(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 7 月 21 日 (21.07.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/151851 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 5/10 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/133817

(22) 国际申请日: 2021 年 11 月 29 日 (29.11.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110036169.2 2021年1月12日 (12.01.2021) CN

(71) 申请人: 上海雅科生物科技有限公司(**SHANGHAI YAKE BIOTECHNOLOGY LTD.**) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区国权北路1600号湾谷科技园A8幢204室, Shanghai 200438 (CN)。

(72) 发明人: 张鸿声 (**CHANG, Alex Hongsheng**); 中国上海市杨浦区国权北路1600号湾谷科技园A8幢204室, Shanghai 200438 (CN)。

(74) 代理人: 上海段和段律师事务所 (**DUAN&DUAN LAW FIRM**); 中国上海市浦东新区金科路2966号2幢406室郭国中, Shanghai 200336 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) **Title:** CD7-TARGETED ENGINEERED IMMUNE CELL, CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR, CD7 BLOCKING MOLECULE AND USE THEREOF

(54) **发明名称:** 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

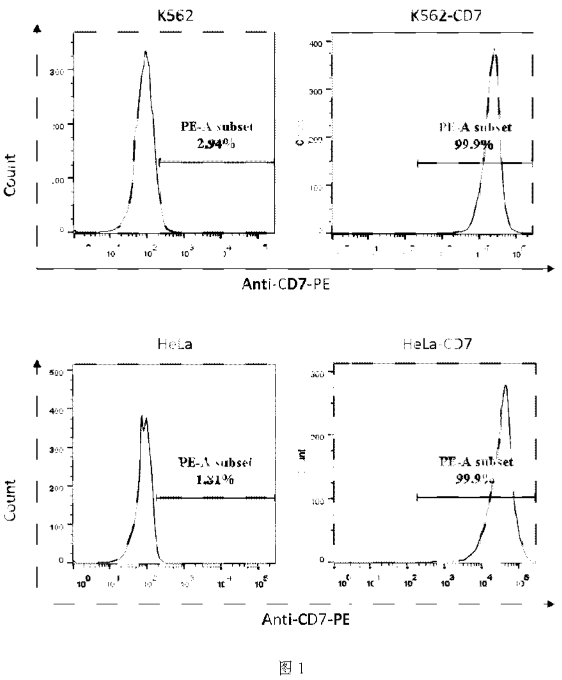


图 1

(57) **Abstract:** A CD7-targeted engineered immune cell, a chimeric antigen receptor, a CD7 blocking molecule and the use thereof. A natural ligand of human CD7 is used for substituting for an antibody sequence to serve as an antigen recognition domain of a CD7-specific CAR-T or CAR-NK cell. The advantage of using human CD7 as the antigen recognition domain in the CD7-specific CAR is that cellular and humoral reactions produced by a host can be prevented, thereby achieving long-term durability and better efficacy of the CAR-T cell.

(57) **摘要:** 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。利用人源CD7的天然配体取代抗体序列作为CD7特异性CAR-T或CAR-NK细胞的抗原识别域。在CD7特异性CAR中使用人源CD7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CAR-T细胞的长期持久性和更好的疗效。

WO 2022/151851 A1

[见续页]

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

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（WTI）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 Zince 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，CD3δ，CD3ε，CD3γ，CD3ζ链，CD4，CD5，CD8α，CD8β，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 CD8α。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中铰链跨膜域 CD8α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，CD8α，CD8β，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：CD3δ，CD3ε，CD3γ，CD3ζ，FcRβ，FcRγ，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 CD3ζ。

在另一优选例中，所述嵌合抗原受体中细胞内主要刺激域 CD3ζ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、γδT细胞、NK或NKT细胞及诱导多能干细胞（iPSC）分化的T细胞、γδT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CD8α。

在另一优选例中，所述载体的CD8α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ｓｃＦｖ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ｓｃＦｖ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）or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 teschovirus-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CD3ζ为T细胞刺激域。单克隆抗体TH69的scFv采用了CD8α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 CD8α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 CD8α铰链跨膜区，4-1BB 共刺激域、CD3ζ 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 CD8α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，5x10E5/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 （8x10E6/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（Ka）约在 $1x10^{8}M^{-1}$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，5x10E5/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 （8x10E6/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，CD3δ，CD3ε，CD3γ,CD3ζ链，CD4，CD5，CD8α，CD8β，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，CD8α，CD8β，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：CD3δ，CD3ε，CD3γ，CD3ζ，FcRβ，FcRγ，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，其特征在于，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，其特征在于，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、γδT 细胞、NK 或 NKT 细胞、及诱导多能干细胞分化的 T 细胞、γδT 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，其特征在于，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，其特征在于，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，马甲鼻炎病毒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。

