经修饰的靶向HPV增强型免疫细胞及其医药用途

技术领域

本申请涉及免疫治疗技术领域，具体涉及一种经修饰的免疫细胞及其医药用途，同时，本申请还提供了一种靶向 HPV 的 E7 抗原的 T 细胞受体或其片段及其相关应用。

背景技术

1.1 HPV 的分子生物学特性及亚型

HPV 属于 DNA 病毒，其基因组 DNA 大小约 8 kb，由早期蛋白编码区、晚期蛋白编码区和上游调控区三部分组成。早期编码区由 4500 个碱基对组成，编码 6 种早期调节性蛋白(E1/E2/E4/E5/E6/E7)，参与 DNA 的复制、转录、翻译调控和细胞转化等。晚期编码区由 2500 个碱基对组成，编码主要衣壳蛋白 L1 和次要衣壳蛋白 L2。上游调控区由 1000 个碱基对组成，包含 HPV 基因组的复制起点和基因表达调控元件，调控病毒的转录与复制。另外，HPV 基因组不编码病毒复制所必需的聚合酶或其他酶，因此 HPV 必须依赖宿主细胞复制蛋白介导病毒 DNA 的合成。根据 E6、E7 和 L1 基因序列的同源性对 HPV 进行分型，以 90%同源性为标准，目前已鉴定出超过 200 种亚型。根据致病性不同，又可以被分为高危型(hrHPV)与低危型。大约有 14 种高危型 HPV，包括 HPV16，HPV18，HPV31，HPV33，HPV35，HPV39，HPV45，HPV51，HPV52，HPV56，HPV58，HPV59，HPV66 和 HPV68。高危型的 HPV 可导致多种癌症，包括几乎所有的宫颈癌，大多数肛门癌和许多口咽癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌。其中，高危型 HPV16 和 HPV18 亚型被发现与大多数 HPV 相关的癌症有关。70%的宫颈癌由 HPV16 和 HPV18 持续感染所导致，84.1%的浸润性宫颈癌也主要由二者引起。

人类白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen, HLA)，是人类基因组中最具多态性的基因复合体基因分型包括 HLA-A，HLA-B，HLA-C，HLA-DRB1，HLA-DQB1 等。研究发现，与其它 HLA 基因相比，HLA-A 等位基因在中国汉族人群中发挥更加重要的作用。在中国最常见的则是 HLA-A*24:02，HLA-A*11:01 和 HLA-A*02:01。

1.2 HPV 的致癌通路

以宫颈癌为例，80%的性活跃女性存 HPV 感染，其中约 90%可依靠自身免疫系统在 1-2 年内自然消退，少部分变为持续感染。最终约 1%的患者发展为子宫颈癌。通常情况下，5-10 年的高危型 HPV 感染才会引起细胞学异常改变，诱发宫颈癌。宫颈癌前驱病变/宫颈上皮不典型增生即称宫颈上皮内瘤变(Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN)，可根据严重程度分为以下三级：

CIN1：病变局限在上皮层的下 1/3，即轻度宫颈不典型增生；

CIN2：病变局限在上皮层的 1/2-2/3，即中度宫颈不典型增生；

CIN3：病变几乎累及全部上皮层，仅余 1-2 层表面的正常鳞状上皮，即重度宫颈不典型

增生及宫颈原位癌。

各个级别癌前病变均有发展为浸润癌的可能性，级别越高进展可能性越大。研究发现，HPV-DNA 整合见于 83%宫颈癌，HPV 基因在 HPV 相关肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用。

HPV 通过上皮组织损伤感染机体，其生命周期与角质形成细胞分化过程密切相关。在角质形成细胞发展到棘突层的过程中，伴随着病毒 DNA 复制及基因表达。病毒通过内吞作用被内化到细胞中，并渗透到细胞核中，启动复制过程。具体地，E1、E2 蛋白在 HPV 病毒起始复制和转录过程中起关键作用，E4、E5 蛋白调节病毒生命周期晚期的功能，它们会通过下调 P21 基因，导致细胞周期调控紊乱，使感染 HPV 的细胞成为恶性细胞。另外，HPV-DNA 整合发生在 E2 基因编码区，该基因表达失活引起 E6 和 E7 基因转录上调。E6 和 E7 是宫颈癌组织中持续发现的仅有的两个病毒基因，提示其与 HPV 相关肿瘤的发生直接相关。研究发现，E6 蛋白与细胞泛素连接酶 E6AP 结合后发生构象改变，可特异性结合抑癌蛋白 p53，形成 E6/E6AP/p53 复合体，从而使 p53 发生泛素化并降解，导致细胞凋亡受阻。类似地，E7 蛋白也可与 pRb 结合并使其失活，促进转录因子家族 E2F 对基因的转录激活，导致细胞周期异常。抑癌基因 p53 和 pRb 的失活，使细胞周期失控，凋亡受阻，引起细胞过渡增殖从而发生癌变。另外，E7 可与 RB-like、E2F4 及 MuyB 蛋白的 DREAM 结构域结合，从而使其通过蛋白酶体途径降解，激活 p53 下游信号通路，导致细胞周期异常。即，E6、E7 蛋白是 HPV 感染细胞发生癌转化和恶性病变的关键因素。

总之，HPV 病毒感染会引发宿主细胞基因表达的变化，涉及许多调控细胞凋亡和细胞周期相关信号转导通路的激活，从而赋予其肿瘤的特征。HPV 持续性感染会促使慢性炎症的发生，导致活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的产生并释放，进而损伤 DNA，致使被感染细胞恶性转化；E5、E6 和 E7 蛋白通过促进环氧合酶 2 表达令机体释放大量前列腺素，参与细胞增殖、血管生成和凋亡抑制，对宫颈组织产生不利影响。此外，E6 和 E7 蛋白还对 NF-κB 信号通路产生抑制作用，利于 HPV 躲避免疫监视。E7 蛋白还抑制凋亡基因 Bcl-xL，Fas 和 Bad 的表达，促进感染细胞恶性增殖，支持 HPV 复制，从而促进病毒的持续存在。这种慢性、持续性的免疫反应，在病理层面上表现为宫颈增生，最终导致宫颈癌。

由于宫颈癌的最初形成和随后的进展完全依赖于 HPV 的两个主要癌基因 E6 和 E7 的组成型表达，癌蛋白 E6 和 E7 是宫颈癌细胞的生物标记物。如果抑制 E6 和或 E7 的表达和功能，肿瘤细胞的增殖停滞并发生凋亡。当 E6、E7 等靶抗原以不同形式递送至机体后，MHC Ⅰ类和Ⅱ类分子分别呈递胞内和胞外抗原，激活 CD8+ T 细胞和 CD4+ T 细胞，诱导针对 HPV 的特异性细胞免疫反应。胞内抗原呈递后，在细胞因子的协同作用下，效应细胞 CD8+ T 细胞杀灭表达靶抗原基因的 HPV 感染细胞或肿瘤细胞。因此，E6、E7 蛋白是治疗 HPV 感染相关炎症及肿瘤的理想靶标，具有广阔的应用开发前景。

1.3 HPV 在世界范围内的流行

HPV 全称人乳头瘤病毒(Human Papilloma Virus, HPV)，是一类具有高宿主特异性和亲和

力的无包膜双链环状 DNA 病毒，主要通过性传播，母婴传播或皮肤黏膜接触。80%的性活跃女性存 HPV 感染，一项分子流行病学调查分析发现，HPV 感染率在非洲和南美洲地区最高，分别达到 22.9%和 18.6%。全球感染亚型率最高为 HPV16 高危型，其次为 HPV18、HPV58、HPV52、HPV31、HPV33、HPV45 型。高危型 HPV DNA 存在于括口咽癌、宫颈癌、外阴癌、阴道癌、阴茎癌和肛门癌等 9 种恶性肿瘤。据 Global Cancer Statistics 2020 报道，全球 HPV 相关癌症年新发病例达 852,620 例，占所有癌症的 4.40%；年死亡病例达 447,900 例，占所有癌症的 4.50%。2022 年中国按性别估计 HPV 相关新发癌症病例达到 127,804 例，死亡病例达到 68,370 例。已成为严重威胁女性健康的公共卫生问题。

1.4 HPV 相关癌症的治疗现状

HPV 相关口咽癌、宫颈癌、外阴癌、阴道癌、阴茎癌和肛门癌，一旦进入晚期阶段，即无法治愈且难以缓解，目前尚缺乏有效的治疗手段。虽然化疗对这些肿瘤有一定缓解作用，但缓解时间通常比较短暂。

