

逆转肿瘤微环境的融合蛋白及其应用

技术领域

本发明属于免疫治疗技术领域，具体涉及一种逆转肿瘤微环境的融合蛋白、一种新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR 以及表达载体、免疫细胞和应用。

背景技术

CAR 全称是嵌合抗原受体，CAR-T 是嵌合抗原受体 T 细胞即表达嵌合抗原受体（CAR）的 T 淋巴细胞，目前 CAR-T 治疗在血液系统肿瘤中取得了突破性进展，但在实体瘤中的效果不如血液系统瘤，其原因一方面因为 CAR-T 较难进入实体瘤内部，一方面即便 CAR-T 细胞进入实体瘤内部也因为肿瘤微环境而不能正常发挥功能，这些都影响 CAR-T 细胞在实体瘤治疗的疗效；肿瘤微环境与肿瘤的发生、生长和转移有着密切关系，近年来的临床研究表明，肿瘤微环境尤其是实体瘤的免疫微环境对免疫治疗（包含免疫细胞治疗）的疗效和预后都有着显著的影响。因此，CAR-T 细胞治疗实体肿瘤，解决肿瘤微环境抑制即实施肿瘤微环境抵抗必不可少。

CD47 作为继 PD-1/PD-L1, CTLA-4 之后新的免疫检查点，通过向巨噬细胞传递“不要吃我”信号，抑制固有免疫的进行。目前有文献报道采用靶向 CD47 ScFv 制备 CAR-T 进行肿瘤治疗。CD47 可以促成肿瘤逃逸的免疫微环境，不过由于肿瘤的异质性，单独靶向 CD47 疗效有限，并且外源的 ScFv 由于其强的亲和力和可能会导致 CAR-T 细胞过度活化存续性差和非特异性引起安全隐患。因此，采用更安全有效的方案去识别 CD47 破除肿瘤微环境的逃逸信号十分重要。

信号调节蛋白 α (SIRP α) 是 CD47 的配体之一，可与 CD47 结合，抑制巨噬细胞的吞噬作用，目前绝大多数关于 CD47 的研究均集中于 SIRP α 。SIRP γ 也可与 CD47 结合，其存在于 T 细胞表面，胞外区由一个 V 结构域和两个 C1 结构域组成，无胞内信号，仅通过 CD47 传递单向信号，目前很少有研究者针对 SIRP γ 进行改造，而我们认为其是更适合进行针对 CD47 进行肿瘤微环境破除的配体。因此，我们选择 SIRP γ 蛋白的胞外段进行改造设计，并进一步设计肿瘤免疫抑制抵抗型的 CAR。

发明内容

本发明的目的在于提供一种逆转肿瘤微环境的融合蛋白和包含该蛋白的表达载体和免疫细胞，所述融合蛋白可以逆转肿瘤微环境，靶向杀伤肿瘤细胞。

为了实现上述目的，本发明采用以下方案：

对 SIRP γ 蛋白的胞外段进行改造设计，得到可以破除肿瘤组织中抑制性信号的逆转肿瘤微环境的融合蛋白。

所述融合蛋白为 SIRP γ 融合蛋白，所述 SIRP γ 融合蛋白结构包含胞外段，跨膜区和胞内信号区。

进一步，跨膜结构来源于人 CD28 跨膜区或人 CD8 来源跨膜区。

进一步，所述跨膜结构氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8 所示。

优选地，所述胞内信号区来源于 CD28，序列如 SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:38 所示。

进一步，所述 SIRP γ 融合蛋白的结构为 SIRP γ -CD28TM-CD28、SIRP γ -CD8TM-4-1BB。

进一步，所述 SIRP γ 胞外段氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 或其功能性变体所示。

进一步，所述 SIRP γ 融合蛋白 SIRP γ -CD28TM-CD28 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:2 或其功能性变体

所示。

进一步，所述 SIRP γ 融合蛋白 SIRP γ -CD8TM-4-1BB 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:3 或其功能性变体所示。

进一步，所述 SIRP γ 融合蛋白为 SIRP γ -CD28TM-CD28 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。

进一步，所述 SIRP γ 融合蛋白 SIRP γ -CD8TM-4-1BB 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:14 所示。

进一步，包含所述表达载体的免疫细胞。

进一步，所述免疫细胞为 T 细胞、T 细胞前体或 NK 细胞。

具体的所述的 T 细胞可以是 $\alpha\beta$ T 细胞，也可以是 $\gamma\delta$ T 细胞； $\gamma\delta$ T 细胞是一群表面含有受体 γ 和 δ 链的独特的 T 细胞亚群，占有 t 淋巴细胞的 0.5-5%，该细胞群于 1987 年首次发现。其虽然具有 $\gamma\delta$ TCR，但是其识别抗原或配体为非 MHC 限制的，与传统的 $\alpha\beta$ T 细胞不同。目前已经有 CN107810267A 和 CN107771215A 等多篇专利公开将 $\gamma\delta$ T 细胞应用于细胞治疗和 CAR-T 细胞治疗中。

具体的，在设计 SIRP γ 融合蛋白的同时还设计了 PD-1 的融合蛋白 PD-1-28TM-28、PD-1-8TM-BB。

具体地，所述设计的 SIRP γ 融合蛋白在与 CAR1 联合应用时，既可单独表达，也可以与 CAR1 共同表达发挥作用。并且所述 SIRP γ 融合蛋白也可单独应用到免疫治疗中。

具体地，本发明中，发明人认为 SIRP γ 蛋白更适合进行针对 CD47 进行肿瘤微环境破除的配体。因此，选择 SIRP γ 蛋白的胞外段进行改造设计，并进一步设计肿瘤免疫抑制抵抗型的 CAR；因此本发明创造性的将设计构建的缺氧可调控启动子联合 CAR-T 细胞技术和缺氧可调控启动子、SIRP γ 蛋白联合 CAR-T 细胞技术应用到肿瘤的免疫治疗当中，即进一步对传统的 CAR 结构进行改造，提高 CAR-T 在实体瘤上的治疗药效及 CAR-T 的安全性。

进一步，所述免疫细胞还包含具有识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体结构，所述嵌合抗原受体包含识别肿瘤抗原的胞外段、hinge 区、跨膜区和胞内信号区，其中肿瘤抗原包含但不限于 PSCA、PSMA、CD19、BCMA、CD123、CD20、CD22、CEA、EGFR、EGFRVIII、GPC3、5T4、CD33、Her2、GD2、CD70、CLL-1、Trop2、CD47、GPC3、CLND18.2、CD133、CS1、CD155、CD30、ROR1、MUC1、IL13RA α 2 或 mesothelin 等可以作为肿瘤靶向性识别的抗原分子。

本发明的目的在于还提供一种新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR，以及包含所述 CAR 的表达载体和免疫细胞。所述新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR 和免疫细胞破除肿瘤组织中抑制性信号对 CAR-T 功能的影响，实现了 CAR-T 治疗有效性，同时能够保证一定的安全性。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

所述新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR 包含目的一所述的逆转肿瘤微环境的融合蛋白和 CAR1，所述 CAR1 包含识别肿瘤抗原的胞外段、hinge 区、跨膜区和胞内信号区。

进一步，所述融合蛋白通过多顺反子结构与 CAR1 连接，所述多顺反子结构为自剪切多肽或内部核糖体进入位点 IRES，所述自剪切多肽为 T2A、P2A、E2A 或 F2A。