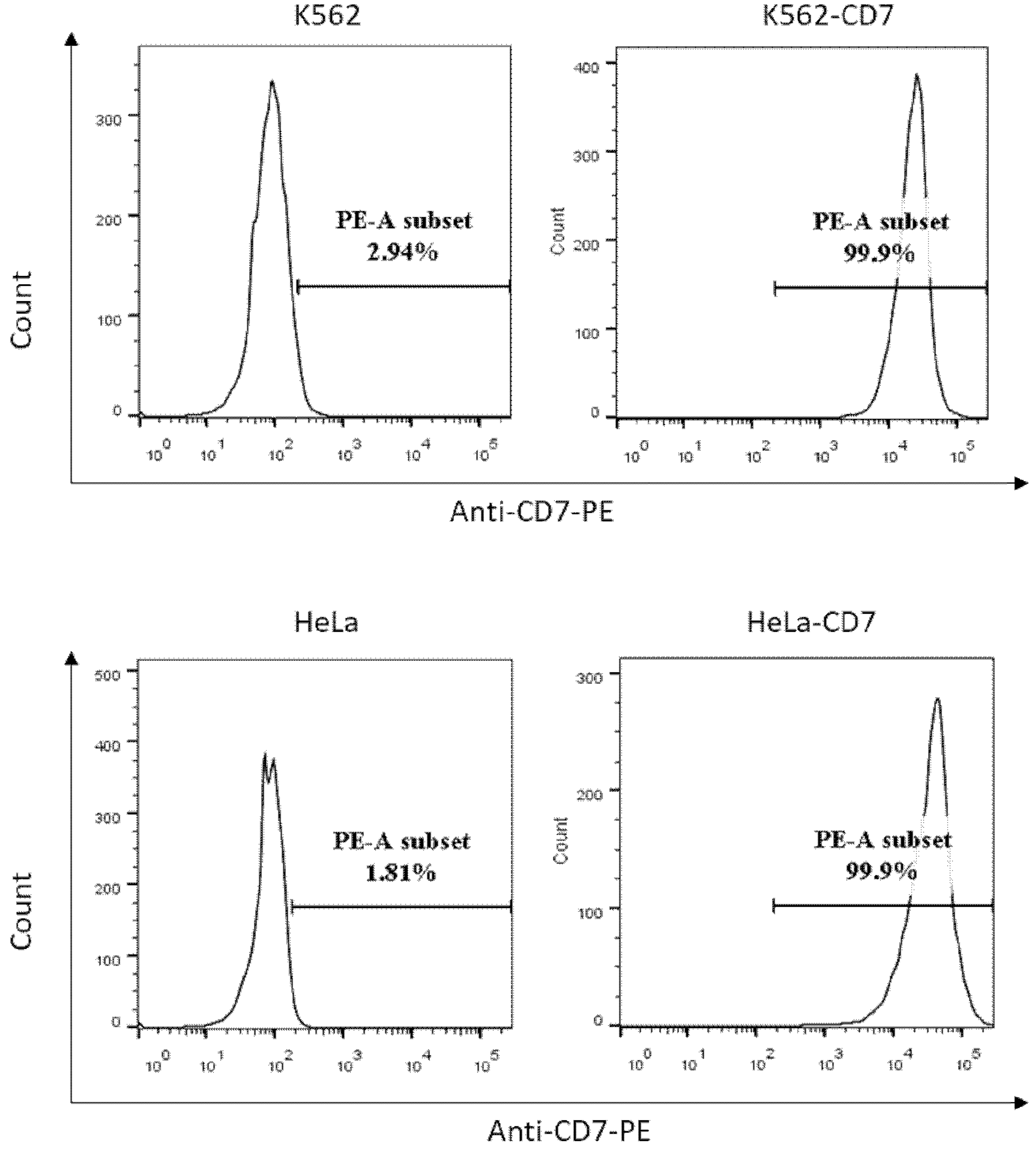

K562
K562-CD7
Count
PE-A subset
2.94%
PE-A subset
99.9%
Anti-CD7-PE
HeLa
HeLa-CD7
Count
PE-A subset
1.81%
PE-A subset
99.9%
Anti-CD7-PE

图 1

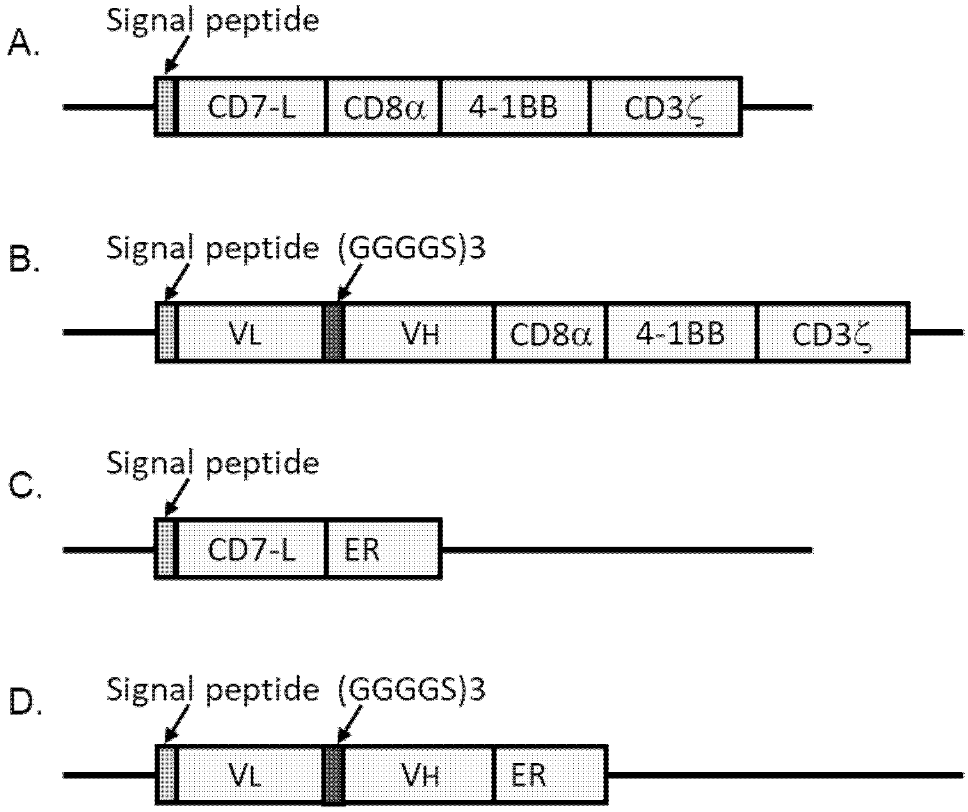

A.
Signal peptide
CD7-L
CD8α
4-1BB
CD3ζ
B.
Signal peptide
(GGGGS)3
VL
VH
CD8α
4-1BB
CD3ζ
C.
Signal peptide
CD7-L
ER
D.
Signal peptide
(GGGGS)3
VL
VH
ER

