

靶向 CD7 的工程化免疫细胞、嵌合抗原受体、CD7 阻断分子及应用

技术领域

本发明涉及细胞免疫治疗技术领域，具体地，涉及靶向 CD7 的免疫治疗方法，尤其是一种靶向 CD7 的工程化免疫细胞、嵌合抗原受体、CD7 阻断分子及应用。

背景技术

T 细胞恶性肿瘤是一组异质性很强的克隆性生长和 T 细胞功能障碍性疾病，主要分为 T 细胞淋巴瘤（T-cell lymphomas, TCLs）和 T 细胞白血病，具有成熟和前体亚型。这类疾病代表了一类极其恶性的血液系统癌症，在儿童和成人中复发率和死亡率都很高，目前还没有有效或针对性的治疗方法。尽管现有技术中已经有多种的化疗方案，在患有 T 细胞急性淋巴细胞白血病（T-cell acute lymphoblastic leukemia, T-ALL）的病患中，只有不到 50% 的成人和 75% 的儿童能够存活 5 年以上。对于初次治疗后复发的患者，挽救性化疗方案只是对 20%-40% 的病例能够起到诱导缓解效果。在复发或化疗难治性 T 细胞恶性肿瘤患者中，治疗预后较差，而有效且可耐受的治疗方法有限。对于 10-50% 在挽救性化疗后获得完全缓解（CR）的患者，唯一的治疗选择仍然是异基因干细胞移植（allogeneic stem cell transplantation, ASCT）。然而，ASCT 的治愈率仍保持在 30% 或更低，而且并非所有 CR 患者都有资格接受移植。其他 T 细胞恶性肿瘤，包括皮肤和外周 T 细胞淋巴瘤（分别为 CTCL 和 PTCL）对化疗的初始反应率更低，即使在有反应的患者中，无进展生存率仍保持在 40-50%。因此，尽管在治疗 T 细胞恶性肿瘤方面取得了进展，但是仍然需要新的、有针对性的治疗方案来改善预后，特别是对于复发和难治的患者。除了 T 细胞恶性肿瘤，如 T-ALL 和 T-NHL，必须认识到还有其他 CD7+ 血液恶性肿瘤仍然缺乏有效治疗和靶向治疗方案，如 20%-30% 的急性髓性白血病（AML），以及绝大部分的 NK 和 NKT 淋巴瘤。

嵌合抗原受体 T（CAR-T）细胞是最有前途的肿瘤免疫治疗方法之一，对 B 淋巴细胞恶性肿瘤患者能够产生显著的应答率。因此，以 CD19（一种在 B 细胞白血病和淋巴瘤中广泛表达的抗原）为靶点的 CAR-T 细胞已成为首个获得许可的癌症 T 细胞疗法。CD19 CAR-T 细胞在治疗复发性和难治性 B 细胞恶性肿瘤方面的成功使其在其他肿瘤中的应用更加广泛。鉴于 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞恶性肿瘤之间的相似性，

将 CAR-T 细胞治疗扩展到这些疾病似乎很简单。然而，针对 T 细胞恶性肿瘤的 CAR-T 细胞治疗已被证明很难开发和实施。这主要是由于在工程化 T 细胞上同时表达靶抗原可导致 CAR-T 细胞在制备过程中自相残杀；同时，CAR-T 细胞回输后正常外周血 T 细胞的清除可导致严重的免疫缺陷。

CD7 是一种跨膜糖蛋白，通常表达在大多数外周血 T 细胞和 NK 细胞（NK 细胞即自然杀伤细胞，来源于骨髓淋巴样干细胞，其分化发育依赖于骨髓及胸腺微环境，主要分布于骨髓、外周血、肝、脾、肺和淋巴结；NK 细胞不同于 T、B 细胞，是一类无需预先致敏就能非特异性杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞的淋巴细胞）及其前体细胞上，作为一种辅助 T 细胞活化和与其他免疫亚群相互作用的共刺激蛋白。95% 以上的淋巴母细胞性白血病和淋巴瘤以及部分外周 T 细胞淋巴瘤表达 CD7。在小鼠动物模型中，缺乏 CD7 的 T 细胞在很大程度上表现出不受干扰的发育、稳态和保护功能。由于 CD7 对外周血 T 细胞功能没有显著的影响，因此它是一个很有前途的 CAR-T 细胞治疗靶标。CD7 曾被作为单克隆抗体（mAb）的靶标采用免疫毒素治疗 T 细胞恶性肿瘤患者进行过评估。这种单克隆抗体的偶联物没有产生严重的 CD7 相关的毒副作用，但抗肿瘤反应不显著，这可能是由于鼠源抗体在患者治疗上的有限活性所致。

现有技术中，关于靶向 CD7 的治疗研究进展如下：

i) CD7-CAR-T 细胞治疗；表达嵌合抗原受体（CAR）的 T 细胞是一种很有前途的肿瘤免疫治疗方法。这种靶向治疗在获得 B 细胞白血病和淋巴瘤患者缓解甚至长期无复发生存方面显示出巨大的潜力。最近已有几个研究小组报告了 CD7 特异性 CAR-T 细胞治疗在 T 细胞恶性肿瘤的临床前模型中的研究进展。在所有这些研究中，CD7-CAR 在 T 细胞上的表达导致严重的自杀现象，造成 CAR-T 细胞无法在体外扩增。

靶标特异性的 CAR 在所转导 T 细胞上的表达可以造成因持续的配体结合引起的 CAR 受体激活，可导致转导 T 细胞的自杀和加速细胞的终末分化使其在体内不能长期存活。由于 CD7 是一种泛 T 细胞抗原，在大部分 T 细胞上均有表达。因此 CD7 抗原特异性的 CAR-T 细胞在制备过程中可产生严重的自杀现象，从而造成 CAR-T 细胞无法有效地扩增。现有两种策略来减少这种自杀现象：1) 使用基因组编辑工具敲除 CD7 靶抗原的基因；2) 通过 CD7 结合域在内质网锚定的方法阻止 CD7 蛋白在细胞内表达过程中转运到细胞表面。这两种方法都可以有效地降低 CD7 在细胞表面的表达，并最大限度地减少了靶向 CD7-CAR-T 细胞的自杀现象。重要的是，CD7 的缺失并不影响 CAR-T 细胞的增殖和短期效应功能，使具有高抗肿瘤活性的功能性 CAR-T

