

一种靶向 CD7 的人源化抗体、嵌合抗原受体及其应用

技术领域

5 本申请涉及生物医药领域，具体涉及一种靶向 CD7 的人源化抗体、嵌合抗原受体及其应用。

背景技术

10 T 细胞恶性肿瘤是一类来源于 T 细胞的淋巴系统恶性肿瘤，由于缺乏对其生物学了解，其分类一直难以完成，许多分类仍属于世界卫生组织（World Health Organization，缩写 WHO）疾病分类中的“临时分类”。目前，WHO 将 T 细胞恶性肿瘤归纳为包括：不成熟 T 细胞肿瘤和成熟 T 细胞肿瘤；其中：不成熟 T 细胞肿瘤包括急性 T 淋巴细胞白血病 (T Acute lymphoblastic leukemia, T-ALL)、T 淋巴母细胞性淋巴瘤(T-lymphoblastic lymphoma, T-LBL)，成熟 T 细胞肿瘤包括各种类型的 T 细胞
15 白血病和 T 细胞淋巴瘤。T 细胞恶性肿瘤具有侵袭性强、症状差异大、大多预后不良、复发率高（30%-40%）、致病因素不明、缺乏生物学的特性。虽然目前的治疗手段对儿童 T-ALL 的疗效较既往提高，患儿无事件生存率(event free survival, EFS)可达 85%，但是复发 T-ALL 患儿 EFS 率<15%；T-ALL 成年患者 5 年总体生存(overall survival, OS)率为 40%~60%，预后均较差。因此，目前仍然需要新的、有针对性的
20 治疗方案来改善 T 细胞恶性肿瘤的预后，特别是对于复发和难治的 T 细胞恶性肿瘤患者。

 嵌合抗原受体（Chimeric Antigen Receptor, CAR）是 CAR 细胞治疗药物的核心部件，其可包括抗原识别结构域、铰链区、跨膜区和细胞内结构域。到目前为止，抗原识别结构域从抗体的单链可变区（Single Chain Variable Fragment，缩写为 scFv）、
25 或者从受体配体相互作用、TCR 模拟物、可变的淋巴细胞受体（Variable Lymphocyte Receptors, VLR）衍生而来；其中最为常见的来源就是 scFv 抗体。CAR-T 细胞免疫疗法，被认为是最有希望攻克肿瘤的手段之一。CAR-T 细胞就是利用基因改造的方法使 T 细胞表达 CAR 蛋白，这种 CAR 蛋白有能力在不依赖于抗原提呈的情况下识别膜表面的完整蛋白，进而引起 T 细胞的活化和功能效应。目前，CAR-T 细胞免疫疗法在
30 多种血液系统肿瘤的治疗中取得了显著的成效，如：用于治疗 B 细胞淋巴瘤的 CD19

CAR-T 和用于治疗多发性骨髓瘤的 BCMA CAR-T 已有上市药物。

CD7 是一种跨膜糖蛋白，是免疫球蛋白超基因家族的成员。CD7 在不成熟 T 细胞肿瘤中普遍过表达，而在成熟 T 细胞肿瘤中，CD7 的表达形式和强弱各有不同。除了 T 细胞恶性肿瘤，大约 30% 的急性髓系白血病(AML)患者的白血病母细胞和恶性祖细胞也表达 CD7。因此以 CD7 作为靶点的 CAR-T 细胞有望治疗上述相应疾病。

发明内容

本申请提供了一种靶向 CD7 的人源化抗体、嵌合抗原受体及其应用。基于现有鼠源抗体序列，发明人设计了 5 条人源化 Th69 scFv 抗体以降低其异源性。但抗体在人源化改造的过程中，抗体与特定抗原的结合亲和力、特异性以及其他功能性可能会受到损失，因此获得降低免疫原性、功能性未受损失或反而有所增强的人源化抗体，具有现实意义。发明人将 5 条人源化 Th69 scFv 抗体作为 CD7 CAR 的胞外抗原识别结构域，并通过体外实验和动物体内实验来评估使用了人源化 Th69 scFv 抗体的 CAR-T 细胞的增殖情况、特异性及功能性，从中筛选出综合效果最好的 3 条人源化 Th69 scFv 抗体。

本申请提供了一种靶向 CD7 的人源化抗体或其抗原结合片段，包含：如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列；

或，如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列；

或，如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列。

上述人源化抗体或其抗原结合片段在某些实施方式中，为 scFv 抗体、sc(Fv)₂ 抗体或[sc(Fv)₂]₂ 抗体。

上述人源化抗体或其抗原结合片段在某些实施方式中，为如 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；

或，为如 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；

或，为如 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列的 scFv 抗体。

再一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码上述人源化抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

上述分离的核酸分子在某些实施方式中，编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；

和/或，编码如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:5 所示；

5 和/或，编码如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:37 所示；

和/或，编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示。

再一方面，本申请还提供了一种载体，其包含上述分离的核酸分子。

10 再一方面，本申请还提供了一种细胞，其包含上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子或载体。

再一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包括上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体或细胞，以及药学上可接受的辅料。

再一方面，本申请还提供了上述人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、
15 载体或细胞在制备用于诊断与 CD7 的表达相关的疾病或病症的检测试剂中的应用。

上述应用在某些实施方式中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述应用在某些实施方式中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病（T Acute lymphoblastic leukemia, T-ALL）、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病（Acute myelocytic leukemia, AML）。

20 上述应用在某些实施方式中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病（Early T cell precursor acute lymphoblastic leukemia, ETP-ALL）和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述应用在某些实施方式中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤（T-Lymphoblastic lymphoma, T-LBL）、CD7⁺结外 NK/T
25 细胞淋巴瘤（Extranodal NK/T-cell lymphoma）、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤（Enteropathy-associated T-cell lymphoma）、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤（Primary cutaneous T-cell lymphoma）和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤（Peripheral T-cell lymphoma）。

再一方面，本申请还提供一种上述人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分
30 子、载体或细胞在制备用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症的药物中的应用。

上述应用在某些实施方式中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述应用在某些实施方式中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述应用在某些实施方式中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前
5 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述应用在某些实施方式中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、
CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

再一方面，本申请还提供了一种治疗疾病或病症的方法，包括以下步骤：将有效
10 量的包含上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体或细胞的
药物施用于具有治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症的需求的受试者。

上述方法在某些实施方式中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述方法在某些实施方式中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急
性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述方法在某些实施方式中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前
15 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述方法在某些实施方式中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、
CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

再一方面，本申请还提供了一种药物，其包含上述人源化抗体或其抗原结合片段、
20 分离的核酸分子、载体或细胞，用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症。

上述药物在某些实施方式中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述药物在某些实施方式中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急
性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述药物在某些实施方式中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前
25 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述药物在某些实施方式中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、
CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

再一方面，本申请还提供了一种抗体药物，其包含上述任一种人源化抗体或其抗
30

原结合片段。

再一方面，本申请还提供了一种抗体药物偶联物，其包含上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段。

再一方面，本申请还提供了一种靶向 CD7 的嵌合抗原受体，其包含靶向 CD7 的胞外抗原识别结构域、铰链区、跨膜区和细胞内结构域，所述靶向 CD7 的胞外抗原识别结构域包括：

如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列；

或，如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列

或，如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列；

可选地，胞外抗原识别结构域包含选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列；

进一步可选地，胞外抗原识别结构域为选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，连接序列选自以下序列的一种或多种：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述胞外抗原识别结构域包含：如 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的 scFv 抗体，或如 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列的 scFv 抗体，或如 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；

- 可选地，所述胞外抗原识别结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，或如
- 5 SEQ ID NO:35 所示，或如 SEQ ID NO:36 所示。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述铰链区来源于 IgG1、IgG4、CD4、CD7、CD28、CD84、CD8 α 中的一种或多种；可选地，所述铰链区的氨基酸来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列；更进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示。

- 10 上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述跨膜区来源于 CD3、CD4、CD7、CD8 α 、CD28、CD80、CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc70 中的一种或多种；可选地，所述跨膜区的氨基酸序列来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列；再更进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示。

- 15 上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，其中所述胞内结构域包含胞内信号传导区；可选地，还包括共刺激信号传导区。

- 上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，其中所述胞内信号传导区来源于 CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、FcR γ 、FcR β 、CD66d、DAP10、DAP12、Syk 中的一种或多种；可选地，所述胞内信号传导区来源于 CD3 ζ ；
- 20 进一步可选地，所述胞内信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列；更进一步可选地，所述胞内信号传导区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示。

- 上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，其中所述共刺激信号传导区来源于 CD2、CD3、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD244、4-1BB、OX40、LFA-1、ICOS、LIGHT、NKG2C、NKG2D、DAP10、B7-H3、MyD88 中的一种、两种或三种以上；可选地，所述共刺激信号传导区来源于 CD28 或 4-1BB；进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列；
- 25 更进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示。

- 上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，还包含位于所述嵌合抗原受体氨基酸序列 N-末端的引导肽；可选地，其中所述引导肽来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述引导肽的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列；更进一步可选地，
- 30

所述引导肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施方式中，所述嵌合抗原受体包括以下序列的任意一种：如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列，或如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列；或如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列；

- 5 可选地，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示，或如 SEQ ID NO:18 所示，或如 SEQ ID NO:19 所示。

再一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码上述任一种嵌合抗原受体的核苷酸序列。

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

编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；和编码如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:5 所示；

- 15 或，编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；和编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:37 所示；和编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示。

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

编码如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:15 所示；

- 25 或，编码如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:39 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:40 所示。

再一方面，本申请还提供了一种载体，其包含上述分离的核酸分子。

- 30 上述载体在某些实施方式中，为表达载体；在另一些实施方式中，载体为病毒载体；在另一些实施方式中，载体为慢病毒载体。

再一方面，本申请还提供了一种经工程化的免疫效应细胞，其包含上述嵌合抗原受体、上述分离的核酸分子，或上述载体。

上述经工程化的免疫效应细胞在某些实施方式中，所述经工程化的免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK 细胞）、外周血单个核细胞（PBMC 细胞）、
5 诱导性多能干细胞（iPSC）、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞（iPSC-T）、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞（iPSC-NK）和胚胎干细胞中的一种或多种。

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

10 上述经工程化的免疫效应细胞在某些实施方式中，所述同种异体 T 淋巴细胞包含经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞；进一步地，所述同种异体 T 淋巴细胞包含 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、95%、95%、96%、97%、98%、99% 以上的经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞。

上述经工程化的免疫效应细胞在某些实施方式中，T 淋巴细胞为 $\alpha\beta$ T 淋巴细胞或
15 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞。

再一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包括上述经工程化的免疫效应细胞和药学上可接受的辅料。

上述药物组合物在某些实施方式中，药学上可接受的辅料包括保护剂。

上述药物组合物在某些实施方式中，药学上可接受的辅料包括细胞冻存液。

20 上述药物组合物在某些实施方式中，药物组合物为细胞悬液或其冻存细胞。

上述药物组合物在某些实施方式中，药物组合物为静脉注射剂。

再一方面，本申请还提供了制备经工程化的免疫效应细胞的方法，其包括以下的步骤：向免疫效应细胞中引入编码上述任一种嵌合抗原受体的核苷酸序列。

上述方法在某些实施方式中，所述免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞
25 （NK 细胞）、外周血单个核细胞（PBMC 细胞）、诱导性多能干细胞（iPSC）、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞（iPSC-T）、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞（iPSC-NK）和胚胎干细胞中的一种或多种。

上述方法在某些实施方式中，所述免疫效应细胞是 T 淋巴细胞；可选地，所述 T 淋巴细胞的来源为自体 T 淋巴细胞或同种异体 T 淋巴细胞。

30 上述方法在某些实施方式中，所述同种异体 T 淋巴细胞包含 50%、60%、70%、

80%、90%、91%、92%、93%、95%、95%、96%、97%、98%、99%以上的经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞。