图 2

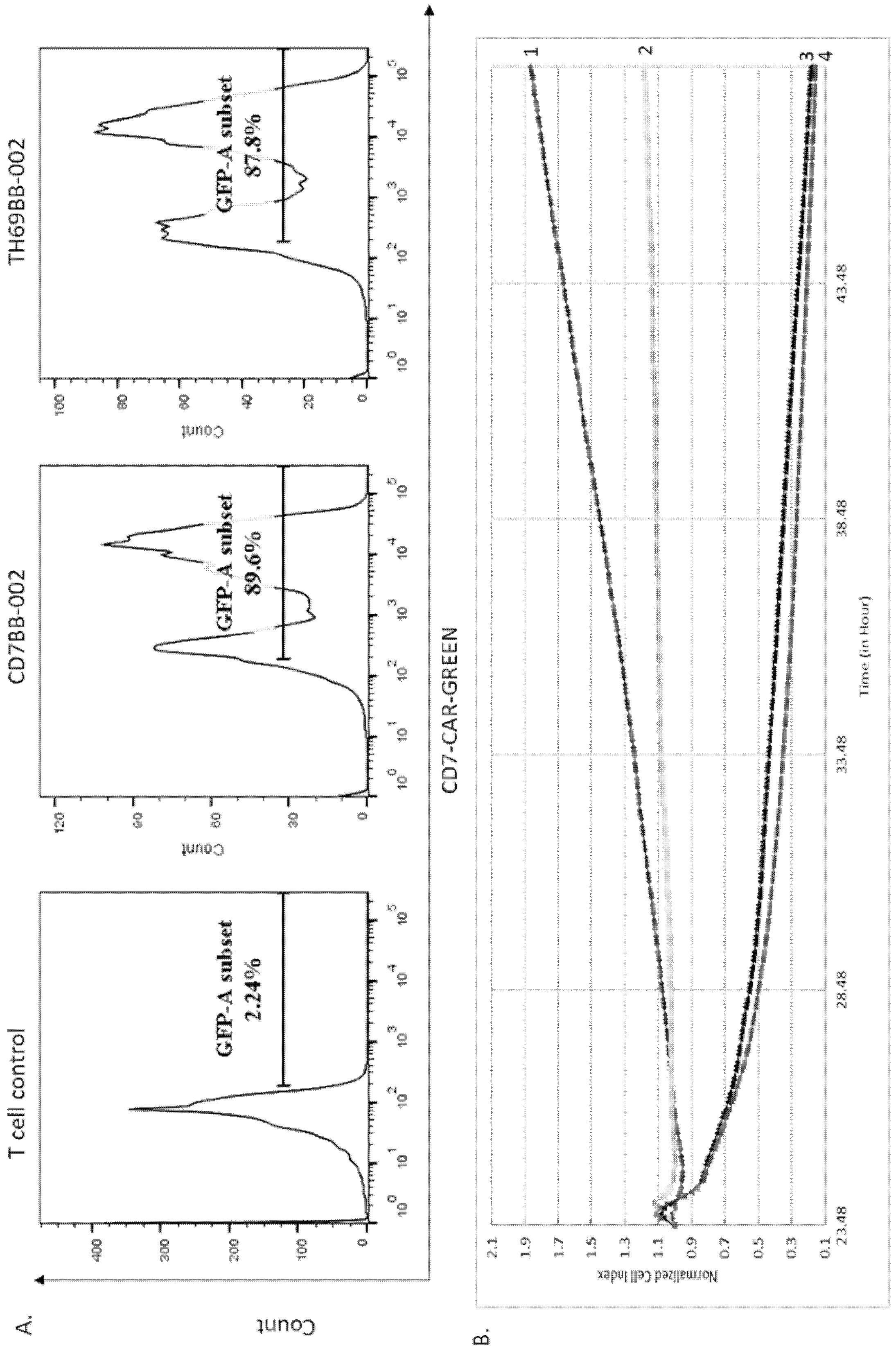

A.
T cell control
CD7BB-002
TH69BB-002
GFP-A subset
2.24%
GFP-A subset
89.6%
GFP-A subset
87.8%
Count
CD7-CAR-GREEN
B.
Normalized Cell Index
Time (in Hour)
E:T=1:1
1 Hela-CD7 only
2 T cell control
3 CD7BB-002(87.8%)
4 TH69BB-002(87.8%)