细胞得以扩增。

从细胞表面上去除 CD7 后, CD7-CAR-T 细胞在体外和体内对原发性 CD7 阳性 T-ALL 和淋巴瘤具有较强的抗肿瘤活性。CD7-CAR-T 细胞对外周血 CD7 阳性 T 细胞和 NK 细胞也具有杀伤性, 这表明这些细胞亚群也将成为 CD7-CAR-T 细胞的靶点。

使用自体细胞进行过继性细胞治疗的一个风险是无意中将外周血的恶性肿瘤细胞也同时进行基因修饰。用 CAR 基因修饰的恶性 T 细胞, 在某些情况下, 允许它们进行基因编辑以降低目标分子的表达可能是一个真实存在的风险, 因此需要在使用这些治疗的知情同意书中加以说明。然而, 考虑到在制造过程中恶性肿瘤细胞的存活率和扩增性较差, 这些不必要的恶性细胞基因修饰应该以较低的频率发生。此外, 在缺乏基因编辑以降低靶抗原表达的情况下, 表达靶抗原的恶性肿瘤细胞在转导后和输注到患者体内之前可能会被 CAR-T 细胞自相残杀而清除。同时, 可以采用健康供者生产的异基因 CD7-CAR-T 细胞用于治疗复发性和难治性 T 细胞恶性肿瘤, 以达到将患者桥接造血干细胞移植的目的, 或用于治疗造血干细胞移植后复发的 T 细胞恶性肿瘤。如果移植物抗宿主的副作用能够得到适当的控制, 异基因 CD7-CAR-T 细胞治疗的优势是除了可以由健康供者提供 T 细胞外, 还可以产生移植物抗白血病的效应。利用现成的同种异体 T 细胞或 NK 细胞作为运载工具, 可以完全避免基因修饰恶性细胞的风险。由于这些细胞产物将由健康的供者产生, 这样可以避免使用患者来源的 T 细胞, 这些 T 细胞往往由于长期处于抑制性肿瘤微环境或因经受过先前的强化治疗而功能低下。

ii) 靶向 CD7 的免疫毒素; CD7 在 T 细胞上以高密度 (约 60000mol/cell) 表达, 即使被单价抗体片段结合, CD7 也被迅速内化。因此, 它是免疫毒素介导治疗 T 细胞肿瘤的理想靶抗原。目前, 抗 CD7 免疫毒素主要由抗 CD7 单克隆抗体与毒素偶联而成。采用鼠抗人 CD7 单克隆抗体 (WT1) 与蓖麻毒素 A 结合的抗 CD7 免疫毒素曾被用来在体外清除肿瘤细胞以用于 T 细胞恶性肿瘤患者的自体骨髓移植。免疫毒素 DA7 通过化学的方法连接小鼠 IgG2b 抗 CD7 (3A1E) 单克隆抗体与去糖基化蓖麻毒蛋白 A 链而构建, 曾被用于 SCID 动物模型中治疗人的 T-ALL, 提示其对预后不良的 T 细胞白血病具有潜在的治疗作用。在 DA7 的 I 期临床试验中, 尽管受到不稳定性和血管毒性的限制, 在其最大耐受剂量下实现了客观的临床反应。抗人 CD7 的单克隆抗体 TH69 也曾被用来构建重组免疫毒素, 该抗体通过基因重组的方法将单链抗体片段 (scFv) 与截短的假单胞菌外毒素 A 片段相连。

iii) 基因敲除; 靶向基因编辑 T 细胞在过继免疫治疗的临床可行性已经得到了

很好的证明。使用锌指核酸酶对 CD4 阳性 T 细胞中的 HIV 共受体 CCR5 进行基因敲除，使这些细胞对 HIV 感染具有抵抗力，并使 CCR5 阴性的 T 细胞能够在 HIV 感染患者中植入并持续存在。采用 TALENs 对 CD19 CAR-T 细胞中的 T 细胞受体 (TCR) 基因进行敲除，使第三方 T 细胞可以成功治疗 B 细胞白血病患者，这是“通用”现成 T 细胞产品的一个令人鼓舞的里程碑，极大地降低了移植物抗宿主病的风险。在此项研究中，CD52 基因也在回输的 CAR-T 细胞中进行了敲除，从而使其对阿来单抗产生抗药性。最近，CRISPR/Cas9 系统被用来敲除 CD7 或在敲除 CD7 的同时也敲除了 T 细胞受体 α 链，这一新的基因编辑系统可以快速有效地敲除 T 细胞中的靶基因。

iv) 细胞内蛋白表达阻断技术；在许多生化和免疫系统中，通常很难判定某些特定分子的作用，但有一种方法是抑制基因表达并寻找其功能效应。通过同源重组或近年来发展的基因编辑技术，如 Zinc Finger 核酸酶、TALENs 和 CRISPR/Cas9 进行基因敲除。虽然这些技术十分强大，但在实践中有很多不足或技术上的困难。因此非常需要发展一种简单有效、可控地去除分子的技术。

已有大量研究表明采用细胞内抗体可以靶向灭活细胞内的重要分子。通过构建抗体的重链和轻链转染哺乳动物细胞，并对其先导序列进行简单的修改，就可以把抗体序列锚定在三个主要细胞内区域：内质网 (ER) /高尔基体、胞浆和细胞核。最初的细胞内抗体研究使用全 IgG，但近来的研究集中在 Fab' 和单链抗体 (scFv) 上。单链抗体分子很小 (约 30 kDa)，通过短肽序列连接重链和轻链的可变区来构建。这些构建产物作为细胞内抗体有许多优点，主要是它们无需将两个独立的抗体链结合形成抗原结合位点。

到目前为止，已有研究表明细胞内抗体可用来防止 HIV gp160 到 gp130 在细胞内质网中的处理；阻断 IL-2 受体 α 链的表达；抑制酵母、非洲爪蟾卵母细胞及人源 T 细胞株中的胞浆酶和抑制转基因植物中的病毒活性。Marasco 及其同事的研究表明，单链抗体可以在 ER 中起作用。Greenman 等人的研究表明，细胞内单链抗体可以用来防止细胞膜蛋白的表达，他们采用的是一种可以结合 T 淋巴细胞表面抗原 CD2 的高亲和力单克隆抗体和一个 ER 滞留信号 (KDEL)。

抗原识别域是 CAR 结构的重要组成部分，负责与肿瘤细胞表面抗原结合。目前，CD7 特异性 CAR-T 细胞治疗的抗原识别域大多由小鼠或羊驼源性抗体的可变区组成。一旦回输至患者体内，这些携带异种抗原识别域的 CAR-T 细胞可诱导很强的宿主细胞和体液反应，回输的 CAR-T 细胞被宿主免疫迅速清除，严重影响 CAR-T 细胞在体内的持久性，最终导致疾病的难治和复发。本发明采用天然的人源 CD7 配体作为 CAR