上述方法在某些实施方式中，T 淋巴细胞为 $\alpha\beta$ T 淋巴细胞或 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞。

上述方法在某些实施方式中，通过基因编辑工具对 T 细胞 *Trac* 基因和 *CD7* 基因进行基因编辑以获得 *CD7/TRAC* 双阴性细胞，所述基因编辑工具选自 CRISPR/Cas 系统、5 锌指核酸酶系统、转录激活因子样效应核酸酶系统中的一种；可选地，所述基因编辑工具选自 CRISPR/Cas 系统；进一步可选地，所述 CRISPR/Cas 系统包括 Cas9 蛋白和 sgRNA。

上述方法在某些实施方式中，针对 *CD7* 基因的 CRISPR/Cas 系统中 sgRNA 如 SEQ ID NO:33 所示。10

上述方法在某些实施方式中，针对 *Trac* 基因的 CRISPR/Cas 系统中 chRDNA 的序列如 SEQ ID NO:34 所示。

上述方法在某些实施方式中，向免疫效应细胞中引入编码上述任一种嵌合抗原受体的核苷酸序列的方法选自以下的一种或多种：使用病毒的方法或使用非病毒的方法；15 可选地，所述使用病毒的方法包括使用以下病毒载体的一种或多种： γ 反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒相关病毒载体；所述使用非病毒的方法包括以下方法的一种或多种：使用转座子进行基因转移、通过 mRNA 介导进行基因转导、电转化。

再一方面，本申请还提供上述嵌合抗原受体、分离的核酸分子、载体或经工程化的免疫效应细胞在制备药物中的应用，所述药物用于治疗与 *CD7* 的表达相关的疾病20 或病症。

上述应用在某些实施方式中，与 *CD7* 的表达相关的疾病或病症为 $CD7^+$ 血液瘤。

上述应用在某些实施方式中，所述 $CD7^+$ 血液瘤选自以下的一种或多种： $CD7^+$ 急性 T 淋巴细胞白血病、 $CD7^+$ T 细胞淋巴瘤、 $CD7^+$ 急性髓系白血病。

上述应用在某些实施方式中，所述 $CD7^+$ 急性 T 淋巴细胞白血病包括 $CD7^+$ 早期前25 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述应用在某些实施方式中，所述 $CD7^+$ T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种： $CD7^+$ T 淋巴母细胞淋巴瘤、 $CD7^+$ 结外 NK/T 细胞淋巴、 $CD7^+$ 肠病型 T 细胞淋巴瘤、 $CD7^+$ 原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 $CD7^+$ 外周 T 细胞淋巴瘤。

再一方面，本申请还提供了一种治疗与 *CD7* 的表达相关的疾病或病症的方法，30 包括以下步骤：将有效量的上述经工程化的免疫效应细胞或药物组合物施用于具有治

疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症的需求的受试者。

上述方法在某些实施方式中，所述施用可以通过不同的方式进行，例如静脉内、瘤内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。例如，施用的方式可以通过静脉注射的方式施用于受试者。在某些实施方式中，有效剂量的经工程化的免疫效应细胞或药物组合物可以单次施用于受试者，也可以在一定期间内分次施用于受试者，如：每周施用一次、两周一次、三周一次、四周一次、一个月一次、3 个月一次、或 3-6 个月一次。

上述方法在某些实施方式中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述方法在某些实施方式中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述方法在某些实施方式中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述方法在某些实施方式中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

上述方法在某些实施方式中，所述施用的方式为静脉注射。

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

再一方面，本申请还提供了一种药物，其包含上述经工程化的免疫效应细胞或药物组合物，用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症。

上述药物在某些实施方式中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述药物在某些实施方式中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述药物在某些实施方式中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述药物在某些实施方式中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

附图说明

图 1 展示了实施例 2 中转导 T 细胞并扩增培养不同时间后 CAR-T 细胞的 CAR+ 表达率的检测结果，其中：UTD-NoEP 表示未转导且未敲除的 T 细胞组、UTD-KO TRAC+CD7 表示未转导但双敲的 T 细胞组、其余 6 组分别表示转导了包含不同 CAR 的双敲 T 细胞组。

5 图 2 展示了实施例 2 中转导 T 细胞并扩增培养不同时间后总 T 细胞数量的检测结果，其中：UTD-NoEP 表示未转导且未敲除的 T 细胞组、UTD-KO TRAC+CD7 表示未转导但双敲的 T 细胞组、其余 6 组分别表示转导了包含不同 CAR 的双敲 T 细胞组。

图 3A 展示了实施例 3 中在效靶比 1:3、1:1、3:1 的条件下，使用了鼠源或 5 种人源化 Th69 scFv 的 CAR-T 细胞对阳性靶细胞 MOLT4 的短时杀伤情况；

10 图 3B 展示了实施例 3 中在效靶比 1:3、1:1、3:1 的条件下，使用了鼠源或 5 种人源化 Th69 scFv 的 CAR-T 细胞对阴性靶细胞 KO CD7-MOLT4 的短时杀伤情况；

图 3C 展示了实施例 3 中在效靶比 1:32、1:16、1:4、1:1 的条件下，使用了鼠源或 5 种人源化 Th69 scFv 的 CAR-T 细胞对阳性靶细胞 MOLT4 的长时杀伤情况；

15 图 3D 展示了实施例 3 中在效靶比 1:32、1:16、1:4、1:1 的条件下，使用了鼠源或 5 种人源化 Th69 scFv 的 CAR-T 细胞对阳性靶细胞 jurkat 的长时杀伤情况；

图 3E 展示了实施例 3 中在效靶比 1:32、1:16、1:4、1:1 的条件下，使用了鼠源或 5 种人源化 Th69 scFv 的 CAR-T 细胞对阴性靶细胞 KO CD7-jurkat 的长时杀伤情况；

20 其中：图 3A-图 3E 中 NoEP 表示未转导且未敲除的 T 细胞、UTD 表示未转导但双敲 CD7 和 TRAC 的 T 细胞、其余 6 组分别表示转导了包含不同 CAR 的双敲 T 细胞组。

图 4 展示了实施例 4 中在多轮刺激实验中，各组 T 细胞在第 1-4 轮的累计扩增倍数，其中：NoEP 表示未转导且未敲除的 T 细胞、UTD 表示未转导但双敲 CD7 和 TRAC 的 T 细胞、其余 6 组分别表示转导了包含不同 CAR 的双敲 T 细胞组。

25 图 5 展示了实施例 6 中体内实验中回输了表 3 不同组供试品后小鼠在不同时间的生存率。

图 6 展示了实施例 6 体内实验中回输了表 3 不同组供试品后小鼠在不同时间的体内肿瘤成像信号值。

具体实施方式

30 以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说

说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

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

在本申请中，术语“抗体”具有本领域常规的含义，在本申请中以最广泛的含义使用。通常抗体具有重(H)链和/或轻(L)链，通过分析不同抗体重链和轻链的氨基酸序列发现，重链和轻链靠近 N 端的氨基酸序列变化很大，其他部分氨基酸序列相对恒定。因此，将抗体轻链和重链中靠近 N 端氨基酸序列变化较大的区域称为可变区(variable region, V), 将靠近 C 端的氨基酸序列相对稳定的区域，称为恒定区(constant region, C)，重链和轻链的 V 区分别简称为 VH 和 VL，重链和轻链的 C 区分别简称为 CH 和 CL。在抗体可变区内有一小部分氨基酸残基变化特别强烈，这些氨基酸的残基组成和排列顺序更易发生变异区域称高变区(hypervariable regions, HVR)；在 L 链、H 链的 V 区中各有三个高变区，该部位因在空间结构上可与抗原决定簇形成精密的互补，故高变区又称互补性决定区(complementarity determining region, CDR)。抗体中，常见的划分 CDR 规则有 Kabat、AbM、Chothia、Contact、IMGT，这些规则为本领域技术人员熟知的，当应用执行这些规则的网站时，只要将 VH 和 VL 序列输入并选择相应规则，即可得到依据不同规则的 CDR 序列。

在本申请中，术语“抗原结合片段”具有本领域常规的含义，是指抗体上可特异性识别并结合抗原的关键片段，包括 VH 和/或 VL 区。

在本申请中，术语“人源化抗体”也称为经过人源化改造的抗体，人源化改造的方法是已知的（如：WO96/02576），进行人源化改造的目的是，基本保留亲本抗体的亲和力和特异性的同时，降低其异源性。例如，在 CDR 获自鼠抗体的情况下，可合成引物（参考 WO98/13388 中描述的方法可以获得相应引物），将其用于将鼠抗体的 CDR 与人抗体的框架区（FR）连接。

在本申请中，术语“Th-69 抗体”、“Th69 抗体”是指一种现有鼠源抗体，是 Gramatzki M 等人在 1985 年通过将 T 细胞急性淋巴细胞白血病 (T-ALL) 细胞系 CEM 和 HSB-2 对小鼠进行免疫产生的 IgG1 单克隆抗体，Th-69 可特异性结合人 CD7 的细胞外结构域，具有高亲和力。如果将鼠源抗体来源的 scFv 直接用于 CAR-T 药物中可

能增加免疫风险，为了降低鼠源抗体来源的 scFv 的免疫原性、提高治疗的安全性，可通过对鼠源抗体来源的 scFv 进行人源化改造实现。但抗体在人源化改造的过程中，抗体与特定抗原的结合亲和力、特异性以及其他功能性可能会受到损失，因此获得降低免疫原性、功能性未受损失或反而有所增强的人源化抗体，具有现实意义。

5 在本申请中，术语“scFv”具有本领域常规的含义，是指单链可变区（Single Chain Variable Fragment，缩写为 scFv），其是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽（linker，连接序列）连接而成的抗体。

在本申请中，术语“Sc(Fv)₂、[Sc(Fv)₂]₂”等未具体解释的名词也都具有本领域常规的含义。

10 在本申请中，术语“抗体药物”具有本领域常规的含义，即以抗体物质作为活性成分的药物，如：单克隆抗体药物、双特异性抗体药物。

在本申请中，术语“抗体药物偶联物”具有本领域常规的含义，即 Antibody-drug conjugate，缩写为 ADC。其是通过一个化学链将具有生物活性的小分子药物连接到单抗上，单抗作为载体将小分子药物靶向运输到目标细胞。

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

在本申请中，术语“胞外抗原识别结构域”是指抗原识别结构域（Antigen Recognition Domain，ARD）。CAR 细胞治疗产品（如 CAR-T 细胞）之所以能特异性识别和/或结合到肿瘤细胞表达的靶抗原，依赖于胞外抗原识别结构域，到目前为止，抗原识别结构域
25 从抗体的单链可变区（Single Chain Variable Fragment，缩写为 scFv）、或者从受体配体相互作用、TCR 模拟物、可变的淋巴细胞受体（Variable Lymphocyte Receptors，VLR）衍生而来。到目前为止，最为常见的来源就是抗体的 scFv 段。

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

本申请中，CD7 是一种跨膜糖蛋白，包含 240 个氨基酸残基，是免疫球蛋白超基因家族的成员。CD7 在不成熟 T 细胞肿瘤中普遍过表达，而在成熟 T 细胞肿瘤中，CD7 的表达形式和强弱各有不同。除了 T 细胞恶性肿瘤，大约 30% 的 AML 患者的白血病母细胞和恶性祖细胞也表达 CD7，因此靶向 CD7 的药物还可以用于治疗 CD7⁺的混合表型 AML，以及绝大部分的 NK 淋巴瘤和 NKT 淋巴瘤。但是 CD7 CAR-T 细胞在杀伤 CD7 高表达的肿瘤细胞的同时，也会残杀 CD7 CAR-T “同胞”，因为 T 细胞表面也有 CD7 基因表达，导致在体外培养阶段的 CAR-T 细胞在第 5 天就出现数量大幅降低的现象。