图 3

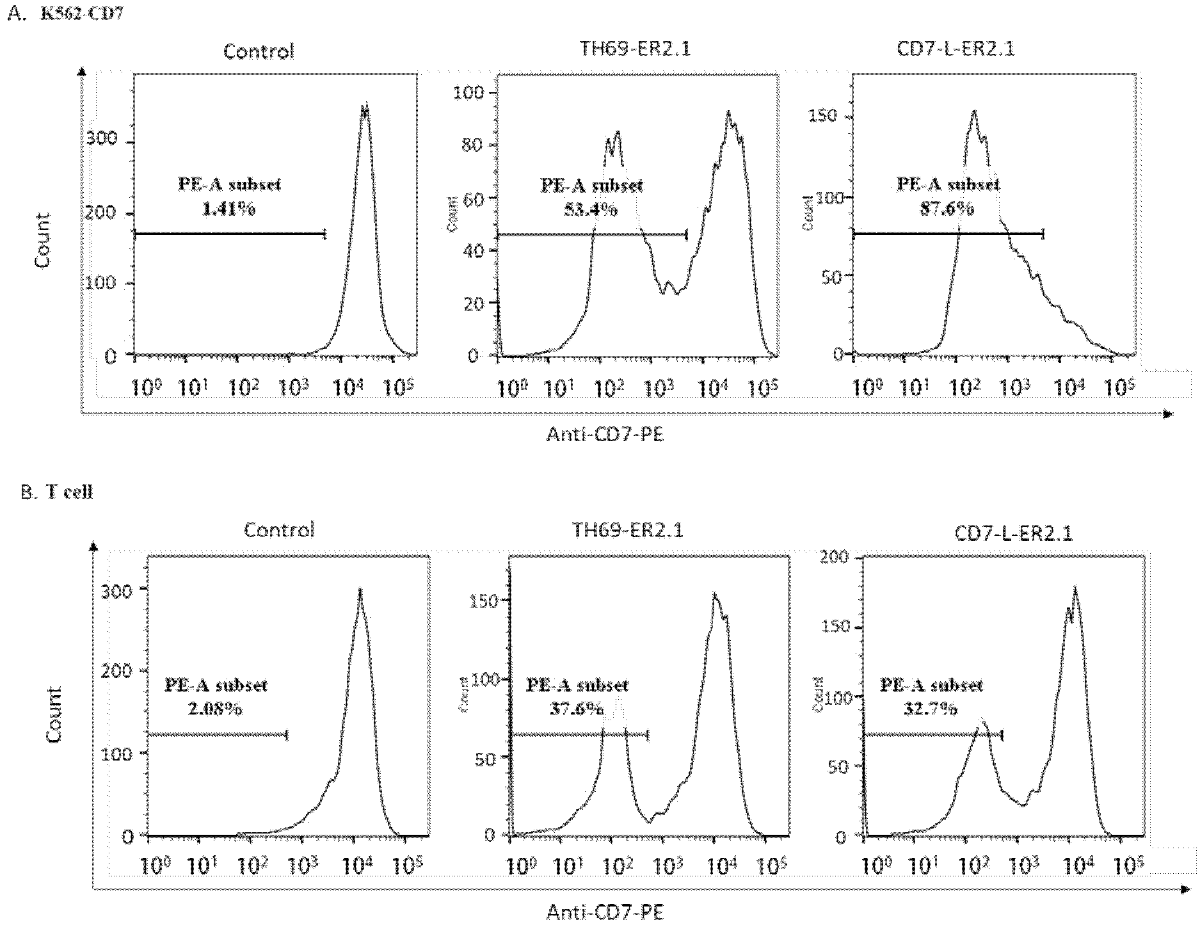

A. K562-CD7
Control
TH69-ER2.1
CD7-L-ER2.1
Count
PE-A subset
1.41%
PE-A subset
53.4%
PE-A subset
87.6%
Anti-CD7-PE
B. T cell
Control