的抗原识别域，其优势在于，由此构建的靶向 CD7-CAR-T 不会诱导产生宿主的免疫反应，可以在体内长期存活，从而达到更好的疗效。

发明内容

针对现有技术中的缺陷，本发明的目的是提供一种靶向 CD7 的工程化免疫细胞、嵌合抗原受体、CD7 阻断分子及应用。

本发明的目的是通过以下方案实现的：

本发明的第一方面提供一种工程化免疫细胞，其中包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸序列，所述嵌合抗原受体包括靶向 CD7 的抗原识别域。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体还包括铰链跨膜域、细胞内共刺激域和细胞内主要刺激域。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中铰链跨膜域选自以下至少一组的氨基酸序列：来源于 T 细胞受体的 α 链、 β 链，CD3 δ ，CD3 ϵ ，CD3 γ ，CD3 ζ 链，CD4，CD5，CD8 α ，CD8 β ，CD9，CD16，CD22，CD28，CD32，CD33，CD34，CD35，CD37，CD45，CD64，CD80，CD86，CD137，ICOS，CD154，FAS，FGFR2B，OX40 或 VEGFR2 的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中铰链跨膜域来源于 CD8 α 。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中铰链跨膜域 CD8 α 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中细胞内共刺激域选自以下至少一种：为 CD2，CD4，CD5，CD8 α ，CD8 β ，CD27，CD28，CD30，CD40，4-1BB (CD137)，ICOS，OX40，LIGHT (CD258) 或 NKG2C。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中细胞内共刺激域来源于 4-1BB。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中细胞内共刺激域 4-1BB 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中铰链跨膜域和细胞内共刺激域来源于 CD28。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中铰链跨膜域和细胞内共刺激域 CD28 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中细胞内主要刺激域选自以下至少一种：CD3 δ ，CD3 ϵ ，CD3 γ ，CD3 ζ ，FcR β ，FcR γ ，CD5，CD66，CD22，CD79a 或 CD79b。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中细胞内主要刺激域来源于 CD3 ζ 。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中细胞内主要刺激域 CD3 ζ 的氨基酸序列如 SEQ

ID NO. 4 所示。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域为人源 CD7-L 细胞外结构域的部分或全部序列，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 的序列一致性，所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

在另一优选例中，所述工程化免疫细胞内还包括 CD7 阻断分子，CD7 阻断分子包括 CD7 结合域和胞内锚定域，CD7 阻断分子能够阻止 CD7 蛋白在细胞表面的转运与表达。

在另一优选例中，所述 CD7 阻断分子具体为通过 CD7 结合域连接胞内锚定域阻止 CD7 蛋白向细胞表面转运。

在另一优选例中，所述胞内锚定域为内质网滞留域、高尔基体滞留域或蛋白酶体定位域的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述胞内锚定域为内质网滞留域。

在另一优选例中，所述胞内锚定域内质网滞留域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 6 或 SEQ ID NO. 7 所示。

在另一优选例中，所述 CD7 结合域为人源 CD7-L 细胞外结构域的部分或全部序列，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 的序列一致性，所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

在另一优选例中，所述 CD7 结合域为抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域为抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv，或者与抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 至少具有 90% 的序列一致性，所述抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

在另一优选例中，所述工程化免疫细胞内还包括 CD7 阻断分子，CD7 阻断分子能够阻止 CD7 蛋白在细胞表面的转运与表达。

在另一优选例中，所述 CD7 阻断分子为通过 CD7 结合域连接胞内锚定域阻止 CD7 蛋白向细胞表面转运。

在另一优选例中，所述胞内锚定域为内质网滞留域、高尔基体滞留域或蛋白酶体定位域的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述 CD7 结合域为人源 CD7-L 细胞外结构域的部分或全部序列，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 的序列一致性，所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

在另一优选例中，所述工程化免疫细胞通过基因敲除技术去除 CD7 的基因表达。

在另一优选例中，所述敲除技术采用的基因组编辑工具为 TALENs 或 CRISPR/cas9。

在另一优选例中，所述细胞为 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、NK 或 NKT 细胞及诱导多能干细胞（iPSC）分化的 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、NK 或 NKT 细胞。

本发明的第二方面提供一种嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域，所述抗原识别域的序列包括部分或全部序列的人源 CD7-L 细胞外结构域，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 序列一致性；所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

本发明的第三方面提供一种上述所述的靶向 CD7 的抗原识别域在制备抗 CD7 阳性血液恶性肿瘤的免疫毒素中的应用。

本发明的第四方面提供一种编码上述所述的嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域的核酸分子。

在另一优选例中，所述编码嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域的核酸分子为 CD7BB-002；所述 CD7BB-002 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示。

本发明的第五方面提供一种重组载体，包含上述所述的编码嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域的核酸分子。

在另一优选例中，载体选自逆转录病毒、慢病毒或转座子。

本发明的第六方面提供一种上述所述的重组载体在制备工程化免疫细胞中的用途。

本发明的第七方面提供一种用于制备上述所述的工程化免疫细胞的 CD7 阻断分子，所述 CD7 阻断分子的 CD7 结合域包括部分或全部序列的人源 CD7-L 细胞外结构域，或与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 序列一致性的蛋白质。

本发明的第八方面提供一种编码上述所述的 CD7 阻断分子的核酸序列。

在另一优选例中，所述 CD7 阻断分子的核酸序列为 CD7-L-ER2.1；所述 CD7-L-ER2.1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

本发明的第九方面还提供一种用于制备上述第一方面所述的工程化免疫细胞的 CD7 阻断分子，所述 CD7 阻断分子的 CD7 结合域为抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv，或者与抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 至少具有 90% 的序列一致性的蛋白质。

本发明的第十方面提供一种编码第九方面所述的 CD7 阻断分子的核酸序列。所述 CD7 阻断分子的核酸分子的编码序列为 TH69-ER2.1；所述 TH69-ER2.1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示。

本发明的第十一方面提供一种重组载体，包括第八方面或第十方面提供的编码 CD7 阻断分子的核酸序列。

在另一优选例中，所述载体选自逆转录病毒、慢病毒或转座子。

本发明的第十二方面提供一种上述第十一方面提供的重组载体在制备工程化免疫细胞中的用途。

本发明的第十三方面提供一种编码同时含有第二方面所述的嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域以及 CD7 阻断分子（第七方面或第九方面提供的 CD7 阻断分子）的核酸分子。