进一步，所述 CAR 的结构为 ScFv-hinge-TM-CD3 ζ -自剪切肽-SIRP γ 融合蛋白或 ScFv-hinge-TM-4-1BB-CD3 ζ -自剪切肽-SIRP γ 融合蛋白。

进一步，所述 CAR 的结构为 ScFv-hinge-TM-CD3 ζ -自剪切肽-SIRP γ -CD28TM-CD28 或 ScFv

-hinge-TM-4-1BB-CD3 ζ -自剪切肽- SIRP γ - CD28TM-CD28。

进一步, 所述 CAR 结构 a 可以是常规的第一代、第二代、第三代 CAR 结构, 也可以是改进的双 CAR、可调控 CAR 结构 (如 FRB/FKBP12 调控) 等新型 CAR 结构。

进一步, CAR1 中的铰链区序列可以来源于: IgG、CD8、CD7、CD4; CAR 结构中跨膜区可以来源于: CD8、CD28、CD3 ϵ 、CD4、CD16、CD137、CD80 以及 CD86; CAR 结构中胞内信号区可来源于: CD3、CD137、CD28、CD27、OX40、ICOS、GITR、CD2、CD40、PD-1、PD1L、B7-H3、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、ICAM-1、CD7、NKG2C、CD83、CD86 以及 CD127。

进一步, 所述 ScFv 可以识别 CD19、CD123、M α v- γ 、PSMA、IL13R α 2、EGFRvIII、EGFR、EPCAM、GD2、MUC1、HER2、GPC3、CEA、Meso、CD133、NKG2D、CD138、LeY、k-Light、CD33、ROR1、BCMA、CD30、CD20、CD22、PSCA、CLL-1、CD70、CD47 中的任一种。

进一步, 所述 ScFv 可以识别 CD47 或 CEA 或 PSCA 或 CD19 或 BCMA。

在某些实施例中, 所述 CAR 结构带有截短的 EGFRt 调控标签; 在某些实施例中, 所述靶向 PSCA 的 CAR 结构为通用型 CAR 结构; 在某些实施例中, 所述靶向 PSCA 的 CAR 结构带有自杀基因如 iCasp9。

在某些实施例中, 所述 CAR 结构包含天然杀伤细胞受体 (NKR) 的一种或多种组分, 因而形成 NKR-CAR。NKR 组分可以是来自以下任何天然杀伤细胞受体的跨膜结构域、铰链结构域或胞质结构域: 杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR), 例如 KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、KIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1 和 KIR3DP1; 天然细胞毒性受体 (NCR), 例如, NKp30、NKp44、NKp46; 免疫细胞受体的信号传导淋巴细胞活化分子 (SLAM) 家族, 例如, CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRA、BLAME 和 CD2F-10; Fc 受体 (FcR), 例如, CD16、和 CD64; 和 Ly49 受体, 例如, LY49A、LY49C。所述的 NKR-CAR 分子可以与衔接分子或胞内信号结构域 (例如, DAP12) 相互作用。

作为一种优选方案 1, 前述的 SIRP γ 融合蛋白的和 CAR1 组成的 CAR 结构, 其中, 所述 CAR1 包含: hinge 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 或其功能性变体所示, TM 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:8, CD3 ζ 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 或其功能性变体所示; 融合蛋白结构: 融合蛋白结构: SIRP γ 的胞外段的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 或功能性变体所示; 来源于人 CD28 的跨膜区氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示; 来源于人 CD28 的胞内信号区氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示。

进一步, 所述 ScFv 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示或其功能性变体。

具体的, 本优选方案设计了表达新型免疫抑制抵抗型 CAR: ScFv-hinge-TM-CD3 ζ -自剪切肽- SIRP γ -28TM-28, ScFv-hinge-TM-CD3 ζ -自剪切肽- SIRP γ -8TM-BB, ScFv-hinge-TM-4-1BB-CD3 ζ -自剪切肽- SIRP γ -28TM-28, ScFv-hinge-TM-4-1BB-CD3 ζ -自剪切肽- SIRP γ -8TM-BB 以及 ScFv-hinge-TM-CD3 ζ -自剪切肽- PD-1-28TM-28 和 ScFv-hinge-TM-CD3 ζ -自剪切肽- PD-1-8TM-BB 的基因修饰的 T 淋巴细胞验证新型免疫抑制抵抗型 CAR 的作用。

进一步, 制备所述的 CAR 的结构的方法为, 将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白共同表达于一个载体转染免疫细胞; 或将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白分别表达于两个载体转染免疫细胞。

作为一种优选方案 2，前述的 SIRP γ 融合蛋白的和 CAR1 组成的 CAR 结构，其中，所述 CAR1 包含抗 CEA 单链抗体、CD8 铰链区、CD8 跨膜区、CD137 和 CD3 ξ 双刺激信号。

优选地，所述 CAR 结构 a 为 CEA ScFv-CD8 铰链区-CD8 跨膜区-CD137-CD3 ξ 结构，其氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 26 所示的序列。其中，编码 CEA 单链抗体的核酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示；编码 CD8 铰链区-CD8 跨膜区-CD137-CD3 ξ 结构的核酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示。

进一步，编码包含缺氧可调控的启动子的所述 CAR 结构的核酸序列包含如 SEQ ID NO: 31 所示的序列。

作为一种优选方案 3，前述的 SIRP γ 融合蛋白的和 CAR1 组成的 CAR 结构，其中，所述 CAR1 包括 CD19 单链抗体、CD8 铰链区、CD8 跨膜区、CD137 和 CD3 ξ 双刺激信号；

优选地，所述 CAR 结构 a 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示或其功能性变体。

进一步，编码所述 CAR 结构的核酸序列包含如 SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 33 所示的序列。

进一步，制备所述的 CAR 的结构的方法为，将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白共同表达于一个载体转染免疫细胞；或将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白分别表达于两个载体转染免疫细胞。

作为一种优选方案 4，前述的 SIRP γ 融合蛋白的和 CAR1 组成的 CAR 结构，其中，所述 CAR 结构 a 包括 PSCA 单链抗体、铰链区、CD28 跨膜区、CD28、CD137 和 CD3 ξ 三刺激信号；所述铰链区为 G4H 或 7H。

优选地，所述 CAR 结构 a 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示或其功能性变体；或如 SEQ ID NO: 29 所示或其功能性变体。氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示或其功能性变体为铰链区为 G4H 的 CAR 结构 a；氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示或其功能性变体为铰链区为 7H 的 CAR 结构 a。

进一步，编码所述 CAR 结构的核酸序列包含如 SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 35 所示的序列；其中 SEQ ID NO: 35 包含了缺氧可调控的启动子。

进一步，制备所述的 CAR 的结构的方法为，将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白共同表达于一个载体转染免疫细胞；或将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白分别表达于两个载体转染免疫细胞。

作为一种优选方案 5，包含前述的 SIRP γ 融合蛋白，和优选方案 1-优选方案 4 中的任一种 CAR1 组成 CAR 结构，所述 CAR 结构还包括缺氧启动子，所述缺氧可调控启动子的核酸序列包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列。包含缺氧启动子的靶向 CD19 的 CAR 结构能够在缺氧微环境中有效的清除体内肿瘤作用，并且利用缺氧微环境诱导的启动子能够在缺氧环境强化目的基因、蛋白等因子的表达，提高肿瘤的药物疗效和 CAR-T 治疗的有效性和安全性，而且不仅可以有效的表达于 T 淋巴细胞，而且在缺氧环境中能够加强 CAR 分子表达，并且使 CAR-T 细胞有高的 IFN- γ 分泌能力，提高 CAR-T 细胞针对肿瘤靶细胞的杀伤，能够用于肿瘤的靶向治疗。