TH69-ER2.1
CD7-L-ER2.1
Count
PE-A subset
2.08%
PE-A subset
37.6%
PE-A subset
32.7%
Anti-CD7-PE

图 4

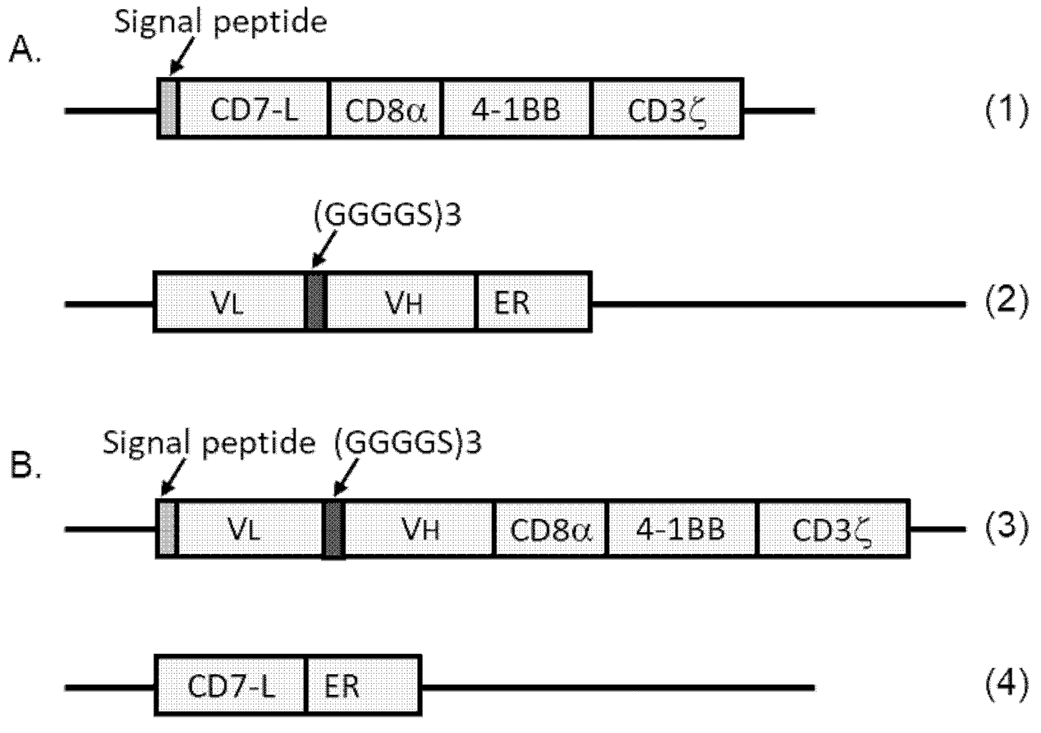
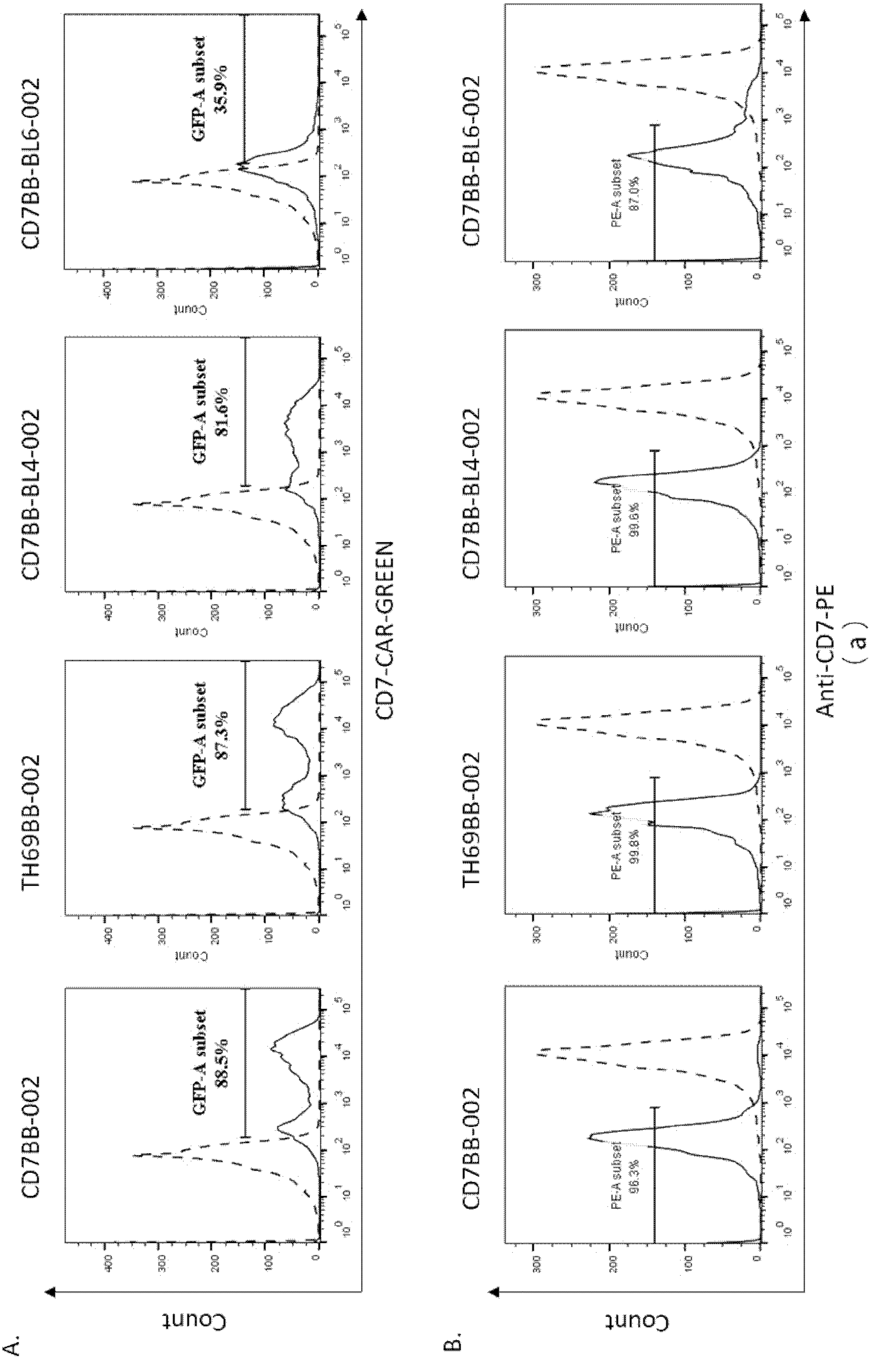