本发明的第十四方面提供一种重组载体，包括第十三方面所述的核酸分子。

在另一优选例中，所述载体选自逆转录病毒、慢病毒、转座子。

在另一优选例中，所述重组载体包含如下序列：CD7BB-BL4-002 或 CD7BB-BL6-002，所述重组载体 CD7BB-BL4-002 或 CD7BB-BL6-002 的载体序列示意图分别如图 5 中 A 和 B 所示。

在另一优选例中，所述重组载体 CD7BB-BL4-002 由 CD7BB-002 和 TH69-ER2.1 通过 T2A 连接，所述重组载体的序列结构示意图如图 5 中 A 的（1）和（2）所示，所述 T2A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 16 所示。

在另一优选例中，所述重组载体 CD7BB-BL6-002 由 TH69BB-002 和 CD7-L-ER2.1 通过 T2A 连接，所述重组载体的序列结构示意图如图 5 中 B 的（3）和（4）所示，所述 T2A 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 16 所示。

在另一优选例中，所述载体的信号肽来源于 CD8 α 。

在另一优选例中，所述载体的 CD8 α 信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示。

在另一优选例中，所述载体的信号肽来源于 GM-CSF-R。

在另一优选例中，所述载体的 GM-CSF-R 信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 13 所示。

在另一优选例中，所述载体的 s c F v 的轻链和重链通过 (GGGGS)₃ 连接肽相连，所述连接肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 14 所示。

在另一优选例中，所述载体的 s c F v 的轻链和重链通过 Whitlow 连接肽相连，所述连接肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 15 所示。

在另一优选例中，所述载体中编码嵌合抗原受体的核酸分子和编码 CD7 阻断分子的核酸分子由内部核糖体进入位点（Internal Ribosome Entry Site, IRES）或核糖体密码子跳过位点（a ribosomal codon skipping site）连接。

在另一优选例中，所述载体的内部核糖体进入位点（Internal Ribosome Entry Site, IRES）来源于脑心肌炎病毒（Encephalomyocarditis virus, EMCV）或肠病毒（Enterovirus）。

在另一优选例中，所述载体的核糖体密码子跳过位点包含 2A 自裂解肽，2A 自裂解

肽可以选自口蹄疫病毒 F2A 肽(foot-and-mouth disease virus 2A peptide), 马甲鼻炎病毒 E2A 肽(equine rhinitis A virus 2A peptide), 猪破伤风病毒 P2A 肽(porcine tetsovirus-1 2A peptide)或 T2A 肽(thosea asigna virus 2A)。

在另一优选例中, 所述载体的 2A 自裂解肽来源于 T2A。

在另一优选例中, 所述载体的 T2A 自裂解肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 16 所示。

在另一优选例中, 所述载体的 2A 自裂解肽来源于 F2A。

在另一优选例中, 所述载体的 F2A 自裂解肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 17 所示。

本发明的第十五方面提供一种第十四方面所述的重组载体在制备工程化免疫细胞中的用途。

本发明的第十六方面提供一种试剂组合, 所述组合包括: (1) 上述第五方面所述的重组载体, 以及 (2) 上述第十一方面所述的载体。

本发明的第十七方面提供第十六方面所述的试剂组合在制备治疗 CD7 阳性血液恶性肿瘤的 CAR-T 或 CAR-NK 细胞中的用途。

本发明的第十八方面提供一种试剂组合, 所述组合包括: (1) 上述第五方面所述的载体, 以及 (2) 能够敲除细胞中的 CD7 基因的基因编辑工具。

在另一优选例中, 所述基因编辑工具为 TALENs 或 CRISPR/cas9。

本发明的第十九方面提供一种嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域序列, 所述序列为抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv, 或者与抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 至少具有 90% 的序列一致性, 所述抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

本发明的第二十方面提供一种编码第十九方面所述的嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域序列的核酸分子。

在另一优选例中, 第二十方面所述核酸分子编码序列为 TH69BB-002, 所述 TH69BB-002 的核酸分子序列如 SEQ ID NO. 18 所示。

本发明的第二十一方面提供一种重组载体, 包含第二十方面所述的核酸分子的序列。

在另一优选例中, 载体选自逆转录病毒、慢病毒、转座子。

本发明的第二十二方面提供一种试剂组合, 所述组合包括:

(1) 第二十一方面所述的重组载体,

以及 (2) 选择以下组合中的一种: 含有第八方面所述核酸序列的重组载体, 或能够敲除细胞中的 CD7 基因的基因编辑工具。

本发明的第二十三方面提供一种第二十二方面所述的试剂组合在制备治疗 CD7 阳性

血液恶性肿瘤的 CAR-T 或 CAR-NK 细胞中的用途。

与现有技术相比，本发明具有如下的有益效果：本发明是利用人源 CD7-L 取代抗体序列作为 CD7 特异性 CAR-T 细胞的抗原识别域，在靶向 CD7 CAR 中使用人源 CD7-L 作为抗原识别域的优点是可以防止宿主产生的细胞和体液反应，从而实现回输后 CAR-T 细胞在体内的长期生存和更好的疗效。

CD7 是一种跨膜糖蛋白，通常在大多数外周 T 细胞和 NK 细胞及其前体表达。病变的 T 细胞和 NK 细胞本身会高密度表达 CD7；缺乏 CD7 的 T 细胞在很大程度上表现出不受干扰的发育、稳态和保护功能；由于 CD7 对外周血 T 细胞功能的影响不明显，因此 CD7 是一个很有前途的 CAR-T 细胞治疗靶点。由于正常和病变的 T 细胞本身都会表达 CD7，所以在进行嵌合抗原受体（Chimeric Antigen Receptor, CAR）T 细胞制备时，需要同时考虑两方面的因素：1、对正常 T 细胞进行基因修饰，使 T 细胞表达靶向 CD7 的嵌合抗原受体（CAR-T），以杀伤 CD7 阳性的病变 T 细胞；2、为避免 CAR-T 细胞发生因互相识别产生的自杀现象，需要阻断 CAR-T 细胞本身的 CD7 表达。因此，本发明的技术方案既对正常 T 细胞进行基因修饰使 T 细胞表达 CD7 特异性 CAR，同时又兼顾了对正常 T 细胞内部的 CD7 表达进行阻断。本发明的申请人经过大量的实验，不断修正验证实验参数，最终获得本发明之技术方案，本发明的技术方案能够对正常 T 细胞进行基因修饰使 T 细胞表达 CD7 特异性 CAR，同时能够对正常 T 细胞的 CD7 表达进行阻断，实现了意想不到的技术效果。