进一步，所述缺氧可调控启动子，由 Hif1a 调节元件和迷你启动子连接构成；所述迷你启动子选自细胞病毒启动子、HSV 胸苷激酶的启动子、猴病毒 40 的启动子、腺病毒晚期启动子和合成启动子中的任一项。

进一步，制备所述的 CAR 的结构的方法为，将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ

融合蛋白共同表达于一个载体转染免疫细胞；或将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白分别表达于两个载体转染免疫细胞。

本发明目的在于还提供一种包含前任一所述的新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR（包括优选方案 1-优选方案 5 中的方案和非优选地方案）的表达载体、包含该表达载体的免疫细胞。

进一步，所述表达载体为慢病毒表达载体、逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、腺相关病毒表达载体、DNA 载体、RNA 载体、质粒中的任一种。

进一步，所述免疫细胞为 T 细胞、T 细胞前体或 NK 细胞。

进一步，制备所述的免疫细胞的方法为，将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白共同表达于一个载体转染免疫细胞；或将不包含所述 SIRP γ 融合蛋白的 CAR 结构和所述 SIRP γ 融合蛋白分别表达于两个载体转染免疫细胞。

在某些实施例中，所述慢病毒载体选自基本上由以下组成的群组：人免疫缺陷病毒 1 (HIV-1)、人免疫缺陷病毒 2 (HIV-2)、维斯纳-梅迪病毒 (visna-maedi virus, VMV) 病毒、山羊关节炎-脑炎病毒 (CAEV)、马传染性贫血病毒 (EIAV)、猫免疫缺陷病毒 (FIV)、牛免疫缺陷病毒 (BIV) 和猿猴免疫缺陷病毒 (SIV)。

在某些实施例中，载体包含左 (5') 逆转录病毒 LTR、Psi (Ψ) 包装信号、中心多嘌呤段/DNA 瓣 (cPPT/FLAP)、逆转录病毒导出元件、可操作地连接到编码本文所涵盖的 CAR 的多核苷酸的启动子和右 (3') 逆转录病毒 LTR。

在某些实施例中，CAR 包含乙型肝炎病毒转录后调节元件 (HPRE) 或土拨鼠转录后调节元件 (WPRES) 以及优化的土拨鼠转录后调节元件 (oPRE)。

在某些实施例中，所述 5' LTR 的启动子经异源启动子置换。

在某些实施例中，所述异源启动子是巨细胞病毒 (CMV) 启动子、劳斯肉瘤病毒 (Rous Sarcoma Virus, RSV) 启动子或猿猴病毒 40 (SV40) 启动子。

在某些实施例中，所述 5' LTR 或 3' LTR 是慢病毒 LTR。

在某些实施例中，所述 3' LTR 是自我失活 (SIN) LTR。

在某些实施例中，所述 CAR 结构的核酸序列包含优化的 Kozark 序列。

在某些实施例中，可操作地连接到编码本文所涵盖的 CAR 的多核苷酸的所述启动子以及以下组成的群组：巨细胞病毒立即早期基因启动子 (CMV)、延伸因子 1 α 启动子 (EF1- α)、磷酸甘油酸激酶-1 启动子 (PGK)、泛素-C 启动子 (UBQ-C)、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子 (CAG)、多瘤病毒增强子/单纯疱疹胸苷激酶启动子 (MC1)、 β -肌动蛋白启动子 (β -ACT)、猿猴病毒 40 启动子 (SV40) 和骨髓增生肉瘤病毒增强子，阴性对照区缺失的、d1587rev 引物结合位点取代的 (MND) 启动子。

在某些实施例中，包含 CAR 的载体可以包含分泌型抗 PD-1 ScFv；在某些实施例中，包含 CAR 的载体包含 PD-1 共轭转导肽（如 PD-1-CD28-CD137-CD3 信号结构）；在某些实施例中，包含 CAR 的载体多个 CAR 组合，如 2 个靶向不同抗原或同一抗原的不同识别位点的 CAR 组合。

本发明的目的在于还提供了一种药物组合物及其应用。

为实现上述目的，本发明采用以下方案：

所述药物组合物包含所述的融合蛋白或包含所述融合蛋白的表达载体和免疫细胞或所述的新型肿

瘤免疫抑制抵抗型 CAR 或包含所述新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR 所述的免疫细胞。

在某些实施例中，融合蛋白可以选择 SIRP α 或者 SIRP α 的部分结构域，融合蛋白的结构可以是 SIRP α -28TM-28，SIRP α -8TM-137，SIRP α -8TM-0X40，SIRP α -8TM-ICOS 等多种融合蛋白。在有些实施例中可以单独使用表达上述 SIRP α 融合蛋白的免疫细胞，也可以将上述 SIRP α 融合蛋白和 CAR 分子共表达于同一免疫细胞；或分别表达 SIRP α 融合蛋白、CAR 分子的免疫细胞以一定比例混合。

在某些具体实施例中，所述活性剂和/或治疗可以是手术、化疗、放射、免疫抑制剂，例如环孢素 (cyclosporin)、硫唑嘌呤 (azathioprine)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、霉酚酸酯 (mycophenolate) 和 FK506、抗体或其它免疫清除剂 (immunoablative agents) 例如 CAMPATH、抗 CD3 抗体或其它抗体治疗、环磷酰胺 (cytoxan)、氟达拉滨 (fludarabine)、环孢素 (cyclosporin)、FK506、雷帕霉素 (rapamycin)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、类固醇 (steroids)、FR901228、细胞因子和辐射。

在某些实施例中，所述细胞可以表达其它活性剂，例如，增强 CAR 表达细胞活性的活性剂。活性剂可以是阻断抑制性分子的活性剂。抑制性分子如 PD1 可以在一些实施方案中降低 CAR 表达细胞发动免疫效应子反应的能力。抑制性分子包括 PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CEACAM (CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、HVEM (TNFRSF14 或 CD270)、KIR、A2aR、MHC I 类、MHC II 类、GAL9、腺苷、TGFR (TGFR β) 和 TGFR β 。所述抑制性分子的胞外结构域可以融合到跨膜结构域和胞内信号传导结构域，比如 PD1 CAR。

进一步，种前任一所述的融合蛋白或前任一所述的 CAR 结构或前任一所述的核酸序列或前任一所述的表达载体或前任一所述的免疫细胞在制备肿瘤药物中的应用。

进一步，所述肿瘤为恶性肿瘤，包括急性淋巴样白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、前列腺癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、肺癌、肾癌、肝癌、脑癌和皮肤癌。

在本发明中，在 CAR 结构中，Z 是指人 CD3 胞内信号 CD3 ζ ，BB 是指人 4-1BB 胞内信号，BBZ 是指 4-1BB ICD-CD3 ζ 的胞内结构域，28Z 是指 CD28 ICD-CD3 ζ 的胞内结构域。

本发明中，所述“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。

本发明中，在 CAR 结构中，CEAZ 是指胞内结构域仅有 CD3 ζ 的靶向 CEA 的 CAR 结构，CEA-28Z 是指胞内具有来源 CD28 胞内域的共刺激信号和 CD3 ζ 的靶向 CEA 的 CAR 结构，CEA-BBZ 是指胞内具有来源 4-1BB 胞内域的共刺激信号和 CD3 ζ 的靶向 CEA 的 CAR 结构，BCMA-BBZ 是指胞内具有来源 4-1BB 胞内域的共刺激信号和 CD3 ζ 的靶向 BCMA 的 CAR 结构；SIRP γ -28TM-28 是指胞内仅有来源 CD28 胞内域信号的 SIRP γ 融合肽，使用 SIRP γ -28 简写；SIRP γ -8TM-BB 是指胞内仅有来源 4-1BB 胞内域信号的融合肽，使用 SIRP γ -BB 简写。