A.
Signal peptide
CD7-L
CD8α
4-1BB
CD3ζ
(1)
(GGGGS)3
VL
VH
ER
(2)
B.
Signal peptide
(GGGGS)3
VL
VH
CD8α
4-1BB
CD3ζ
(3)
CD7-L
ER
(4)

图 5


A.
Count
CD7BB-002
GFP-A subset
88.5%
TH69BB-002
GFP-A subset
87.3%
CD7BB-BL4-002
GFP-A subset
81.6%
CD7BB-BL6-002
GFP-A subset
35.9%
CD7-CAR-GREEN
B.
Count
CD7BB-002
PE-A subset
96.3%
TH69BB-002
PE-A subset
99.8%
CD7BB-BL4-002
PE-A subset
99.6%
CD7BB-BL6-002
PE-A subset
87.0%
Anti-CD7-PE

(a)

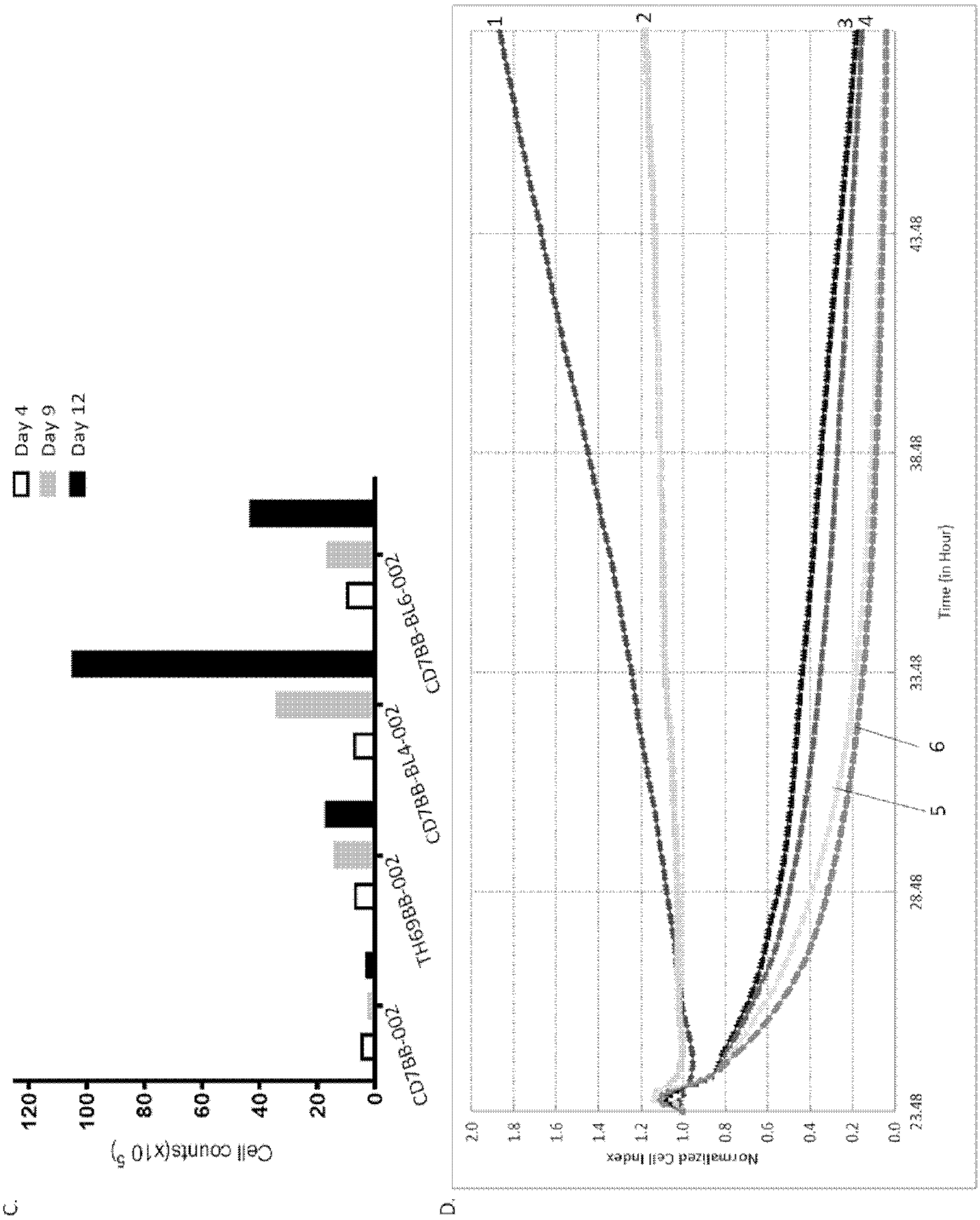
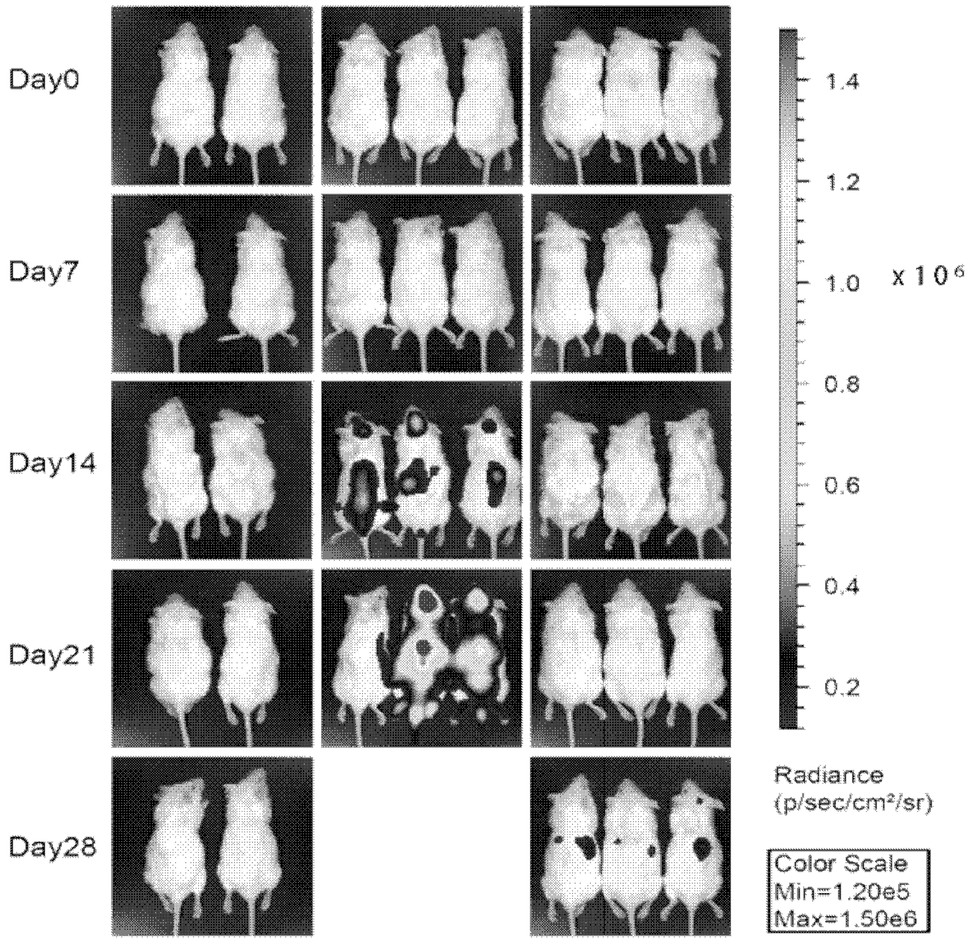

C.
Cell counts(x10 5)
120
100
80
60
40
20
0
CD7BB-002
TH69BB-002
CD7BB-BL4-002
CD7BB-BL6-002
Day 4
Day 9
Day 12
D.
Normalized Cell Index
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
23.48
28.48
33.48
38.48
43.48
Time (in Hour)
E:T=1:1
1 Hela-CD7 only
2 T cell control
3 CD7 BB-002
4 TH69 BB-002
5 CD7BB-BL4-002
6 CD7BB-BL6-002
（b）

图 6

A、


1
2
3
Day0
Day7
Day14
Day21
Day28
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
x 10⁶
Radiance
(p/sec/cm²/sr)
Color Scale
Min=1.20e5
Max=1.50e6