附图说明

通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述，本发明的其它特征、目的和优点将会变得更加明显：

图 1 为建立表达 CD7 的 K562 和 HeLa 细胞株。采用携带 CD7 cDNA 的慢病毒载体转导 K562 和 HeLa 细胞株，并通过流式分选获得 K562-CD7 和 HeLa-CD7。图示为流式检测 CD7 在 K562 和 HeLa 细胞株上的表达。

图 2 为 CD7-CAR 和 CD7 阻断分子的载体结构示意图。A 和 B 为两种第二代 CD7 特异性 CAR。其中，A、CD7BB-002 的抗原识别区为 CD7-L；B、TH69BB-002 的抗原识别区为单克隆抗体 TH69 的 scFv；两种 CAR 载体具有相同的 CD8a 铰链跨膜区，4-1BB 共刺激域和 CD3 ζ 为 T 细胞刺激域。单克隆抗体 TH69 的 scFv 采用了 CD8 α 信号肽，其轻链（VL）和重链（VH）可变区的连接肽为（GGGGS）₃。C 和 D 为两种 CD7 阻断分子。其中，C、CD7-L-ER2.1 的 CD7 结合域为 CD7-L；D、TH69-ER2.1 的 CD7 结合域

为 TH69 的 scFv, 其采用了 CD8 α 信号肽, 其轻链 (VL) 和重链 (VH) 可变区的连接肽为 (GGGGS)₃; 两种 CD7 阻断分子具有相同的 ER 内质网滞留域。

图 3 为 CD7-CAR-T 细胞的流式检测和体外杀伤实验结果示意图。A、流式检测 CD7BB-002 和 TH69BB-002 两种靶向 CD7 的 CAR 在 T 细胞上的表达; B、采用 iCELLigence™ 实时细胞分析仪 (Agilent Biosciences, Inc.) 进行体外杀伤实验; “T cell control” 为未转导的 T 细胞对照, “CD7BB-002” 为表达 CD7BB-002 的 CAR-T 细胞, “TH69BB-002” 为表达 TH69BB-002 的 CAR-T 细胞。结果表明这两种 CAR-T 细胞都能够靶向 CD7 进行肿瘤细胞杀伤。CD7-CAR-T 细胞的流式检测试剂为 CD7-CAR-GREEN; 细胞体外杀伤实验采用的靶细胞为 HeLa-CD7。

图 4 为采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术阻断 CD7 在细胞膜上的表达结果示意图。采用携带可与 CD7 结合的配体 CD7-L 或 TH69 scFV cDNA, 并连接 ER 滞留域的慢病毒载体 CD7-L-ER2.1 和 TH69-ER2.1 转导 K562-CD7 细胞株 (A) 或 T 细胞 (B), 并进行 CD7 的流式检测。结果表明这两种 CD7 表达阻断分子都能够有效减少 CD7 在细胞表面的表达。

图 5 为采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术构建靶向 CD7 CAR 的慢病毒载体结构示意图。A 和 B 为两种采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术构建的 CD7-CAR 慢病毒载体。其中, A、CD7BB-BL4-002, (1) 为靶向 CD7 的嵌合抗原受体示意图, 其抗原识别区为 CD7-L; (2) 为 CD7 阻断分子示意图, 起到 CD7 表达阻断作用的 CD7 结合域为单克隆抗体 TH69 的 scFv; B、CD7BB-BL6-002, (3) 为靶向 CD7 的嵌合抗原受体示意图, 其抗原识别区为单克隆抗体 TH69 的 scFv; (4) 为 CD7 阻断分子示意图, 起到 CD7 表达阻断作用的 CD7 结合域为 CD7-L; 两种 CAR 载体具有相同的 CD8 α 铰链跨膜区、4-1BB 共刺激域、CD3 ζ T 细胞刺激域和 ER 内质网滞留域。单克隆抗体 TH69 的 scFv 采用了 CD8 α 信号肽, 其轻链和重链可变区的连接肽为 (GGGGS)₃。

图 6、采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术后 CD7-CAR-T 细胞可以克服自杀现象有效地杀伤靶细胞。(a) 中, A、流式检测靶向 CD7 的四种不同 CAR 在 T 细胞上的表达; B、流式检测 CD7 在上述四种不同 CAR-T 细胞上的表达; 所用载体分别为: CD7BB-002、TH69BB-002 和采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术构建的 CD7BB-BL4-002 和 CD7BB-BL6-002; 虚线为未转导的 T 细胞对照, 实线为靶向 CD7 的 CAR 转导过的 T 细胞。(b) 中, C、上述四种不同 CAR-T 细胞在体外培养的增殖观察; D、采用 iCELLigence™ 实时细胞分析仪 (Agilent Biosciences, Inc.) 进行体外杀伤实验。T cell control 为未转导的 T 细胞对照, CD7BB-002、TH69BB-002、CD7BB-BL4-002

和 CD7BB-BL6-002 均为靶向 CD7 的 CAR-T 细胞，其中 CD7BB-BL4-002 和 CD7BB-BL6-002 为采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术的 CD7-CAR-T 细胞。CD7-CAR-T 细胞的流式检测试剂为 CD7-CAR-GREEN；细胞体外杀伤实验采用的靶细胞为 HeLa-CD7。

图 7、采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术的 CD7-CAR-T 细胞体内肿瘤杀伤实验结果图。采用雌性 NSG 小鼠，D0 天注射肿瘤细胞（携带荧光素酶的肿瘤细胞株，CCRF-CEM-Luc， 5×10^5 /mouse，i.v.）。A、1. 阴性对照组；2 和 3. 分别为回输 T 细胞对照组和靶向 CD7 的 CD7BB-BL4-002 CAR-T 细胞治疗组。在注射肿瘤细胞后 D3 天，分别静脉注射 T 细胞或 CD7BB-BL4-002 CAR-T 细胞（ 8×10^6 /mouse），之后每 7 天进行小鼠活体荧光素酶成像观察。B、回输 T 细胞对照组（control group）和 CD7BB-BL4-002 CAR-T 细胞治疗组（treatment group）小鼠的生存曲线。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明，但不以任何形式限制本发明。应当指出的是，对本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变化和改进。这些都属于本发明的保护范围。