HPV 相关癌症中宫颈癌占比最高，大约达到 70%。由于宫颈癌筛查的普及和 HPV 疫苗的推广，宫颈癌在很大程度上已成为一种可预防的疾病。然而，目前宫颈癌患者的 5 年生存率仍只有 60%左右。对于早期无转移的宫颈癌，手术及放化疗是主要的治疗手段，无淋巴结转移的 FIGO 分期为ⅠB～ⅡA 的患者，5 年生存率可达 88%～95%。但是对于转移性或复发性宫颈癌，传统的治疗方法并未取得满意的疗效。随着抗血管生成药物、免疫检查点抑制剂等靶向治疗和免疫治疗药物的使用，这部分患者的生存时间得到了显著延长，但仍未达到最终治愈的效果，亟需更深入的分子层面研究揭示新的治疗靶点以及新的治疗方法解决临床需求。

宫颈癌治疗早期以根治性手术为主，晚期以放射治疗为主。随着新的化疗药物和化学治疗途径的出现，同期放疗、化疗已成为中晚期宫颈癌中的标准治疗方案，但局部的复发仍较高。约 29%～38%的宫颈癌患者在治疗后复发，因此，复发性宫颈癌成为临床关注的重点。复发性宫颈癌的化疗选择非常有限，大多数复发性宫颈癌病例均无法治愈。根据妇科肿瘤组(Gynecologic Oncology Group, GOG)的评估，复发或转移性宫颈癌的最佳方案是联合顺铂、紫杉醇和贝伐单抗，总响应率(Response Rate, RR)为 48%，中位生存期为 17 个月。然而，由于该组患者预后不佳，二线化疗对复发性宫颈癌的益处尚未达成共识。

免疫疗法是一种新的治疗癌症的方法，它依赖于免疫系统对肿瘤细胞的直接识别和杀伤能力。近年来，宫颈癌的几种免疫治疗策略取得了重大突破。

治疗性疫苗

预防性 HPV 疫苗目前已得到批准，在预防 HPV 感染方面非常有效，但在清除已建立的 HPV 感染方面似乎无效。针对宫颈发育不良和宫颈癌的新型治疗性疫苗的研究正在进行中。一项利用假单胞菌外毒素-HPV16 E70KDEL3 融合蛋白或 TVGV-1 与两种不同佐剂结合的临床前试验在小鼠模型中显示了初步的有效结果，这与延长 HPV16 E7 特异性 CD8+T 细胞的存活期和增殖有关。另外，治疗性疫苗 pNGVL4a-CRT/E7 也已有了初步结果，针对 CIN2/3

级继发 HPV16 的患者。该疫苗由一个 DNA 质粒(pNGVL4a-A)构成，该质粒编码与 HPV16 型 E7 抗原脱毒形式相关的钙网蛋白。这种疫苗旨在增加细胞毒性 T 细胞，以期清除已建立的 HPV16 感染。在这项首次人类临床试验中，27 名妇女接种了疫苗，缓解到 CIN 1 或更低水平的比率为 30%。与对照组相比，细胞毒性 T 细胞增多。

免疫检查点疗法

肿瘤表达 PD-L1 可使肿瘤逃避 CD8+杀伤性 T 细胞的细胞破坏，多项研究表明 PD-L1 的表达与预后差相关，不依赖于包括分期、肿瘤大小、浸润深度、淋巴管间隙侵犯或淋巴结转移等其它影响因素。

另有，CTLA-4、LAG-3、VISTA 和 TIGIT 等检查点抑制剂正在作为单一药物或与其他检查点抑制剂联合测试治疗宫颈癌的潜在疗效。

T 细胞过继疗法

过继性 T 细胞疗法(Adoptive T-Cell Therapy, ACT)，通过对自体 T 细胞体外改造后进行培养增殖，并特异性识别肿瘤细胞，将具有抗肿瘤反应性的细胞大量的扩增后回输到癌症患者体内，可以介导某些晚期恶性肿瘤持久、完全地消退。

E7 是 HPV 主要的致癌蛋白，在宿主细胞中的过表达是宫颈癌发生、发展及转移的关键因子，同时做为外源病毒抗原，在正常组织中不表达，因此针对 HPV E7 的 TCR-T 是治疗 HPV 相关晚期恶性肿瘤的理想靶标，具有广阔的应用开发前景。

由于实体瘤有广泛的主动免疫逃避策略，抗原重复刺激以及抑制性肿瘤微环境等是导致 T 细胞耗竭并影响免疫治疗效果的原因。靶向 HPV 的抗耗竭型 TCR-T 细胞是自主开发的新一代抗耗竭型 TCR-T 疗法，将靶向 HPV E7 的 TCR 和抗耗竭融合受体转导入 T 细胞，通过靶向病毒特有抗原表达和 DNA 整合机制杀灭肿瘤细胞并同步清除病毒感染。其抗耗竭融合受体为对抗肿瘤微环境、减轻免疫抑制的组件，使 TCR-T 细胞持续发挥对肿瘤杀伤和增殖能力，进而诱发持久抗肿瘤免疫反应，适用于人乳头瘤病毒(HPV)导致的多种恶性肿瘤，包括宫颈癌、口咽癌、头颈癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌等。

LN-145 是一个正在进行的临床试验(NCT03108495)，它是一种从 TIL 中提取和扩大的产品。这些 TIL 在骨髓清除化疗后再融合，这种类型的治疗已经观察到完全和持久的反应。在 18 例可评价的宫颈癌患者中，5 例患者有缓解，其中 2 例完全缓解。另使用识别 HLA-A*02:01 限制的 HPV-16 癌蛋白基因工程化 T 细胞受体的 T 细胞的一项 I 期临床试验(NCT02280811)显示，在 HPV16 阳性肛管癌患者中有响应，初步证明了其效力。

综上，由于当前可用治疗方式与药物的局限性和风险，需要新的治疗策略为 HPV 相关宫颈癌患者提供更多治疗选择。

1.5 T 细胞在 HPV 相关肿瘤免疫治疗中的作用及使用 TCR-T 细胞的基本原理

T 细胞是来源于骨髓、淋巴，并在胸腺(Thymus)中分化成熟的免疫细胞，其表面表达有 T 细胞抗原受体(TCR)，在细胞介导的免疫中起到清除感染和癌细胞的重要作用。TCR 能够识别由主要组织相容性复合物(MHC)分子呈递的靶抗原表位并与之特异性结合。一旦 T 细胞

识别其靶点，即可通过大量增殖、释放细胞因子和细胞毒性等作用杀伤靶细胞。

而谈到 TCR-T 治疗适用范围，目前人们普遍尝试使用 T 细胞过继免疫疗法，治疗人类恶性肿瘤(例如白血病)，病毒类疾病(例如乙型肝炎病毒(HBV)，巨细胞病毒(CMV)，爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)。然而，从患者的血液中分离和扩增病毒或肿瘤特异性的 T 细胞非常困难且耗时。因此，研究人员采用了新的治疗策略，通过导入靶向特定抗原的 T 细胞受体(TCR)或 TCRα/β 异二聚体，使得这些基因编辑过的 T 淋巴细胞作用于特定的病毒或肿瘤抗原，赋予 T 细胞明确的抗原特异性。对于 TCR-T 应用于实体瘤，特别是 HPV 感染相关的宫颈癌有较高的临床应用价值和意义。

TCR-T 细胞治疗依赖于组织相容性复合体(MHC 分子)的呈现来识别靶点并激活 T 细胞功能，可以识别 MHC 分子呈现的细胞内抗原片段，这样的特点决定了 TCR-T 细胞治疗的靶标范围更广，包括细胞内抗原、细胞表面抗原，以及肿瘤细胞突变后产生的新抗原，能够克服肿瘤异质性对于恶性肿瘤细胞抗原表达所带来的差异，体现了更高的治疗价值。

有研究表明，通过基因编辑表达 HPV 特异性 T 细胞受体(TCR)的 T 细胞，可以特异性识别 HPV16 E7 相关宫颈癌细胞，并被激活扩增，有效清除 HPV16 E7 阳性肿瘤细胞。因此，HPV16 E7 蛋白是一个 HPV 相关癌症的治疗靶点。

1.6 T 细胞耗竭及客服策略

T 细胞耗竭是一直存在且导致细胞治疗在实体瘤中疗效较差的原因。T 细胞耗竭常见于恶性肿瘤中，是长期暴露于持续性抗原刺激下所致的 T 细胞功能障碍，即 T 细胞持续发挥作用后最终失去效应功能，其中表现为肿瘤坏死因子(TNF)和干扰素-γ(IFN-γ)产生缺陷，这是恶性肿瘤细胞免疫逃避的机制之一。

研究发现，肿瘤细胞表达的细胞程序性死亡-配体 1(PD-L1)与淋巴细胞的程序性死亡受体 1(PD-1)结合是导致淋巴细胞耗竭的一个重要信号通道，耗竭的 T 细胞表型可以通过拮抗 PD-1/PD-L1 相互作用得到恢复，该结论在解决 TCR-T 耗竭、提高实体瘤疗效方面有重要启示作用。