本发明的有益效果在于：

本发明提供的逆转肿瘤微环境的融合蛋白可以逆转肿瘤微环境，靶向杀伤 CD47 阳性的肿瘤细胞；包含所述融合蛋白的新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR 和免疫细胞破除肿瘤组织中抑制性信号对 CAR-T 功能的影响，实现了 CAR-T 治疗有效性，同时能够保证一定的安全性。

附图说明

图 1 为免疫抑制破除融合蛋白结构图。

图 2 为免疫抑制型 CAR 结构示意图。

图 3 为 CAR 构建质粒验证图。

图 4 为靶细胞构建结果。

图 5a 为新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 的 CAR 阳性率。

图 5b 为新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 的表达强度。

图 6a 为新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 体外功能验证。

图 6b 为新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 体外杀伤率。

图 7 为新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 对肿瘤抑制环境破除验证。

图 8a 为 NCG 小鼠 CEA, PD-L1, CD47 三阳性表达。

图 8b 为 NCG 小鼠的肿瘤体积测量数据绘制肿瘤体积增长曲线。

图 9 为二代免疫抑制型 CAR 的体内有效性。

图 10 为 CEA 靶点各实验组平均荧光强度情况。

图 11 为 CEA 靶点各实验组阳性率情况。

图 12 为 CEA 靶点各实验组 CAR-T 的体外扩增倍数曲线。

图 13 为 CEA 靶点各实验组 CAR-T 对靶细胞 DLD1-CEA 的杀伤效率。

图 14 为 CEA 靶点各实验组分别在 DLD1-CEA 和 DLD1-CEA(CD47-)细胞中 IFN- γ 分泌情况。

图 15 为 CEA 靶点各实验组分别在 DLD1-CEA 和 DLD1-CEA(CD47-)细胞中 IL-2 分泌情况。

图 16 为 CEA 靶点各实验组分别在 DLD1-CEA 和 DLD1-CEA(CD47-)细胞中 TNF- α 分泌情况。

图 17 为 CEA 靶点筛选对比组 a 体内缺氧模型验证小鼠肿瘤生长情况实体图。

图 18 为 CEA 靶点筛选对比组 a 体内缺氧模型验证肿瘤小鼠体内生物发光量情况。

图 19 为流式检测靶向 CD19 的各实验组 CAR-T 的阳性率情况。

图 20 为靶向 CD19 的各实验组细胞杀伤情况。

图 21 为靶向 CD19 的各实验组 IFN- γ 因子分泌情况。

图 22 为靶向 CD19 的各实验组小鼠体内生物发光情况。

图 23 为靶向 CD19 的各实验组小鼠体内肿瘤生长情况。

图 24 为 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A- SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况。

图 25 为 PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况。

图 26 为 PSCA-28BBZ- G4H -28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况。

图 27 为 PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况。

图 28 为 PSCA-28BBZ-G4H-28TM、PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况。

图 29 为 PSCA-28BBZ-7H-28TM、PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况。

图 30 为 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A- SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况。

图 31 为 PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况。

图 32 为 PSCA-28BBZ-G4H-28TM+ SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况。

图 33 为 PSCA-28BBZ-7H-28TM+ SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况。

图 34 为 PSCA-28BBZ-G4H-28TM、PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28 中细胞杀伤情况。

图 35 为 PSCA-28BBZ-7H-28TM、PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 中细胞杀伤情况。

图 10-图 18 中，5HCEA-BBZ 指的是含缺氧的并且胞内具有来源 4-1BB 胞内域的共刺激信号和 CD3 ζ 的靶向 CEA 的 CAR 结构；CEA-BBZ 指的是胞内具有来源 4-1BB 胞内域的共刺激信号和 CD3 ζ 的靶向 CEA 的 CAR 结构；CEA-28Z 指的是胞内具有来源 CD28 胞内域的共刺激信号和 CD3 ζ 的靶向 CEA 的 CAR 结构，SIRP γ -28TM-28 是指胞内仅有来源 CD28 胞内域信号的融合肽后续使用 SIRP γ -28 简写。

图 19-图 23 中，5HCD19-BBZ 是指胞内具有缺氧启动子、来源 4-1BB（简写为 BB）胞内域的共刺激信号和 CD3 ζ 的靶向 CD19 的 CAR 结构；SIRP γ -28TM-28（SIRP γ -28）是指胞内仅有来源 CD28 胞内域信号的融合肽；5HCD19-BBZ-SIRP γ -28 指的是指的是如下结构的 CAR：5HCD19-8H-8TM-CD137-CD3 ζ ；SIRP γ -28-5HCD19-BBZ 是指是包含缺氧启动子的 CAR 融合蛋白分别表达两个载体转染免疫细胞获得的 CAR-T。

图 24-图 35 中，RT4-Luc-GFP 为阳性细胞，PC-3-Luc-GFP 为阴性细胞；SIRP γ -28TM-28（SIRP γ -28）是指胞内仅有来源 CD28 胞内域信号的融合肽；PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 指的是将 PSCA-28BBZ-G4H-28TM 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM 和 SIRP γ -28 与融合蛋白 SIRP γ -28 分别表达于两个载体转染免疫细胞获得的产品。PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A-SIRP γ -28 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A-SIRP γ -28 指的是将 PSCA-28BBZ-G4H-28TM 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM 和 SIRP γ -28 与融合蛋白 SIRP γ -28 共同表达于一个载体转染免疫细胞获得的产品。

具体实施方式

以下将参照附图，对本发明的优选实施例进行详细描述。优选实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如分子克隆实验指南（第三版，J. 萨姆布鲁克等著）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。所举实施例是为了更好地对本发明的内容进行说明，但并不是本发明的内容仅限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整，仍属于本发明的保护范围。

本发明实施例中，涉及到的载体结构原件的序列如下表 1 所示。

表 1 载体结构原件的序列

CAR 结构原件	核苷酸序列	氨基酸序列
SIRP γ	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:1
hinge		SEQ ID NO:24
CD28TM	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:7
CD8TM	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:8
CD28 ICD	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:9
4-1BB ICD	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:10
CD3 ζ	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:11

CEA ScFv		SEQ ID NO:25
CEAZ	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:4
CEA-BB-CD3 ζ		SEQ ID NO:23
SIRP γ -28TM-28	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:2
SIRP γ -8TM-BB	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:3
CEAZ-P2A-SIRP γ -28	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:5
CEAZ-P2A-SIRP γ -BB	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:6

本发明实施例中(表1中):Z是指CD3 ζ ,CEAZ是指胞内结构仅有CD3 ζ 的CAR结构(ScFv(CEA)-hinge-TM-CD3 ζ),CEA-28Z是指胞内具有来源CD28胞内域的共刺激信号和CD3 ζ 的靶向CEA的CAR结构(ScFv(CEA)-hinge-TM-CD28-CD3 ζ),CEA-BBZ是指胞内具有来源4-1BB胞内域的共刺激信号和CD3 ζ 的靶向CEA的CAR结构(ScFv(CEA)-hinge-TM-4-1BB-CD3 ζ),BCMA-BBZ是指胞内具有来源4-1BB(简称为BB)胞内域的共刺激信号和CD3 ζ 的靶向BCMA的CAR结构;SIRP γ -28TM-28是指胞内仅有来源CD28胞内域信号的融合肽后续使用SIRP γ -28简写,SIRP γ -8TM-BB是指胞内仅有来源4-1BB胞内域信号的融合肽,后续使用SIRP γ -BB简写。