本发明将 SECTM1 (K12) 的胞外域作为 CD7 的抗原识别域，用于开发针对 CD7 阳性血液恶性肿瘤的 CAR-T 细胞治疗和免疫毒素。在此专利申请中，使用 CD7-L 代替 SECTM1 或 K12。CD7-L 基因最初被鉴定为在人类 17 号染色体上 CD7 基因的 5' 端。人类 CD7-L 蛋白主要表达于脾脏、前列腺、睾丸、小肠和外周血白细胞，CD7-L 的一个特点是编码一种跨膜蛋白，细胞外结构域类似于免疫球蛋白样的结构域。CD7-L 于 2000 年被克隆，并发现它是 CD7 的结合蛋白。

为了确定 CD7-L 蛋白的结合作用，之前的研究采用了 CD7-L 的细胞外域（氨基酸 1-145）与人 IgG1 的 Fc 部分的融合蛋白。流式细胞术实验表明，CD7-L-Fc 融合蛋白可在人源 T 细胞和 NK 细胞上检测到高水平结合。几种靶向 CD7 的抗体不同程度地阻断了 CD7-L-Fc 融合蛋白与细胞的结合。反之亦然，CD7-L-Fc 融合蛋白可以阻断这些 CD7 单克隆抗体与 CD7 的结合，表明 CD7-L-Fc 可与细胞上的 CD7 受体结合。将 CD7-L-Fc 融合蛋白进行放射标记并用于结合实验，以确定其与 Jurkat 细胞（人类 T 细胞白血病细胞系）或 KG-1 细胞（人类粒细胞白血病细胞系）的亲和力，这两种细胞都表达 CD7。CD7-L-Fc 对人 CD7 的结合亲和力（ K_a ）约在 $1 \times 10^8 M^{-1}$ 范围

内。由于 CD7 被认为是 T 细胞恶性肿瘤的良好标记物，已有研究通过抗人 CD7 单克隆抗体偶联蓖麻毒素或皂甙制造免疫毒素。

因此，本专利申请在构建靶向 CD7 的嵌合抗原受体及其 CD7 的阻断分子中使用 CD7-L 的胞外结构域，用于发展 CD7-CAR-T 或 CAR-NK 细胞治疗 T 细胞恶性肿瘤。同时，本专利申请还将 CD7-L 的胞外区域与毒素相结合，并将这些结合物用作抗 T 细胞恶性肿瘤的免疫毒素，因其免疫原性低于基于抗体的结合物，因此可能具有更长的半衰期。

实施例 1、采用 CD7-L 为抗原识别域的 CAR-T 细胞可以有效地识别 CD7 肿瘤抗原；

本实施例首先构建了以 CD7-L 或 CD7 特异性单克隆抗体 TH69 的 scFv 为抗原识别区的两种第二代 CAR 慢病毒载体，CD7BB-002 和 TH69BB-002（图 2A、B）。通过 CAR 慢病毒载体转导获得 CAR-T 细胞，并采用 CD7 和报告基因 eGFP 融合蛋白生产的 CD7-CAR-T 细胞的流式检测试剂（CD7-CAR-GREEN）进行流式检测（图 3A）。结果证明 CD7-CAR-GREEN 可以有效地用来检测这两种靶向 CD7 的 CAR-T 细胞，说明 CD7-L 与单克隆抗体 TH69 的 scFv 均可作为 CAR-T 细胞的 CD7 特异性抗原识别区。

实施例 2、靶向 CD7 的 CAR-T 细胞可以有效地杀伤表达 CD7 阳性的肿瘤细胞；

本实施例首先采用携带 CD7 cDNA 的慢病毒载体转导 K562 和 HeLa 细胞株，并通过流式分选获得表达 CD7 的 K562-CD7 和 HeLa-CD7 细胞株（图 1）。通过 CAR 慢病毒载体转导获得 CD7BB-002 和 TH69BB-002 两种靶向 CD7 的 CAR-T 细胞，并采用 iCELLigence™ 实时细胞分析仪（Agilent Biosciences, Inc.）进行体外杀伤实验（图 3B）。结果证明采用 CD7-L 为抗原识别区的 CD7BB-002 与采用单克隆抗体 TH69 scFv 为抗原识别区的 TH69BB-002 均可有效地识别 CD7 抗原，并在 CD7 阳性的 HeLa-CD7 靶细胞杀伤上具有同等效果。

实施例 3、Intrablock™ CD7 表达阻断技术可以有效地阻断 CD7 在细胞膜上的表达；

本实施例首先构建了以 CD7-L 或 CD7 特异性单克隆抗体 TH69 的 scFv 为 CD7 结合域，并连接 ER 滞留域的慢病毒载体，CD7-L-ER2.1 和 TH69-ER2.1（图 2C、D）。通过慢病毒载体转导 K562-CD7 细胞株或原代 T 细胞，并进行流式检测对 CD7 表达阻断技术进行评估。结果表明 TH69-ER2.1 和 CD7-L-ER2.1 均可有效地阻断 CD7 在 K562-CD7 细胞株（图 4A）或 T 细胞（图 4B）上的表达，说明 TH69-ER2.1 和 CD7-L-ER2.1 均可在细胞内与 CD7 结合并将其滞留在内质网。因此，这一 Intrablock™ CD7 表达阻断技术可用来阻断 CD7

在细胞上的表达、防止靶向 CD7 CAR-T 细胞的自杀现象。

实施例 4、Intrablock™ CD7 表达阻断技术可用来克服 CD7-CAR-T 细胞的自杀现象和有效地杀伤 CD7 阳性的靶细胞；

本实施例首先构建了具有 Intrablock™ CD7 表达阻断功能，同时靶向 CD7 的 CAR 慢病毒载体，CD7BB-BL4-002 和 CD7BB-BL6-002（图 5A、B）。由于用作 CAR-T 细胞制备的 T 细胞上本身就表达 CD7，所以在靶向 CD7 的 CAR-T 细胞制备时会发生自杀现象，造成 CAR-T 细胞的制备困难。如图 6 所示，靶向 CD7 的两种 CAR-T 细胞，CD7BB-002 和 TH69BB-002 均可有效地被 CD7-CAR-GREEN 所识别（图 6A），并能有效地杀伤 CD7 阳性的 HeLa-CD7 靶细胞（图 6D）。但是，这两种靶向 CD7 的 CAR-T 细胞在体外培养过程中均会发生严重的自杀现象，造成 CAR-T 细胞在体外扩增和制备上的困难（图 6C）。采用实施例 3 所描述的 Intrablock™ CD7 表达阻断技术，进行靶向 CD7 的 CD7BB-BL4-002 和 CD7BB-BL6-002 慢病毒载体构建，并用来制备 CAR-T 细胞。这两种采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术制备的 CAR-T 细胞，CD7BB-BL4-002 和 CD7BB-BL6-002 均可有效地被 CD7-CAR-GREEN 所识别（图 6A）、保持 HeLa-CD7 靶细胞的杀伤能力（图 6D），同时能够阻断 CD7 的表达（图 6B）、克服在 CAR-T 细胞制备中的自杀现象（图 6C），使靶向 CD7 特异性 CAR-T 细胞的体外扩增和制备成为可能。

