域可以源自任何具有跨膜結構域的蛋白質(包括I型、II型或III型跨膜蛋白中的任何)的跨膜序列。此外本發明的CAR的跨膜結構域還可以包含人工疏水序列。在一些實施方案中，所述跨膜結構域包含選自下述分子的跨膜結構域：TCRα、TCRβ、TCRγ、CD3ζ、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD28、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、KIRDS2、OX40、CD2、CD27、LFA-1、ICOS (CD278)、4-1BB、CTLA-4、GITR、CD40、BAFFR、LIGHTR、SLAMF7、NKp80、CD160、CD19、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA1、VLA1、CD49α、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、

ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、ITGB7、TNFR2、CD226、SLAMF4、CD84、CD96、CEACAM1、CRT AM、CD229、CD160、PSGL1、CDIOO、SLAMF6、SLAMF1、SLAMF8、CD162、LTBR、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、或NKG2C；優選地為CD4、CD8α、CD28、CD3ζ、PD1、或4-1BB的跨膜結構域或與其保有相同功能的變體。

【0030】 在一些實施方案中，所述跨膜結構域可以包含鄰近跨膜結構域的一個或多個另外的氨基酸，例如，與所述跨膜結構域所源自的蛋白質的胞外區域締合的一個或多個氨基酸(例如，細胞外區域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至15個氨基酸)和/或與跨膜蛋白所源自的蛋白質的細胞內區域締合的一個或多個另外的氨基酸(例如，細胞內區域的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至15個氨基酸)。在一方面，所述跨膜結構域源自與訊號轉導結構域、共刺激結構域或鉸鏈結構域所源自的蛋白質相同的蛋白質。在另一方面，所述跨膜結構域並非源自與CAR的任何其它結構域所源自的蛋白質相同的蛋白質。在本申請的一些優選的實施方案中，所述跨膜結構域包含CD8α的跨膜結構域。在一些實施方案中，所述跨膜結構域包含如SEQ ID NO: 16中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0031】 在一些實施方案中，所述跨膜結構域與所述特異性識別結構域直接連接。在一些實施方案中，所述跨膜結構域與所述特異性識別結構

域之間通過樞紐區相連接。在一些實施方案中，所述樞紐區包含選自下組的氨基酸序列：人CD8α或抗體的Fc片段或其功能等效物、片段或衍生物，人CD8α或抗體的樞紐區或其功能等效物、片段或衍生物，抗體的CH2區，抗體的CH3區，人工間隔序列以及它們的組合；優選地為IgG、IgD、CD8α或CD28的樞紐區氨基酸序列。在一些示例性實施方案中，所述樞紐區包含以下之中的任何一種或多種：(i)IgG4的樞紐區、CH2區和CH3區，(ii)IgG4的樞紐區，(iii)IgG4的樞紐區和CH2區，(iv)CD8α的樞紐區，(v)IgG1的樞紐區、CH2區和CH3區，(vi)IgG1的樞紐區，(vi)IgG1的樞紐區和CH2區，或(vii)其組合。在一些特定的實施方案中，所述樞紐區為人CD8α的樞紐區。在一些特定的實施方案中，所述樞紐區包含如SEQ ID NO: 14中所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0032】 在一些實施方案中，所述CAR進一步包含一段訊號肽。通常訊號肽（SP）位於蛋白質的N端，並攜帶蛋白質分泌資訊，參與決定了蛋白質的分泌途徑及分佈。本領域技術人員應當知曉，定位於核內、線粒體內、胞質的蛋白，以及胞漿中的游離蛋白及分泌或最終錨定在細胞膜上的蛋白通常具有不同的訊號肽。本領域技術人員可以通過軟體預測及訊號肽資料庫挑選出適於某種蛋白質發揮功能的訊號肽序列。因此，在本申請的一些實施方案中，所述訊號肽選自任意分泌蛋白或細胞膜蛋白的訊號肽序列，或與他們保有相同功能的變體。在一些實施方案中，所述訊號肽序列為CD8α的訊號肽。在一些實施方案中，所述訊號肽序列包含如SEQ ID

NO:2中的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0033】 工程化T細胞受體

一方面，本申請還提供了一種特異性識別BAFF-R的工程化T細胞受體（TCR）。T細胞表面的特異性受體，負責識別由主要組織相容性複合體（MHC）所呈遞的抗原。T細胞受體是異源二聚體，由兩個不同的亞基所構成。通常情況下，95%的T細胞的受體由α亞基和β亞基構成，另外5%的受體由γ亞基和δ亞基構成。每一個亞基都含有兩個細胞外的結構域：可變區與恒定區。每個亞基的可變區（例如α亞基可變區Vα，β亞基可變區Vβ，γ亞基可變區Vγ，δ亞基可變區Vδ）又至少包含三個高度易變的互補決定區：CDR1、CDR2和CDR3。其中，CDR3負責直接與MHC所呈遞的多肽結合，α亞基和β亞基的CDR1分別作用於多肽的N端和C端，而CDR2則參與識別MHC。

【0034】 在一些實施方案中，所述工程化T細胞受體包含：

Vα，其包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；以及Vβ，其包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；或

Vβ，其包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；以及Vα，其包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO: 12的

氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

【0035】 在另一些實施方案中，所述工程化T細胞受體包含：

Vγ，其包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；以及Vδ，其包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；或

Vδ，其包含選自SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；以及Vγ，其包含選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO: 12的氨基酸序列，或與它們具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

所述工程化TCR可特異性識別由MHC呈遞的BAFF-R，並與負責訊號傳遞的CD3δ/ε二聚體、CD3γ/ε二聚體以及CD247ζ/ζ或ζ/η二聚體，以及在一些實施方案中，與協同受體，共同啟動下游訊號通路。

【0036】 核酸分子

本申請還提供了編碼特異性識別BAFF-R的受體或其片段的核酸分子，在一些實施方案中，所述特異性識別BAFF-R的受體為前述嵌合抗原受體；在一些實施方案中，所述特異性識別BAFF-R的受體為前述工程化T細胞受體。所述核酸分子包含編碼前述嵌合抗原受體或工程化T細胞受體或其片段的多核苷酸序列。所述核酸分子可以為DNA亦可以為RNA。在一些實施方案中，所述核酸分子為線狀，在一些實施方案中，所述核酸分子為環狀。在一些實施方案中，所述核酸分子為雙鏈。在一些實施方案中，所述核酸分子為單鏈。在一些實施方案中，所述核酸分子經化學合成。

在一些實施方案中，所述核酸分子包含化學修飾以使其在細胞中或動物體中更加穩定。在一些實施方案中，所述核酸分子通過細菌、真菌或動物細胞合成。在一些實施方案中，所述核酸分子為質粒、病毒載體或寡核苷酸。

【0037】 在一些實施方案中，所述多核苷酸序列包含編碼識別所述特異性識別BAFF-R的受體的特異性識別結構域。在一些實施方案中，所述特異性識別結構域為scFv。在一些實施方案中，所述多核苷酸序列包含如SEQ ID NO:3所示的DNA序列和/或與其互補的DNA，或與其相對應的或互補的RNA序列，或與本段所述DNA或RNA序列具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或99%以上序列同一性的多核苷酸序列。如本文所用，核酸的“互補”是指兩條多核苷酸可在嚴格條件下雜交，所述嚴格雜交，即是指所述兩條多核苷酸在雜交時，其每個堿基或每個核苷酸，均按照Watson-Crick堿基配對原則，即A與T或U、C與G或I配對。如本文所用，所述與DNA序列“相對應的”RNA，是指與所述DNA序列的堿基排列順序一致，且所有T堿基均被U堿基替代的核糖核苷酸（RNA）序列。

【0038】 在一些實施方案中，所述核酸分子包含膜定位訊號肽分子的編碼序列。在一些實施方案中，所述其中所述膜定位訊號肽為CD8 α 的膜定位訊號肽。在一些實施方案中，所述其中所述膜定位訊號肽分子的編碼序列包含如SEQ ID NO: 1所示的DNA序列和/或與其互補的DNA，或與其相對應的或互補的RNA序列，或與本段所述DNA或RNA序列具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%以上序列同一性的多核苷酸序列。

【0039】 在一些實施方案中，所述核酸分子包含編碼樞紐區的序列。在一些實施方案中，所述編碼樞紐區為CD8 α 的樞紐區。在一些實施方案中，所述編碼樞紐區的序列包含如SEQ ID NO：13所示的DNA序列和/或與其互補的DNA，或與其相對應的或互補的RNA序列，或與本段所述DNA或RNA序列具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%以上序列同一性的多核苷酸序列。

【0040】 在一些實施方案中，所述核酸分子包含編碼訊號轉導結構域的序列。在一些實施方案中，所述訊號轉導結構域為CD3ζ的訊號轉導結構域。在一些實施方案中，所述編碼訊號轉導結構域的序列包含如SEQ ID NO：19中所示的DNA序列和/或與其互補的DNA，或與其相對應的或互補的RNA序列，或與本段所述DNA或RNA序列具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%以上序列同一性的多核苷酸序列。

【0041】 在一些實施方案中，所述核酸分子包含編碼共刺激結構域的序列。在一些實施方案中，所述共刺激結構域為4-1BB的訊號轉導結構域。在一些實施方案中，所述編碼訊號轉導結構域的序列包含如SEQ ID NO：17中所示的DNA序列和/或與其互補的DNA，或與其相對應的或互補的RNA序列，或與本段所述DNA或RNA序列具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%以上序列同一性的多核苷酸序列。