本发明实施例中,5HCD19-BBZ是指胞内具有缺氧启动子、来源4-1BB(简称为BB)胞内域的共刺激信号和CD3 ζ 的靶向CD19的CAR结构;SIRP γ -28TM-28(简写SIRP γ -28)是指胞内仅有来源CD28胞内域信号的融合肽;SIRP γ -28+5HCD19-BBZ是指是包含缺氧启动子的CAR融合蛋白分别表达两个载体转染免疫细胞获得的CAR-T。5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28是指是包含缺氧启动子的CAR融合蛋白共同表达一个载体转染免疫细胞获得的CAR-T。

本发明实施例中,PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28或PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28指的是将PSCA-28BBZ-G4H-28TM或PSCA-28BBZ-7H-28TM和SIRP γ -28与融合蛋白SIRP γ -28分别表达于两个载体转染免疫细胞获得的产品。PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A-SIRP γ -28或PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A-SIRP γ -28指的是将PSCA-28BBZ-G4H-28TM或PSCA-28BBZ-7H-28TM和SIRP γ -28与融合蛋白SIRP γ -28共同表达于一个载体转染免疫细胞获得的产品。

本发明实施例中采用磷酸钙法包装慢病毒的方法,具体为:用含10%FBS(w/v)的DMEM培养基培养293T细胞至较佳状态,包装质粒(RRE:REV:2G)和表达质粒按一定比例加入到1.5的离心管中,加入CaCl₂和2×HBS,混匀后室温静置后加入到处理好的293T细胞培养液中,3-5h后再次换液至10mL含10%FBS的DMEM培养基,48h或72h后收集细胞上清,纯化病毒。

本发明实施例中,抗体为:Protein-L-PE,Protein-L可识别抗体轻链,CAR抗原识别区的ScFv序列的轻链可被Protein-L识别,因此利用Protein-L可检测CAR阳性率和CAR表达强度。SIRP γ -28后有GFP标签,以GFP阳性率确定其表达情况。

本发明实施例中,检测不同CAR-T对靶细胞杀伤能力的方法为:利用ACEA xCELLigence RTCA MP仪器进行,实验步骤依据仪器说明书进行。ACEA xCELLigence RTCA MP原理为对附着于孔底的肿瘤细胞以电阻指数为数据每15分钟记录一次,通过电阻指数判断贴壁的靶细胞的增殖或者死亡情况。利用电阻指数分析结果公式为:CAR-T细胞杀伤率=基线电阻指数-实时电阻指数。

本发明实施例中,IFN- γ 检测采用BD IFN- γ 试剂盒检测,实验步骤依据产品说明书进行;IL-2检测采用inritrogen IL-2试剂盒检测,实验步骤依据产品说明书进行;TNF- α 检测采用Biolegend试剂

盒检测, 实验步骤依据产品说明书进行。

本发明实施例中, 验证缺氧模型是否构建完成的方法为: 利用重组质粒病毒感染活化的 PBMC 构建体外缺氧细胞模型, 培养 12-18h 后换液; 然后利用 CoCl_2 诱导缺氧环境, 培养至第 N 天通过检测 CAR 结构上轻链抗体检测 CAR 表达情况。

本发明实施例中, 体内验证使用小鼠为 NOD.Cg-PrkdcscidII2rgtm1Sug/JicCr1, 简称 NOG 小鼠, 由日本实验动物研究所(CIEA)的 Mamoru Ito 培育而成, 为国际上 CAR-T 体内相关成瘤实验最常见品系。

本发明实施例中, 体内缺氧模型验证的方法为: 选择 6-8 周龄雌性 NOG 小鼠, 标记耳号后, 在小鼠背部以 1×10^6 /只细胞量皮下注射靶细胞, 成瘤第 12 天测量小鼠肿瘤体积。

第一部分

实施例 1 质粒构建

基于如图 1 所示的 CAR 模式图, 以 SIRP γ 及 CD47 全长的质粒、pL-CAG-2AGFP、pL-CAG-PD1-CD28-2ACherry、pL-CAG-PD1-BB-2ACherry 为模板, 构建如图 2 所示的 CAR 结构和对应的单靶点 CAR 结构。构建获得载体: CEAZ-PD1-28、CEAZ-PD1-BB、CEAZ-SIRP γ -BB、CEAZ-SIRP γ -28、CEABBZ-P2A-SIRP γ -28、CEABBZ-P2A-SIRP γ -BB、BCMA-BBZ-P2A-SIRP γ -28 和单靶点 CAR: CEAZ, PD1-28, PD1-BB, SIRP γ -28TM-28, SIRP γ -8TM-BB。通过酶切及测序比对验证后, 结果如图 3 所示, 重组质粒的酶切鉴定: 1-3: pL-CAG-CEAZ-PD1-28 质粒, 依次为: 原质粒, CEAZ (1371bp), PD1-28 (783bp); 4-6: pL-CAG-CEAZ-PD1-BB 质粒, 依次为: 原质粒, CEAZ (1371bp), PD1-BB (798bp); 7-9: pL-CAG-CEAZ-SIRP γ -28 质粒, 依次为: 原质粒, CEAZ (1371bp), SIRP γ -28 (1374bp); 10-12: pL-CAG-CEAZ-SIRP γ -BB 质粒, 依次为: 原质粒, CEAZ (1371bp), SIRP γ -BB (1368bp); M1: DL5000 DNA 分子量标准; M2: DL15000 DNA 分子量标准; 13-15: pL-CAG-SIRP γ -28-2AGFP 质粒, 依次为: 原质粒, SIRP γ -28 (1292bp), 2AGFP (785bp); 16-18: pL-CAG-SIRP γ -BB-2AGFP 质粒, 依次为: 原质粒, SIRP γ -BB (1286bp), 2AGFP (785bp) 19-20: pL-CAG-CD47 质粒, 依次为: CD47 (974bp), 原质粒; M3: DL5000 DNA 分子量标准; 构建成功。

实施例 2 靶细胞构建

利用磷酸钙法制备获得 CEA, PD-L1, CD47 抗原的病毒, 分别感染 CHO 细胞构建 CHO-CEA 细胞、CHO-CEA-PD-L1 细胞系和 CHO-CEA-CD47 细胞系。信号调节蛋白 α (SIRP γ) 是 CD47 的配体之一, 可与 CD47 结合, 因此可用 CD47 阳性靶细胞对 CEAZ-SIRP γ -BB、CEAZ-SIRP γ -28、SIRP γ 、SIRP γ -28, SIRP γ -BB 进行评估。

三个细胞系经十次传代培养后检测其阳性率, 结果如图 4 显示, CHO-CEA 的阳性率为 97.1%, CHO-CEA-CD47 的双阳率为 97.6%, CHO-CEA-PD-L1 的双阳率为 87%, 符合实验需求, 表明细胞系已构建成功, 可作为靶细胞用于后续的 CAR-T 药效评价。