在肿瘤进展过程中，肿瘤微环境中肿瘤细胞、间充质成纤维细胞和其他细胞大量分泌转化生长因子 β(TGF-β)。一方面，肿瘤细胞通过分泌大量 TGF-β 使自身处于高浓度 TGF-β 环境下，从而建立耐受性。另一方面，TGF-β 抑制免疫细胞的抗肿瘤活性从而促使肿瘤细胞逃避免疫系统的监视，进一步促进肿瘤的进程。大多数恶性肿瘤可以使用广泛的主动免疫逃避策略，通过产生 TGF-β 从而抑制免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用。拮抗 TGF-β 下游信号通路具有阻遏肿瘤微环境中存在 TGF-β 所导致的免疫抑制效应的潜力，防止 T 细胞免疫杀伤能力的削弱与耗竭，从而进一步提高治疗效果，同时延长体内 TCR-T 细胞存活时间并促进 T 细胞浸润的目的，解决 TCR-T 细胞治疗持久性不够、治疗效果欠佳及预防肿瘤复发的痛点，更好地满足患者需求。

发明内容

鉴于目前存在的技术问题，本申请提供了一种经修饰的免疫细胞，靶向特异的HPV E7抗原，且能够克服肿瘤微环境免疫抑制导致的免疫细胞耗竭。其能够特异性杀灭由HPV感染所诱发的宫颈癌、口咽癌、头颈癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌和肛门癌等癌细胞，从而治疗HPV感染诱发的宫颈癌、口咽癌、头颈癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌和肛门癌等。

本申请的第一方面提供了一种经修饰的免疫细胞，其包含靶向HPV E7抗原的T细胞受体(HPV TCR)和转换刺激分子。

在一些实施方案中，所述HPV TCR包含TCRα链可变域和TCRβ链可变域；其中，所述TCRα链可变域的αCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，或其变体，其中一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换；且所述TCRβ链可变域的βCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示，或其变体，其中一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换。

在一些实施方案中，所述 TCRα 链可变域包含互补决定区 αCDR1、αCDR2 和 αCDR3，且所述 TCRβ 链可变域包含互补决定区 βCDR1、βCDR2 和 βCDR3，其中：αCDR1、αCDR2 和 αCDR3 分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示；βCDR1、βCDR2 和 βCDR3 分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示；或包含上述 CDR 变体，其中一个或多个 CDR 中的一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换。

在一些实施方案中，所述 TCRα 链可变域包含与 SEQ ID NO:7 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列；在一些实施方案中，所述 TCRβ 链可变域包含与 SEQ ID NO：8 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 HPV TCR 包含如 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述转换刺激分子包含：免疫抑制蛋白的细胞外结构域 (ECD)，其中所述 ECD 与介导免疫细胞激活信号的共刺激分子的细胞内结构域(ICD)融合；其中所述免疫抑制蛋白的细胞外结构域与其配体结合在所述经修饰的免疫细胞中产生免疫细胞激活信号而非免疫细胞失活信号。

在一些实施方案中，所述免疫抑制蛋白选自包括 PD-1、CTLA4，BTLA，TIM3，TIGIT，TGFβ 受体以及其他任意具有免疫抑制功能或与免疫抑制信号通路相关的蛋白的任意一种蛋白或其组合，且所述免疫抑制蛋白的 ECD 序列可存在至少一个氨基酸突变。

在一些实施方案中，本申请的 ECD 为 TGFβ 受体 II ECD；在一些实施方案中，TGFβ 受体 II ECD 序列可存在至少一个氨基酸突变；在一些实施方案中，TGFβ 受体 ECD 氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示。

在一些实施方案中，本申请的 ECD 为 PD-1 ECD；在一些实施方案中，PD-1 ECD 序列可存在至少一个氨基酸突变；在一些实施方案中，PD-1 ECD 存在一个氨基酸突变，132 位的丙氨酸突变为亮氨酸，增加了 PD-1 ECD 与 PDL1 的亲和力，ECD 氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示。

在一些实施方案中，所述共刺激分子包含：CD28、4-1BB、ICOS、CD27、IL-12R、CD3、OX40 蛋白中的任意一种蛋白或其组合，且上述共刺激分子的 ICD 序列可存在至少一个氨基

酸突变。

在一些实施方案中，本申请的 ICD 为 4-1BB ICD；在一些实施方案中，4-1BB ICD 序列可存在至少一个氨基酸突变；在一些实施方案中，4-1BB ICD 氨基酸序列如 SEQ ID NO:11 所示。

在一些实施方案中，所述 TCR 包含 TCR α 链和 TCR β 链，所述 TCR α 链可变域包含与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列；和/或

所述 TCR β 链可变域包含与 SEQ ID NO：8 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 ECD 和所述 ICD 通过跨膜区(TM)序列连接；在一些实施方案中，跨膜区包含选自以下的蛋白的跨膜结构域：T 细胞受体的 α，β 或 ζ 链，CD28，CD3ε，CD45，CD4，CD5，CD8，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137 和 CD154 及其组合，且上述蛋白的跨膜结构域可存在至少一个氨基酸突变。

在一些实施方案中，所述跨膜区序列为 CD8 跨膜区序列；在一些实施方案中，所述 CD8 跨膜区序列如 SEQ ID NO:10 所示。

在一些实施方案中，所述经修饰的免疫细胞表达以下外源多肽：

A. T 细胞受体(TCR)，所述 TCR 特异性靶向 HPV 的 E7 抗原；和

B. 转换刺激分子，所述转换刺激分子包含：胞外结构域(ECD)和胞内结构域(ICD)，其中，所述 ECD 选自免疫抑制分子的 ECD，所述 ICD 选自共刺激分子的 ICD。

在一种实施例中，所述 TCR 能够结合由 HLA-A*02 呈递的 HPV E7 抗原多肽, 更优选的，所述 TCR 能够结合由 HLA-A*02:01 呈递的 HPV E7 抗原多肽；所述表面抗原多肽包含 HPV16 E7 和 HPV52 E7 第 11-19 的氨基酸序列，其对应的氨基酸序列分别为 YMLDLQPET 或 YILDLQPET。

在一些实施方案中，转换共刺激分子为 PD1(ECD)-CD8(TM)-4-1BB(ICD)(PD1-BB)；在一些实施方案中，PD1-BB 氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示；在一些实施方案中，转换共刺激分子为 TGFβ 受体(ECD)-CD8(TM)- 4-1BB (ICD)(TGF-BB)；在一些实施方案中，TGFβ-BB 氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示。

在一些实施方案中，所述经修饰的免疫细胞包含 HPV TCR 和结构为 PD1(ECD)-CD8(TM)-4-1BB(ICD)(PD1-BB)的转换共刺激分子；优选的，上述经修饰的免疫细胞包含由 SEQ ID NO：15 所示的氨基酸序列。优选的，所述经修饰的免疫细胞包含 HPV TCR 和结构为 TGFβ 受体(ECD)-CD8(TM)- 4-1BB (ICD)(TGF-BB)的转换共刺激分子；在一些实施方案中，上述经修饰的免疫细胞包含由 SEQ ID NO：17 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述免疫细胞选自淋巴细胞、树突状细胞、单核/巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞；在一些实施方案中，所述免疫细胞为 T 细胞。

本申请的第二方面提供了一种核酸分子，所述核酸分子包含编码本申请第一方面所述的 TCR 分子的核酸序列；和/或包含编码本申请第一方面所述的转换共刺激分子的核酸序列。

在一些实施方案中，所述 HPV TCR 由 SEQ ID NO：18 所示的核酸序列编码。

在一些实施方案中，所述核酸分子包含编码 HPV TCR 分子的核酸序列和包含编码 PD1-BB 的转换共刺激分子的核酸序列；在一些实施方案中，上述核酸分子包含由 SEQ ID NO：19 所示的核酸序列。

在一些实施方案中，所述核酸分子包含编码 HPV TCR 分子的核酸序列和包含编码结构为 TGF-BB 的转换共刺激分子的核酸序列；在一些实施方案中，上述核酸分子包含由 SEQ ID NO：20 所示的核酸序列。

本申请的第三方面提供了一种载体，其中所述的载体包含本申请的第二方面所述的核酸分子。

本申请的第四方面提供了一种药物组合物，所述组合物含有药学上可接受的载体以及本申请第一方面所述的经修饰的免疫细胞、本申请的第二方面所述的核酸分子、本申请的第三方面所述的载体。