【0042】 在一些實施方案中，所述核酸分子包含前述編碼共刺激結構

域的序列、前述編碼訊號轉導結構域的序列、前述編碼樞紐區的序列、前述膜定位訊號肽分子的編碼序列、以及前述編碼特異性識別結構域序列。如何排列前述核酸分子中所包含的序列以使所述核酸分子，以及加入哪些調控表達的相關部件，以使所述核酸分子導入細胞後成功合成完整的識別所述特異性識別BAFF-R的受體，對於本領域技術人員是顯而易見的。在一些特定的實施方案中，所述核酸分子從5'端到3'端依次包含如下所述的多核苷酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列，例如與其具有約75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%以上序列同一性的多核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 19，其中所述多核苷酸序列之間可以包含其它序列。

【0043】 本申請還提供了包含多個核酸分子的混合物。所述多個核酸分子分別包含選自下述的一項或多項：前述編碼共刺激結構域的序列、前述編碼訊號轉導結構域的序列、前述編碼樞紐區的序列、前述膜定位訊號肽分子的編碼序列、前述編碼特異性識別結構域序列。將所述混合物共同導入細胞，則可合成完整的識別所述特異性識別BAFF-R的受體。

【0044】 工程化免疫效應細胞

一種工程化免疫效應細胞，其包含前述特異性識別BAFF-R的受體或前述核酸分子。

【0045】 在一些實施方案中，所述特異性識別BAFF-R的受體為前述嵌合抗原受體，所述工程化免疫效應細胞為CAR-T或CAR-NK細胞。

【0046】 在一些實施方案中，所述特異性識別BAFF-R的受體為前述

工程化T細胞受體，所述述工程化免疫效應細胞為TCR-T細胞。在一些實施方案中，所述特異性識別BAFF-R的受體為前述工程化T細胞受體，所述述工程化免疫效應細胞為TCR-NK細胞。

【0047】 病毒顆粒、脂質體、脂質納米顆粒、藥物組合物

本申請還提供了一種病毒質粒，其中包裝的病毒載體包含如前所述的嵌合抗原受體或工程化T細胞受體和/或編碼所述嵌合抗原受體或工程化T細胞受體的多核苷酸序列。本申請還提供了脂質體或脂質納米顆粒，所述脂質體或脂質納米顆粒包含如前所述的特異性識別BAFF-R的受體或其片段或編碼所述受體或其片段的核酸分子。

【0048】 本申請還進一步提供了一種藥物組合物，其包含治療有效量的選自下述的一項或多項：前述嵌合抗原受體、前述T細胞受體、前述核酸分子、前述工程化免疫效應細胞，前述病毒顆粒、脂質體、脂質納米顆粒。在一些實施方案中，所述藥物組合物還進一步包括合適的賦形劑、載劑、和/或穩定劑。所述可接受的載劑、賦形劑或穩定劑在所採用的劑量和濃度下對接受者無毒，並且包括例如：緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽或乙酸鹽，pH通常為5 .0至8 .0，任選地6 .0至7 .0；實現等滲的鹽，諸如氯化鈉、氯化鉀等等；抗氧化劑；防腐劑；低分子量多肽；蛋白；親水性聚合物，諸如聚山梨醇酯80；氨基酸，諸如甘氨酸；碳水化合物；螯合劑；糖；以及本領域的技術人員已知的其他標準成分(Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Loyd V .Allen等人編,Pharmaceutical Press(2012))。

【0049】 療法

本申請同時公開了一種治療或預防有需要的受試者的疾病或症狀的方法，所述方法包括向受試者施用有效量的如前所述的藥物組合物，所述疾病選自由B細胞BAFF-BAFF-R訊號通路失衡引起的疾病。任選地，所述方法還包括向受試者施用第二治療劑，例如能夠結合CD20抗原的單克隆抗體、能夠結合CD19的單克隆抗體、能夠結合免疫檢查點，例如PD-1/PD-L1的單克隆抗體，或靶向CD20、CD19、PD-L1的工程化免疫效應細胞等。在一些實施方案中，所述疾病選自下述的任一種：自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病或腫瘤。

【0050】 在一些實施方案中，所述疾病是癌症。任選地，所述癌症是淋巴瘤、白血病或骨髓瘤。任選地，所述癌症是淋巴瘤。任選地，所述淋巴瘤是套細胞淋巴瘤、濾泡淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤或伯基特氏淋巴瘤。任選地，所述癌症是白血病。任選地，所述白血病是淋巴母細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病或毛細胞白血病。任選地，所述癌症是骨髓瘤。任選地，所述骨髓瘤是多發性骨髓瘤。

【0051】 在一些實施方案中，所述疾病是自身免疫疾病。任選地，所述自身免疫疾病是類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、多發性硬化症、腎小球腎炎、舍葛蘭綜合征或自身免疫性溶血性貧血。

【0052】 在另一個方面中，本申請還提供一種抑制細胞增殖的方法。所述方法包括將所述細胞與如本申請所提供的藥物組合物接觸，從而形成接觸細胞。使抗BAFF-R受體或其功能片段結合接觸細胞上的BAFF-R蛋白，從而抑制細胞增殖。任選地，所述細胞是淋巴細胞。任選地，所述細胞是B細胞或癌細胞。任選地，所述細胞是淋巴瘤細胞。

【0053】 如本文所用，治療或預防疾病或症狀是指獲得有益或所需結果(包括臨床結果)的方法。有益或所需臨床結果可包括但不限於：緩解或改善一個或多個症狀或病狀；減輕病狀、病症或疾病的程度；穩定病狀、病症或疾病的狀態；預防病狀、病症或疾病的發展；預防病狀、病症或疾病的蔓延；延緩或減慢病狀、病症或疾病進展；延緩或減慢病狀、病症或疾病發作；改善或緩和病狀、病症或疾病狀態；以及好轉，不管是部分還是全部。治療還可意味延長受試者的存活，超過在不存在治療的情況下預期的存活。治療還可意味抑制病狀、病症或疾病的進展，暫時減慢病狀、病症或疾病的進展，但是在一些情況下，其涉及永久地停止病狀、病症或疾病的進展。

【0054】 以上詳細描述了本發明的優選實施方案，但是，本發明並不限於此。在本發明的技術構思範圍內，可以對本發明的技術方案進行多種簡單變型，包括各個技術特徵以任何其它的合適方式進行組合，這些簡單變型和組合同樣應當視為本發明所公開的內容，均屬於本發明的保護範圍。

【0055】 應當理解，以上描述以及隨後的實施例旨在說明而不是限制本發明的範圍。在本發明範圍內的其他方面，優點和修改對於本發明所屬領域的技術人員將是顯而易見的。

【0056】 [實施例]

【0057】 實施例1：靶向BAFF-R的嵌合抗原受體的設計

本發明構建了抗BAFF-R的嵌合抗原受體(H90-11 CAR，其包含如美國申請公開文本：US 2021/0261676 A1所示的H90-11 mAb單克隆抗體的

重鏈可變區和輕鏈可變區，所述美國申請公開文本US 2021/0261676 A1的內容在此通過引用併入本文)，如結構示意圖圖1所示，該嵌合抗原受體包括一段CD8α的訊號肽序列(Leader)，與BAFF-R抗原特異性結合的單鏈抗體序列(scFv)，人CD8α的樞紐區(Hinge)和跨膜結構域序列(Transmembrane)，4-1BB共刺激域序列和CD3ζ訊號傳導域序列，具體各部分序列如下所示，具體序列參見表1：

人CD8α分子訊號肽(Leading signal)的多核苷酸序列如SEQ ID NO: 1所示，氨基酸序列如SEQ ID NO: 2所示；

人源BAFF-R單鏈抗體(scFv)的多核苷酸序列如SEQ ID NO: 3所示，氨基酸序列如SEQ ID NO: 4所示；其中所述scFv的重鏈可變區（VH）為SEQ ID NO: 5，所述VH包含的三個互補決定區CDR H1、CDR H2、CDR H3的氨基酸序列分別為：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8；所述scFv的輕鏈可變區（VL）為SEQ ID NO: 9，所述VL包含的三個互補決定區CDR L1、CDR L2、CDR L3的氨基酸序列分別為：SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12；

人CD8α樞紐區(CD8 Hinge)的多核苷酸序列如SEQ ID NO: 13所示，氨基酸序列如SEQ ID NO: 14所示；

人CD8α跨膜結構域(CD8 TM)的多核苷酸序列如SEQ ID NO: 15所示，氨基酸序列如SEQ ID NO: 16所示；

人4-1BB分子胞內區(4-1BB)的多核苷酸序列如SEQ ID NO: 17所示，氨基酸序列如SEQ ID NO: 18所示；

人CD3ζ分子胞內區(CD3ζ) 核苷酸序列如SEQ ID NO: 19所示，氨基

酸序列如SEQ ID NO: 20所示；

【0058】 表1：

序號	具體序列（5’-3’/N端-C端）
SEQ ID NO: 1	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCT GGCTCTTCTGCTCCACGCCGCTCGGCCC
SEQ ID NO: 2	MALPVTALLLPLALLLHAARP
SEQ ID NO: 3	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTGATAGCCTGG CCGTGTCTCTGGGAGAGAGAGCCACCATCAACTG CAAGAGCAGCCAGAGCGTGCTGTACTCCAGCAAC AACAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGC CCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCC AGCATCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTTT CCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGAC CATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGAGCTACAGCACCCCTTGGAC ATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGA GGCGGAGGTTCTGGCGGCGGAGGAAGTGGTGGCG GAGGCTCTGAGGTTCAGCTGCAAGAGTCTGGCCC TGGCCTGGTCAAGCCTAGCCAAACACTGAGCCTG ACCTGTACCGTGTCCGGCGATAGCATCACAAGCG GCTACTGGAACTGGATCAGACAGCACCCTGGCAA GGGCCTCGAGTACATCGGCTACATCAGCTACAGC GGCAGCACCTACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCA GAGTGACCATCAGCAGAGACACCAGCAAGAACCA GTACTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAGCCGCC GATACAGCCGTGTACTACTGCGCCTCTCCTAACTA CCCCTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGA ACCCTGGTTACCGTTAGCTCT
SEQ ID NO: 4	DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTK LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPGLVKPSQT LSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYS GSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADT AVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 5	EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNW IRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTS KNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 6	SGYWN
SEQ ID NO: 7	YISYSGSTYYNPSLKS