实施例 3 制备慢病毒及感染 T 淋巴细胞

采用磷酸钙法包装慢病毒, 获得实施例 1 中 5 个单表达的 CAR (CEAZ, PD1-28, PD1-BB, SIRP γ -28, SIRP γ -BB) 及 6 个新型免疫抑制抵抗型 CAR (CEAZ-PD1-28, CEAZ-PD1-BB, CEAZ-SIRP γ -28, CEAZ-SIRP γ -BB, CEABBZ-SIRP γ -28, CEABBZ-SIRP γ -BB) 病毒颗粒。

利用梯度离心法进行淋巴细胞分离; 离心后, 取第二层白色淋巴细胞层, 生理盐水洗涤, 加入含有

10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基培养，获得人 PBMC 细胞。获得的 PBMC 细胞经抗 CD3、CD28 单克隆抗体活化 24h 后，按一定的感染复数 (MOI) 感染已活化的 PBMC，在病毒感染的第 12 天检测 CAR-T 的阳性率，检测方法为流式检测，抗体为：Protein-L-PE，Protein-L 可识别抗体轻链，CAR 抗原识别区的 ScFv 序列的轻链可被 Protein-L 识别，因此利用 Protein-L 可检测 CAR 阳性率和 CAR 表达强度。

结果如图 5a 所示：免疫抑制破除融合蛋白可在 T 细胞表面表达成功，如图 5b 所示新型免疫抑制抵抗型 CAR 表达成功。

实施例 4 新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 体外功能验证

以未表达免疫抑制破除融合蛋白的 Control T 细胞作为对照，验证免疫抑制破除融合蛋白 SIRP γ -28TM-28，SIRP γ -8TM-BB 的功能。靶细胞为表达 CD47 的 CHO 细胞系。结果如图 6a 所示，SIRP γ -28TM-28 和 SIRP γ -8TM-BB 融合蛋白在针对 CD47 阳性的靶细胞均有杀伤作用。

以 CEAZ 组作为阳性对照，Control-T 组作为阴性对照，设置 CEAZ-PD1-28，CEAZ-PD1-BB，CEAZ-SIRP γ -28，CEAZ-SIRP γ -BB 组为实验组，将 CHO-CEA-CD47 和 CHO-CEA-PD-L1 作为靶细胞，验证新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 体外有效性。结果如图 6b 及下表 2 所示，CEAZ-PD1-28 和 CEAZ-SIRP γ -28 组的细胞杀伤率显著高于 CEAZ 组，而 CEAZ-PD1-BB 和 CEAZ-SIRP γ -BB 组对靶细胞的杀伤对比 CEAZ 组无明显增强。此外，CEAZ-PD1-28，CEAZ-PD1-BB 组在与 CHO-CEA-CD47 共培养情况下以及 CEAZ-SIRP γ -28，CEAZ-SIRP γ -BB 组在与 CHO-CEA-PD-L1 共培养情况下杀伤效率较 CEAZ 组均无明显的差异，表明新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 组具有杀伤特异性，且 CEAZ-PD1-28 和 CEAZ-SIRP γ -28 对靶细胞有较显著的杀伤效果。

表 2 免疫抑制抵抗型 CAR-T 体外杀伤率

结构	靶细胞	
	CHO-CEA-CD47 (specific lysis%)	CHO-CEA-PDL1(specific lysis%)
CEA-Z	52.95458±16.246	42.37838±17.43639
CEA-Z-PD1-28	26.8274±13.62647	66.58775±16.8083
CEA-Z-PD1-BB	25.88708±19.55145	21.18065±18.72001
CEA-Z-SIRP γ -28	62.89653±15.15207	19.26225±24.32014
CEA-Z-SIRP γ -BB	19.08425±19.57656	6.92085±4.83563

以 K562-BCMA 为靶细胞，Control-T 组作为阴性对照，验证 BCMA-BBZ-P2A- SIRP γ -28 的功能，结果显示 BCMA-BBZ-P2A- SIRP γ -28 可以显示很好的杀伤功能。

实施例 5 新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 对肿瘤抑制环境破除验证

CAR-T 细胞在浸润肿瘤组织后往往受到肿瘤免疫抑制为环境影响，高表达 PD1，LAG-3，Tim-3 衰减分子，进而杀伤肿瘤细胞有效功能减弱，CART 细胞自身凋亡增加。为了验证新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 是否能够破除肿瘤抑制微环境信号，对 CEAZ，CEA-28Z，CEA-BBZ，CEAZ-PD1-28，CEAZ-PD1-BB，CEAZ-SIRP γ -28，CEAZ-SIRP γ -BB 及 Control-T 组 CAR-T 细胞培养至 Day 7 时将 CAR-T 细胞与 DLD-1-CEA-Luc-GFP 细胞 12 孔细胞培养板中进行共培养，48h 后收集 CAR-T 细胞，标记抗人 CD3，PL，PD1，LAG-3，Tim-3 流式抗体后进行流式检测，分析检测结果以评价其效应能力。由于 CEAZ-PD1-28 和 CEAZ-PD1-BB 组中外源表达 PD1，因此这两组的 PD1 阳性率不用于评价 CAR-T 细胞的衰竭程度。衰竭分子检测结果如图 7 以及下

表 3 所示: 在 CD3+ PL+下,CEAZ-SIRP γ -28 的 PD1,LAG-3,Tim-3 的表达程度低于 CEAZ 组,表明 CEAZ-SIRP γ -28 经抗原刺激后衰竭程度较低。

表 3 免疫抑制抵抗型 CAR-T 对肿瘤抑制环境破除验证情况

结构	衰竭分子的表达值		
	PD1	LAG-3	TIM-3
CEAZ	27.93333 $\pm$ 11.55783	37.36667 $\pm$ 12.72019	41.26667 $\pm$ 19.85254
CEAZ-PD1-28	50.56667 $\pm$ 28.00042	26.02667 $\pm$ 29.26886	34.11333 $\pm$ 40.76119
CEAZ-PD1-BB	40.93333 $\pm$ 36.89205	31.36 $\pm$ 37.05815	39.86667 $\pm$ 41.51293
CEAZ-SIRP γ -28	11.27667 $\pm$ 7.901559	12.28667 $\pm$ 7.190447	27.06667 $\pm$ 16.64041
CEAZ-SIRP γ -BB	29.49667 $\pm$ 29.36888	30.2 $\pm$ 25.03937	36.44 $\pm$ 38.31466
Control-T	11.65667 $\pm$ 13.05796	19.05 $\pm$ 14.40113	17.20667 $\pm$ 8.675606

同样的,BCMA-BBZ-P2A-SIRP γ -28 经 BCMA 抗原刺激后也显示较低的衰竭分子表达。

实施例 6 新型免疫抑制抵抗型 CAR-T 体内功能验证

体内验证使用小鼠为 NCG 小鼠。选取 30 只 NCG 小鼠,并注 DLD-1-CEA-Luc-GFP (CEA,PD-L1,CD47 三阳性表达,如图 8a 所示)进行荷瘤。肿瘤生长到如绿豆大小可测量时,测量肿瘤大小,在实验过程中,实验组小鼠出现萎靡濒死、半身或全身瘫痪、体重丢失 20% (与实验开始前比较)、肿瘤体积 $\geq$ 1500 mm³ 任一情况时终止实验。

荷瘤后 Day 5 测量小鼠肿瘤荧光值,以活体成像荧光值进行随机分组,保证各组小鼠体重和荧光度值无显著差异,计算体重平均值。Day 6 回输 CAR-T 细胞,体积为 100 μ L (含有效 CAR-T 细胞数量 3×10^6),给予相同总细胞数的未转染的 T 细胞作为对照组。NCG 小鼠的肿瘤体积测量数据绘制肿瘤体积增长曲线,发现 Day 27-30,CEAZ-SIRP γ -28 对肿瘤有较为明显的抑制效果,结果如图 8b 所示。