在本申请中，术语“*Trac* 基因”、“*TRAC* 基因”具有本领域通常的含义，是指 T 细胞受体 α 链恒定区。T 细胞受体 (TCR) 识别抗原的信号主要通过 TCR-CD3 复合体 (包括 TCR 的 α 链、 β 链、CD3 γ 、CD3 δ 等)，TCR 由 α 链和 β 链组成，翻译的 α 链和 β 链组装成异二聚体后，与多个 CD3 亚型分子结合；在细胞中，如果不能与 CD3 分子形成完整的复合物，则多余 TCR 会被降解。将 *Trac* 基因敲除后，将影响 TCR-CD3 复合体的形成，意味着 T 细胞表面的 T 细胞受体会被清除，避免了移植物抗宿主反应 (GVHD) 的发生。

在本申请中，术语“GVHD (graft-versus-host disease)”具有本领域通常的含义，一般是指移植物抗宿主病，是由于在移植后，异体供者移植物中的 T 淋巴细胞经受者发动的一系列“细胞因子风暴”刺激，大大增强了其对受者抗原的免疫反应和以受者靶细胞为目标发动细胞毒攻击，其中皮肤、肝及肠道是主要的靶目标。

在本申请中，“CD7/*TRAC* 双阴性同种异体 T 淋巴细胞”是指 CD7 基因和 *TRAC* 基因不能正常表达，或是，CD7 蛋白质和 T 细胞受体 α 链恒定区没有正确表达的同种异体 T 淋巴细胞

在本申请中，术语“基因不能正常表达”具有本领域通常的含义，基因表达是指将来自基因的遗传信息合成功能性基因表达产物的过程，基因表达产物通常是指蛋白质。

在本申请中，术语“基因编辑”、“基因编辑技术”具有本领域通常的含义，是指对基因组进行定点修饰的一项技术。利用该技术，可以精确地定位到基因组的某一位点上，在该位点上剪断靶标 DNA 片段、敲入或敲除靶标基因片段。基因编辑技术作为一种分子生物学技术，能够实现对染色体的精确修改，从而改变细胞的已有功能。与基础研究常常使用的细胞系相比，T 细胞作为一种原代细胞，除了无法长期增殖外，并不具有特殊性，同样可以应用基因编辑技术进行编辑。目前主要有 3 种基因编辑工具，分别为锌

指核酸酶（zinc finger nuclease, ZFN）技术、转录激活因子样效应核酸酶（transcription activator-like effector nuclease, TALEN）技术和 RNA 引导的 CRISPR/Cas 核酸酶技术。与传统的基因打靶技术相比，基因编辑新技术保留了可定点修饰的特点，可应用到更多的物种和细胞上，效率更高，构建时间更短，成本更低。

5 在本申请中，术语“CRISPR/Cas 技术”、“CRISPR/Cas 系统”具有本领域通常的含义，其全名为常间回文重复序列丛集及其关联蛋白（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins），是目前发现的存在于大多数细菌与所有的古菌中的一种后天免疫系统，可以定向切割外来的基因片段。目前已发现不同类型的 CRISPR/Cas 系统，其中第二型的组成较为简单，以 Cas9 蛋白以及向导 RNA（guide
10 RNA, Grna，也称为 sgRNA）为核心组成。与较早的 ZFN 技术和 TALEN 技术相比，CRISPR/Cas 具有以下优点：低脱靶率、高效、经济实惠、应用范围广。另外，也有文献报道 CRISPR 杂合 RNA-DNA(chRDNA)引导技术与全 RNA 引导技术相比，可显著提高 Cas9 蛋白的特异性，从而在细胞中实现高水平的预期基因组编辑，最大限度的减少脱靶。

15 在本申请中，术语“锌指核酸酶技术”、“锌指核酸酶系统”具有本领域通常的含义，锌指核酸酶技术的核心设计思想是把两个有特定功能的结构域-即一个特异性识别模块和一个功能模块，进行了巧妙的嵌合。最经典的锌指核酸酶是将一个非特异性的核酸内切酶 Fok I 与含有锌指的结构域进行融合，含有锌指的结构域可以识别特定的 DNA 序列。

在本申请中，术语“转录激活因子样效应核酸酶技术”、“转录激活因子样效应核酸
20 酶系统”具有本领域通常的含义，TALE 效应因子最初是作为一种细菌感染植物的侵袭策略而被发现的。研究者通过将 Fok I 核酸酶与一段人造具有序列特异性结合能力的 TALE 连接起来，形成了一类具有特异性基因编辑功能的强大工具，即 TALEN 蛋白。典型的 TALEN 蛋白由一个包含核定位信号（nuclear localization signal, NLS）的 N 端结构域，一个包含可识别特定 DNA 序列的典型串联 TALE 重复序列的中央结构域，以及
25 一个具有 Fok I 核酸内切酶功能的 C 端结构域组成。TALEN 技术的核心原理就是在同一个 TALEN 蛋白上有序地实现引导进入细胞核、靶位点 DNA 的特异性识别和靶位点 DNA 的切割这三个不同的功能。

在本申请中，术语“铰链区”是指作用于胞外抗原识别结构域与跨膜结构域之间的连接段，这个区域通过给予抗原识别结构域一定的活动范围，允许 CAR 识别抗原。目前
30 使用的铰链区主要来源于 IgG1、IgG4、CD4、CD7、CD28、CD84、CD8 α 中的一种或

多种。

在本申请中，“跨膜区”是指连接着 CAR 结构的细胞内和细胞外成分的跨膜结构域。不同的跨膜结构域可以一定程度上影响 CAR 的表达和稳定性，但是并不直接参与信号传递，通过相互作用可以提高下游信号传递。所述跨膜区可以来源于 CD3、CD4、CD7、
5 CD8 α 、CD28、CD80、CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc70 中的一种或多种。

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

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

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

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

在本申请中，决定 CAR-免疫效应细胞治疗效果的关键因素之一是对肿瘤靶抗原的选择，但对抗原靶点的选择不一定是单一的，因此胞外抗原识别结构域还可以包含靶向以下任一种靶点的胞外抗原识别结构域（如：scFv 抗体）：CD5、CD19、CD20、CD22、CD33、CD123、CLL1、BCMA、CD138、CS1。如：在双靶点 CAR-T 产品中胞外抗原识别结构域就包括针对二个靶点的 scFv 序列。针对单一靶点的 scFv 抗体包括抗体重链可变区（VH）和轻链可变区（VL），二者之间通过连接序列连接；针对二个或大于二个靶点的 scFv 抗体中包括针对不同靶点的 VH 区和 VL 区，不同区域之间也通过连接序列直接连接或间接连接，其排列方式可以通过以下形式的任意一种：靶点 1 VL-靶点 1 VH-靶点 2 VL-靶点 2 VH，靶点 2 VL-靶点 2 VH-靶点 1 VL-靶点 1 VH，靶点 1 VL-靶点
25 2 VL-靶点 2 VH-靶点 1 VH，靶点 2 VL-靶点 1 VL-靶点 1 VH-靶点 2 VH，上述“-”代表
30

通过连接序列连接。

在本申请中，术语“连接序列”通常是指长度为约 1 至 100 个氨基酸的寡肽或多肽区，其将本发明的抗体、嵌合抗原受体的任何结构/区域连接在一起。连接序列可由不同的氨基酸残基(如甘氨酸和丝氨酸)组成，以便相邻的蛋白质结构域相对于彼此自由移动。

- 5 当期望确保两个相邻结构域在空间上不相互干扰时，可使用较长的连接序列。

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

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

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

- 术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内得以表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬
20 菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、
25 脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。但将可编码某蛋白的多聚核苷酸引入细胞的方式不必然通过载体，如转座子、电转等方式。术语“转座子”是指不连续的 DNA 片段，具有在染色体位点之间迁移和携带基因信息的能力，如：睡美人 SB 系统和来源于鳞翅目昆虫的 PB 系统。在某些实施例中，还可以使用电转的方法将 mRNA 转导进 T 细胞。
30

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

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

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

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下本领域技术人员可接受的波动范围，如：在±0.5%-10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、

15 1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%或 10%的范围内变动。

靶向 CD7 的人源化抗体或其抗原结合片段、相应核酸分子、相应载体、相应细胞、相应药物组合物

一方面，本申请提供了一种靶向 CD7 的人源化抗体或其抗原结合片段，包含：

20 如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列；

或，如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列；

25 或，如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列。

在本申请中，生物计算评价结果显示对鼠源抗体 Th69 进行人源化的设计均提高了抗体的人源化程度，免疫原性预测结果显示人源化降低了抗体的免疫原性，5 个候选抗体免疫原性风险均为低。发明人又通过实验对 5 条人源化 scFv 抗体组成的嵌合抗原受体进行了增殖情况、特异性、功能性的验证：5 组人源化 CAR-T 细胞对阴性靶细胞的非
30 特异性杀伤显著弱于鼠源 mTh69 CAR-T 细胞；人源化 Th69 较鼠源 mTh69 CAR-T 与抗

原阳性靶细胞培养后 CD107a 表达更高，与抗原阴性靶细胞培养后 CD107a 表达没有明显差异，提示人源化 Th69 scFv 提高了对 CD7 抗原的特异性结合能力；多轮刺激扩增能力检测实验结果显示人源化 Th69 增殖能力均显著优于鼠源 CAR-T 细胞，其中 hu11 CAR-T 细胞、hu12 CAR-T 细胞和 hu21 CAR-T 细胞的增殖更具有优势；体内药效结果
5 显示人源化序列 hu21 杀瘤效果更强，小鼠生存时间延长。综上，选择人源化 hu21、hu11、hu12 作为候选序列。

上述人源化抗体或其抗原结合片段在某些实施例中，为 scFv 抗体、sc(Fv)₂ 抗体或 [sc(Fv)₂]₂ 抗体。

上述人源化抗体或其抗原结合片段在某些实施例中，为如 SEQ ID NO:3 所示氨基酸
10 序列的 scFv 抗体；

或，为如 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；

或，为如 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列的 scFv 抗体。

再一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码上述人源化抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

15 上述分离的核酸分子在某些实施例中，编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；

和/或，编码如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:5 所示；

和/或，编码如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如
20 SEQ ID NO:37 所示；

和/或，编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示。

再一方面，本申请还提供了一种载体，其包含上述分离的核酸分子。载体可以任意地选自以下载体地一种或几种：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工
25 染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。

再一方面，本申请还提供了一种细胞，其包含上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子或载体。
30

再一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包括上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体或细胞，以及药学上可接受的辅料。药学上可接受的辅料包括但不限于：载剂、保护剂、稳定剂中的一种或多种。

靶向 CD7 的人源化抗体或其抗原结合片段的应用

- 5 再一方面，本申请还提供了上述人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体或细胞在制备用于诊断与 CD7 的表达相关的疾病或病症的检测试剂中的应用。

上述应用在某些实施例中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述应用在某些实施例中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

- 10 上述应用在某些实施例中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述应用在某些实施例中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴瘤、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

- 15 再一方面，本申请还提供一种上述人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体或细胞在制备用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症的药物中的应用。

上述应用在某些实施例中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述应用在某些实施例中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

- 20 上述应用在某些实施例中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述应用在某些实施例中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

- 25 再一方面，本申请还提供了一种治疗疾病或病症的方法，包括以下步骤：将有效量的包含上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体或细胞的药物施用于具有治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症的需求的受试者。

上述方法在某些实施例中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

- 30 上述方法在某些实施例中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述方法在某些实施例中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

- 上述方法在某些实施例中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、
5 CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