B、

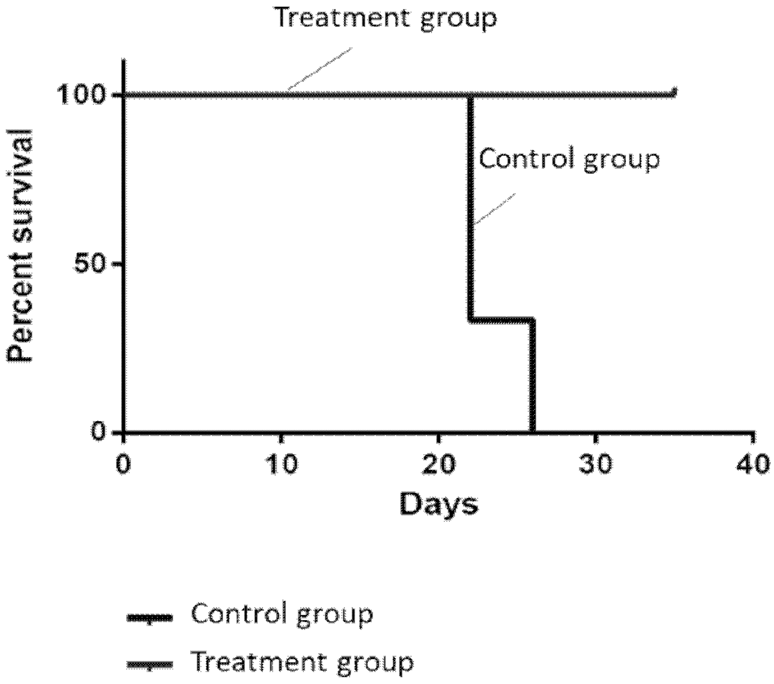

Treatment group
Control group
Percent survival
100
50
0
0
10
20
30
40
Days
Control group
Treatment group

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/133817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i； C12N 15/62(2006.01)i； C12N 15/13(2006.01)i； C12N 15/867(2006.01)i； C07K 16/28(2006.01)i； A61K 39/395(2006.01)i； A61P 35/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPTXT; VEN; USTXT; WOTXT; CNABS; GOOGLE SCHOLAR; PUBMED; ISI WEB OF SCIENCE; CNKI; 万方; GENBANK; STN: CD7-L, SECTM1, K12, 胞外域, CD7, 嵌合抗原受体, T细胞, NK细胞, CAR, 单克隆抗体, TH6, scFv, 下调, 沉默, 阻断, down-regulation, silence, block, 白血病, leukemia, lymphoma, SEQ ID NOs: 5-18

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113234682 A (SHANGHAI YAKE BIOTECH CO., LTD.) 10 August 2021 (2021-08-10) claims 1-52	1-52
X	WO 2020102589 A1 (MEDISIX THERAPEUTICS PTE LTD.) 22 May 2020 (2020-05-22) description paragraphs 100, 130, claims 19-22	1-5, 19, 30
X	LYMAN, S.D. et al. "Identification of CD7 as a Cognate of the Human K12 (SECTM1) Protein" *The Journal of Biological Chemistry,* Vol. 275, No. 5, 04 February 2000 (2000-02-04), pp. 3431-3437	27-28
X	CN 110760007 A (PERSONGEN BIOMEDICINE (SUZHOU) CO., LTD.) 07 February 2020 (2020-02-07) claims 1-7	1-5, 19, 30
X	US 2019144522 A1 (ST. JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL) 16 May 2019 (2019-05-16) claims 1-7	1-5, 19, 30
X	US 2018148506 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE) 31 May 2018 (2018-05-31) description, paragraphs 6-23, table 1	1-5, 19, 30

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 February 2022	**25 February 2022**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107249602 A (ICELL GENE THERAPEUTICS LLC et al.) 13 October 2017 (2017-10-13) entire document	1-52
A	BADE-DÖDING, C. et al. "AutocrineGM-CSF transcription in the leukemic progenitor cell line KG1a is mediated by the transcription factor ETS1 and is negatively regulated through SECTM1 mediated ligation of CD7" *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA,* No. 1840, 06 November 2013 (2013-11-06), pp. 1004-1013	1-52
A	GOMES-SILVA, D. et al. "CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies" *Blood,* Vol. 130, No. 3, 20 July 2017 (2017-07-20), pp. 285-296	1-52
A	施菊妹 等 (SHI, Jumei et al.). "自然杀伤细胞在血液系统肿瘤治疗中的应用 (Non-official translation: Uses of Natural Killer Cells in Treating Hematologic Tumors)" *上海医学 (Shanghai Medical Journal),* Vol. 33, No. 9, 31 December 2010 (2010-12-31), pp. 830-833	1-52

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/133817

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 113234682 A	10 August 2021	None	
WO 2020102589 A1	22 May 2020	EP 3864052 A1	18 August 2021
		AU 2019378039 A1	27 May 2021
		US 2021395779 A1	23 December 2021
		CA 3119296 A1	22 May 2020
		CN 113227144 A	06 August 2021
		KR 20210091250 A	21 July 2021
		SG 11202104334 S A	28 May 2021
		CN 109414428 A	01 March 2019
CN 110760007 A	07 February 2020	WO 2021098882 A1	27 May 2021
US 2019144522 A1	16 May 2019	WO 2017213979 A1	14 December 2017
US 2018148506 A1	31 May 2018	WO 2018098306 A1	31 May 2018
		WO 2018098306 A8	23 August 2018
		JP 2019536480 A	19 December 2019
		KR 20190085528 A	18 July 2019
		SG 11201903830 T A	30 May 2019
		AU 2017363278 A1	23 May 2019
		EP 3545082 A1	02 October 2019
		EP 3545082 A4	01 July 2020
		CN 110268049 A	20 September 2019
		US 10550183 B2	04 February 2020
		SG 10201912387 P A	27 February 2020
		US 2018179280 A1	28 June 2018
		CA 3043752 A1	31 May 2018
		CN 109414428 A	01 March 2019
CN 107249602 A	13 October 2017	CN 109414428 A	01 March 2019
		JP 2021078514 A	27 May 2021
		TW 201706295 A	16 February 2017
		WO 2017146767 A1	31 August 2017
		WO 2016138491 A1	01 September 2016
		EP 3261651 A1	03 January 2018
		EP 3261651 A4	07 November 2018
		IL 254141 D0	31 October 2017
		SG 11201706774 W A	28 September 2017
		US 2018066034 A1	08 March 2018
		US 10273280 B2	30 April 2019
		AU 2016225012 A1	31 August 2017
		AU 2016225012 B2	03 September 2020
		KR 20180002604 A	08 January 2018
		US 2019345217 A1	14 November 2019
		JP 2018513692 A	31 May 2018
		CA 2977106 A1	01 September 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/133817