本申请第五方面提供了本申请第一方面所述的经修饰的免疫细胞、本申请第二方面所述的核酸分子、本申请第三方面所述载体或本申请第四方面所述的药物组合物在制备用于预防或治疗由 HPV 感染所引发的相关疾病的药物中的用途；所述 HPV 感染相关疾病包含 HPV 导致的多种恶性肿瘤，包括宫颈癌、口咽癌、头颈癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌和肛门癌等所组成的一种或多种。

本申请第六方面提供了一种靶向 HPV 的 E7 抗原的 T 细胞受体或或其片段，所述 T 细胞受体包含选自下组的 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域：

（1）所述 TCR α 链可变域包含以下 3 个 CDR：SEQ ID NO: 1 所示的 α CDR1，SEQ ID NO: 2 所示的 α CDR2，和 SEQ ID NO: 3 所示的 α CDR3，或替换其中 1 或 2 个氨基酸的上述 CDR 变体；和

（2）所述 TCR β 链可变域包含以下 3 个 CDR：SEQ ID NO: 4 所示的 β CDR1，SEQ ID NO: 5 所示的 β CDR2，和 SEQ ID NO: 6 所示的 β CDR3，或替换其中 1 或 2 个氨基酸的上述 CDR 变体。

在一些实施方案中，所述 TCR α 链可变域包含以下 3 个 CDR：SEQ ID NO: 1 所示的 α CDR1，SEQ ID NO: 2 所示的 α CDR2，和 SEQ ID NO: 3 所示的 α CDR3；和

所述 TCR β 链可变域包含以下 3 个 CDR：SEQ ID NO: 4 所示的 β CDR1，SEQ ID NO: 5 所示的 β CDR2，和 SEQ ID NO: 6 所示的 β CDR3。

在一些实施方案中，所述 TCR α 链可变域包含与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列；和/或 所述 TCR β 链可变域包含与 SEQ ID NO：8 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，T 细胞受体或其片段，由 HLA-A*02 呈递的 HPV E7 抗原多肽, 更优选的，其能够结合由 HLA-A*02:01 呈递的 HPV E7 抗原多肽。在一些实施方案中，所述多肽包含氨基酸序列 YMLDLQPET 或 YILDLQPET。

本申请第七方面提供了一种核酸分子，所述核酸分子包含编码本申请第六方面所述的靶

向 HPV 的 E7 抗原的 T 细胞受体或或其片段或其互补序列。

本申请第八方面提供了一种载体，所述的载体包含本申请第七方面所述的核酸分子，其中所述载体选自质粒、二元载体、DNA 载体、mRNA 载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、基于转座子的载体和人工染色体。

本申请第九方面提供了一种分离的多肽，其由本申请第七方面所述的核酸分子或本申请第八方面所述的载体编码。

本申请第十方面提供了一种分离的细胞，所述细胞中包含本申请第六方面所述的 T 细胞受体或其片段、本申请第七方面所述的核酸分子、本申请第八方面的载体或本申请第九方面所述的多肽，优选的，所述细胞包含 HPV E7_SCG61 TCR，所述 HPV E7_SCG61 TCR 的氨基酸序列如 SEQ ID NO：13 所示。

本申请第十一方面提供了一种药物组合物，其特征在于，所述组合物含有药学上可接受的载体以及本申请第六方面所述的 T 细胞受体或其片段、本申请第七方面所述的核酸分子、本申请第八方面的载体或本申请第九方面所述的多肽或本申请第十方面所述的细胞。

本申请第六方面所述的 T 细胞受体或其片段、本申请第七方面所述的核酸分子、本申请第八方面的载体或本申请第九方面所述的多肽或本申请第十方面所述的细胞或本申请第十一方面所述的药物组合物在制备用于预防或治疗由 HPV 感染所引发的相关疾病的药物中的用途。在一些实施方案中，所述 HPV 感染相关疾病包含人乳头瘤病毒(HPV)导致的多种恶性肿瘤，包括宫颈癌，口咽癌、头颈癌，阴道癌、外阴癌、阴茎癌和肛门癌所组成的一种或多种。

本申请的有益效果：

靶向 HPV-16 及 HPV-52 相关肿瘤细胞 E7 抗原的抗耗竭型的 TCR-T 产品。结构上，靶向 HPV 增强型 TCR-T 细胞可同时表达特异性 TCR 和 PD-1 或 TGF β RII 共刺激融合受体。其中，TCR 受体具有 MHC 限制性(只针对 HLA-A*02:01)，可特异性识别 HLA-A*02:01 呈递的 HPV-16/52 E7 病毒肽，产生细胞因子，如干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等，并对肿瘤细胞起到细胞裂解的作用。靶向 HPV 增强型 TCR-T 细胞含有的 PD-1 或 TGFβRII 共刺激域融合受体，胞内激活信号域替换了原有的抑制性受体的胞内抑制信号域，目的是将 T 细胞抑制性信号转换为活化信号，以增加细胞增殖能力、细胞因子的释放等，并增加 TCR-T 细胞的抗耗竭能力。

采用本发明的靶向 HPV-16 E7 的增强型 TCR-T 细胞治疗 HPV 相关实体瘤，有如下主要优点：

(a)以 HPV E7 为靶点的抗肿瘤治疗，可以克服肿瘤屏障(Tumor Barrier)对于实体恶性肿瘤组织的保护作用。肿瘤屏障是肿瘤进行自我保护的机制可以限制免疫效应细胞进入肿瘤组织。不同于 TAA 靶点，HPV 慢性感染导致的癌前病变区在正常组织和肿瘤组织之间形成一个 HPV E7 靶点高表达的区域，这些靶点可以引导相应的固有免疫细胞渗透入肿瘤内部起到杀伤作用，从而克服肿瘤屏障。

(b)HPV E7 是外来抗原，正常组织没有表达。TCR-T 药物的 CRS 和 ICANS 反应轻微、耐受性良好，主要的不良反应多因药物攻击肿瘤外有相应靶点表达的正常组织细胞所致。因此靶向 HPV 增强型 TCR-T 细胞具有更优异的安全性特性。

(c)靶向 HPV 增强型 TCR-T 细胞可识别满足 HLA-A*02:01 配型的 HPV E7 相应肽段，不论是否表达完整 E7 抗原。研究表明，靶向 HPV 增强型 TCR-T 细胞对免疫缺陷小鼠表达 HPV-16 E7 的 CDX 宫颈癌和头颈鳞癌移植瘤的生长有显著的抑制作用，且呈现出剂量依赖性。

(d) 本发明人成功筛选获得超高亲和力的全天然 HPV 特异性 TCR，并对 TCR 恒定区进行了改造，降低了与内源性 TCR 链错配的风险。

(e)靶向 HPV 的增强型 TCR-T 细胞可以同时识别 HPV-16 和 HPV-52 基因型相关宫颈癌、头颈癌等多种 HPV 病毒相关肿瘤，显著提升患者人群覆盖率。

(f)靶向 HPV 增强型 TCR-T 细胞携带的共刺激分子融合受体还可以逆转由信号通路介导的 T 细胞耗竭，使 TCR-T 细胞持续发挥对肿瘤的杀伤作用。拮抗免疫抑制下游信号通路延长体内 TCR-T 细胞存活时间并促进 T 细胞浸润的目的，解决 TCR-T 细胞治疗持久性不够、治疗效果欠佳及预防肿瘤复发的痛点，更好地满足患者需求。

(g)相比嵌合开关受体增强型 CAR-T，增强型 TCR-T 细胞可识别被 MHC 呈递到细胞表面的胞内抗原片段，能够克服肿瘤异质性对于恶性肿瘤细胞抗原表达所带来的差异，且 TCR-T 可识别低丰度的肿瘤抗原，搭配嵌合开关受体后，在克服抑制性肿瘤微环境的同时，进一步增强 CD8+和 CD4+ TCR-T 细胞的增殖和肿瘤杀伤作用，并促进记忆性 T 细胞的长期存续，确保免疫细胞疗法持久显著的治疗效果，这对于实现实体瘤的突破性疗效至关重要。另外增强型 TCR-T 细胞治疗发生细胞因子释放综合征(CRS)的风险相比增强型 CAR-T 可能更低。

附图说明

为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案，下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例，对于本领域技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 为 SCG61 TCR 结构示意图；