上述方法在某些实施例中，所述施用可以通过不同的方式进行，例如口服、静脉内、瘤内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。

再一方面，本申请还提供了一种药物，其包含上述人源化抗体或其抗原结合片段、分离的核酸分子、载体或细胞，用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症。

- 10 上述药物在某些实施例中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述药物在某些实施例中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述药物在某些实施例中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

- 15 上述药物在某些实施例中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、
CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

包含靶向 CD7 的人源化抗体或其抗原结合片段的抗体药物、抗体药物偶联物

- 20 再一方面，本申请提供了一种抗体药物，其包含上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段。

上述抗体药物在某些实施例中，所述抗体药物为单特异性抗体药物、双特异性抗体药物、三特异性抗体药物或四特异性抗体药物。

再一方面，本申请还提供了一种抗体药物偶联物，其包含上述任一种人源化抗体或其抗原结合片段。

- 25 **靶向 CD7 的嵌合抗原受体、相应核酸分子、相应载体、相应免疫效应细胞、药物组合物**

再一方面，本申请还提供了一种靶向 CD7 的嵌合抗原受体，其包含靶向 CD7 的胞外抗原识别结构域、铰链区、跨膜区和细胞内结构域，所述靶向 CD7 的胞外抗原识别结构域包括：

- 30 如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:2 所示的轻链

可变区的氨基酸序列；

或，如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列

或，如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列；

可选地，胞外抗原识别结构域包含选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列；

进一步可选地，胞外抗原识别结构域为选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列。

在上述描述中，“-”表示相互连接，并且在上述描述中“-”具有方向性，其表示从氨基酸的 N 端向 C 端的连接；可选地，“-”表示直接连接。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，连接序列选自以下序列的一种或多种：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，所述胞外抗原识别结构域包含：如 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的 scFv 抗体，或如 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列的 scFv 抗体，或如 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；

可选地，所述胞外抗原识别结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，或如 SEQ ID NO:35 所示，或如 SEQ ID NO:36 所示。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，所述铰链区来源于 IgG1、IgG4、CD4、CD7、CD28、CD84、CD8 α 中的一种或多种；可选地，所述铰链区的氨基酸来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列；更进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示。

5 上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，所述跨膜区来源于 CD3、CD4、CD7、CD8 α 、CD28、CD80、CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc70 中的一种或多种；可选地，所述跨膜区的氨基酸序列来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列；再更进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示。

10 上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，其中所述细胞内结构域包含胞内信号传导区；可选地，还包括共刺激信号传导区。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，其中所述胞内信号传导区来源于 CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、FcR γ 、FcR β 、CD66d、DAP10、DAP12、Syk 中的一种或多种；可选地，所述胞内信号传导区来源于 CD3 ζ ；
15 进一步可选地，所述胞内信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列；更进一步可选地，所述胞内信号传导区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，其中所述共刺激信号传导区来源于 CD2、CD3、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD244、4-1BB、OX40、LFA-1、ICOS、LIGHT、NKG2C、NKG2D、DAP10、B7-H3、MyD88 中的一种、两种或三种以上；可选地，所述共刺激信号传导区来源于 CD28 或 4-1BB；进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列；
20 更进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，还包含位于所述嵌合抗原受体氨基酸序列 N-末端的引导肽；可选地，其中所述引导肽来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述
25 引导肽的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列；更进一步可选地，所述引导肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示。

上述任一种嵌合抗原受体在某些实施例中，所述嵌合抗原受体包括以下序列的任意一种：如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列，或如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列；或如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列；

30 可选地，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示，或如 SEQ ID

NO:18 所示，或如 SEQ ID NO:19 所示。

再一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其包含编码上述任一种嵌合抗原受体的核苷酸序列。

上述分离的核酸分子在某些实施例中，编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列包含：

5 编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；和编码如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:5 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；和编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，
10 其如 SEQ ID NO:38 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:37 所示；和编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示。

上述分离的核酸分子在某些实施例中，编码所述嵌合抗原受体的核苷酸序列包含：

15 编码如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:15 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:39 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:40
20 所示。

再一方面，本申请还提供了一种载体，其包含上述分离的核酸分子。载体可选子以下的任意一种或几种：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录酶病毒（包
25 括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。

上述载体在某些实施例中，为表达载体；在另一些实施方式中，载体为病毒载体；在另一些实施方式中，载体为慢病毒载体。

再一方面，本申请还提供了一种经工程化的免疫效应细胞，其包含上述嵌合抗原
30 受体、上述分离的核酸分子，或上述载体。

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

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

 上述经工程化的免疫效应细胞在某些实施方式中，所述同种异体 T 淋巴细胞包含经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞；进一步地，所述同种异体 T 淋巴细胞包含
10 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、95%、95%、96%、97%、98%、99%以上的经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞。

 上述经工程化的免疫效应细胞在某些实施例中，T 淋巴细胞的 $\alpha\beta$ T 淋巴细胞或 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞。

 再一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包括上述经工程化的免疫效应细胞和药学上可接受的辅料。
15

 上述药物组合物在某些实施例中，药学上可接受的辅料包括保护剂。

 上述药物组合物在某些实施例中，药学上可接受的辅料包括细胞冻存液。

 上述药物组合物在某些实施例中，药物组合物为细胞悬液或其冻存细胞。

 上述药物组合物在某些实施例中，药物组合物为静脉注射剂。

20 **经工程化的免疫效应细胞的制备方法**

 再一方面，本申请还提供了制备经工程化的免疫效应细胞的方法，其包括以下的步骤：向免疫效应细胞中引入编码上述任一种嵌合抗原受体的核苷酸序列。

 上述方法在某些实施例中，所述免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞（NK 细胞）、外周血单个核细胞（PBMC 细胞）、诱导性多能干细胞、诱导性多能
25 干细胞分化成的 T 细胞（iPSC-T）、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞（iPSC-NK）和胚胎干细胞中的一种或多种。

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

 上述方法在某些实施例中，所述同种异体 T 淋巴细胞包含 50%、60%、70%、
30 80%、90%、91%、92%、93%、95%、95%、96%、97%、98%、99%以上的经过基

因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性同种异体 T 淋巴细胞。

上述方法在某些实施例中，通过基因编辑工具对 T 细胞 *Trac* 基因和 *CD7* 基因进行基因编辑以获得 *CD7/TRAC* 双阴性细胞，所述基因编辑工具选自 CRISPR/Cas 系统、锌指核酸酶系统、转录激活因子样效应核酸酶系统中的一种；可选地，所述基因编辑
5 工具选自 CRISPR/Cas 系统；进一步可选地，所述 CRISPR/Cas 系统包括 Cas9 蛋白和 sgRNA。

上述方法在某些实施例中，针对 *CD7* 基因的 CRISPR/Cas 系统中 sgRNA 如 SEQ ID NO:33 所示。

上述方法在某些实施例中，针对 *Trac* 基因的 CRISPR/Cas 系统中 chRDNA 的序列
10 如 SEQ ID NO:34 所示。

上述方法在某些实施例中，T 淋巴细胞为 $\alpha\beta$ T 淋巴细胞或 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞。

上述方法在某些实施例中，向免疫效应细胞中引入编码上述任一种嵌合抗原受体的核苷酸序列的方法选自以下的一种或多种：使用病毒的方法或使用非病毒的方法；可选地，所述使用病毒的方法包括使用以下病毒载体的一种或多种： γ 反转录病毒载
15 体、慢病毒载体、腺病毒相关病毒载体；所述使用非病毒的方法包括以下方法的一种或多种：使用转座子进行基因转移、通过 mRNA 介导进行基因转导、电转化。

靶向 *CD7* 的嵌合抗原受体的应用

再一方面，本申请还提供上述嵌合抗原受体、分离的核酸分子、载体或经工程化的免疫效应细胞在制备药物中的应用，所述药物用于治疗与 *CD7* 的表达相关的疾病
20 或病症。

上述应用在某些实施例中，与 *CD7* 的表达相关的疾病或病症为 $CD7^+$ 血液瘤。

上述应用在某些实施例中，所述 $CD7^+$ 血液瘤选自以下的一种或多种： $CD7^+$ 急性 T 淋巴细胞白血病、 $CD7^+$ T 细胞淋巴瘤、 $CD7^+$ 急性髓系白血病。

上述应用在某些实施例中，所述 $CD7^+$ 急性 T 淋巴细胞白血病包括 $CD7^+$ 早期前 T
25 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述应用在某些实施例中，所述 $CD7^+$ T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种： $CD7^+$ T 淋巴母细胞淋巴瘤、 $CD7^+$ 结外 NK/T 细胞淋巴、 $CD7^+$ 肠病型 T 细胞淋巴瘤、 $CD7^+$ 原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 $CD7^+$ 外周 T 细胞淋巴瘤。

再一方面，本申请还提供了一种治疗与 *CD7* 的表达相关的疾病或病症的方法，
30 包括以下步骤：将有效量的上述经工程化的免疫效应细胞或药物组合物施用于具有治

疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症的需求的受试者。

上述方法在某些实施例中，所述施用可以通过不同的方式进行，例如静脉内、瘤内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。例如，施用的方式可以通过静脉注射的方式施用于受试者。在某些实施方式中，有效剂量的经工程化的免疫效应细胞或
5 药物组合物可以单次施用于受试者，也可以在一定期间内分次施用于受试者，如：每周施用一次、两周一次、三周一次、四周一次、一个月一次、3 个月一次、或 3-6 个月一次。

上述方法在某些实施例中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述方法在某些实施例中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性
10 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述方法在某些实施例中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述方法在某些实施例中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、
15 CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

上述方法在某些实施例中，所述施用的方式为静脉注射。

上述方法在某些实施例中，有效量的经工程化的免疫效应细胞或药物组合物为
1×10⁵ 至 1×10⁷ 个细胞/kg 的剂量。在某些实施例中，针对不同的适应症，给药剂量可以不同；针对病情严重程度不同的患者，给药剂量也可以不同。施用剂量范围可以是
20 1×10⁵ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg 至 1×10⁷ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg，例如，1×10⁵ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg 至 1×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg 至 1×10⁷ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、0.5×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、0.6×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、0.7×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、0.8×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、0.9×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.0×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.1×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.2×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.3×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.4×10⁶ 个
25 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.5×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.6×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.7×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.8×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、1.9×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg、2.0×10⁶ 个 CAR 阳性 T 细胞/kg。

再一方面，本申请还提供了一种药物，其包含上述经工程化的免疫效应细胞或药
30 物组合物，用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症。

上述药物在某些实施例中，与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤。

上述药物在某些实施例中，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

上述药物在某些实施例中，所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T
5 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病。

上述药物在某些实施例中，所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：
CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、
CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的嵌合抗原受体、
10 经工程化的免疫效应细胞、制备方法和用途等，而不适用于限制本申请发明的范围。实
施例不包括对传统方法的详细描述，如那些用于构建载体和质粒的方法，将编码蛋白
的基因插入到这样的载体和质粒的方法或将质粒引入宿主细胞的方法。这样的方法对
于本领域中具有普通技术的人员是众所周知的，并且在许多出版物中都有所描述，包
括 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory
15 Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

实施例 1、对鼠源抗体的人源化改造设计及 CD7 CAR-T 细胞的制备

在本申请中，对鼠源抗体序列 Th69 的 VH 氨基酸序列（如 SEQ ID NO:31 所示）
和 VL 氨基酸序列（如 SEQ ID NO:32 所示）基于 KABAT 规则进行 CDR 划分，获得
了分别如 SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23 所示的 VH CDR1、CDR2、
20 CDR3 的氨基酸序列和分别如 SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26 所示的
VL CDR1、CDR2、CDR3 的氨基酸序列，基于此进行人源化改造。