实施例 5、在动物模型上验证采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术的 CD7-CAR-T 细胞在体内的肿瘤杀伤功能；

本实施例采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术的 CD7BB-BL4-002 CAR-T 细胞进行了体内肿瘤杀伤实验（图 7）。采用 6-8 周的雌性 NSG 小鼠，D0 天尾静脉注射携带荧光素酶的肿瘤细胞株，CCRF-CEM-Luc， 5×10^5 /mouse，i.v.。在注射肿瘤细胞后 D3 天，分别静脉注射 T 细胞（回输 T 细胞对照组）或 CD7BB-BL4-002 CAR-T 细胞（ 8×10^6 /mouse）（CAR-T 细胞治疗组）。D0 天后每 7 天进行小鼠活体荧光素酶成像观察。结果证明采用 Intrablock™ CD7 表达阻断技术的 CD7BB-BL4-002 CAR-T 细胞可以有效地在这一小鼠肿瘤模型上杀伤肿瘤，并延长了 CAR-T 细胞治疗组小鼠的生存期（如图 7 中 A、B 所示）。

与现有技术相比，本发明具有如下的有益效果：本发明是利用人源 CD7-L 取代抗体序列作为 CD7 特异性 CAR-T 细胞的抗原识别域，在靶向 CD7 CAR 中使用人源 CD7-L 作为抗原识别域的优点是可以防止宿主产生的细胞和体液反应，从而实现回输后 CAR-T 细胞在体内的长期生存和更好的疗效。CD7 是一种跨膜糖蛋白，通常在

大多数外周 T 细胞和 NK 细胞及其前体表达。病变的 T 细胞和 NK 细胞本身会高密度表达 CD7；缺乏 CD7 的 T 细胞在很大程度上表现出不受干扰的发育、稳态和保护功能；由于 CD7 对外周血 T 细胞功能的影响不明显，因此 CD7 是一个很有前途的 CAR-T 细胞治疗靶点。由于正常和病变的 T 细胞本身都会表达 CD7，所以在进行嵌合抗原受体（Chimeric Antigen Receptor, CAR）T 细胞制备时，需要同时考虑两方面的因素：1、对正常 T 细胞进行基因修饰，使 T 细胞表达靶向 CD7 的嵌合抗原受体（CAR-T），以杀伤 CD7 阳性的病变 T 细胞；2、为避免 CAR-T 细胞发生因相互识别产生的自杀现象，需要阻断 CAR-T 细胞本身的 CD7 表达。因此，本发明的技术方案既对正常 T 细胞进行基因修饰使 T 细胞表达 CD7 特异性 CAR，同时又兼顾了对正常 T 细胞内部的 CD7 表达进行阻断。本发明的申请人经过大量的实验，不断修正验证实验参数，最终获得本发明之技术方案，本发明的技术方案能够对正常 T 细胞进行基因修饰使 T 细胞表达 CD7 特异性 CAR，同时能够对正常 T 细胞的 CD7 表达进行阻断，实现了意想不到的技术效果。

以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是，本发明并不局限于上述特定实施方式，本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变化或修改，这并不影响本发明的实质内容。Intrablock 系商标标识，也不构成对本发明技术方案的任何限制或缩限。在不冲突的情况下，本申请的实施例和实施例中的特征可以任意相互组合。

权利要求书

1、一种工程化免疫细胞，其中包括编码嵌合抗原受体的多核苷酸序列，其特征是，所述嵌合抗原受体包括靶向 CD7 的抗原识别域。

2、如权利要求 1 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述嵌合抗原受体还包括铰链跨膜域、细胞内共刺激域和细胞内主要刺激域。

3、如权利要求 2 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述嵌合抗原受体中铰链跨膜域包括选自以下组合中的至少一种氨基酸序列：来源于 T 细胞受体的 α 链、 β 链，CD3 δ ，CD3 ϵ ，CD3 γ ，CD3 ζ 链，CD4，CD5，CD8 α ，CD8 β ，CD9，CD16，CD22，CD28，CD32，CD33，CD34，CD35，CD37，CD45，CD64，CD80，CD86，CD137，ICOS，CD154，FAS，FGFR2B，OX40 或 VEGFR2 的氨基酸序列。

4、如权利要求 2 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述嵌合抗原受体中细胞内共刺激域包括选自以下组中的至少一种：为 CD2，CD4，CD5，CD8 α ，CD8 β ，CD27，CD28，CD30，CD40，4-1BB (CD137)，ICOS，OX40，LIGHT (CD258) 或 NKG2C。

5、如权利要求 2 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述嵌合抗原受体中细胞内主要刺激域包括选自以下组合中的至少一种：CD3 δ ，CD3 ϵ ，CD3 γ ，CD3 ζ ，FcR β ，FcR γ ，CD5，CD66d，CD22，CD79a 或 CD79b。

6、如权利要求 1 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域为人源 CD7-L 细胞外结构域的部分或全部序列，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 的序列一致性，所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

7、如权利要求 6 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述工程化免疫细胞内还包括 CD7 阻断分子，CD7 阻断分子能够阻止 CD7 蛋白在细胞表面的转运与表达。

8、如权利要求 7 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述 CD7 阻断分子具体为通过 CD7 结合域连接胞内锚定域阻止 CD7 蛋白向细胞表面转运。

9、如权利要求 8 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述胞内锚定域为内质网滞留域、高尔基体滞留域或蛋白酶体定位域的氨基酸序列。

10、如权利要求 8 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述 CD7 结合域为人源 CD7-L 细胞外结构域的部分或全部序列，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 的序列一致性的蛋白质，所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

11、如权利要求 8 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述 CD7 结合域为抗 CD7 的

单克隆抗体 TH69 的 scFv。

12、如权利要求 1 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域为抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv，或者与抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 至少具有 90% 的序列一致性，所述抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

13、如权利要求 12 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述工程化免疫细胞内还包括 CD7 阻断分子，CD7 阻断分子能够阻止 CD7 蛋白在细胞表面的转运与表达。