图 2 为 TCR-T 生产流程图；

图 3 为不同 MOI 感染 SCG61 TCR-T 细胞表达检测；

图 4 为 SCG61 TCR 结合活性检测；

图 5 为 SCG61 TCR 对靶细胞的体外杀伤和细胞因子分泌功能；

图 6 为 SCG61 TCR-T 细胞多轮刺激增殖能力；

图 7 为 SCG61 TCR-T 对相似靶表位的识别能力；

图 8 为 SCG61 TCR-T 对不同 HPV 亚型多肽的识别能力；

图 9 为 SCG61 TCR-T 对免疫缺陷小鼠 CaSki 移植瘤模型体内药效实验；

图 10 为 SCG61-PD1-BB 表达 HPV TCR 和嵌合转换受体结构序列；

图 11 为 SCG61-PD1-BB TCR-T 细胞表达及表型检测；

图 12 为 SCG61-PD1-BB TCR-T 细胞增殖；

图 13 为 SCG61-PD1-BB 对靶细胞的体外杀伤功能；

图 14 为 SCG61-PD1-BB 对不同 HLA 亚型及 HPV/PDL1±靶细胞的体外杀伤功能；

图 15 为 SCG61-PD1-BB 对多轮肿瘤细胞刺激的体外杀伤功能；

图 16 为 SCG61-PD1-BB 对多轮肿瘤细胞刺激的增殖能力；

图 17 为 SCG61-PD1-BB 对免疫缺陷小鼠 CaSki 移植瘤模型体内药效实验；

图 18 为 SCG61-PD1-BB 对免疫缺陷小鼠 SCC-090 移植瘤模型体内药效实验；

图 19 为 SCG61-PD1-BB 与内源性 TCR 的错配率；

图 20 为丙氨酸筛查库技术鉴定 SCG61-PD1-BB 识别的关键氨基酸；

图 21 为 SCG61-PD1-BB 对 T2 负载 E7 多肽的功能亲和力；

图 22 为 SCG61-PD1-BB 在免疫缺陷小鼠 CaSki 移植瘤模型的体内功能；

图 23 为 SCG61-PD1-BB 在小鼠体内肿瘤、肺脏、脾脏等组织中的分布；

图 24 为 SCG61-TGF-BB 表达 HPV TCR 和嵌合转换受体结构序列；

图 25 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 细胞表达及表型检测；

图 26 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 错配率及记忆耗竭表型检测；

图 27 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对不同 HPV 亚型多肽的识别能力；

图 28 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对不同 HPV 亚型靶细胞杀伤功能；

图 29 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对不同 HPV 亚型靶细胞杀伤细胞因子分泌；

图 30 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 机理验证对 pSMAD2/3 通路的抑制作用；

图 31 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对 TGFβ1 亲和力功能验证；

图 32 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对 TGFβ1 的靶细胞杀伤功能；

图 33 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对多轮肿瘤细胞刺激的体外杀伤功能；

图 34 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对多轮肿瘤细胞刺激的增殖能力；

图 35 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 对人多肽表位的交叉反应；

图 36 为 SCG61-TGF-BB TCR-T 动物实验批次对靶细胞的体外杀伤功能；

图 37 为 SCG61-TGF-BB 在免疫缺陷小鼠 CaSki-E7 移植瘤模型的体内杀伤功能；

图 38 为 SCG61-TGF-BB 在免疫缺陷小鼠 CaSki-E7 移植瘤模型的体内扩增和存续；

图 39 为 SCG61-TGF-BB 在免疫缺陷小鼠 HepG2-E7 移植瘤模型的体内杀伤功能；

图 40 为 SCG61-TGF-BB 在免疫缺陷小鼠 HepG2-E7 移植瘤模型的体内扩增和存续。

具体实施方式

为了更容易理解本发明，描述实施例之前，先对本发明某些技术和科学术语做说明。除显而易见在本发明申请文件中的它处另有明确定义，本发明使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

术语“HPV E7抗原T细胞受体 (TCR)”在本文中被定义为这样的TCR，其在主要组织相容

性复合体(MHC)分子环境下与HPV E7表面抗原结合从而在表达重组TCR的细胞中诱导产生辅助子或细胞毒性应答。本申请的TCR或其片段，其能够识别满足HLA-A*02:01配型的HPV-16 E7相应肽段，不论是否表达完整E7抗原。

术语“MHC分子”是免疫球蛋白超家族的蛋白质，可以是Ⅰ类或Ⅱ类MHC分子。因此，其对于抗原的呈递具有特异性，不同的个体有不同的MHC，能呈递一种蛋白抗原中不同的短肽到各自的APC细胞表面。人类的MHC通常称为HLA基因或HLA复合体。

TCR是由α链/β链或者γ链/δ链以异质二聚体形式存在的细胞膜表面的糖蛋白。在 95%的T细胞中TCR异质二聚体由α和β链组成，而5%的T细胞具有由γ和δ链组成的TCR。天然αβ异质二聚TCR具有α链和β链，α链和β链构成αβ异源二聚TCR的亚单位。α和β各链包含可变区和恒定区，各可变区包含嵌合在框架结构(framework regions)中的3个CDR(互补决定区)，CDR1、CDR2和CDR3，本申请TCR的α链和β链的CDR区划定采用IMGT编号规则。CDR区决定了TCR与pMHC复合物的结合。TCR恒定域的序列可以在国际免疫遗传学信息系统(IMGT)的公开数据库中找到。

在本申请中，术语“T细胞受体”、“TCR”、“TCR分子”可互换使用。TGFβRII和TGFβ受体II具有相同的意思，可以互换使用。

TCR分子

本申请的TCR或其片段识别HLA-A*02:01配型的HPV-16 E7相应肽段。大约总人口的50%表达MHC I类分子HLA-A*02，因此，HLA-A*02限制性TCR可具有普遍的治疗用途。具体而言，本申请的TCR可以识别许多HLA-A*02等位基因的产物，包括HLA-A*0201、HLA-A*0202、HLA-A*0203、HLA-A*0206和HLA-A*0207等。尽管，白种人和亚洲人的HLA基因亚型可存在明显的差异；然而，超过95%的HLA-A2阳性的白种人是HLA-A*0201；而HLA-A2阳性的中国人由如下HLA-A2亚型组成：23%HLA-A*0201；45%HLA-A*0207；8%HLA-A*0206；23%HLA-A*0203。

在一些实施例中，所述TCR包含TCRα链可变域和TCRβ链可变域，并且TCRα和β链各具有3个互补决定区(CDR)。

在一些实施例中，所述TCRα链可变域的αCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，或其变体，其中一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换；和/或所述TCRβ链可变域的βCDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示，或其变体，其中一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换。

在一些实施例中，所述 TCRα 链可变域包含互补决定区 αCDR1、αCDR2 和 αCDR3，且所述 TCRβ 链可变域包含互补决定区 βCDR1、βCDR2 和 βCDR3，其中：

αCDR1、αCDR2 和 αCDR3 分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示，βCDR1、βCDR2 和 βCDR3 分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示；或 CDR 变体，其中一个或多个 CDR 中的一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换。

在一些实施例中，所述αCDR1、αCDR2和αCDR3分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示；和/或所述βCDR1、βCDR2和βCDR3分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5

和SEQ ID NO:6所示。

在一些实施例中，所述TCR包含如SEQ ID NO：13所示的氨基酸序列。

可以将上述本申请的CDR区氨基酸序列嵌入到任何适合的框架结构中来制备嵌合TCR。只要框架结构与本申请的TCR的CDR区兼容，本领域技术人员根据本申请公开的CDR区就能够设计或合成出具有相应功能的TCR分子。因此，本申请TCR分子是指包含上述α和/或β链CDR区序列及任何适合的框架结构的TCR分子。本申请TCRα链可变域为与SEQ ID NO:7具有至少90%，优选地95%，更优选地98%序列相同性的氨基酸序列；和/或本申请TCRβ链可变域为与SEQ ID NO:8具有至少90%，优选地95%，更优选地98%序列相同性的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述TCR为αβ异质二聚体，其包含TCRα链恒定域和TCRβ链恒定域。在一些实施例中，本申请的TCR分子的恒定域是人的恒定域。本领域技术人员知晓或可以通过查阅相关书籍或IMGT(国际免疫遗传学信息系统)的公开数据库来获得人的恒定域氨基酸序列。例如，本发明TCR分子α链的恒定域序列可以为“TRAC*01”，TCR分子β链的恒定域序列可以为“TRBC1*01”或“TRBC2*01”。在一些实施例中，恒定域引入一个额外的二硫键提高稳定性并减少外源转入的TCR分子与内源的TCR分子错配。本申请的TCR分子的恒定域也可以是小鼠的恒定域。将TRAC和TRBC同时换成小鼠来源的恒定域可以避免外源转入的TCR分子与内源的TCR分子错配，造成TCR靶向错误。此效用与外源导入人工二硫键目的类似。

转换共刺激分子

如本文所用，术语“转换刺激分子”和“转换共刺激分子”可互换使用。

本申请的转换刺激分子包含：免疫抑制蛋白的细胞外结构域 (ECD)，其中所述ECD与介导免疫细胞激活信号的共刺激分子的细胞内结构域(ICD)融合；其中所述免疫抑制蛋白细胞外结构域与其配体结合在所述经修饰的免疫细胞中产生免疫细胞激活信号而非免疫细胞失活信号。

