

权利要求书

1. 一种逆转肿瘤微环境的融合蛋白，其特征在于，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，跨膜结构和胞内信号区。
2. 根据权利要求 1 的融合蛋白，其特征在于，跨膜结构来源于人 CD28 跨膜区或人 CD8 来源跨膜区，优选地，所述胞内信号区来源于 CD28 或 4-1BB。
3. 根据权利要求 2 所述的融合蛋白，其特征在于，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。
4. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，所述 SIRP γ 融合蛋白的结构为 SIRP γ -CD28TM-CD28 或 SIRP γ -CD8TM-4-1BB。
5. 根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于，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。
6. 根据权利要求 4 所述的融合蛋白，其特征在于，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。
7. 根据权利要求 4 所述的融合蛋白，其特征在于，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。
8. 根据权利要求 6 所述的融合蛋白，其特征在于，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。
9. 根据权利要求 7 所述的融合蛋白，其特征在于，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。
10. 包含权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白的表达载体。
11. 根据权利要求 10 所述的表达载体，其特征在于，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。
12. 包含权利要求 10-11 任一项所述的表达载体的免疫细胞。
13. 根据权利要求 12 所述的免疫细胞，其特征在于，所述免疫细胞为 T 细胞、T 细胞前体或 NK 细胞。
14. 根据权利要求 13 所述的免疫细胞，其特征在于，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，所述肿瘤抗原包含但不限于 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。
15. 一种肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR，其特征在于，所述 CAR 包含权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白和 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。
16. 根据权利要求 15 所述的新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR，其特征在于，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。
17. 根据权利要求 15 所述新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR，其特征在于，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。

18. 根据权利要求 15 所述的新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR, 其特征在于, 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。
19. 根据权利要求 15 所述的新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR, 其特征在于, CAR1 结构: 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: SIRP γ SIRP γ 胞外段氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示或功能性变体; 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。
20. 根据权利要求 17 或 18 或 19 所述的新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR, 其特征在于, 所述 ScFv 可以识别 CD19、CD123、MOV- 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 中的任一种或多种。
21. 根据权利要求 20 所述的 CAR, 其特征在于, 所述 ScFv 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:25 所示或其功能性变体。
22. 根据权利要求 15 或 16 所述的肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR, 其特征在于, 所述 CAR1 包含以下几种的一种,
 - a) CAR1 包含包括 CEA 单链抗体、CD8 铰链区、CD8 跨膜区、CD137 和 CD3 ζ 双刺激信号; 优选地, 所述 CAR 结构 a 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示或其功能性变体;
 - 或 b) 所述 CAR1 包含 CD19 单链抗体、CD8 铰链区、CD8 跨膜区、CD137 和 CD3 ζ 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;
 - 或 c) 所述 CAR1 包含 PSCA 单链抗体、铰链区、CD28 跨膜区、CD28、CD137 和 CD3 ζ 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。
23. 根据权利要求 22 所述的新型肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR, 其特征在于, 所述 a) 和 b) 的 CAR1 结构中还包括缺氧启动子, 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。
24. 核酸序列, 其特征在于, 编码权利要求 21 或 22 所述的肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR, 所述核酸序列包含如 SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 35 所示的序列。
25. 包含权利要求 15-23 任一项所述的肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR 的表达载体, 其特征在于, 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。
26. 包含权利要求 25 所述的表达载体的免疫细胞。
27. 根据权利要求 26 所述的免疫细胞, 其特征在于, 所述免疫细胞为 T 细胞、T 细胞前体或 NK 细胞。
28. 一种制备如权利要求 14 所述的免疫细胞的方法, 其特征在于, 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。

29. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白或权利要求 15-23 任一所述的肿瘤免疫抑制抵抗型 CAR 或权利要求 12-14 任一项所述的免疫细胞或 26-27 任一所述的免疫细胞或权利要求 10-11 任一项所述的表达载体或权利要求 25 所述的表达载体或权利要求 24 所述的核酸序列。
30. 根据权利要求 19 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物还包括可增强 CAR 表达活性的活性剂和/或治疗剂。
31. 权利要求 29 或 30 所述的药物组合物在制备肿瘤药物中的应用。
32. 根据权利要求 31 所述的应用，其特征在于，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，所述肿瘤高表达 CD19、CD123、MOv- 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 中的任何一种或多种。