进一步,验证了二代 CAR 与融合蛋白联合设计的免疫抑制型 CAR 即 CEABBZ-P2A-SIRP γ -28 结构的体内有效性,同样采用 NCG 小鼠注射 DLD-1-CEA-Luc-GFP 细胞荷瘤,荷瘤 13 天后进行 CAR-T 细胞回输,总细胞数 8×10^6 。结果如图 9 所示,本发明的免疫抑制型 CAR-T (CEABBZ-P2A-SIRP γ -28)能够很好的在体内发挥功能,效果明显优于对照组二代 CAR 结构的 CEABBZ。

第二部分 靶向 CEA 的 CAR 结构 (其中 CAR1 氨基酸序列为 27) 的实验部分

实施例 7 靶向 CEA 的质粒构建

(1) 实验组质粒构建

由迷你启动子 miniCMV 合成缺氧启动序列 5HRE-CMVmini promoter,其核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。然后由 5HRE-CMVmini promoter、慢病毒表达载体、CEAScFv-CD8 铰链区-CD8 跨膜区-CD137-CD3 ξ -P2A-SIRP γ -CD28 (5HCEA-BBZ-P2A-SIRP γ -28)的 CAR 结构利用双酶切分别切割并回收片段,基因片段进行连接、转化并挑单克隆,构建靶向 CEA 的 CAR-T 细胞制剂的含有 SIRP γ 融合蛋白的重组质粒 PBKL1-5H1P-CEA-OPRE (SIRP γ 融合蛋白),该步骤中,使用了 CAR 和融合蛋白共同表达于一个载体转染免疫细胞或者 CAR 和融合蛋白共同分别表达于一个载体转染免疫细胞两种方法来获得我们的含有融合蛋白的 CAR 的结构,其中 CAR 和融合蛋白共同分别表达于一个载体转染免疫细胞获得的产品 用缩写

“5HCEA-BBZ+SIRP γ -28”表示。

(2) 对照组质粒构建

按照实施例 1 中 (1) 的方法构建 5HCEA-BBZ-8H-8。

实施例 8 靶向 CEA 的质粒体外功能模型验证

分别设置 5HCEA-BBZ-8H-8、5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28、SIRP γ -28 加 CoCl_2 为实验组验证缺氧模型，结果如图 10 和图 11 所示，平均荧光强度和阳性率 5HCEA-BBZ-8H-8、5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28、SIRP γ -28 相近，如图 12 所示，5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28 扩增倍数更具有优势。

实施例 9 靶向 CEA 的 CAR-T 有效性验证

(1) 靶细胞 DLD1-CEA 的杀伤效率

分别以 CEA 阳性的 DLD1-CEA 和 DLD1-CEA (CD47-) 细胞为靶细胞。将效应细胞(常规 CAR-T 细胞和含缺氧启动子 CAR 表达的 CAR-T 细胞)缺氧处理后，按照 1: 1 的效靶比铺于靶细胞中，检测不同 CAR-T 对靶细胞杀伤能力。

加入 CAR-T 的 24h 后，各组 CAR-T 对靶细胞 DLD1-CEA 的杀伤效率结果如图 13 以及下表 4 所示，5HCEA-BBZ-8H-8、5HCEA-BBZ+SIRP γ -28 和 5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28 具有较强杀伤功能、SIRP γ -28 组也具有杀伤功能。

表 4 靶向 CEA 的各组 CAR-T 对靶细胞 DLD1-CEA 的杀伤效率

结构	Specific Lysis (%)
5HCEA-BBZ+SIRP γ -28	84.4752
5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28	99.4934
5HCEA-BBZ-8H-8	99.7738
SIRP γ	45.2293
Control T	29.721
Medium	0

(2) IFN- γ 、IL-2、TNF- α 分泌检测

接着 (1)，在杀伤 24 小时后收集细胞上清，进行 CAR-T 细胞受到靶细胞刺激后 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 分泌能力的检测。收集的上清，使用试剂盒利用 ELISA 方法检测 IFN- γ 和 IL-2 的分泌情况。

结果如图 14、图 15、图 16 所示，靶细胞为 DLD1-CEA 时，5HCEA-BBZ-8H-8 分泌 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 较少，5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 远高于 5HCEA-BBZ-8H-8 组，靶细胞为 DLD1-CEA (CD47-) 细胞，IFN- γ 、IL-2、TNF- α 较低或达不到检测线。本发明 5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28 更有利于 CAR-T 的增值和杀伤肿瘤相关的因子分泌，说明其确实能够提高 CAR-T 的有效性。

实施例 8 含有 SIRP γ 融合蛋白的质粒体内功能验证

体内验证使用的成瘤靶细胞选择 DLD1-CEA-Luc-GFP 细胞，构建人 CEA+实体瘤荷瘤模型。根据肿瘤体积随机分为 Control T (CT) 组、5HCEA-BBZ-8H-8、5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28、对照组为 Control T 组。在成瘤第 12 天向不同分组小鼠尾静脉注射对应的 CAR-T 细胞 1×10^7 Copies/只；Control T 组于第 81 天回输总数相同的 T 淋巴细胞。每三天测量一次各组小鼠肿瘤体积，实验结果如图 17 和图 18 所示，可见进行 5HCEA-BBZ-8H-8 相较于 5HCEA-BBZ- P2A-SIRP γ -28 组小鼠体内有效性显著提高，5HCEA-BBZ-8H-8 组对肿瘤也具有明显的消除作用。

第三部分 CD19 靶点的 CAR 结构的实验部分

实施例 9 靶向 CD19 质粒构建

以 SIRP γ 及 CD47 全长的质粒、pL-CAG-2AGFP、pL-CAG-PD1-CD28-2ACherry、pL-CAG-PD1-BB-2ACherry 为模板，CD19 靶点 CAR 结构。构建获得载体：SIRP γ -28、5HCD19-BBZ、5HCD19-BBZ-SIRP γ -28。通过测序比对验证后，结构构建成功。

实施例 10 制备慢病毒及感染 T 淋巴细胞

采用磷酸钙法包装慢病毒，获得实施例 1 中 3 个病毒颗粒（SIRP γ -28、5HCD19-BBZ、5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28）。

利用梯度离心法进行淋巴细胞分离，离心后，取第二层白色淋巴细胞层，生理盐水洗涤，加入含有 10%FBS 的 RPMI 1640 完全培养基培养，获得人 PBMC 细胞。获得的 PBMC 细胞经抗 CD3、CD28 单克隆抗体活化 24h 后，按一定的感染复数（MOI）感染已活化的 PBMC，在病毒感染的第 8 天利用流式检测 CAR-T 的阳性率，结果如图 19 以及下表 5 所示。

表 5 流式检测靶向 CD19 的各实验组 CAR-T 的阳性率

结构	% of CD3+ T Cells
Control T	0.26
SIRP γ -28	51.25
5HCD19-BBZ	53.15
5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28	54.89
SIRP γ -28+5HCD19-BBZ	18.04