免疫细胞包含的与其配体结合后引发免疫细胞失活信号的蛋白质包括：免疫抑制蛋白是包括PD-1、CTLA4，BTLA，TIM3，TIGIT，TGFβ受体以及其他任意具有免疫抑制功能或与免疫抑制信号通路相关的蛋白中的任意一种蛋白或其组合，且上述免疫抑制蛋白的ECD可存在至少一个氨基酸突变。

在一些实施例中，本申请的ECD为PD1 ECD；在一些实施例中，PD1 ECD序列可存在至少一个氨基酸突变；在一些实施例中，PD-1 ECD存在一个氨基酸突变，132位的丙氨酸(A)突变为亮氨酸(L)，增加了PD-1 ECD与PDL1的亲和力，ECD氨基酸序列如SEQ ID NO:9所示。

在一些实施例中，本申请的ECD为TGFβ受体 ECD；在一些实施例中，TGFβ受体 ECD序列可存在至少一个氨基酸突变；在一些实施例中，TGFβ受体 ECD氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示。

本申请的共刺激分子包含：CD28、4-1BB、ICOS、CD27、IL-12R、CD3、OX40蛋白中的任意一种蛋白或其组合，且上述共刺激分子的ICD序列可存在至少一个氨基酸突变。

在一些实施例中，本申请的ICD为4-1BB ICD；在一些实施例中，4-1BB ICD序列可存在

至少一个氨基酸突变；在一些实施例中，4-1BB ICD 氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

在一些实施例中，所述 TCR 包含 TCRα链和 TCRβ链，所述 TCRα链可变域包含与SEQ ID NO: 7 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列；和/或

所述 TCRβ链可变域包含与 SEQ ID NO：8 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述ECD和所述ICD通过跨膜区(TM)序列连接；跨膜区包含选自以下的蛋白的跨膜结构域：T细胞受体的α，β或ζ链, CD28，CD3ε，CD45，CD4，CD5，CD8，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137和CD154及其组合，且上述蛋白的跨膜结构域可存在至少一个氨基酸突变。

在一些实施例中，所述跨膜区序列为CD8跨膜区序列或CD28跨膜区序列；在一些实施例中，所述CD8跨膜区序列如SEQ ID NO:10所示。

在一些实施例中，转换共刺激分子为PD1(ECD)-CD8(TM)-4-1BB(ICD)(PD1-BB)；在一些实施例中，PD1-BB氨基酸序列如SEQ ID NO:14所示；在一些实施例中，转换共刺激分子为TGFβ(ECD)-CD8(TM)-4-1BB(ICD)(TGF-BB)；在一些实施例中，TGF-BB氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。

核酸分子

本申请的核酸分子，其包含编码HPV TCR分子的核酸序列；和/或，包含编码转换刺激分子的核酸序列。

本申请提供了编码本文上述TCR分子或其片段的核酸分子，所述片段可以是一个或多个CDR，α和/或β链的可变域，以及α链和/或β链。

在一些实施例中，所述核酸编码一种或多种结构特征，用于增加和/或稳定所表达的TCRα和β链之间的缔合。在一些实施例中，所述特征可以是特定的氨基酸或氨基酸序列。在一些实施方式中，所述核酸可编码一个或多个非天然半胱氨酸残基，用于在所述TCRα和β链之间形成一个或多个二硫键。在一些实施方式中，所述核酸可编码所述TCRα和β链的恒定域中的一个或多个非天然半胱氨酸残基。

本申请核酸分子的核苷酸序列可以是单链或双链的，该核酸分子可以是RNA或DNA，并且可以包含或不包含内含子。优选地，本申请核酸分子的核苷酸序列不包含内含子但能够编码本申请TCR，和/或本申请的转换刺激分子。

核苷酸序列可以是经密码子优化的。不同的细胞在具体密码子的利用上是不同的，可以根据细胞的类型，改变序列中的密码子来增加表达量。哺乳动物细胞以及多种其他生物的密码子选择表是本领域技术人员公知的。

在一些实施例中，本申请的编码序列为单链，通过P2A编码序列将TCRβ链编码序列和TCRα链编码序列连接，然后再通过T2A编码序列和共刺激分子编码序列连接；且所述单链编码核苷酸在同一阅读框中。

应理解，在基因克隆操作中，常常需要设计合适的酶切位点，这势必在所表达的氨基酸序列末端引入了一个或多个不相干的残基，而这并不影响目的序列的活性。为了构建融合蛋

白、促进重组蛋白的表达、获得自动分泌到宿主细胞外的重组蛋白、或利于重组蛋白的纯化，常常需要将一些氨基酸添加至重组蛋白的N-末端、C-末端或该蛋白内的其它合适区域内，例如，包括但不限于，适合的接头肽、信号肽、前导肽、末端延伸等。因此，本发明的融合蛋白的氨基端或羧基端还可含有一个或多个多肽片段，作为蛋白标签。任何合适的标签都可以用于本文。例如，所述的标签可以是FLAG，HA，HA1，c-Myc，Poly-His，Poly-Arg，Strep-TagII，AU1，EE，T7，4A6，ε，B，gE以及Ty1。这些标签可用于对蛋白进行纯化。

在一些实施例中，所述HPV TCR由SEQ ID NO：18所示的核酸序列编码。

在一些实施例中，所述核酸分子包含编码HPV TCR分子的核酸序列和包含编码PD1-BB的转换共刺激分子的核酸序列；在一些实施例中，上述核酸分子包含由SEQ ID NO：19所示的核酸序列。

在一些实施例中，所述核酸分子包含编码HPV TCR分子的核酸序列和包含编码结构为TGF-BB的转换共刺激分子的核酸序列；在一些实施例中，上述核酸分子包含由SEQ ID NO：20所示的核酸序列。

载体

本发明也涉及载体，该载体含有本文所述的核酸分子序列，以及与这些序列操作性连接的一个或多个调控序列。本发明所述的核酸分子可以多种方式被操作以保证所述融合蛋白的表达。利用重组DNA方法来改变多核苷酸序列的技术是本领域已知的。

调控序列可以是合适的启动子序列。启动子序列通常与待表达蛋白的编码序列操作性连接。启动子可以是在所选择的宿主细胞中显示转录活性的任何核苷酸序列，包括突变的、截短的和杂合启动子，并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的胞外或胞内多肽的基因获得。调控序列也可以是合适的转录终止子序列，由宿主细胞识别以终止转录的序列。终止子序列与编码该多肽的核苷酸序列的3'末端操作性连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本发明。调控序列也可以是合适的前导序列，对宿主细胞翻译重要的mRNA的非翻译区。前导序列与编码该多肽的核苷酸序列的5'末端可操作连接。在选择的宿主细胞中有功能的任何终止子都可用于本申请。

本申请的核酸分子可被克隆入许多类型的载体。例如，可被克隆入质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和粘粒。进一步地，载体是表达载体。表达载体可以以病毒载体形式提供给细胞。病毒载体技术在本领域中是公知的并在例如Sambrook等(2001，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory，New York)和其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和慢病毒。

通常，合适的载体包含在至少一种有机体中起作用的复制起点、启动子序列、方便的限制酶位点和一个或多个可选择的标记(例如，WO 01/96584和美国专利号6,326 ,193)。

例如，在某些实施方案中，本发明使用慢病毒载体，该慢病毒载体含有复制起始位点，3'LTR，5'LTR，本文所述的多核苷酸序列，以及任选的可选择的标记。

合适的启动子的一个例子为即时早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是能够驱动可操作地连接至其上的任何多核苷酸序列高水平表达的强组成型启动子序列。合适的启动子的另一个例子为延伸生长因子-1α(EF-1α)。然而，也可使用其他组成型启动子序列，包括但不限于类人猿病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳癌病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、鸟类白血病病毒启动子、EB病毒即时早期启动子、鲁斯氏肉瘤病毒启动子、以及人基因启动子，诸如但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红素启动子和肌酸激酶启动子。进一步地，也可考虑使用诱导型启动子。诱导型启动子的使用提供了分子开关，其能够在期限表达时打开可操作地连接诱导型启动子的多核苷酸序列的表达，而在当表达是不期望的时关闭表达。诱导型启动子的例子包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

为了评估目的基因的表达，被引入细胞的表达载体也可包含可选择的标记基因或报道基因中的任一个或两者，以便于从通过病毒载体寻求被转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在其他方面，可选择的标记可被携带在单独一段DNA上并用于共转染程序。可选择的标记和报道基因两者的侧翼都可具有适当的调节序列，以便能够在宿主细胞中表达。有用的可选择标记包括例如抗生素抗性基因，诸如neo等等。

报道基因用于鉴定潜在转染的细胞并用于评价调节序列的功能性。在DNA已经被引入受体细胞后，报道基因的表达在合适的时间下进行测定。合适的报道基因可包括编码荧光素酶、β-半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色萤光蛋白基因的基因。合适的表达系统是公知的并可利用已知技术制备或从商业上获得。