SEQ ID NO: 8	PNYPFYAMDY
SEQ ID NO: 9	DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTK LEIK
SEQ ID NO: 10	KSSQSVLYSSNNKNYLA
SEQ ID NO: 11	WASIRES
SEQ ID NO: 12	QQSYSTPWT
SEQ ID NO: 13	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGG CGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGC CCAGAAGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCA GTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
SEQ ID NO: 14	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACD
SEQ ID NO: 15	ATCTACATTTGGGCCCCTCTGGCTGGTACTTGCGG GGTCCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACT GT
SEQ ID NO: 16	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
SEQ ID NO: 17	AAGCGCGGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTA AGCAACCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCA AGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGGTTCCCAGAG GAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTG
SEQ ID NO: 18	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCEL
SEQ ID NO: 19	CGCGTGAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAG CCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGA ACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTG CTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAG GGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGG CAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGA ACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTA CCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTAT GACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCCTCGG
SEQ ID NO: 20	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR

【0059】 實施例2 構建嵌合抗原受體表達載體

抗 BAFF-R 的 H90-11 CAR 慢 病 毒 表 達 載 體

pCDH-EF1a-H90-11CAR-4-1BB-EGFRt以及對照EGFRt CAR慢病毒表達載體pCDH-EF1a-EGFRt-AT-Free(delete T2A)均由南京金斯瑞公司合成並構建，具體實驗步驟如下：

抗BAFF-R的scFv基因序列由南京金斯瑞公司合成，按照In-Fusion Snap assembly無縫克隆試劑生產商使用說明書，將基因合成的scFv序列插入到pCDH-EF1a-4-1BB-EGFRt載體（南京金斯瑞，訂單編號：C046EEE310）中，獲得抗BAFF-R的嵌合抗原受體慢病毒表達載體pCDH-EF1a-H90-11CAR-4-1BB-EGFRt（南京金斯瑞，訂單編號：C9401FG210），載體圖譜見圖2。

pCDH-EF1a-T2A-EGFRt（iCarTab提供）慢病毒表達載體，因T2A連接子中存在一個ATG起始密碼子，因移碼突變導致EGFRt不能正常表達，按照In-Fusion Snap assembly無縫克隆試劑生產商使用說明書，將pCDH-EF1a-T2A-EGFRt載體中的T2A刪除，獲得對照EGFRt CAR慢病毒表達載體pCDH-EF1a-EGFRt-AT-Free(delete T2A)（由南京金斯瑞構建），載體圖譜見圖3。

【0060】 實施例 3 慢病毒包裝及滴度測定

【0061】 慢病毒的包裝

準備15cm培養皿，接種1×10^7個293T細胞，加入含10%FBS（Gibco, 貨號：10099-141）的DMEM（Gibco, 貨號：41965-062）完全培養基，置於37°C、5% CO2培養箱，過夜培養。取2mL PBS（Gibco, 貨號：14190-250）至6孔板的一個孔，分別加入20μg慢病毒表達質粒（pCDH-EF1a-H90-11 CAR-4-1BB-EGFRt 或

pCDH-EF1a-EGFRt-AT-Free(delete T2A)）、30μL 慢病毒包裝質粒Mix（iCarTab, 貨號：LVP2MIX），移液槍上下吹打充分混勻後，加入150μL LVTransm轉染試劑（iCarTab, 貨號：LVTran100），立即用移液器上下吹打混勻，室溫下靜置10分鐘。將前述DNA/PEI複合物逐滴加入到15cm培養皿中，輕輕晃動培養皿，充分混勻。將培養皿置於37°C、5% CO2培養箱，培養6~8小時後，將含有轉染試劑的培養基棄掉，更換為新鮮的完全培養基。連續培養48小時後，收集培養皿中含有病毒的培養基上清，用0.45μm的濾膜過濾，轉至離心管中，20000 g 4°C離心2小時。離心結束後，在生物安全櫃中，將離心管中的液體棄掉，加入500μL PBS緩衝液重懸病毒沉澱，分裝後，將病毒置於-80°C冰箱保存。

【0062】 病毒滴度測定

復蘇293T細胞，將細胞狀態調整至對數生長期。取一塊新的6孔板，按照每孔8×10^5個細胞接種293T細胞，補充培養基至終體積為2mL，將6孔板置於37°C、5% CO2培養箱中，過夜培養。將濃縮後的慢病毒按照50μL的量加入至前述6孔板中，同時添加終濃度為6μg/mL的polybrene（Sigma，貨號：107689-10G），將6孔板重新放回37°C、5% CO2培養箱中，連續培養48小時。

培養結束後，使用PBS洗滌每孔的細胞，然後使用MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit（Takara, 貨號：9765）提取基因組DNA，並使用NanoDrop2000測定所提取的基因組DNA的濃度。按照下表2所示的PCR反應體系，製備螢光定量PCR反應預混液。

【0063】 表2：

試劑名稱	體積（20μL 反應體系）
2×PCR Mix	10
Probe Mix (LTR 探針、ALB 探針)	0.4
Primer mix (LTR F&R、ALB F&R)	0.4
PCR grade water	4.2

所用引物的序列及螢光基團如下表3所示。

【0064】 表3：

引物名稱	序列資訊（5’-3’）	探針螢光標記基團
LTR F	TGACAGCCGCCTAGCATTTC (SEQ ID NO: 21)	
LTR R	GCTCGATATCAGCAGTTCTTGAAG (SEQ ID NO: 22)	
LTR 探針	CACGTGGCCCGAGAGCTGCATC (SEQ ID NO: 23)	5’-FAM-BHQ1-3’
ALB F	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT (SEQ ID NO: 24)	
ALB R	ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC (SEQ ID NO: 25)	
ALB 探針	CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC(SEQ ID NO: 26)	5’-FAM-BHQ1-3’

從冰箱中取出pUC-LTR（購自：iCarTab）和pUC-ALB質粒（購自：iCarTab），分別按照10倍稀釋，共6個點，準備螢光定量PCR所需的標準曲線樣品。取一塊新的96孔PCR反應板，按照每孔加入5μL基因組樣品或標準曲線樣品，然後向每孔加入15μL前述製備的PCR反應預混液，使用封膜密封後，短暫離心1分鐘。根據如下表4的PCR程式進行PCR反應。

【0065】 表4：

	溫度 (°C)	時間 (sec)
變性	95	30
第 1 步，第 2 步重複 40 迴圈		

第1步	95	5
第2步	60	30

PCR反應結束後，使用Roche 480的配套軟體獲取標準曲線的Ct值及樣品的Ct值；以Ct值為縱坐標，以拷貝數的Log值為橫坐標，製作標準曲線；根據標準曲線計算樣品的拷貝數。並根據以下公式計算病毒的滴度：

$$慢病毒滴度(TU/mL)=\frac{(Copy_{test}-Copy_{ALB})\times 2\times Cell_{NO.}}{Volume_{virus}} \quad (1)$$

根據公式（1）計算得到的慢病毒滴度結果如下表5所示。

|0066| 表5：

慢病毒名稱	活性滴度(TU/mL)
pCDH-EF1a-H90-11CAR-4-1BB-EGFR1慢病毒	1.7×10^{8}
pCDH-EF1a-EGFR1-AT-Free(delete T2A)慢病毒	1.6×10^{8}

從表5可以看出，包裝出了高滴度的慢病毒，可以用於後續感染T細胞製備CAR-T細胞。

|0067| 實施例4 CAR-T細胞的製備

|0068| 外周血PBMC分離T細胞

將10mL抗凝外周血血樣轉移至一個15 mL無菌離心管內，800g離心20分鐘，去掉上層淺黃色血清層，然後向下層的外周血細胞層加入等體積的PBS，輕輕上下顛倒混勻。取出淋巴細胞分離液（瀚洋生物，貨號：1077），並上下顛倒數次，充分混勻。另取一個15 mL離心管，加入5 mL淋巴細胞分離液，將稀釋後的血樣沿管壁緩慢加至淋巴細胞分離液的上層，避免分離液與血樣的混合，800g離心20分鐘。離心結束後，輕輕的取出離心管，將處於中間的白色單核細胞層吸至一個新的無菌離心管中，加入等體積的生理鹽水輕輕混勻，800g離心5分鐘，離心結束後，去除上

清，重複清洗一次PBMC，調整細胞密度至5×10^7個細胞/mL，以1mL/支轉移至2mL細胞凍存管中。

使用PBS洗滌Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28（Thermo, 貨號:11141D）2遍，取適量的Dynabeads® Human T-Expander CD3/CD28加入到2mL細胞凍存管中的PBMC中，輕輕混勻，室溫孵育20分鐘。將2 mL細胞凍存管插入磁極，室溫靜置1分鐘，輕輕倒置，將管內的液體倒出。將細胞凍存管從磁極中取出，加入適量X-Vivo 15培養基（含200 IU/mL IL-2（北京遠策藥業有限責任公司，貨號：20150713B），10 ng/mL IL-7（PrimeGene, 貨號:101-07），5 ng/mL IL-15（PrimeGene, 貨號:101-15）重懸並計數，調整細胞密度至0.5~1×10^6個細胞/mL，轉移至6孔板中，置於37℃、5% CO_2培養箱中連續培養48 h。