实施例 11 靶向 CD19 的体外药效学评价

以 Control T 为对照组，实验组设置 SIRP γ -28 组、5HCD19-BBZ 组、5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28 组，以 Nam6-Luc-GFP（CD19 阳性）、K562-Luc-GFP（CD19 阴性）为靶细胞，通过体外杀伤和体外因子分泌验证体外有效性。结果如图 20 及下表 6 所示，采用一个共表达的载体转染免疫细胞获得的产品（5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28）与采用两个分别表达的载体共转染免疫细胞获得的产品（SIRP γ -28+5HCD19-BBZ）的体外杀伤显著高于 SIRP γ -28 组和 5HCD19-BBZ 组，对阴性细胞无杀伤。

和图 21 及表 7 所示，采用一个共表达的载体转染免疫细胞获得的产品（5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28）与采用两个分别表达的载体共转染免疫细胞获得的产品（SIRP γ -28+5HCD19-BBZ）的因子分泌显著高于 SIRP γ -28 组和 5HCD19-BBZ 组。

表 6 靶向 CEA 的各实验组细胞杀伤情况

结构	Specific Lysis (%)
Control T	37.2867
SIRP γ -28	28.6995
5HCD19-BBZ	84.3876
5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28	97.5187
SIRP γ -28+5HCD19-BBZ	97.4608

表 7 靶向 CEA 的各实验组 IFN- γ 因子分泌情况

结构	IFN- γ (pg/ml)
----	-----------------------

Control T	135
SIRP γ -28	453.97
5HCD19-BBZ	17296.67
5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28	21820
SIRP γ -28+5HCD19-BBZ	14363.33

实施例 12 靶向 CD19 的体内药效学评价

选用 NCG 小鼠（雌性，6 周龄），以 1×10^6 Cells/只剂量皮下注射 (s.c.) NaIm6-Luc-GFP 细胞建立体内荷瘤模型，荷瘤后 8d 以 1×10^7 CAR-T Cells/只剂量尾静脉注射 (i.v.) 给予不同组别 (Control T、5HCD19-BBZ、5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28) CAR-T。通过活体成像观察肿瘤体内生长情况，体内评价不同 CAR-T 对淋巴瘤治疗效果。结果如图 22 和图 23 所示，相比 Control T 组和 5HCD19-BBZ 组，5HCD19-BBZ-P2A-SIRP γ -28 体内抗肿瘤效果明显，能明显清除肿瘤。

第四部分 PSCA 靶点的 CAR 结构的实验部分

实施例 13 靶向 PSCA 的质粒构建及感染 T 细胞

(1) 质粒构建

慢病毒表达载体、PSCA ScFv- G4H 铰链区-CD28 跨膜区-CD28-CD137-CD3 ξ -P2A-SIRP γ -28 (PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A-SIRP γ -28) 的 CAR 结构利用双酶切分别切割并回收片段，基因片段进行连接、转化并挑单克隆。

慢病毒表达载体、PSCA ScFv- 7H 铰链区-CD28 跨膜区-CD28-CD137-CD3 ξ -P2A-SIRP γ -28 (PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A-SIRP γ -28) 的 CAR 结构利用双酶切分别切割并回收片段，基因片段进行连接、转化并挑单克隆。

(2) 感染 T 细胞

将获得的质粒感染 T 细胞，得 CAR-T 细胞。

实施例 14 靶向 PSCA 的 IFN- γ 因子分泌情况

以 Control T 为对照组，实验组分别设置 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A-SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A-SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-G4H-28TM、PSCA-28BBZ-7H-28TM，以 RT4-Luc-GFP (PSCA 阳性) 为靶细胞，通过体外因子分泌验证体外有效性。结果如表 8-表 13 及图 24-图 29 所示。采用一个共表达的载体转染免疫细胞获得的产品 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A-SIRP γ -28 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A-SIRP γ -28 与采用两个分别表达的载体共转染免疫细胞获得的产品 PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 的 IFN- γ 因子分泌显著高于对照组和 PSCA-28BBZ-G4H-28TM 组或 PSCA-28BBZ-7H-28TM 组，对阴性细胞无杀伤

表 8 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A-SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况

结构	IFN- γ (pg/ml)
PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A-SIRP γ -28	4060.33
Control T	234.23

表 9 PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况

结构	IFN- γ (pg/ml)
PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28	4024. 67
Control T	234. 23

表 10 PSCA-28BBZ- G4H -28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况

结构	IFN- γ (pg/ml)
PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28	6862. 33
Control T	234. 23

表 11 PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况

结构	IFN- γ (pg/ml)
PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28	8550. 67
Control T	234. 23

表 12 PSCA-28BBZ-G4H-28TM、PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况

结构	IFN- γ (pg/ml)
PSCA-28BBZ-G4H-28TM	6998. 67
PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28	6862. 33
Control T	234. 23

表 13 PSCA-28BBZ-7H-28TM、PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 分泌 IFN- γ 因子情况

结构	IFN- γ (pg/ml)
PSCA-28BBZ-7H-28TM	6660. 33
PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28	8550. 67
Control T	234. 23

实施例 14 靶向 PSCA 的细胞杀伤情况

实验组分别设置 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A- SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28、PSCA-28BBZ-G4H-28TM、PSCA-28BBZ-7H-28TM，分别以 RT4-Luc-GFP（PSCA 阳性）、PC-3-Luc-GFP（PSCA 阴性）为靶细胞，结果如表 14-表 19 及图 30-图 35 所示。采用一个共表达的载体转染免疫细胞获得的产品 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A- SIRP γ -28 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28 与采用两个分别表达的载体共转染免疫细胞获得的产品 PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28 或 PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 的体外杀伤显著高于对照组和 PSCA-28BBZ-G4H-28TM 组或 PSCA-28BBZ-7H-28TM 组，对阴性细胞无杀伤。

表 14 PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A- SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况

结构	IFN- γ (pg/ml)	
	RT4-Luc-GFP	PC-3-Luc-GFP
PSCA-28BBZ-G4H-28TM-P2A- SIRP γ -28	45. 2911	-0. 7548
Control T	25. 6632	-8. 3602

表 15 PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况

结构	IFN- γ (pg/ml)	
	RT4-Luc-GFP	PC-3-Luc-GFP
PSCA-28BBZ-7H-28TM-P2A- SIRP γ -28	46.2139	-2.4081
Control T	25.6632	-8.3602

表 16 PSCA-28BBZ-G4H-28TM+ SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况

结构	IFN- γ (pg/ml)	
	RT4-Luc-GFP	PC-3-Luc-GFP
PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28	69.9491	-9.91984
Control T	25.6632	-18.3602

表 17 PSCA-28BBZ-7H-28TM+ SIRP γ -28 分别在阳性/阴性细胞中细胞杀伤情况

结构	IFN- γ (pg/ml)	
	RT4-Luc-GFP	PC-3-Luc-GFP
PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28	76.6439	-10.0736
Control T	25.6632	-18.3602

表 18 PSCA-28BBZ-G4H-28TM、PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28 中细胞杀伤情况

结构	IFN- γ (pg/ml)	
	RT4-Luc-GFP	PC-3-Luc-GFP
PSCA-28BBZ-G4H-28TM	53.5258	-19.8898
PSCA-28BBZ-G4H-28TM+SIRP γ -28	69.9491	-9.91984
Control T	25.6632	-18.3602

表 19 PSCA-28BBZ-7H-28TM、PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28 中细胞杀伤情况

结构	IFN- γ (pg/ml)	
	RT4-Luc-GFP	PC-3-Luc-GFP
PSCA-28BBZ-7H-28TM	52.6503	-12.1743
PSCA-28BBZ-7H-28TM+SIRP γ -28	76.6439	-10.0736
Control T	25.6632	-18.3602

最后说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围，其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。