将基因引入细胞和将基因表达入细胞的方法在本领域中是已知的。载体可通过在本领域中的任何方法容易地引入宿主细胞，例如，哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞。例如，表达载体可通过物理、化学或生物学手段转移入宿主细胞。

将多核苷酸引入宿主细胞的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质转染法、粒子轰击、微注射、电穿孔等等。将感兴趣的多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用DNA和RNA载体。将多核苷酸引入宿主细胞的化学手段包括胶体分散系统，诸如大分子复合物、纳米胶囊、微球；和基于脂质的系统，包括水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。

将多核苷酸引入宿主细胞的生物学方法包括使用病毒载体，特别是慢病毒载体，这已经成为最广泛使用的将基因插入哺乳动物例如人细胞的方法。其他病毒载体可源自痘病毒、单纯疱疹病毒I、腺病毒和腺伴随病毒等等。已经开发了许多基于病毒的系统，用于将基因转移入哺乳动物细胞。例如，逆转录病毒提供了用于基因传递系统的方便的平台。可利用本领域中已知的技术将选择的基因插入载体并包装入逆转录病毒颗粒。该重组病毒可随后被分离和传递至体内或离体的对象细胞。许多反转录病毒系统在本领域中是已知的。在一些实施方案中，使用腺病毒载体。许多腺病毒载体在本领域中是已知的。在一个实施方案中，使用慢病毒载体。

免疫细胞

本申请的免疫细胞选自淋巴细胞、树突状细胞、单核/巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞。在一些实施例中，免疫细胞为淋巴细胞；在一些实施例中，免疫细胞为NK细胞；在一些实施例中，免疫细胞为B细胞；在一些实施例中，免疫细胞为TIL细胞。在一些实施例中，免疫细胞为T细胞，所述T细胞可衍生自从受试者分离的T细胞，或者可以是从受试者中分离的混合细胞群，诸如外周血淋巴细胞(PBL)群的一部分。如，该细胞可以分离自外周血单核细胞(PBMC)，可以是CD4+辅助T细胞或CD8+细胞毒性T细胞。该细胞可在CD4+辅助T细胞/CD8+细胞毒性T细胞的混合群中。一般地，该细胞可以用抗体(如，抗-CD3抗体)活化，以便使它们能够更容易接受转染。

本申请经修饰的免疫细胞，为包含上述TCR受体分子和上述免疫共刺激分子的免疫细胞；在一些实施例中，通过向分离的免疫细胞导入编码上述TCR受体分子和上述免疫共刺激分子的编码序列或包含上述编码序列的载体构建经修饰的免疫细胞；在一些实施例中，向体内的免疫细胞导入编码上述TCR受体分子和上述免疫共刺激分子的编码序列或包含上述编码序列的载体构建经修饰的免疫细胞；在一些实施例中，TCR受体分子和免疫共刺激分子的编码序列串联表达，且处于同一个阅读框中。

在一些实施例中，所述经修饰的免疫细胞包含HPV TCR和结构为PD1(ECD)-CD8(TM)-4-1BB(ICD)(PD1-BB)的转换共刺激分子；在一些实施例中，上述经修饰的免疫细胞包含由SEQ ID NO：15所示的氨基酸序列。

在一些实施例中，所述经修饰的免疫细胞包含HPV TCR和结构为TGF β 受体(ECD)-CD8(TM)- 4-1BB (ICD)(TGF-BB)的转换共刺激分子；在一些实施例中，上述经修饰的免疫细胞包含由SEQ ID NO：17所示的氨基酸序列。

组合物

本申请还提供了包含本发明的经修饰的免疫细胞、核酸或载体的组合物。在一些实施例中，所述组合物是药物组合物。在一些实施方式中，所述组合物是适合用于研究、治疗、预防和/或诊断的组合物。

在一些实施例中，本申请的经修饰的免疫细胞、核酸或载体优选与本领域技术人员公知的一种或多种其它可药用成分一起配制成药剂或药物，所述可药用成分包括但不限于可药用载体、佐剂、赋形剂、稀释剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂、掩蔽剂、着色剂、调味剂和甜味剂。术语“可药用”用于本文中时涉及化合物、成分、材料、组合物、剂型等，它们在合理的医学判断范围内、适合用于接触所讨论的对象(例如人类)的组织而没有过度的毒性、刺激、变态反应或者其它问题或并发症、与合理的效益/风险比相称。每种载体、佐剂、赋形剂等在与制剂的其它成分相容的意义上，也必须是“可接受的”。合适的载体、佐剂，赋形剂等可以在标准的药物教科书中找到，例如，《雷氏药物科学》(Remington 's Pharmaceutical Sciences)；以及《药用赋形剂手册》(Hand book of Pharmaceutical Excipients)。

本发明的药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。施用的数量和频率

将由这样的因素确定，如患者的病症、和患者疾病的类型和严重度。

当指出“免疫学上有效量”、“抗肿瘤有效量”、“肿瘤-抑制有效量”或“治疗量”时，待施用的本发明组合物的精确量可由医师确定，其考虑患者(对象)的年龄、重量、肿瘤大小、感染或转移程度和病症的个体差异。可通常指出：包括本文描述的T细胞的药物组合物可以以E4至E9个细胞/kg体重的剂量，优选E5至E7个细胞/kg体重的剂量。T细胞组合物也可以以这些剂量多次施用。细胞可通过使用免疫疗法中公知的注入技术(见例如Rosenberg等，New Eng.J.of Med.319:1676，1988)施用。对于具体患者的最佳剂量和治疗方案可通过监测患者的疾病迹象并因此调节治疗由医学领域技术人员容易地确定。

对象组合物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过喷雾法、注射、吞咽、输液、植入或移植。本文描述的组合物可被皮下、皮内、瘤内、结内、脊髓内、肌肉内、通过静脉内注射或腹膜内施用给患者。

医药用途

在另一方面，提供了本申请的经修饰的免疫细胞、核酸、载体或药物组合物在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的应用。

在一些实施例中，本申请的经修饰的免疫细胞、核酸、载体或药物组合物可用于预防或治疗由HPV感染所引发的相关疾病。由HPV感染所引发的相关疾病包括宫颈癌、口咽癌、头颈癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌等所组成的一种或多种。

治疗和预防方法

可以通过分离患有与HPV相关疾病的病人或志愿者的T细胞，并将本申请的核酸分子或载体导入上述T细胞中，随后将这些基因工程修饰的细胞回输到病人体内来进行治疗。因此，本申请提供了一种治疗HPV相关疾病的方法，包括将分离的表达本申请TCR的T细胞，优选地，该T细胞来源于病人本身，输入到病人体内。一般地，包括(1)分离病人的T细胞，(2)用本申请核酸分子或载体，体外转导T细胞，(3)将基因工程修饰的T细胞输入到病人体内。分离、转染及回输的细胞的数量可以由医师决定。

在本发明的一些实施方案中，本发明的经修饰的免疫细胞、核酸、载体或药物组合物可与本领域已知的其它疗法结合。所述疗法包括但不限于化疗、放疗、免疫抑制剂和病毒抑制剂。例如，可结合本领域周知的治疗HPV诱发的疾病的核苷酸类似物或干扰素进行治疗。

“患者”、“对象”、“个体”等在本文中可交换使用，指可引起免疫应答的活有机体，如哺乳动物。例子包括但不限于人、狗、猫、小鼠、大鼠和其转基因物种。

下面将结合具体实施例，对本申请的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。需说明的是，以下实施例的描述顺序不作为对实施例优选顺序的限定。

下面实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人在分子克隆：实验室手册(Molecular cloning-A Laboratory manual.第三版.2001)中的条件，或按照制造厂

商所建议的条件。除非另有说明，否则百分比和份数按重量计算。除非另有说明，文中涉及的试剂与材料均可商购获得，或本领域技术人员可依据公知常识自行制备。任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本申请中。文中的较佳实施方法与材料仅作示范之用，但不能限制本申请的内容。

实施例1：表达SCG61 TCR病毒载体构建

本发明人通过大规模筛选，意外地获得一种TCR，其识别HLA-A*02:01配型的HPV-16 E7相应肽段。所述TCR被命名为SCG61 TCR，其包含TCRα链可变域和TCRβ链可变域，并且TCRα和β链各具有3个互补决定区(CDR)：αCDR1、αCDR2和αCDR3分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示；所述βCDR1、βCDR2和βCDR3分别如SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示。