A. 主题的分类

C12N 5/10(2006.01)i；C12N 15/62(2006.01)i；C12N 15/13(2006.01)i；C12N 15/867(2006.01)i；C07K 16/28(2006.01)i；A61K 39/395(2006.01)i；A61P 35/02(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C07K; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

EPTXT;VEN;USTXT;WOTXT;CNABS;GOOGLE SCHOLAR;PUBMED;ISI WEB OF SCIENCE;CNKI;万方;GENBANK;STN:CD7-L, SE-CTM1, K12, 胞外域,CD7,嵌合抗原受体，T细胞，NK细胞，CAR,单克隆抗体,TH6,scFv,下调，沉默，阻断，down-regulation, silence,block,白血病,leukemia,lymphoma,SEQ ID NOs:5-18

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113234682 A (上海雅科生物科技有限公司) 2021年8月10日 (2021 - 08 - 10) 权利要求1-52	1-52
X	WO 2020102589 A1 (MEDISIX THERAPEUTICS PTE LTD.) 2020年5月22日 (2020 - 05 - 22) 说明书第100、130段，权利要求19-22	1-5、19、30
X	LYMAN, S.D. 等. "Identification of CD7 as a Cognate of the Human K12 (SE-CTM1) Protein" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第275卷，第5期，2000年2月4日 (2000 - 02 - 04), 第3431 - 3437页	27-28
X	CN 110760007 A (博生吉医药科技苏州有限公司) 2020年2月7日 (2020 - 02 - 07) 权利要求1-7	1-5、19、30
X	US 2019144522 A1 (ST. JUDE CHILDRENS RES HOSPITAL) 2019年5月16日 (2019 - 05 - 16) 权利要求1-7	1-5、19、30

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。　　☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
- “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
- “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
- “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
- “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
- “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
- “T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
- “X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
- “Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
- “&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年2月16日	2022年2月25日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 李恩 电话号码 86-(10)-53961874

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	US 2018148506 A1 (NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE) 2018年5月31日 (2018 - 05 - 31) 说明书第6-23段，表1	1-5、19、30
A	CN 107249602 A (美商生物细胞基因治疗有限公司 等) 2017年10月13日 (2017 - 10 - 13) 全文	1-52
A	BADE-DÖDING, C. 等. "AutocrineGM-CSF transcription in the leukemic progenitor cell line KG1a is mediated by the transcription factor ETS1 and is negatively regulated through SECTM1 mediated ligation of CD7" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 第1840期, 2013年11月6日 (2013 - 11 - 06), 第1004 - 1013页	1-52
A	GOMES-SILVA, D. 等. "CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies" BLOOD, 第130卷，第3期，2017年7月20日 (2017 - 07 - 20), 第285-296页	1-52
A	施菊妹 等. "自然杀伤细胞在血液系统肿瘤治疗中的应用" 上海医学, 第33卷，第9期，2010年12月31日 (2010 - 12 - 31), 第830-833页	1-52

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/133817

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

   a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
      - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
      - ☐ 纸件或图形文件形式

   b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

   c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
      - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
      - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/133817

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	113234682	A	2021年8月10日	无			
WO	2020102589	A1	2020年5月22日	EP	3864052	A1	2021年8月18日
				AU	2019378039	A1	2021年5月27日
				US	2021395779	A1	2021年12月23日
				CA	3119296	A1	2020年5月22日
				CN	113227144	A	2021年8月6日
				KR	20210091250	A	2021年7月21日
				SG	11202104334S	A	2021年5月28日
				CN	109414428	A	2019年3月1日
CN	110760007	A	2020年2月7日	WO	2021098882	A1	2021年5月27日
US	2019144522	A1	2019年5月16日	WO	2017213979	A1	2017年12月14日
US	2018148506	A1	2018年5月31日	WO	2018098306	A1	2018年5月31日
				WO	2018098306	A8	2018年8月23日
				JP	2019536480	A	2019年12月19日
				KR	20190085528	A	2019年7月18日
				SG	11201903830T	A	2019年5月30日
				AU	2017363278	A1	2019年5月23日
				EP	3545082	A1	2019年10月2日
				EP	3545082	A4	2020年7月1日
				CN	110268049	A	2019年9月20日
				US	10550183	B2	2020年2月4日
				SG	10201912387P	A	2020年2月27日
				US	2018179280	A1	2018年6月28日
				CA	3043752	A1	2018年5月31日
				CN	109414428	A	2019年3月1日
CN	107249602	A	2017年10月13日	CN	109414428	A	2019年3月1日
				JP	2021078514	A	2021年5月27日
				TW	201706295	A	2017年2月16日
				WO	2017146767	A1	2017年8月31日
				WO	2016138491	A1	2016年9月1日
				EP	3261651	A1	2018年1月3日
				EP	3261651	A4	2018年11月7日
				IL	254141	D0	2017年10月31日
				SG	11201706774W	A	2017年9月28日
				US	2018066034	A1	2018年3月8日
				US	10273280	B2	2019年4月30日
				AU	2016225012	A1	2017年8月31日
				AU	2016225012	B2	2020年9月3日
				KR	20180002604	A	2018年1月8日
				US	2019345217	A1	2019年11月14日
				JP	2018513692	A	2018年5月31日
				CA	2977106	A1	2016年9月1日