【0069】 慢病毒感染T細胞

將培養後的T細胞密度調整至1×10^6個/mL，從-80℃超低溫冰箱中取出慢病毒，迅速在37℃水浴鍋中解凍，向準備好的T細胞中，加入聚凝胺（Sigma，貨號：107689-10G）至終濃度為6μg/mL，加入適量體積病毒（感染複數MOI=25），用移液器輕輕吹打混勻，使用封口膜將培養器皿密封，800 g室溫離心1小時。離心結束後，繼續培養24小時後，進行換液，然後在37℃、5%CO_2培養箱繼續培養。

【0070】 T細胞大量擴增

每天輕輕吹打培養體系中的Dynabeads®/細胞團至完全分開並計數，當細胞密度大於1×10^6個/mL時，添加X-Vivo 15培養基（含200 IU/mL IL-2，10 ng/mL IL-7，5 ng/mL IL-15）調整細胞密度至0.5×10^5個/mL，

繼續培養。擴增培養到第10天，收集細胞，並保存在細胞凍存液中。

【0071】 CAR-T陽性率檢測

通過使用FITC-Anti-EGFR 抗體（iCARTAB, 貨號：IAB006A）（終濃度 10μg/mL ）分別與 H90-11 CAR-T （感染 pCDH-EFIa-H90-11CAR-4-1BB-EGFRt 慢病毒的 T 細胞）和 EGFRt CAR-T細胞（感染pCDH-EF1a-EGFRt-AT-Free(delete T2A)慢病毒的T細胞）孵育，室溫避光孵育30分鐘後，流式檢測EGFRt的表達反應CAR-T細胞陽性率，結果如圖4所示，H90-11 CAR-T細胞陽性率為36.1%，EGFRt CAR-T細胞陽性率為78.1%。同時使用BAFF-R Liama IgG2b Fc Tag重組蛋白（Acro，貨號：BAR-H5258）(終濃度10μg/mL)分別與H90-11 CAR-T和EGFRt CAR-T細胞孵育，室溫孵育30分鐘後，500g離心5分鐘後棄上清，用0.5%BSA PBS按照1:1000稀釋FITC-anti Liama IgG(H+L)（Novus, 貨號：NBP1-47627），以100 μL/樣品重懸細胞沉澱，室溫避光孵育30分鐘後，FACS檢測CAR-T細胞陽性率，結果如圖5所示，H90-11 CAR-T細胞陽性率為30.2%，EGFRt CAR-T細胞陽性率為0.65%。H90-11 CAR-T細胞既表達EGFRt蛋白又表達抗BAFF-R CAR分子，且陽性率基本保持一致；而EGFRt CAR-T細胞只表達EGFRt蛋白不表達抗BAFF-R CAR分子，說明H90-11 CAR-T和EGFRt CAR-T細胞均製備成功。

【0072】 實施例 5 評估靶向BAFF-R的嵌合抗原受體T細胞在體外對腫瘤細胞殺傷情況

【0073】 CAR-T細胞對靶細胞的裂解

Nalm6-螢光素酶細胞是高表達人BAFF-R的急性淋巴細胞白血病細

胞，該細胞是通過慢病毒感染Nalm6細胞（購自：吉凡生物）獲得的過表達Luciferase(螢光素酶)的細胞。用Luciferase檢測試劑盒（Promega, 貨號：E2610）檢測H90-11 CAR-T細胞對Nalm6-螢光素酶靶細胞的細胞毒性實驗，並用EGFR1 CAR-T細胞作為對照，具體步驟如下：

將Nalm6-螢光素酶靶細胞重懸于完全培養基（RPMI1640+10%FBS）中，按2×10^4個/孔接種靶細胞至96孔板中，置於37°C、5% CO2培養箱中，過夜培養。離心收集製備的CAR-T細胞，使用10%FBS的1640培養基重懸；從培養箱中取出96孔板，將孔中的培養基完全吸出，用無菌PBS輕輕將細胞洗滌一遍，按照效靶比為0.5:1、1:1、2.5:1、5:1、10:1加入CAR-T細胞，設置雙複孔並將最終體積補至200μL/孔；Maxi lysis孔和Mini lysis孔接種同樣數量的靶細胞，但是不加CAR-T細胞。將96孔板置於37°C、5% CO2培養箱中，培養18小時。培養結束後，按照Luciferase檢測試劑盒（Promega, 貨號：E2610）使用說明書，通過檢測Luciferase活性反映重組CAR-T 細胞對靶細胞的裂解能力。靶細胞裂解百分數計算公式：

$$Lysis\% = (1 - |RLU|\ Sample/|RLU|\ Max) \times 100\%$$

結果如圖6所示，H90-11 CAR-T細胞對表達BAFF-R的Nalm6-螢光素酶細胞的殺傷效果顯著高於EGFR1 CAR-T組，在效靶比為0.5:1、1:1、2.5:1、5:1、10:1時，H90-11 CAR-T對靶細胞殺傷率分別為62.7%、83.1%、95.4%、98.9、99.7%，EGFR1 CAR-T組對靶細胞的殺傷率分別為2.1%、10.5%、10.5%、18.1、24.7%。由此說明經本發明方法製備的靶向BAFF-R的嵌合抗原受體T細胞具有很強的腫瘤殺傷能力。

【0074】 CAR-T細胞因子分泌水準檢測

通過ELISA方法檢測靶細胞Nalm6-螢光素酶和製備的CAR-T細胞共培養上清中IL-2和IFN-γ的表達水準，具體實驗步驟如下：

將Nalm6-螢光素酶靶細胞重懸于完全培養基中，按2×10^4個/孔接種靶細胞至96孔板中，置於37℃、5% CO_2培養箱中，過夜培養。分別以重組H90-11 CAR-T細胞和EGFRt CAR-T細胞為效應細胞，建立效應細胞與靶細胞的共培養體系，效靶比為0.5:1、1:1、2.5:1，5:1和10:1，設置雙複孔。將孔板置於37℃、5% CO_2培養箱中，培養18小時。培養結束後，將孔板從培養箱中取出，1200 g室溫離心96孔板5分鐘，輕輕的將孔板取出，轉移上清通過IL-2（福麥斯生物，貨號：FMS-ELH003）和IFN-γ檢測試劑盒（福麥斯生物，貨號：FMS-ELH035）檢測IL-2和IFN-γ的表達水準（具體步驟見ELISA檢測試劑盒說明書）。

結果如圖7A（IL-2）和圖7B(IFN-γ)所示，表達BAFF-R的Nalm6-螢光素酶細胞與H90-11 CAR-T共培養上清中IL-2和IFN-γ細胞因子水準較EGFRt CAR-T組有顯著性升高，且呈梯度增加。結果表明，H90-11 CAR-T細胞在表達BAFF-R的靶細胞的刺激下，能夠分泌Th1類細胞因子。

【0075】 實施例 6 評估靶向BAFF-R的嵌合抗原受體T細胞在小鼠體內對腫瘤細胞殺傷情況

將急性淋巴細胞白血病Nalm6-螢光素酶細胞系異種移植至NSG小鼠模型中，用於評估H90-11 CAR-T的體內活性。

取6-8周齡NSG小鼠（購自北京百奧賽圖基因生物技術有限公司）（體重18-22g）20只，適應飼養一周後，尾靜脈接種Nalm6-螢光素酶，每只

小鼠接種1×10^6個腫瘤細胞，尾靜脈接種腫瘤細胞5天后，進行第一次活體成像，成像效果不理想，接種8天后，對於造模不成功的小鼠從後續的實驗組中剔除，根據小鼠的活體成像結果進行分組，將小鼠隨機分為2組，每組8只，經尾靜脈分別輸注2.25×10^6個H90-11 CAR-T細胞或EGFRt CAR-T細胞，每隔7天對小鼠腹腔注射D-luciferin（上海樂辰，貨號：BC219-10）同時使用氣體麻醉機對小鼠進行麻醉，採集腫瘤活體成像資料，並記錄小鼠體重變化同時繪製小鼠的生存曲線。

分別於建模後第8、15、22天時，利用小動物活體成像設備，進行活體成像觀察，成像結果在圖8A中，繪製的絕對發光量曲線呈現於圖8B中，根據成像結果，與EGFRt CAR-T對照組相比，H90-11 CAR-T對腫瘤細胞有顯著地殺傷效果；第8天進行CAR-T細胞輸注治療後，相較於EGFRt CAR-T輸注對照組，H90-11 CAR-T輸注組小鼠在輸注後至第15天腫瘤負荷（絕對發光量）增加放緩，第15天之後腫瘤負荷出現快速下降。繪製的小鼠的體重變化曲線圖如圖8C所示，輸注EGFRt CAR-T對照細胞的小鼠體重與輸注H90-11 CAR-T細胞的小鼠體重相當；實驗期間小鼠體重維持緩慢增長，說明CAR-T細胞輸注不會造成嚴重毒性反應。