Th69 VH 区域进行人源化改造所选择的模板是 IGHv3-21*07，VH 的人源化改造
中选择了多个重要氨基酸的不同组合进行回复突变，形成了 3 种人源化 Th69 VH 设计，
分别为 Th69 VH-1、Th69 VH-2、Th69 VH-3（其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、
25 SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28 所示），多个重要氨基酸包括 PHI-ANGLE 位置的氨
基酸、完全埋藏内部的氨基酸同时其在人的该位置出现频次较低、PHI-ANGLE 位置
的氨基酸同时距离 CDR 区很近。

Th69 VL 区域进行人源化改造所选择的模板是 IGKv1-27*01，VL 的人源化改造
中选择了多个重要氨基酸的不同组合进行回复突变，形成了 3 种人源化 Th69 VL 设计，
30 分别为 Th69 VL-1、Th69 VL-2、Th69 VL-3（其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29、

SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:2 所示），多个重要氨基酸包括 PHI-ANGLE 位置的氨基酸、处于 VH/VL 界面的氨基酸、upper 核心氨基酸。

经过人源化改造的重链和轻链通过连接序列结合分别组成了 hu01 scFv、hu10 scFv、hu11 scFv、hu12 scFv、hu21 scFv，我们选择在二代 CAR 结构上对各条候选人源化 scFv 抗体进行筛选，即以信号肽-胞外抗原识别结构域-铰链区-跨膜区-共刺激信号传导区-胞内信号传导区按照从 N 端到 C 端的顺序直接相连获得的二代 CAR 结构。在各个 CAR 结构中，均采用了 CD8 α 引导链为信号肽（如 SEQ ID NO:13 所示），以 hu01 scFv、hu10 scFv、hu11 scFv、hu12 scFv、hu21 scFv 和鼠源对照 Th69 scFv 分别作为胞外抗原识别结构域，铰链区（如 SEQ ID NO:9 所示）和跨膜区（如 SEQ ID NO:10 所示）采用 CD8 α 的结构，以 4-1BB 为共刺激信号传导区（如 SEQ ID NO:12 所示），CD3 ζ 为胞内信号传导区（如 SEQ ID NO:11 所示），具体各条候选人源化 scFv 相应 VH 和 VL 氨基酸序列、相应 CAR 的氨基酸序列如表 1 所示。

表 1、各种 CD7 CAR 序列

CAR 名称	CAR 氨基酸序列编号	采用的 scFv	scFv VH 氨基酸序列编号	scFv VL 氨基酸序列编号
hu01 CAR	SEQ ID NO:16	hu01 scFv	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:29
hu10 CAR	SEQ ID NO:17	hu10 scFv	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:30
hu11 CAR	SEQ ID NO:18	hu11 scFv	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:30
hu12 CAR	SEQ ID NO:19	hu12 scFv	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:30
hu21 CAR	SEQ ID NO:14	hu21 scFv	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2
Th69 CAR	SEQ ID NO:20	Th69 scFv	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32

具体获得 CD7 CAR-T 细胞的方法如下：

15 1、慢病毒载体的构建

根据表 1，将编码上述 6 种 CD7 CAR 结构的核苷酸序列分别构建到空慢病毒载体（厂家：SBI 公司，货号：CD500-CD800，如 WO2021/121227 实施例 1 中记载的进行常规抗性改造）中获得 CAR 表达载体，随后将 CAR 表达载体和三种包装质粒一起转染 293T 细胞，经过收集纯化之后得到有功能性的慢病毒载体。三种包装质粒分别是 pMD2.G（购自 Biovector 公司，产品号 Biovector012259），pMDLg/pRRE（购自 Biovector 公司，产品号 Biovector012251），pRSV-Rev（购自 Biovector 公司，产品号 Biovector012253）。

20 2、T 细胞的制备

1) 分选 T 细胞

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

2) 对 T 细胞进行激活处理

- 5 将分离的 T 细胞用完全淋巴细胞培养液 (X-VIVO15 培养基 + 5% 胎牛血清 + 300IU/ml IL-2 或 X-VIVO15 培养基 + 5% 胎牛血清 + 5ng/ml IL-15 + 10ng/ml IL-7) 进行重悬，使终浓度为 $(1\sim3) \times 10^6$ 个细胞/ml，按 1ul beads/ 1×10^6 cells 加入 CD3/CD28 磁珠刺激，混匀后置于培养箱培养，培养条件为 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ ，培养时间至少 24 小时，获得经过激活处理的 T 细胞。

10 3) 对激活处理后的 T 细胞进行基因编辑

90%的 T 细胞表面表达 CD7，如果 CD7 CAR-T 细胞的表面本身表达 CD7 就会导致 CD7 CAR-T 细胞的自杀伤。利用基因编辑的方法敲除 T 细胞的 CD7 基因使其表面不表达 CD7 是避免自杀伤的一种有效方法，同时利用基因编辑的方法敲除 T 细胞的 *Trac* 基因使其可作为通用性 CAR-T 产品，具体方法如下：

- 15 配制 RNP 复合物，每 11.5μl RNP 复合物中由 10μl Opti-MEM 培养基+0.6μl Cas9 (10mg/ml) + 0.45μl CD7 (100μM) gRNA + 0.45μl TRAC chRDNA (100μM) 组成，室温孵育 15 分钟，其中 CD7 sgRNA 的序列如 SEQ ID NO:33 所示，TRAC chRDNA 的序列如 SEQ ID NO:34 所示。取经激活处理的 T 细胞，按照 10μl/M Cell 加入电转液，重悬细胞，与孵育完成的 RNP 复合物混合，每 1M 细胞中加入 RNP 复合物 11.5μl，转入
20 电转条。Lonza 4D 电转仪的电击程序选 EH100，进行电击，电击完成后，迅速向电转条中加入预温 T 细胞完全培养基，立即将电转条放入培养箱孵育 15 分钟，后将细胞转移到 96 孔板中，补加 100ul 的预温的 T 细胞完全培养基，培养条件为 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ 。

3、通过慢病毒转导经过分选激活以及基因编辑 (CD7 与 *Trac* 双基因敲除) 的 T 细胞以制备相应 CD7 CAR-T 细胞。

- 25 取出上述经过基因编辑的 T 细胞，用含终浓度为 8μg/ml 的聚凝胺 (polybrene) 的单纯 X-VIVO15 培养基重悬，混匀获得细胞悬液，并按每 800ul 细胞悬液 (含 2×10^6 细胞) 缓慢加入 200ul 的慢病毒载体，混匀后放入孔板，并于培养箱培养，培养条件为 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ ，培养时间至少 4-6 小时。

4、转导后 T 细胞的扩增培养

- 30 取出转导后的细胞，用完全淋巴细胞培养液培养，隔天传代，使细胞密度维持在

($0.8 \sim 2$) $\times 10^6$ 个细胞/ml, 以备后续实施例使用。

分别使用包含有表 1 中 CAR 结构的慢病毒感染 T 细胞后, 获得的 T 细胞分别按其 CAR 序号进行命名, 比如使用 hu21 CAR 获得的 T 细胞即命名为 hu21 CAR-T 细胞、使用 hu12 CAR 获得的 T 细胞即命名为 hu12 CAR-T 细胞。

- 5 在转导后的第 4 天通过带荧光标记的 CD7 抗体 (BioLegend, 395606) /CD3 抗体 (BioLegend, 317318) 对细胞染色、流式细胞仪检测 CD7⁺/CD3⁺ 细胞比例, 计算得 CD7 敲除效率为 $94.481 \pm 3.656\%$ 、TRAC 敲除效率为 $96.201 \pm 1.437\%$ 。

实施例 2、CAR-T 细胞 CAR 阳性比例检测、CAR-T 细胞扩增情况检测

1、CAR-T 细胞中 CAR 阳性比例检测

- 10 用 FITC 荧光标记的 CD7 抗原 (厂家: ACRO Biosystems, 货号: CD7-HF258) 对实施例 1 获得的 6 种 CAR-T 细胞、未转导且未敲除的 T 细胞 (UTD-NoEP 组)、未转导但双敲的 T 细胞 (UTD-KO TRAC+CD7 组) 进行染色标记, 并在转导后的不同天数通过流式细胞术对各种细胞进行 CAR 分子阳性比例检测, 检测结果如图 1 所示: 5 种使用了人源化 scFv 的 CAR-T 细胞表面的 CAR 表达情况与使用了鼠源 scFv 的 CAR-T 细胞无显著差异, 转导后 4、6、11 天检测的 CAR 阳性率均在一个水平上; 未转导且未敲除的 T 细胞和未转导但双敲的 T 细胞作为 2 组阴性对照, 均无检测到 CAR 的表达。

2、转导后培养不同天数的总 T 细胞的扩增检测

- 对实施例 1 获得的 6 种 CAR-T 细胞、未转导且未敲除的 T 细胞 (UTD-NoEP 组)、未转导但双敲的 T 细胞 (UTD-KO TRAC+CD7 组) 在转导后的不同天数取样, 用 20 AO/PI 双荧光染色 (AO/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒可通过商业化渠道购买, 其是采用 AO/PI 探针双染细胞核的方法检测凋亡细胞的状态, 可以区分正常细胞和凋亡细胞), 通过细胞计数仪对各组细胞进行计数, 从而计算培养过程中的总 T 细胞扩增倍数。检测结果如图 2 所示: 5 种使用了人源化 scFv 的 CAR-T 细胞在培养过程中扩增倍数均较使用了鼠源 scFv 的 CAR-T 细胞更高, 但 5 种使用了人源化 scFv 的 CAR-T 细胞的扩增能力 25 无显著差异。另外, 进行了双敲的 T 细胞, 无论是否转导有 CAR 结构, 扩增能力都显著高于未进行敲除的 T 细胞, 推测是未敲除 CD7 基因导致的对 T 细胞的自杀伤影响扩增能力引起的

实施例 3、CAR-T 细胞的体外杀伤能力

- 体外杀伤实验分为短时杀伤实验与长时杀伤实验, 其中: 短时杀伤是指将使用了鼠 30 源或人源化 Th69 scFv 的 CAR-T 细胞分别与靶细胞按照效应细胞 (效应细胞按 CAR⁺细

胞计数)与靶细胞不同效靶比(1:3、1:1和3:1)的条件在X-VIVO15培养基中共培养4-6小时后,通过检测靶细胞中稳定表达的荧光素酶活性检测CAR-T细胞对靶细胞的杀伤比例,稳定表达荧光素酶的靶细胞系的建立方法如下:用带有luc-GFP序列(现有技术中的常规荧光素酶和荧光蛋白序列即可)的病毒感染靶细胞,通过无限稀释法单克隆培养,挑GFP阳性、生长状态好的克隆培养;长时杀伤是指将使用了鼠源或人源化Th69 scFv的CAR-T细胞分别与靶细胞按照效应细胞(效应细胞按CAR⁺细胞计数)与靶细胞不同效靶比(1:32、1:16、1:4和1:1)的条件在X-VIVO15培养基中共培养24小时后,通过检测靶细胞中稳定表达的荧光素酶活性检测CAR-T细胞对靶细胞的杀伤比例。

- 10 在上述实验中,使用了未转导且未敲除的T细胞(NoEP组)和未转导但双敲的T细胞(UTD组)作为阴性效应细胞;靶细胞包括内源表达CD7的阳性靶细胞Molt-4细胞(人急性T淋巴细胞白血病细胞)、Jurkat细胞(人T淋巴细胞白血病细胞),以及作为阴性对照的KO CD7 Molt-4细胞(指采用CRISPR/Cas9技术基因编辑方法敲除CD7后采用无限稀释法挑选单克隆CD7⁻ Molt-4细胞培养建立KO CD7 Molt-4细胞系,所用
- 15 CD7 sgRNA同实施例1)、KO CD7 Jurkat细胞(指采用CRISPR/Cas9技术基因编辑方法敲除CD7后采用无限稀释法挑选单克隆CD7⁻ Jurkat细胞培养建立KO CD7 Jurkat细胞系,所用CD7 sgRNA同实施例1)。实验结果如下:

- 短时杀伤结果:如图3A所示,在效靶比1:3、1:1、3:1的条件下,使用了鼠源或人源化Th69 scFv的CAR-T细胞对阳性靶细胞MOLT4的杀伤能力处于同一水平;但如图
- 20 3B所示,鼠源Th69 CAR-T细胞和人源化hu01 CAR-T细胞在高效靶比3:1时对阴性靶细胞KO CD7 MOLT4存在非特异性杀伤作用,而4组人源化hu10 CAR-T细胞、hu11 CAR-T细胞、hu12 CAR-T细胞、hu21 CAR-T对阴性靶细胞均没有非特异性杀伤,差异显著(**表示 $p < 0.001$,****表示 $p < 0.0001$),表明这4组人源化CAR-T细胞的安全性可能更好。

- 25 长时杀伤结果:如图3C和图3D所示,在效靶比1:32、1:16、1:4、1:1的条件下,使用了鼠源或5种人源化Th69 scFv的CAR-T细胞对阳性靶细胞MOLT4、jurkat的整体杀伤能力处于同一水平,但人源化hu21 CAR-T细胞相对于鼠源Th69 CAR-T细胞对阳性靶细胞Jurkat在低效靶比1:32时的杀伤作用具有显著优势(*表示 $p < 0.05$);另外如图3E所示,在较高效靶比1:4和1:1时,鼠源Th69 CAR-T细胞对阴性靶细胞KO
- 30 CD7 Jurkat有非特异性杀伤,而5组人源化CAR-T细胞对阴性靶细胞的非特异性杀伤显

著弱于鼠源 Th69 CAR-T 细胞 (*表示 $p < 0.05$, *表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$, ****表示 $p < 0.0001$), 表明其安全性更好。

实施例 4、CAR-T 细胞的多轮刺激实验

抗原刺激可以激活 CAR-T 细胞使 CAR-T 细胞增殖, 而 T 细胞的持续激活会导致细胞耗竭, 耗竭的 T 细胞的增殖能力和效应功能都会有所下降, 我们通过检测 CD7 CAR-T 细胞组在 5 多轮抗原刺激实验后 CD3⁺细胞的增殖情况 (即 T 细胞的增殖情况), 确定其持续增殖能力。将具备长期增殖能力的人源化 scFv 作为优选抗体的筛选标准。

将各人源化 CAR-T 细胞的 CAR 阳性比例都利用 UTD 调整到了与 CAR 阳性比例最低的一组 CAR-T 细胞一致的水平, 在抗原刺激实验中, 将各组 CAR-T 细胞分别与 10 CD7⁺靶细胞 Molt4 按照效靶比 1:1 在 24 孔板中进行共培养, 每孔 2ml X-VIVO15 培养基, 每组细胞重复 3 孔。用荧光标记的 CD3 抗体 (厂家: Biolegend, 货号: 300312) 进行 T 细胞 (CD3 是区分是否为 T 细胞的标记物) 标记, 通过流式细胞术进行检测分析, 统计 T 细胞的增殖情况。根据体积倍数的换算计算 CD3 阳性细胞的细胞数, 然后根据计算结果各组再取出一定量 CAR-T 细胞按照效靶比 1:1 加入对应的阳性靶细胞进行新一轮刺激, 15 每隔 48h 一次, 如此重复进行 4 轮刺激。增殖结果如图 4 所示: 人源化 CAR-T 细胞组的增殖能力均比 Th69 CAR-T 细胞组具有显著优势 (**表示 $p < 0.01$, ***表示 $p < 0.001$, ****表示 $p < 0.0001$), 其中 hu21 CAR-T 细胞、hu11 CAR-T 细胞和 hu12 CAR-T 细胞的增殖更具有优势。

实施例 5、特异性分析

20 为了检验人源化序列改造是否会影响 CD7 CAR 的特异性, 我们通过设计细胞水平实验对筛选获得的 5 条人源化 Th69 CAR 的特异性进行评估。溶酶体相关膜蛋白 1 (CD107a) 在膜上的表达被认为是细胞毒性淋巴细胞 (CD8⁺ T 细胞和 NK 细胞) 活化的标志物, 当细胞毒性淋巴细胞被给予特定抗原刺激, 即发生免疫激活表达 CD107a, 是否表达 CD107a 因此可作为检测 CAR-T 细胞特异性的手段。

25 按照如下方法进行细胞共培养, 通过流式检测 CD107a 来评估 CD7 CAR 的特异性。具体步骤为: 分别对肿瘤细胞、CAR-T 细胞和未转导 T 细胞进行计数, 用 X-VIVO15 培养基将肿瘤细胞调整至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 将 CAR-T 细胞和未转导 T 细胞调整至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。在 96 孔板中每孔加 20 μl 被荧光标记过的 CD107a 抗体 (购自: Biolegend, 型号: 328608), 然后每孔加 100 μl 的 T 细胞 (T 细胞指 CAR-T 细胞或未转导 T 细胞) 和 100 μl 的肿瘤细胞, 30 加完后 400r/min 离心 3 分钟。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱培养 60 分钟。60 分钟后每孔加

入 20μl 的 Golgi stop 工作液（即：3ml X-VIVO15 培养基加 2μl Golgi stop 蛋白转运抑制剂，Golgi stop 购自 BD，型号 554724）培养箱培养 2.5 小时。取 CD3（购自：Biolegend，型号：300326）和 CD8 抗体（购自：Biolegend，型号：344722）等体积混合，混匀后每孔加 10μl，培养箱培养 30 分钟。30 分钟后 1500r/min 离心 5 分钟，甩去上清，加 5 200μl FACS buffer（PBS+0.5%BSA），混匀。1500r/min 离心 5 分钟，甩去上清。每孔加 200μl FACS buffer（PBS+0.5%BSA）混匀，转移到已标记好的流式管中，上机检测。分析 CD3⁺CD8⁺细胞群里 CD107a 的荧光信号。上述实验中，CAR-T 细胞指鼠源 Th69 CAR-T 细胞、5 种人源化 CAR-T 细胞或将 h189-4 anti-CD7 scFv（VL 和 VH 分别来源于 CN 112300282A 中的 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18，连接序列与其他组的连接序列相同）、3A1e-LH anti-CD7 scFv（VL 和 VH 分别来源于 CN 113383071A 的 SEQ ID NO:90 和 SEQ ID NO:91，连接序列与其他组的连接序列相同）按着与实施例 1 中相同的 CAR 组件序列加装在如实施例中提到的空慢病毒载体上并按照实施例 1 中的方法制备的 CAR-T 细胞；肿瘤细胞指：高表达 CD7 的细胞系（在本申请中也被称为 CD7⁺靶细胞）CCRF-CEM（急性 T 淋巴细胞白血病细胞，商业化细胞系）、MOLT4（急性 T 淋巴细胞白血病细胞，商业化细胞系）；低表达 CD7 的细胞系（在本申请中也被称为 CD7⁻靶细胞）CD7 KO MOLT4（用 CRISPR/CAS9 敲除 CD7 后，挑选 CD7-单克隆 MOLT4 细胞培养建立细胞系）、Nalm6（人急性淋巴细胞白血病细胞，商业化细胞系）、786-O（人肾透明细胞腺癌细胞，商业化细胞系）、U266（人多发性骨髓瘤细胞，商业化细胞系）。

CD107a 的检测结果如表 2 所示：CD7⁺靶细胞、CD7⁻靶细胞与未转导的 T 细胞（UTD 组）共培养之后，CD107a 表达水平无显著差异；各组 CD7 CAR-T 细胞与 CD7⁺靶细胞 CCRF/MOLT4 共培养之后，都有较高比例细胞表达 CD107a，而 CAR-T 细胞与 CD7⁻靶细胞 CD7 KO MOLT4/Nalm6/786-O/U266 共培养之后的 CD107a 阳性比例非常低，说明 5 种人源化 Th69 CAR 具有很好的抗原识别特异性。另外，hu01 CAR-T、hu10 CAR-T、hu11 CAR-T、hu12 CAR-T、hu21 CAR-T 细胞较鼠源 Th69 CAR-T 细胞与抗原 25 阳性靶细胞培养后 CD107a 表达更高，提示人源化 Th69 scFv 提高了对 CD7 抗原的特异性结合能力。

表 2、UTD 或不同 CD7 CAR-T 细胞被各种靶细胞刺激后的 CD107a 表达情况

	CD7 表 达	UTD	h189-4	3A1e	mTh69	hu01	hu10	hu11	hu12	hu21
NC（本 底表达）	---	1.86%	3.00%	3.90%	2.01%	2.69%	2.50%	3.35%	2.59%	3.16%

CCRF-CEM	99.99%	4.06%	12.04%	33.70%	15.35%	26.33%	26.01%	27.08%	26.33%	25.70%
MOLT4	98.89%	4.79%	14.32%	31.21%	11.63%	22.78%	24.72%	28.07%	24.68%	25.38%
KO CD7-MOLT4	0.24%	4.35%	5.16%	8.39%	4.76%	6.28%	4.79%	6.68%	6.11%	5.08%
Nalm6	0.30%	4.10%	4.83%	7.22%	4.32%	6.34%	5.08%	5.33%	4.51%	5.96%
786-O	0.80%	3.46%	3.82%	3.21%	5.98%	4.85%	3.32%	4.35%	3.19%	3.29%
U266	1.28%	4.90%	4.54%	6.50%	5.05%	6.67%	5.27%	6.03%	6.39%	6.18%

实施例 6、体内功能实验

为了进一步筛选并确定具有最优功能的人源化抗体，我们开展了 CD7 CAR-T 的体内药效学试验。在选择体内功能实验的候选序列时，通过人源化打分软件（如：采用 T20 score 经典的人源化打分系统）、计算机免疫原性预测（采用 AlphaMHC 算法），

5 hu01 scFv、hu10 scFv 序列人源化程度高、免疫原性低，因此选择其作为体内功能实验的候选序列；体外功能实验结果显示 hu21 CAR-T 细胞的体外杀伤能力强且非特异性杀伤弱、多轮刺激扩增能力强，因此也将其列入体内功能实验的候选序列。

将 CCRF-CEM-GFP-Luc 细胞以 2×10^5 个/0.2ml/只体积接种于雌性 NSG 小鼠尾静脉以建立 CCRF-CEM-GFP-Luc 急性 T 淋巴白血病动物模型，细胞接种后第 4 天按照肿瘤

10 成像信号强度进行随机分组，通过尾静脉回输相应细胞，实验共分 8 组（分组信息见下表），其中分别包括：PBS 组、未转导未敲除的 T 细胞组（T cell 组）、双敲 CD7/TRAC 的未转导 T 细胞组（DKO-T cell 组）、阳性对照 3A1e 组（如实施例 5 提到）、鼠源 Th69 CAR-T 细胞组（mTh69 KO 组），人源化 hu01 CAR-T 细胞组（hu01 KO 组）、人源化 hu10 CAR-T 细胞组（hu10 KO 组）和人源化 hu21CAR-T 细胞组（hu21 KO 组），上述

15 3-8 组的 T 细胞来源均为经过 CD7/TRAC 双敲的 T 细胞。各组 CAR-T 阳性率相差不大，回输前调至相同阳性率，通过尾静脉单次回输 CAR-T 细胞，剂量为 3×10^6 /0.2ml/只 CAR+细胞。回输 Day0 至 Day14，每周进行活体成像 2 次，采血进行流式检测 2 次，此后改为每周一次。记录小鼠体重和肿瘤成像信号值，监控和评估人源化 hu01、hu10、hu21 CAR-T 在动物体内的肿瘤清除效果。