14、如权利要求 12 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述 CD7 阻断分子为通过 CD7 结合域连接胞内锚定域阻止 CD7 蛋白向细胞表面转运。

15、如权利要求 14 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述胞内锚定域为内质网滞留域、高尔基体滞留域或蛋白酶体定位域的氨基酸序列。

16、如权利要求 14 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述 CD7 结合域为人源 CD7-L 细胞外结构域的部分或全部序列，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 的序列一致性，所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

17、如权利要求 6 或 12 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述工程化免疫细胞通过基因敲除技术去除 CD7 的基因表达。

18、如权利要求 17 所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述敲除技术采用的基因组编辑工具为 TALENs 或 CRISPR/cas9。

19、如权利要求 1-16、18 任一项所述的工程化免疫细胞，其特征是，所述细胞为 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、NK 或 NKT 细胞、及诱导多能干细胞分化的 T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞、NK 或 NKT 细胞。

20、一种嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域，其特征是，所述抗原识别域的序列包括部分或全部序列的人源 CD7-L 细胞外结构域，或者与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 序列一致性；所述人源 CD7-L 细胞外结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

21、一种如权利要求 20 所述的靶向 CD7 的抗原识别域在制备抗 CD7 阳性血液恶性肿瘤的免疫毒素中的应用。

22、一种编码如权利要求 20 所述的嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域的核酸分子。

23、根据权利要求 22 所述的编码靶向 CD7 的抗原识别域的核酸分子，其特征是，所述核酸分子编码序列为 CD7BB-002，所述 CD7BB-002 的核酸分子序列如 SEQ ID NO. 9

所示。

24、一种重组载体，其特征是，包含如权利要求 22 所述的编码嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域的核酸分子。

25、如权利要求 24 所述的重组载体，其特征是，载体选自逆转录病毒、慢病毒或转座子。

26、一种如权利要求 24 所述的重组载体在制备工程化免疫细胞中的用途。

27、一种用于制备权利要求 1-16 任一项所述的工程化免疫细胞的 CD7 阻断分子，其特征是，所述 CD7 阻断分子的 CD7 结合域包括部分或全部序列的人源 CD7-L 细胞外结构域，或与人源 CD7-L 细胞外结构域至少具有 90% 序列一致性的蛋白质。

28、一种编码权利要求 27 所述的 CD7 阻断分子的核酸序列。

29、如权利要求 28 所述的编码 CD7 阻断分子的核酸序列，其特征是，所述核酸序列为 CD7-L-ER2.1，所述 CD7-L-ER2.1 的核酸分子序列如 SEQ ID NO.10 所示。

30、一种用于制备权利要求 1-16 任一项所述的工程化免疫细胞的 CD7 阻断分子，其特征是，所述 CD7 阻断分子的 CD7 结合域为抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv，或者与抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 至少具有 90% 的序列一致性。

31、一种编码权利要求 30 所述的 CD7 阻断分子的核酸序列，其特征是，所述 CD7 阻断分子的核酸分子的编码序列为 TH69-ER2.1，所述 TH69-ER2.1 的核酸分子序列如 SEQ ID NO.11 所示。

32、一种重组载体，其特征是，包括如权利要求 29 或 31 所述的核酸序列。

33、根据权利要求 32 所述的重组载体，其特征是，所述载体选自逆转录病毒、慢病毒或转座子。

34、一种如权利要求 32 所述的重组载体在制备工程化免疫细胞中的用途。

35、一种核酸分子，其特征是，包括：

(1) 编码含有如权利要求 20 所述的抗原识别域序列的核酸序列；

以及 (2) 编码如权利要求 27 或权利要求 30 所述的 CD7 阻断分子的核酸序列。

36、一种重组载体，其特征是，包括如权利要求 35 所述的核酸分子。

37、根据权利要求 36 所述的重组载体，其特征是，所述载体选自逆转录病毒、慢病毒、转座子。

38、如权利要求 36 所述的重组载体，其特征是，所述载体中编码嵌合抗原受体的核酸分子和编码 CD7 阻断分子的核酸分子由内部核糖体进入位点或核糖体密码子跳过位点连接。

39、如权利要求 36 所述的重组载体，其特征是，所述载体的内部核糖体进入位点来源于脑心肌炎病毒或肠病毒。

40、如权利要求 36 所述的重组载体，其特征是，所述载体的核糖体密码子跳过位点包含 2A 自裂解肽，2A 自裂解肽可以选自口蹄疫病毒 F2A 肽，马甲鼻病毒 E2A 肽，猪破伤风病毒 P2A 肽或 T2A 肽。

41、一种如权利要求 36 所述的重组载体在制备工程化免疫细胞中的用途。

42、一种试剂组合，其特征在于，所述组合包括：(1) 如权利要求 24 所述的重组载体，以及 (2) 如权利要求 32 所述的重组载体。

43、一种如权利要求 42 所述的试剂组合在制备治疗 CD7 阳性血液恶性肿瘤的 CAR-T 或 CAR-NK 细胞中的用途。

44、一种试剂组合，其特征是，所述组合包括：(1) 如权利要求 24 所述的重组载体，以及 (2) 能够敲除细胞中的 CD7 基因的基因编辑工具。

45、如权利要求 44 所述的试剂组合，其特征是，所述基因编辑工具为 TALENs 或 CRISPR/cas9。

46、一种嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域序列，其特征在于，所述序列为抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv，或者与抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 至少具有 90% 的序列一致性，所述抗 CD7 的单克隆抗体 TH69 的 scFv 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

47、一种编码如权利要求 46 所述的嵌合抗原受体中靶向 CD7 的抗原识别域序列的核酸分子。

48、如权利要求 47 所述的核酸分子，其特征是，所述核酸分子编码序列为 TH69BB-002，所述 TH69BB-002 的核酸分子序列如 SEQ ID NO. 18 所示。

49、一种重组载体，其特征在于，包含如权利要求 47 所述的核酸分子的序列。

50、如权利要求 49 所述的重组载体，其特征是，载体选自逆转录病毒、慢病毒、转座子。

51、一种试剂组合，其特征在于，所述组合包括：

(1) 如权利要求 49 所述的重组载体，

以及 (2) 选择以下组合中的一种：含有权利要求 29 所述核酸序列的重组载体，或能够敲除细胞中的 CD7 基因的基因编辑工具。

52、一种如权利要求 51 所述的试剂组合在制备治疗 CD7 阳性血液恶性肿瘤的 CAR-T 或 CAR-NK 细胞中的用途。