【符號說明】

【0076】

無

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing  dtdVersion="V1_3" fileName="TFF00629TW.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.1.2" productionDate="2022-09-
06">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>111118769</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-05-19</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>X223242TWI</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>CN</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>PCT/CN2021/094605</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2021-05-19</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">上海詩健生物科技有限公司、廣州茵諾萊生物科技有
限公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Shanghai Shijian Biotechnology Co., Ltd. / Guangzhou
Yinnuolai Biotechnology Co., Ltd.</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">張,新敏</InventorName>
 <InventorNameLatin> Zhang, Xin-Min</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子及其應用
</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>26</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>63</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..63</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q1">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>CD8</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..63</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q86">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcc
c</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q3">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>CD8</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q87">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>MALPVTALLLPLALLLHAARP</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="3">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>738</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..738</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q5">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>scFv</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..738</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q88">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gacatccagatgacacagagccctgatagcctggccgtgtctctgggagagagagccaccat
caactgcaagagcagccagagcgtgctgtactccagcaacaacaagaactacctggcctggtatcagcagaagcccggcc
agcctcctaagctgctgatctactgggccagcatcagagaaagcggcgtgcccgatagattttccggctctggcagcggc
accgacttcaccctgaccatatctagcctgcagcctgaggacttcgccacctactactgccagcagagctacagcacccc
ttggacatttggccagggcaccaagctggaaatcaagggaggcggaggttctggcggcggaggaagtggtggcggaggct
ctgaggttcagctgcaagagtctggccctggcctggtcaagcctagccaaacactgagcctgacctgtaccgtgtccggc
gatagcatcacaagcggctactggaactggatcagacagcaccctggcaagggcctcgagtacatcggctacatcagcta
cagcggcagcacctactacaaccccagcctgaagtccagagtgaccatcagcagagacaccagcaagaaccagtactccc
tgaagctgagcagcgtgacagccgccgatacagccgtgtactactgcgcctctcctaactacccccttctacgccatggac
tactggggccagggaaccctggttaccgttagctct</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q7">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>scFv</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q89">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPGLVKP
SQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYY
CASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="5">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q9">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>VH</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q90">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPS
LKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q11">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>CDR H1</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q91">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SGYWN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q13">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>CDR H2</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q92">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>YISYSGSTYYNPSLKS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q15">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>CDR H3</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q93">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>PNYPFYAMDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

```
 <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q17">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>VL</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q94">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q19">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>CDR L1</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q95">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>KSSQSVLYSSNNKNYLA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q21">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CDR L2</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q96">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>WASIRES</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="12">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q23">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CDR L3</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q97">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQSYSTPWT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="13">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>135</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q25">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CD8 </INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q98">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>accacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtc
cctgcgcccagaagcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgat</INSDS
eq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="14">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>45</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q27">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CD8</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..45</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q99">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD</INSDSeq_sequenc
e>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="15">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>72</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..72</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q29">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CD8 TM</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..72</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q100">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgctttcactcgtgatcac
tctttactgt</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q31">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>CD8 TM</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q101">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="17">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>126</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..126</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q33">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>4-1BB</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..126</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q102">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgtgcagac
tactcaagaggaggacggctgttcatgccggttcccagaggaggaggaaggcggctgcgaactg</INSDSeq_sequen
ce>
   </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>42</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q35">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>4-1BB</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..42</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q103">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>336</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..336</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q37">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CD3</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..336</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q104">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctcta
caacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggacccagaaatgggcggga
agccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagatt
ggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacaccta
tgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="20">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q39">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CD3</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q105">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="21">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q41">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>LTR-F</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q106">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>tgacagccgcctagcatttc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="22">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q43">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>LTR-R</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q107">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>gctcgatatcagcagttcttgaag</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="23">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q45">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>LTR </INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q108">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>cacgtggcccgagagctgcatc</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="24">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q47">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>ALB-F</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q109">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>gctgtcatctcttgtgggctgt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier id="q49">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>ALB-R</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q110">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>actcatgggagctgctggttc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>misc_feature</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q51">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>ALB</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q111">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>cctgtcatgcccacacaaatctctcc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，包含特異性識別結構域及活化刺激結構域，以及位於該特異性識別結構域和活化刺激結構域之間的跨膜結構域，其中，該特異性識別結構域包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

該重鏈可變區包含三個互補決定區CDR H1、CDR H2和CDR H3，並且CDR H1包含SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列，CDR H2包含SEQ ID NO: 7所示的氨基酸序列，CDR H3包含SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列；

該輕鏈可變區包含CDR L1、CDR L2和CDR L3，並且該CDR L1包含SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列，CDR L2包含SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列，CDR L3包含SEQ ID NO: 12所示的氨基酸序列。

【請求項2】如請求項1所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該重鏈可變區和輕鏈可變區還進一步包含人抗體骨架區。

【請求項3】如請求項1或2所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該重鏈可變區包含如SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列；以及該輕鏈可變區包含如SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

【請求項4】如請求項3所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該重鏈可變區與該輕鏈可變區連接形成scFv，該scFv包含如SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

【請求項5】如請求項1至4中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該活化刺激結構域包含訊號轉導結構域，該訊號轉導結構域含有免疫受體酪氨酸活化基序。