20

表 3、小鼠实验的分组和各组剂量

组别		剂量（阳性率一致，剂量一致）	动物数
1	PBS 组	NA	3
2	T cell 组	按供试品总细胞量最多的一组来算	3
3	DKO-T cell 组	按供试品总细胞量最多的一组来算	3
4	3A1e 组	3×10^6	4

5	mTh 69 KO 组	3×10^6	4
6	hu01 KO 组	3×10^6	4
7	hu10 KO 组	3×10^6	4
8	hu21 KO 组	3×10^6	4

注：以复苏后活细胞总数计，以 PBS 调整细胞浓度至给药浓度。

小鼠实验结果分别如表 4、图 5 和图 6 所示。表 4 和图 5 的结果展示了小鼠的生存情况，3A1e 组、mTh69 组、hu01 KO 组、hu10 KO 组小鼠生存时间较 PBS 组、T cell 组、DKO-T cell 组长，hu21 KO 组小鼠生存时间最长（如图 5 所示），中位生存时间为 34.5 天（如表 4 所示）。

表 4

	PBS 组	T cell 组	DKO-T cell 组	3A1e 组	mTh 69 组	hu01 KO 组	hu10 KO 组	hu21 KO 组
中位生存期/天	27	26	26	31	31.5	32	31	34.5

小鼠体内肿瘤成像信号值结果如图 6 所示，与 PBS 组、T cell 组和 DKO-T cell 组相比，其余各组 CAR-T 细胞在测试剂量下均能够显著抑制肿瘤生长，其中 hu21 KO 组的抑瘤效果最好。

综合比较各组 CAR-T 细胞的抗肿瘤效果和各组小鼠生存期，体内药效结果显示人源化序列 hu21 杀瘤效果强于 mTh69、hu-10 KO、hu-21 KO 和 3A1e 组，小鼠生存时间较 PBS 对照延长 7.5 天，较鼠源 Th69 CAR-T 延长 3 天。

序列表说明

SEQ ID NO:1---Th69 VH-1，hu01/11/21 CAR 中 scFv 的重链可变区的氨基酸序列；
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQAPEKRLEWVSSISSGG
FTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEVRGYLDVWGQGTT
VTVSS

SEQ ID NO:2---Th69 VL-3，hu21 CAR 中 scFv 的轻链可变区的氨基酸序列；
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPDKTVKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:3---hu21 CAR 中 scFv 的氨基酸序列；
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPDKTVKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQAPEKRLEWVSSI

SSGGFTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEV RGYLDVWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO:4---编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列;

5 GAGGTCCA ACTGGTGGAGTCCGGCGGGGGCCTCGTGAAGCCTGGCGGCAGCC
TGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCCTGACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGG
GTGAGACAAGCCCCCGAGAAGAGACTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAGCGGC
GGCTTCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAGACAA
CGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC
10 GTGTACTACTGCGCTAGAGACGAGGTGAGAGGCTACCTGGACGTGTGGGGCCAAG
GCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO:5---编码如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列;

GACATTCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACAG
15 AGTGACCATCACCTGCAGCGCCTCCCAAGGCATCAGCAACTACCTGAACTGGTATC
AGCAGAAGCCCGACAAGACCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACAAGCAGCCTGCA
CAGCGGCGTGCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACCCTG
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTACAG
CAAGCTGCCCTACACATTTGGGGGCGGGACCAAACTCGAGATTAAG

20

SEQ ID NO:6---连接序列;

GGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO:7---连接序列;

25 GSTSGSGKPG SGEGSTKG

SEQ ID NO:8---连接序列;

GGGGS

30 SEQ ID NO:9---铰链区的氨基酸序列;

TTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO:10---跨膜区的氨基酸序列;

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

SEQ ID NO:11---胞内信号传导区的氨基酸序列;

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNP
5 QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

SEQ ID NO:12---共刺激信号传导区的氨基酸序列;

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
10

SEQ ID NO:13---引导肽的氨基酸序列;

MALPVTALLPLALLLHAARP

SEQ ID NO:14---hu21 CAR 的氨基酸序列;

15 MALPVTALLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVITCSASQGISNYLNW
YQQKPKDKTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP
YTFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSS
YAMSWVRQAPEKRLEWVSSISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED
TAVYYCARDEVRGYLDVWGQGTITVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
20 GGAHVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

25 SEQ ID NO:15---编码 hu21 CAR 的氨基酸序列的核苷酸序列;

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC
GCCAGGCCGGACATTCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCTCCGTGG
GCGACAGAGTGACCATCACCTGCAGCGCCTCCCAAGGCATCAGCAACTACCTGAAC
TGGTATCAGCAGAAGCCCGACAAGACCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACAAGCAG
30 CCTGCACAGCGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTAC
ACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCA
GTACAGCAAGCTGCCCTACACATTTGGGGGCGGGACCAAACTCGAGATTAAGGGCG
GGGGCGGGAGCGGCGGGGGCGGGTCCGGGGGCGGGGGCAGCGAGGTCCAACCTGG

TGGAGTCCGGCGGGGGCCTCGTGAAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGC
CGCCTCCGGCCTGACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCG
AGAAGAGACTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAGCGGCGGCTTCACCTACTACCC
CGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTG
5 TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAG
AGACGAGGTGAGAGGCTACCTGGACGTGTGGGGCCAAGGCACCACCGTGACCGTG
AGCAGCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGT
CGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCG
10 GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCA
GAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTC
AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA
ACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
15 CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGC

20

SEQ ID NO:16--- hu01 CAR 的氨基酸序列;

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQGISNYLNW
YQQKPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP
YTFGGGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSS
25 YAMSWVRQAPEKRLEWVSSISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED
TAVYYCARDEVRGYLDVWGQGTITVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
30 STATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:17--- hu10 CAR 的氨基酸序列;

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQGISNYLNW

YQQKPGKTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP
YTFGGGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSS
YAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARDEVRGYLDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
5 AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
LSTATKDTYDALHMQALPPR

10 SEQ ID NO:18--- hu11 CAR 的氨基酸序列;

MALPVTALLPLALLLHAARPDIMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQGISNYLNW
YQQKPGKTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP
YTFGGGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSS
YAMSWVRQAPEKRLEWVSSISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAED
15 TAVYYCARDEVRGYLDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

20

SEQ ID NO:19--- hu12 CAR 的氨基酸序列;

MALPVTALLPLALLLHAARPDIMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQGISNYLNW
YQQKPGKTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP
YTFGGGKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSS
25 YAMSWVRQAPEKRLEWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARDEVRGYLDVWGAGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG
30 LSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO:20---Th69 CAR 的氨基酸序列;

MALPVTALLPLALLLHAARPDIMTQTTSSLSASLGDRVITITCSASQGISNYLNW

YQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLP
YTFGGGKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFS
SYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSED
TAMYYCARDEVRGYLDVWGAGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
5 GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL
STATKDTYDALHMQALPPR

10 SEQ ID NO:21---Th69 抗体 VH CDR1 的氨基酸序列;
SYAMS

SEQ ID NO:22--- Th69 抗体 VH CDR2 的氨基酸序列;
SISSGGFTYYPDSVKG

15 SEQ ID NO:23--- Th69 抗体 VH CDR3 的氨基酸序列;
DEVRGYLDV

SEQ ID NO:24--- Th69 抗体 VL CDR1 的氨基酸序列;
20 SASQGISNYLN

SEQ ID NO:25--- Th69 抗体 VL CDR2 的氨基酸序列;
YTSSLHS

25 SEQ ID NO:26--- Th69 抗体 VL CDR3 的氨基酸序列;
QQYSKLPYT

SEQ ID NO:27---Th69 VH-2, hu10 CAR 中 scFv 的重链可变区的氨基酸序列;
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGG
30 FTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEVRGYLDVWGQGT
TVTSS

SEQ ID NO:28---Th69 VH-3, hu12 CAR 中 scFv 的重链可变区的氨基酸序列;

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQAPEKRLEWVASISSGG
FTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEV RGYLDVWGAGTT
VTVSS

5 SEQ ID NO:29--- Th69 VL-1, hu01 CAR 中 scFv 的轻链可变区的氨基酸序列;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIK

10 SEQ ID NO:30--- Th69 VL-2, hu10/11/12 CAR 中 scFv 的轻链可变区的氨基酸序列;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPGKTVKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:31---鼠源抗体 Th69 的重链可变区的氨基酸序列;

15 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGLTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGG
FTYYPD SVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARDEV RGYLDVWGAGTT
VTVSS

SEQ ID NO:32---鼠源抗体 Th69 的轻链可变区的氨基酸序列;

20 DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO:33---CD7 sgRNA;

CGGAACCGUCUGUCCGUAGU

25 SEQ ID NO:34---TRAC chRDNA;

AGAGTCUCTCAGCUGGUACA

SEQ ID NO:35---hu11 CAR 中 scFv 的氨基酸序列;

30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPGKTVKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGG
GSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQAPEKRLEWVSSI
SSGGFTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEV RGYLDVWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO:36---hu12 CAR 中 scFv 的氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPGKTVKLLIYYTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGG
5 GSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFSSYAMSWVRQAPEKRLEWVASI
SSGGFTYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEVRGYLDVWG
AGTTVTVSS

SEQ ID NO:37---编码如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序
10 列

GAGGTCCAACCTGGTGGAGTCCGGCGGGGGCCTCGTGAAGCCTGGCGGCAGCC
TGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCCTGACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGG
GTGAGACAAGCCCCGAGAAGAGACTGGAGTGGGTGGCCTCCATCAGCAGCGGCG
GCTTCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAGACAAC
15 GCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCG
TGTAATACTGCGCTAGAGACGAGGTGAGAGGCTACCTGGACGTGTGGGGCGCCGG
CACCACCGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO:38---编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序
20 列

GACATTCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGACAG
AGTGACCATCACCTGCAGCGCCTCCCAAGGCATCAGCAACTACCTGAACTGGTATC
AGCAGAAGCCCGGCAAGACCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACAAGCAGCCTGCA
CAGCGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTG
25 ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTACAG
CAAGCTGCCCTACACATTTGGGGGCGGGACCAAACCTCGAGATTAAG

SEQ ID NO:39---编码 hu11 CAR 的氨基酸序列的核苷酸序列

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC
30 GCCAGGCCGGACATTCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCTCCGTGG
GCGACAGAGTGACCATCACCTGCAGCGCCTCCCAAGGCATCAGCAACTACCTGAAC
TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGACCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACAAGCAG
CCTGCACAGCGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC

ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCA
GTACAGCAAGCTGCCCTACACATTTGGGGGCGGGACCAAACCTCGAGATTAAGGGCG
GGGGCGGGAGCGGCGGGGGCGGGTCCGGGGGCGGGGGCAGCGAGGTCCAACTGG
TGGAGTCCGGCGGGGGCCTCGTGAAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGC
5 CGCCTCCGGCCTGACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCCG
AGAAGAGACTGGAGTGGGTGAGCAGCATCAGCAGCGGCGGCTTCACCTACTACCC
CGACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTG
TACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAG
AGACGAGGTGAGAGGCTACCTGGACGTGTGGGGCCAAGGCACCACCGTGACCGTG
10 AGCAGCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGT
CGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCG
GGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCA
GAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTC
15 AAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGA
ACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCC
TCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
20 GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGC

SEQ ID NO:40---编码 hu12 CAR 的氨基酸序列的核苷酸序列

25 ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCC
GCCAGGCCGGACATTCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCTCCGTGG
GCGACAGAGTGACCATCACCTGCAGCGCCTCCCAAGGCATCAGCAACTACCTGAAC
TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGACCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACAAGCAG
CCTGCACAGCGGCGTGCCTAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC
30 ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCAGCA
GTACAGCAAGCTGCCCTACACATTTGGGGGCGGGACCAAACCTCGAGATTAAGGGCG
GGGGCGGGAGCGGCGGGGGCGGGTCCGGGGGCGGGGGCAGCGAGGTCCAACTGG
TGGAGTCCGGCGGGGGCCTCGTGAAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGC
CGCCTCCGGCCTGACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGACAAGCCCCCG

AGAAGAGACTGGAGTGGGTGGCCTCCATCAGCAGCGGCGGCTTCACCTACTACCCC
GACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTGT
ACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGA
GACGAGGTGAGAGGCTACCTGGACGTGTGGGGCGCCGGCACCACCGTGACCGTGA
5 GCAGCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTC
GCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTG
CACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGG
GACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAG
AAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCA
10 AGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAA
CTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGA
ACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGAC
AAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT
CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG
15 AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCA
GGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC
CCCCTCGC

权 利 要 求 书

1. 一种靶向 CD7 的人源化抗体或其抗原结合片段，其包含：如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列；
- 5 或，如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列；
- 或，如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的人源化抗体或其抗原结合片段，其为 scFv 抗体、sc(Fv)₂
- 10 抗体或[sc(Fv)₂]₂ 抗体。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的人源化抗体或其抗原结合片段，其为如 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；
- 或，为如 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；
- 或，为如 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列的 scFv 抗体。
- 15 4. 一种分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1-3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。
5. 根据权利要求 4 所述的核酸分子，其中：编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；
- 和/或，编码如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如
- 20 SEQ ID NO:5 所示；
- 和/或，编码如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:37 所示；
- 和/或，编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示。
- 25 6. 一种载体，其包含权利要求 4 或 5 所述的核酸分子。
7. 一种细胞，其包含权利要求 1-3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段、权利要求 4 或 5 所述的分离的核酸分子或权利要求 6 所述的载体。
8. 一种药物组合物，其包括权利要求 1-3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段、权利要求 4 或 5 所述的分离的核酸分子、权利要求 6 所述的载体或权利要求 7 所
- 30 述的细胞，以及药学上可接受的辅料。

9. 权利要求 1-3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段、权利要求 4 或 5 所述的分离的核酸分子、权利要求 6 所述的载体或权利要求 7 所述的细胞在制备用于诊断与 CD7 的表达相关的疾病或病症的检测试剂中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的应用，其中所述与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤；可选地，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

11. 根据权利要求 10 所述的应用，其中所述 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病；和/或，其中所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴瘤、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

12. 权利要求 1-3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段、权利要求 4 或 5 所述的分离的核酸分子、权利要求 6 所述的载体或权利要求 7 所述的细胞在制备用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症的药物中的应用。

13. 根据权利要求 12 所述的应用，其中所述与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤；可选地，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺ T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

14. 根据权利要求 13 所述的应用，其中 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病；和/或，其中所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：CD7⁺ T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴瘤、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

15. 一种抗体药物，其包含权利要求 1-3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段。

16. 一种抗体药物偶联物，其包含权利要求 1-3 中任一项所述的人源化抗体或其抗原结合片段。

17. 一种靶向 CD7 的嵌合抗原受体，其包含靶向 CD7 的胞外抗原识别结构域、铰链区、跨膜区和细胞内结构域，所述靶向 CD7 的胞外抗原识别结构域包括：

如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列；

或，如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻

链可变区的氨基酸序列

或，如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列和如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 17 所述的嵌合抗原受体，其中所述胞外抗原识别结构域包括选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列；

可选地，胞外抗原识别结构域包含选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列；

进一步可选地，胞外抗原识别结构域为选自以下结构中的任意一种：如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列、如 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列-连接序列-如 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 18 所述的嵌合抗原受体，其中所述连接序列选自以下序列的一种或多种：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8。

20. 根据权利要求 19 所述的嵌合抗原受体，其中所述胞外抗原识别结构域包含：如 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列的 scFv 抗体，或如 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列的 scFv 抗体，或如 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列的 scFv 抗体；

可选地，所述胞外抗原识别结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，或如 SEQ ID NO:35 所示，或如 SEQ ID NO:36 所示。

21. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述铰链区来源于 IgG1、IgG4、CD4、CD7、CD28、CD84、CD8 α 中的一种或多种；可选地，所述铰链区的氨基酸来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述铰链区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列。

22. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述跨膜区来源于 CD3、CD4、CD7、CD8 α 、CD28、CD80、CD86、CD88、4-1BB、CD152、OX40、Fc70 中的一种或多种；可选地，所述跨膜区的氨基酸序列来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述跨膜区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列。

5 23. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的嵌合抗原受体，其中所述胞内结构域包含胞内信号传导区；可选地，还包括共刺激信号传导区。

24. 根据权利要求 23 所述的嵌合抗原受体，其中所述胞内信号传导区来源于 CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、FcR γ 、FcR β 、CD66d、DAP10、DAP12、Syk 中的一种或多种；可选地，所述胞内信号传导区来源于 CD3 ζ ；
10 进一步可选地，所述胞内信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列。

25. 根据权利要求 23 所述的嵌合抗原受体，其中所述共刺激信号传导区来源于 CD2、CD3、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD83、CD244、4-1BB、OX40、LFA-1、ICOS、LIGHT、NKG2C、NKG2D、DAP10、B7-H3、MyD88 中的一种、两
15 种或三种以上；可选地，所述共刺激信号传导区来源于 CD28 或 4-1BB；进一步可选地，所述共刺激信号传导区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列。

26. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的嵌合抗原受体，其还包含位于所述嵌合抗原受体氨基酸序列 N-末端的引导肽；可选地，其中所述引导肽来源于 CD8 α ；进一步可选地，所述引导肽的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列。

20 27. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的嵌合抗原受体，所述嵌合抗原受体包括以下序列的任意一种：如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列，或如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列；或如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列；

可选地，所述嵌合抗原受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示，或如 SEQ ID NO:18 所示，或如 SEQ ID NO:19 所示。

25 28. 一种分离的核酸分子，其包含编码权利要求 17-20 中任一项所述的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

29. 根据权利要求 28 所述的核酸分子，其中所述核苷酸序列包含：

编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；和编码如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其
30 如 SEQ ID NO:5 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:4 所示；和编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示；

5 或，编码如 SEQ ID NO:28 所示的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:37 所示；和编码如 SEQ ID NO:30 所示的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:38 所示。

30. 根据权利要求 28 所述的核酸分子，其中所述核苷酸序列包含：

编码如 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:15 所示；

10 或，编码如 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:39 所示；

或，编码如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列的核苷酸序列，其如 SEQ ID NO:40 所示。

31. 一种载体，其包含权利要求 28-30 中任一项所述的分离的核酸分子；可选地，
15 所述载体为表达载体。

32. 根据权利要求 31 所述的载体，所述载体为病毒载体；可选地，所述载体为慢病毒载体。

33. 一种经工程化的免疫效应细胞，其包含权利要求 17-27 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 28-30 中任一项所述的分离的核酸分子，或权利要求 31-32 中任
20 一项所述的载体。

34. 根据权利要求 33 所述的经工程化的免疫效应细胞，其选自 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞、外周血单个核细胞、诱导性多能干细胞、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞和胚胎干细胞中的一种或多种；可选地，其选自 T 淋巴细胞；进一步可选地，所述 T 淋巴细胞的来源为自体 T 淋巴细胞或同种异体 T 淋巴细胞；更进一步可选地，所述同种异体 T 淋巴细胞包含经过基因编辑的
25 *CD7/TRAC* 双阴性细胞；再更进一步可选地，所述同种异体 T 淋巴细胞包含 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、95%、95%、96%、97%、98%、99% 以上的经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞。

35. 根据权利要求 34 所述的经工程化的免疫效应细胞，其中所述 T 淋巴细胞为
30 $\alpha\beta$ T 淋巴细胞或 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞。

36. 一种药物组合物，其包括权利要求 33-35 中任一项所述的经工程化的免疫效应细胞和药学上可接受的辅料。

37. 根据权利要求 36 所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的辅料包括保护剂。

5 38. 根据权利要求 37 所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的辅料包括细胞冻存液。

39. 制备经工程化的免疫效应细胞的方法，其包括以下的步骤：向免疫效应细胞中引入编码权利要求 26-36 中任一项所述的嵌合抗原受体的核苷酸序列。

40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述免疫效应细胞选自 T 淋巴细胞、自然
10 杀伤细胞、外周血单个核细胞、诱导性多能干细胞、诱导性多能干细胞分化成的 T 细胞、诱导性多能干细胞分化成的 NK 细胞和胚胎干细胞中的一种或多种；可选地，所述免疫效应细胞是 T 淋巴细胞；进一步可选地，所述 T 淋巴细胞的来源为自体 T 淋巴细胞或同种异体 T 淋巴细胞；更进一步可选地，所述同种异体 T 淋巴细胞包含经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞；再更进一步可选地，所述同种异体 T 淋巴细胞包含
15 50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、95%、95%、96%、97%、98%、99% 以上的经过基因编辑的 *CD7/TRAC* 双阴性细胞。

41. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述 T 淋巴细胞为 $\alpha\beta$ T 淋巴细胞或 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞。

42. 根据权利要求 40 所述的方法，通过基因编辑工具对 T 细胞 *Trac* 基因和 *CD7*
20 基因进行基因编辑以获得 *CD7/TRAC* 双阴性细胞，所述基因编辑工具选自 CRISPR/Cas 系统、锌指核酸酶系统、转录激活因子样效应核酸酶系统中的一种；可选地，所述基因编辑工具选自 CRISPR/Cas 系统；进一步可选地，所述 CRISPR/Cas 系统包括 Cas9 蛋白和 sgRNA。

43. 根据权利要求 39 所述的方法，针对 *CD7* 基因的 CRISPR/Cas 系统中 sgRNA 如
25 SEQ ID NO:33 所示；和/或，针对 *Trac* 基因的 CRISPR/Cas 系统中 chRDNA 的序列如 SEQ ID NO:34 所示。

44. 根据权利要求 39-43 中任一项所述的方法，其中所述向免疫效应细胞中引入编码权利要求 26-36 中任一项所述的嵌合抗原受体的核苷酸序列的方法选自以下的一种或多种：使用病毒的方法或使用非病毒的方法；可选地，所述使用病毒的方法包括
30 使用以下病毒载体的一种或多种： γ 反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒相关病毒

载体；所述使用非病毒的方法包括以下方法的一种或多种：使用转座子进行基因转移、通过 mRNA 介导进行基因转导、电转化。

45. 权利要求 17-27 中任一项所述的嵌合抗原受体、权利要求 28-30 中任一项所述的分离的核酸分子、权利要求 31-32 中任一项所述的载体或权利要求 33-35 中任一项所述的经工程化的免疫效应细胞在制备药物中的应用，所述药物用于治疗与 CD7 的表达相关的疾病或病症。

46. 根据权利要求 45 所述的应用，其中所述与 CD7 的表达相关的疾病或病症为 CD7⁺血液瘤；可选地，所述 CD7⁺血液瘤选自以下的一种或多种：CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病、CD7⁺T 细胞淋巴瘤、CD7⁺急性髓系白血病。

- 10 47. 根据权利要求 46 所述的应用，其中 CD7⁺急性 T 淋巴细胞白血病包括 CD7⁺早期前 T 淋巴母细胞白血病和其他急性 T 淋巴细胞白血病；和/或，其中所述 CD7⁺T 细胞淋巴瘤选自以下的一种或几种：CD7⁺T 淋巴母细胞淋巴瘤、CD7⁺结外 NK/T 细胞淋巴瘤、CD7⁺肠病型 T 细胞淋巴瘤、CD7⁺原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤和 CD7⁺外周 T 细胞淋巴瘤。

15