【請求項6】如請求項5所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該訊號轉導結構域包含CD3ζ、CD3γ、CD3δ、CD3ε、FcεRIγ、FcεR1β、CD79α、CD79β、FcγRIIa、DAP10或DAP12分子胞內區的訊號轉導結構域，或保有其相同功能的變體。

【請求項7】如請求項6所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該訊號轉導結構域包含如SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

【請求項8】如請求項5至7中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該活化刺激結構域進一步包含一個、兩個、三個或更多個共刺激結構域。

【請求項9】如請求項8所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該共刺激結構域來自如下的一種或多種分子的胞內區：CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、CD2、LFA-1、LIGHT、NKG2C、B7-H3、PD-1、ICOS、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHTR、SLAMF7、CD7、NKp80 (KLRF1)、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1、SLAMF4、

CD84、CD96、CEACAM1、CRTAM、CD229、CD160、PSGL1、CD100、CD69、SLAMF6、SLAMF1、SLAMF8、CD162、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、及與CD83特異性結合的配體。

【請求項10】如請求項9所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該共刺激結構域包含如SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

【請求項11】如請求項1至10中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該跨膜結構域包含選自下組的跨膜結構域或其保有相同功能的變體：CD4、CD8α、CD28或CD3ζ的跨膜結構域。

【請求項12】如請求項11所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該跨膜結構域包含如SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

【請求項13】如請求項1至12中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該跨膜結構域與該特異性識別結構域之間通過樞紐區相連接，該樞紐區選自IgG、IgD、或CD8α/CD28的樞紐區。

【請求項14】如請求項13所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子，其中，該樞紐區包含如SEQ ID NO: 14所示的氨基酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的氨基酸序列。

【請求項15】一種編碼如請求項1至14中任一項所述特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子的核酸分子。

【請求項16】如請求項15所述的核酸分子，其包含如SEQ ID NO:3所示的多核苷酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列。

【請求項17】如請求項15或16所述的核酸分子，其進一步包含膜定位訊號肽分子的編碼序列。

【請求項18】如請求項17所述的核酸分子，其中，該膜定位訊號肽分子的編碼序列包含如SEQ ID NO: 1所示的多核苷酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列。

【請求項19】如請求項18所述的核酸分子，其從5’端到3’端依次包含如下該的多核苷酸序列或與其具有約70%以上序列同一性的多核苷酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 19。

【請求項20】一種工程化免疫效應細胞，其包含如請求項1至14中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子及/或如請求項15至19中任一項所述的核酸分子。

【請求項21】如請求項20所述的工程化免疫效應細胞，其中，該工程化免疫效應細胞為CAR-T細胞。

【請求項22】一種藥物組合物，其包含治療有效量的如請求項1至14中任一項所述的特異性識別BAFF-R的嵌合抗原受體分子、如請求項15至19中任一項所述的核酸分子、及/或如請求項20或21所述的工程化免疫效應細胞。

【請求項23】一種治療或預防有需要的受試者的疾病的方法，該方法包括向受試者施用如請求項22所述的藥物組合物，其中，該疾病選自由B細胞BAFF-BAFF-R訊號通路失衡引起的疾病。

【請求項24】如請求項23所述的方法，其中，該疾病包括：自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病和腫瘤。

圖(發明圖式)

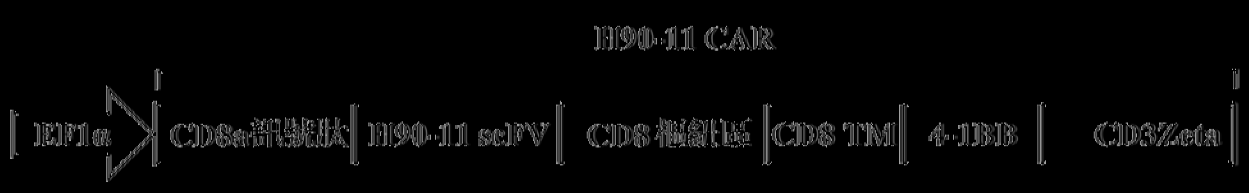

H90-11 CAR
EF1α
CD8α訊號肽
H90-11 scFV
CD8 樞紐區
CD8 TM
4-1BB
CD3Zeta

圖1

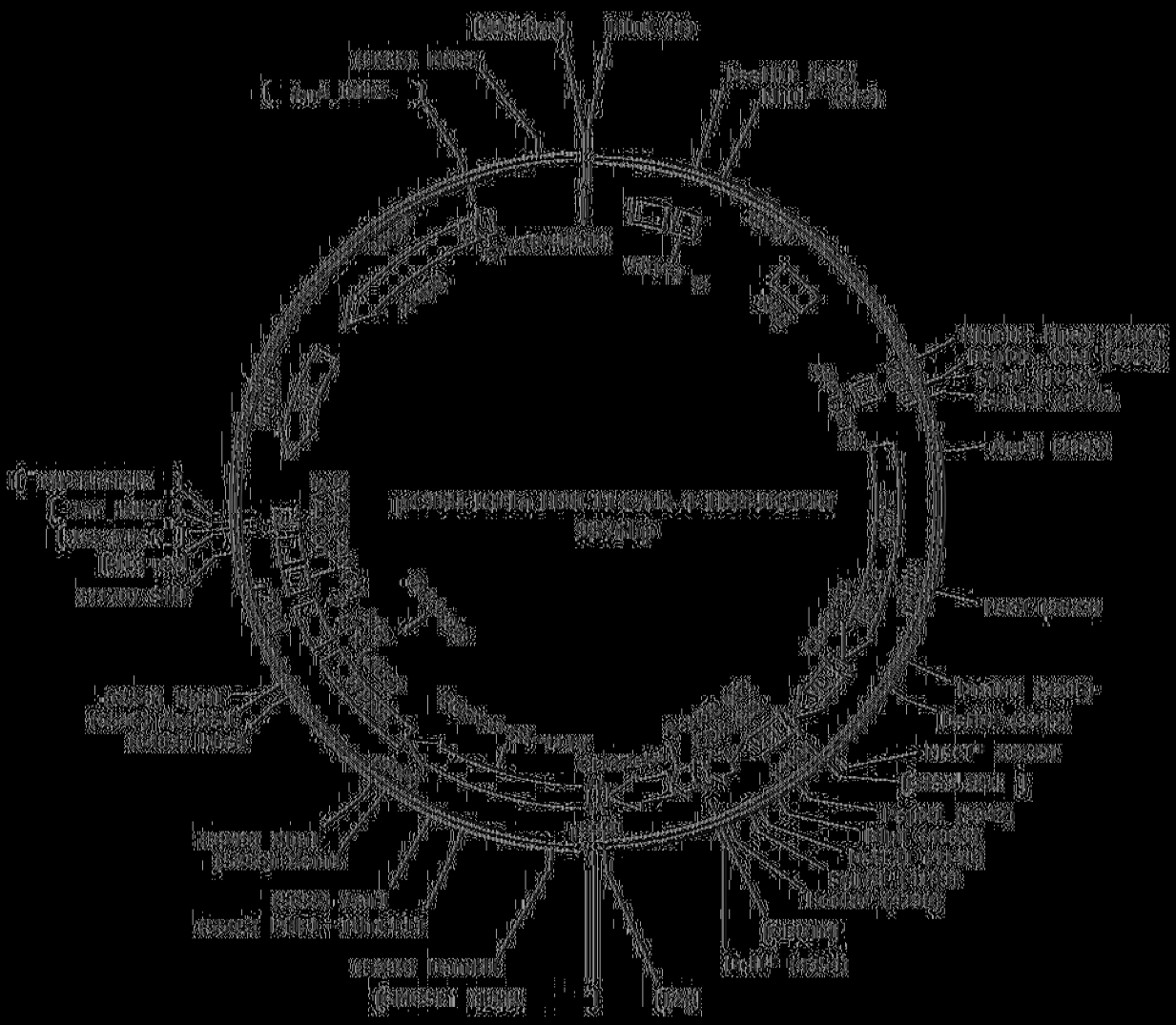


圖2

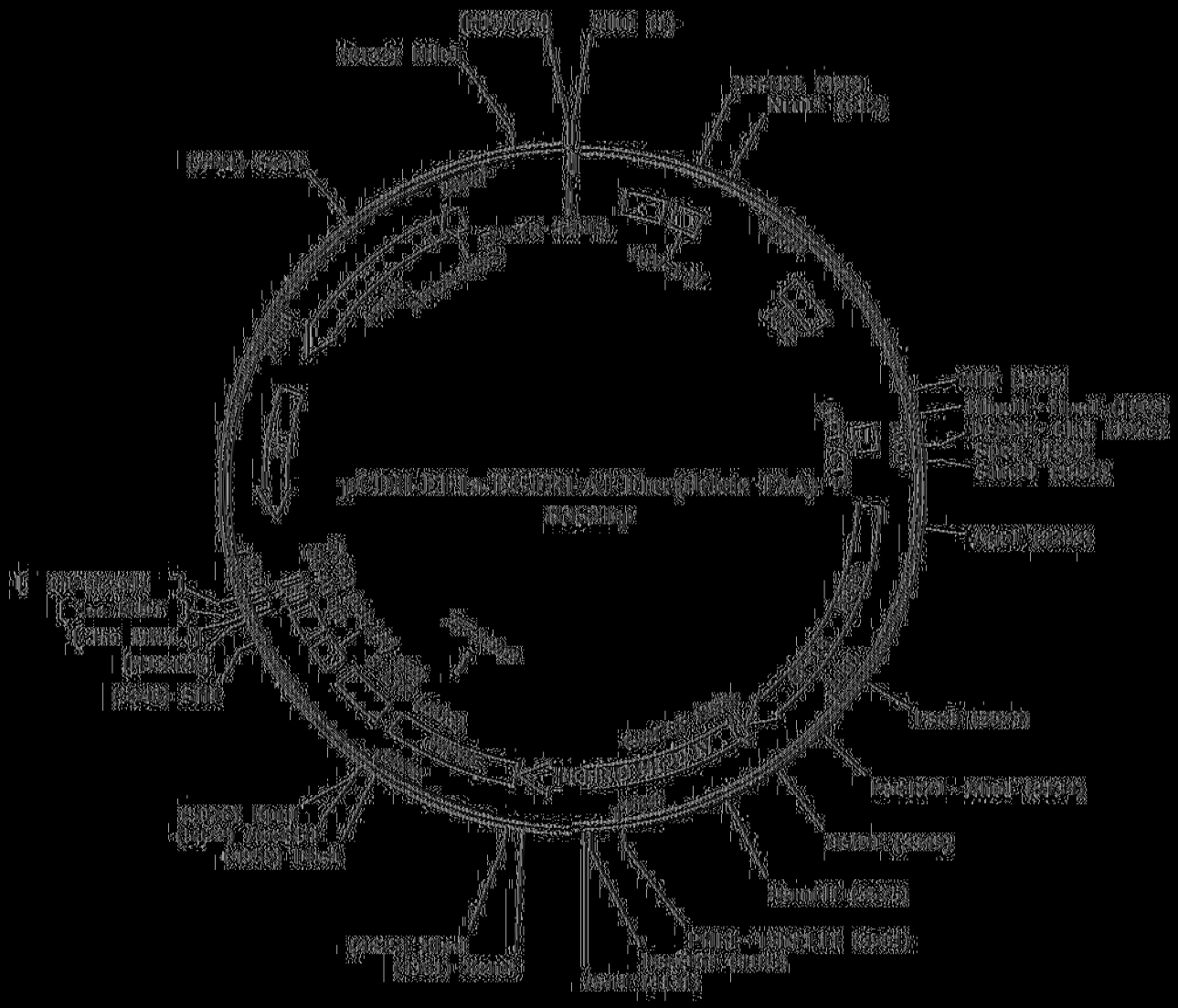
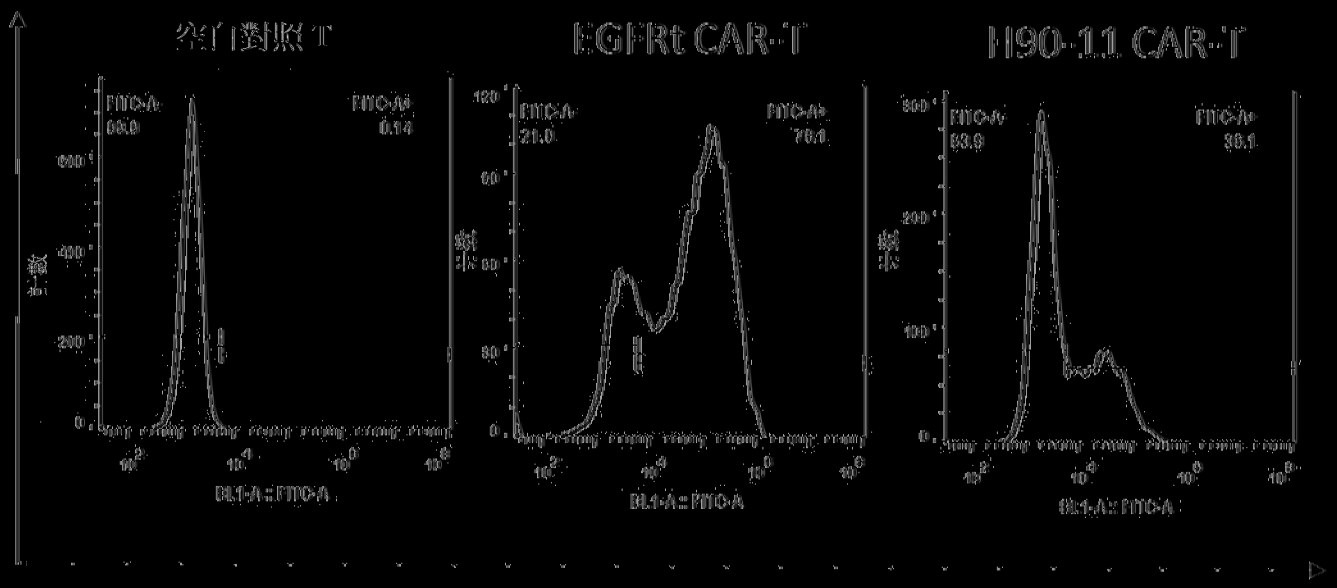


圖3



FITC 標記的 Anti-EGER 抗體

圖4

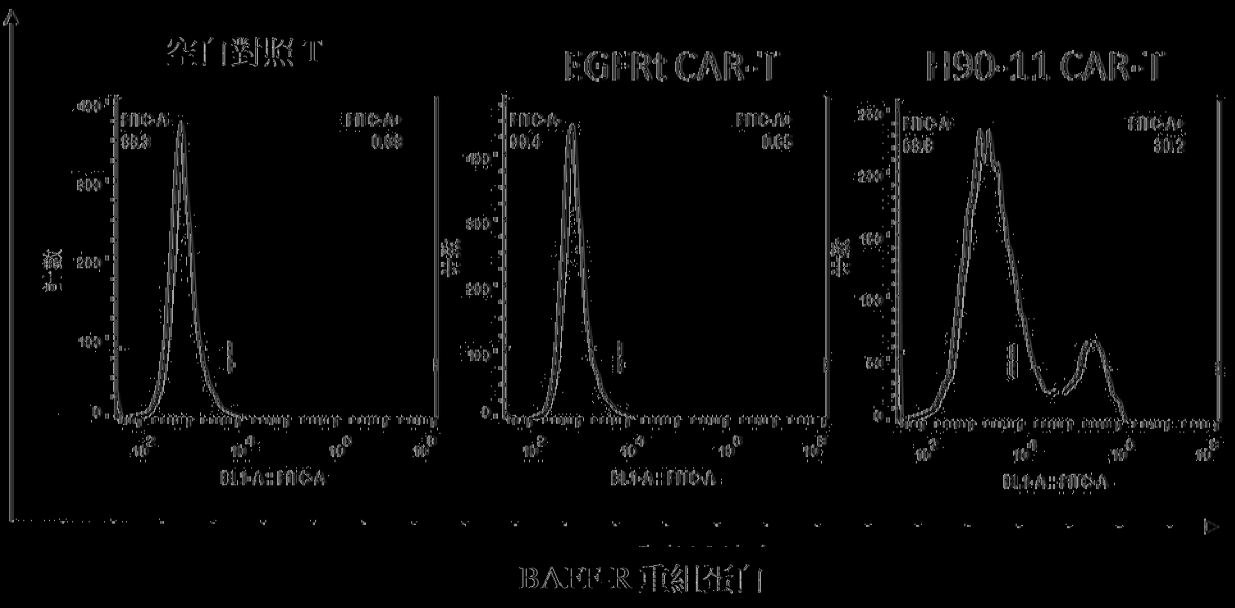

空白對照T
EGFRt CAR-T
H90-11 CAR-T
FITC-A+
68.8
FITC-A+
0.08
FITC-A+
60.4
FITC-A+
0.06
FITC-A+
68.8
FITC-A+
30.2
細胞數
DL5-A::FITC-A
BAGER重組蛋白

圖5

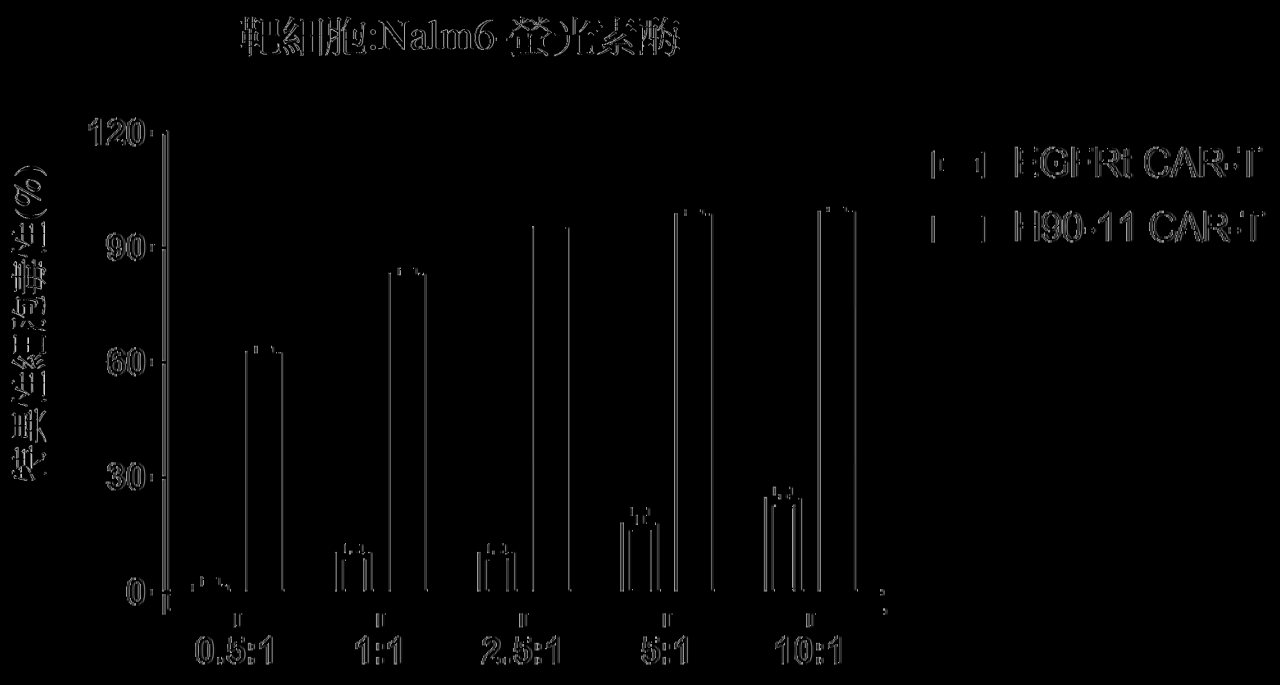

靶細胞:Nalm6 螢光素酶
120
90
60
30
0
特異性細胞毒殺(%)
EGFRt CAR-T
H90-11 CAR-T
0.5:1
1:1
2.5:1
5:1
10:1
效應細胞/靶細胞 比率

圖6

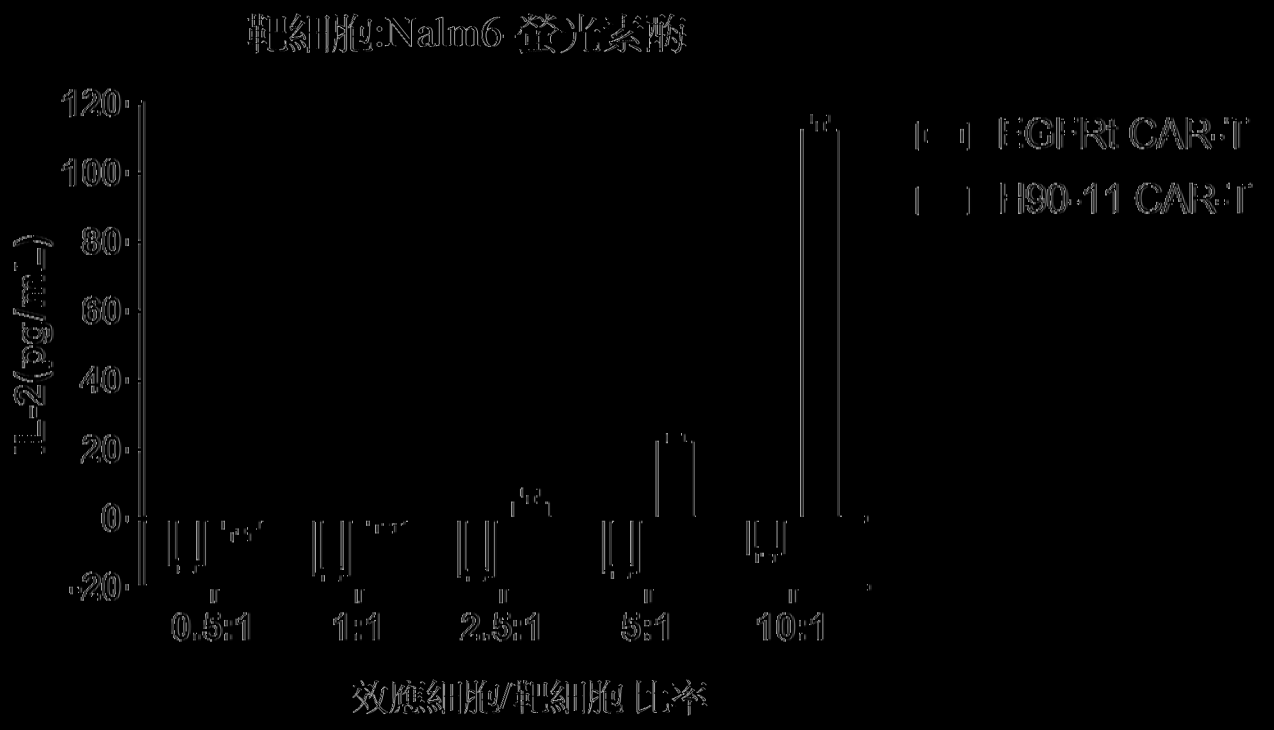

靶細胞:Nalm6 螢光素酶
120
100
80
60
40
20
0
-20
[ ] EGFRt CAR-T
[ ] H90-11 CAR-T
0.5:1
1:1
2.5:1
5:1
10:1
效應細胞/靶細胞 比率

圖7A

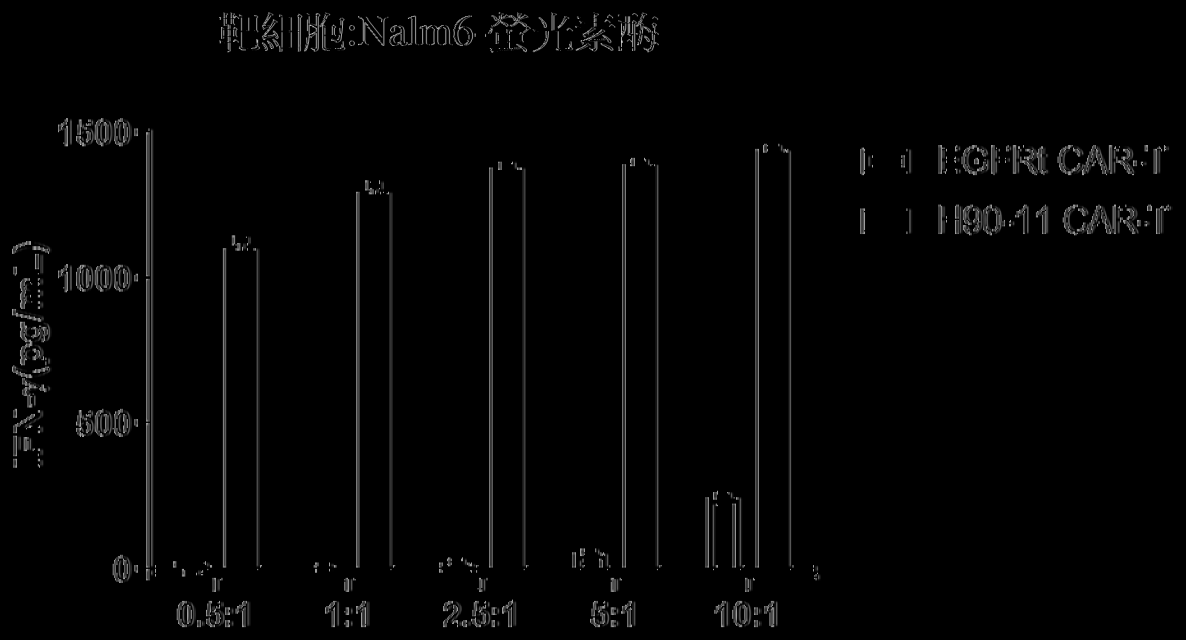

靶細胞:Nalm6 螢光素酶
1500
1000
500
0
0.5:1
1:1
2.5:1
5:1
10:1
效應細胞/靶細胞 比率
EGFRt CAR-T
H90-11 CAR-T

圖7B

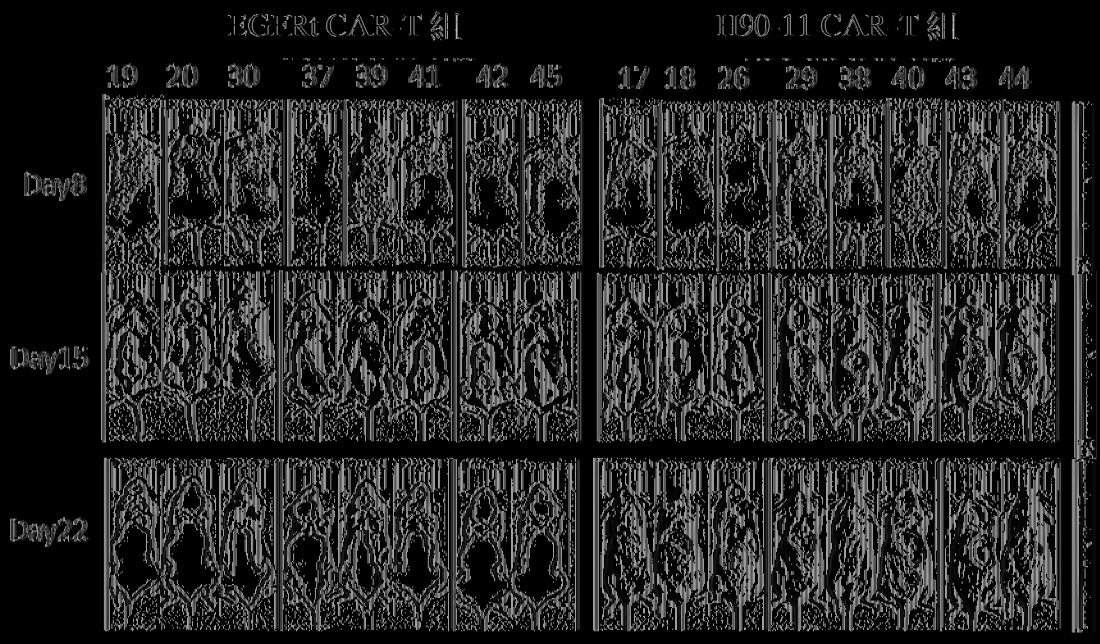

EGFR1 CAR-T 組
H90-11 CAR-T 組
19 20 30 37 39 41 42 45
17 18 26 29 38 40 43 44
Day8
Day15
Day22

圖8A

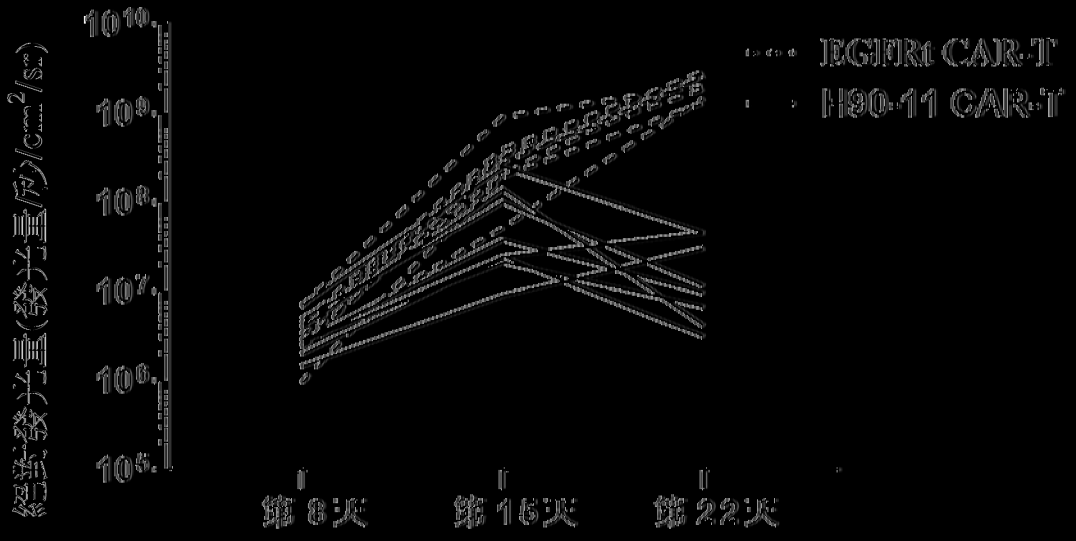

EGFRt CAR-T
H90-11 CAR-T
總流發光量(發光量/cm²/s)
10¹⁰
10⁹
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
第 8天
第 15天
第 22天
成癌後天數

圖8B

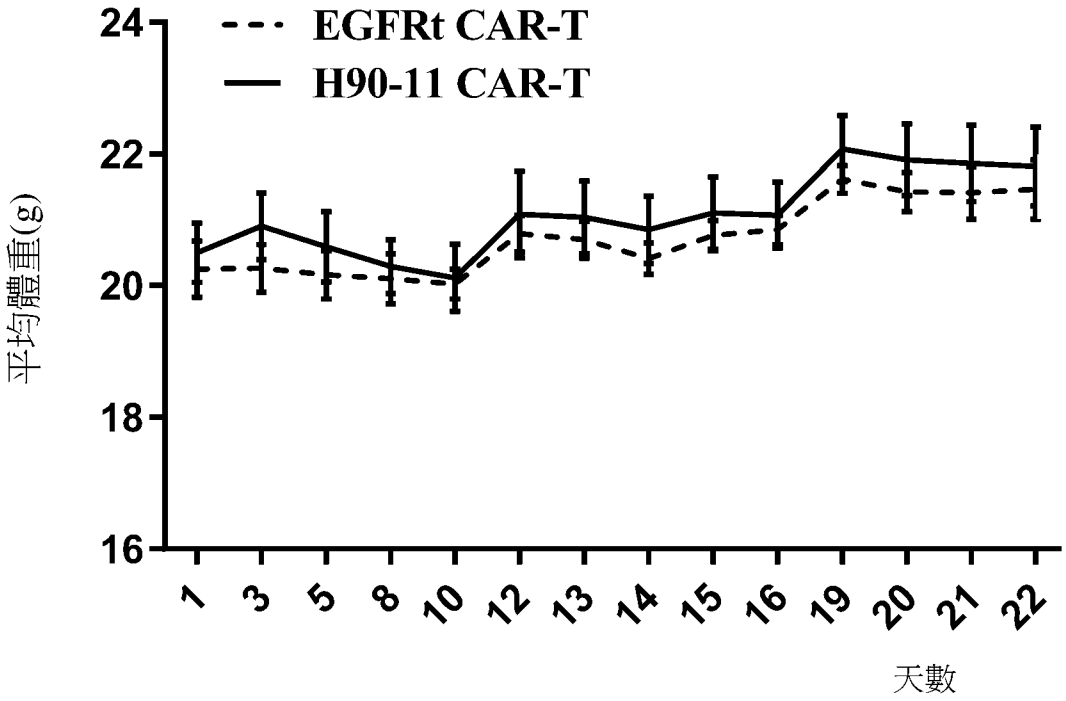

EGFRt CAR-T
H90-11 CAR-T
平均體重(g)
24
22
20
18
16
1
3
5
8
10
12
13
14
15
16
19
20
21
22
天數

圖8C