一种优选的SCG61 TCR结构示意如图1所示。全基因合成HPV TCR片段编码序列，合成基因经双酶切后插入慢载体构建质粒，构建得到的载体后进行慢病毒包装。SCG61 TCR由HPV E7 T细胞受体β链可变区(E7 TCR Vβ)、T细胞受体β链恒定区(TCR Cβ)、2A自剪切肽、HPV E7 T细胞受体α链可变区(E7 TCR Vα)、T细胞受体α链恒定区(TCR Cα)组成，其中TCR恒定区经过序列改造来减少内源TCR错配。

实施例2：制备SCG61 TCR-T

T细胞完全培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)、400IU/mL 注射用IL-2(山东泉港药业有限公司，08-102)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞冻存液配制：75%CS10(ThermoFisher，A2596101) + 25%HSA (FLEXBUMIN，S20181007)。

生产工艺流程见图2；

Day0：从单采血中分离获得较纯的CD3+T细胞，用T细胞完全培养基调整细胞浓度至1×10^6/mL，按Transact(CD3/CD28微球)(Macs, 6201000014)：细胞悬液=1:30加入激活剂，轻轻充分混匀，刺激培养24h后不同MOI病毒感染；

Day1：计数细胞，调整T细胞的密度在5×10^5/mL，加入病毒液；

Day2-11：细胞感染后，每天观察细胞状态，适时补加T细胞完全培养基，使T细胞的密度维持在5×10^5/mL，使细胞扩增；

Day12：300g离心5分钟收获细胞，用含5%人血白蛋白的生理盐水溶液清洗细胞，用T细胞冻存液按照适当的密度进行冻存，经程序降温仪冷冻后保存于液氮中。

实施例3：不同MOI感染SCG61 TCR-T细胞表达检测

流式缓冲液配制：DPBS(Gibco, 14190250)、2%FBS(Gibco,10099141)，置4℃冰箱备用。

取SCG61 TCR-T细胞和UT细胞(对照组)，流式缓冲液洗涤1次后弃上清，加入PE HLA-A*02:01 HPV E7 Tetramer (MBL，TB-0031-1)，4℃避光孵育60min后流式缓冲液洗涤，重悬，

最后流式细胞仪(Beckman CytoFLEX)检测。

结果显示，MOI = 0.3～8，SCG61 TCR阳性率在17%～96%，且PD1表达都没有明显升高(图3)，说明SCG61 TCR表达与MOI正相关，也没有上调耗竭表型PD1的表达。

实施例4： SCG61 TCR结合活性检测

TCR亲和力可衡量TCR-pMHC结合的强度，同时考虑其他分子(如TCR共受体)在相互作用中的影响。使用mTCR标记TCR阳性细胞，从而圈出TCR阳性细胞群，再对选中的阳性细胞进行不同浓度梯度的E7 11-19 pMHC tetramer染色，检测不同浓度梯度条件下阳性的SCG142细胞和E7 11-19 peptide-MHC tetramer结合能力，可以SCG61 TCR和tetramer浓度呈明显的正相关趋势(图4)。

实施例5：SCG61 TCR对靶细胞的体外杀伤和细胞因子分泌功能

实验使用实时细胞分析(RTCA)技术评估SCG61 TCR对靶细胞的杀伤效果。在96孔RTCA板上培养了人宫颈癌Caski细胞(HPV-16 E7+)作为靶细胞，孵育约16小时后加入SCG61 TCR-T和UT共同培养，之后连续观察36小时，并将靶细胞的生存曲线绘制成连续图谱进行对比，并收集共培养上清进行细胞因子检测。

M10细胞完全培养基配制：DMEM (Gibco,11965-092)、10% FBS (Gibco,10099141)、1% Sodium Pyruvate (Gibco, 11360070)、1%HEPES (Gibco, 15630080)、1%NEAA (Gibco, 11140-050)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

SCG61 TCR-T对肿瘤细胞的杀伤(RTCA)

Day 0：取生长状态良好的人宫颈癌CaSki细胞(R10细胞完全培养基)，消化后调整细胞密度至4×10^5/ml备用，取一块Collagen包被好的RTCA用96孔板，加入50ul/孔相应培养基进行仪器基线测定，再每孔加入密度为4×10^5/ml的靶细胞50ul，静置约5min后上机，连续检测约16h生长曲线；

Day 1：取已测好阳性率和细胞活率的SCG61 TCR-T和UT，按照阳性率计算效应细胞数，按照效靶比1:1和1:3，加入效应细胞50ul/孔，上机连续检测杀伤曲线，24小时后取上清测细胞因子；

细胞因子检测：

取细胞因子试剂盒Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array Kit II (BD,551809)，平衡至室温；

吸取2ml Assay Diluent 复溶标准品至浓度5000pg/ml，室温平衡30min；

标准品配制：取标准品，标记为S1，依次2倍稀释标准品S2-S9，S10为空白；

配置Human Th1/Th2 Cytokine Capture Beads混合液：取微球溶液A1-A6，震荡混匀后按相同比例混合；

取96孔U形底板，每个样本孔加入50ul的Human Th1/Th2 Cytokine Capture Beads混合液；

按50ul/孔加入检测样本和标曲样本S1-S10；

加入50ul的Human Th1/Th2 PE Detection Reagent；

室温避光孵育180min；

加入100ul Wash buffer，300g离心5min，弃上清；

用100ul Wash buffer重悬，上样流式检测，使用FCAP Array v3软件进行流式结果分析。

结果显示，SCG61 TCR-T对表达HPV-16 E7+的CaSki有显著杀伤作用，且杀伤速度与效靶比呈正相关(图5 A)。共同培养36小时后，E:T=1:1和E:T=1:3组对阳性靶细胞的杀伤比例接近100%；释放出的IFN-γ含量显著高于Mock T组(图5 B)。

实施例6： SCG61 TCR-T细胞多轮刺激增殖能力

通过多轮肿瘤细胞刺激实验对SCG61 TCR-T增殖能力进行了研究。

在SCG61 TCR-T和UT细胞培养皿中，以1：1的比例加入CaSki(HPV-16 E7+)靶细胞刺激，并每隔2-3天对细胞进行计数。刺激5-7天后调整SCG61 TCR-T和UT的细胞量，再加入等量的肿瘤细胞，重复上述操作，共进行三次多轮刺激。

实验数据表明，每轮肿瘤细胞刺激后，SCG61 TCR-T的增殖倍数都明显高于UT(图6)。SCG61 TCR-T能够在多轮肿瘤刺激后仍维持持久的增殖活力。

实施例7：SCG61 TCR-T对相似靶表位的识别能力

实验使用T2细胞负载九肽(HPV E7 11-19)、(HPV E7 12-20)以及十肽(HPV E7 11-20)后与SCG61 TCR-T共孵育，检测上清中IFN-γ含量，确定SCG61 TCR-T的识别表位，为非临床安全性研究提供支持和依据。

靶细胞准备：取传代数次后生长状态良好的T2细胞，500g离心5min后去上清，使用R10培养基重悬细胞，计数后取96孔U底板，按100μl/孔加入T2细胞，2×10^4/孔；分别按照10uM和1uM加入11ul对应多肽溶液，使其终浓度为：1uM和100nM；将96孔U底板放入37℃培养箱孵育2小时后加入效应细胞。

效应细胞准备：吹匀SCG61 TCR-T，计数后按阳性率调整细胞密度4.0×10^5/ml，按50μl/孔加入效应细胞，吹匀后放入37℃培养箱。共孵育约24h后取细胞流式检测细胞因子水平。

结果显示，使用2个多肽浓度梯度(1uM和100nM), SCG61 TCR-T对负载E7 11-19多肽的T2细胞显著分泌细胞因子IFN-γ，对E7 11-20多肽识别能力则相对较弱，同时对阴性对照组E6 29-38多肽以及E7 12-20多肽均未检测细胞因子分泌(图7)，表明SCG61 TCR-T的识别表位是HPV E7 11-19九肽。

实施例8：SCG61 TCR-T对不同HPV亚型多肽的识别能力

HPV是一类具有高宿主特异性和亲和力的无包膜双链环状DNA病毒。本实验主要针对全球高危感染亚型HPV16型、HPV31型和HPV52型。实验通过T2细胞负载不同浓度的HPV16-

E7、HPV31-E7、HPV52-E7多肽，检测共培养的细胞因子分泌，研究SCG61 TCR-T是否能够识别不同亚型的HPV。

SCG61 TCR-T对T2负载不同亚型HPV-E7多肽共孵育实验

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

靶细胞准备：取传代数次后生长状态良好的T2细胞，500g，5min离心后去上清，使用R10细胞完全培养基重悬细胞，计数后，取96孔U底板，按100μl/孔加入T2细胞，2×10^4/孔，阴性对照组各孔加入100ul TCM培养基；按照浓度梯度加入对应的HPV16-E7、HPV31-E7、HPV52-E7、HPV16-E6多肽溶液，使其终浓度为：10^{-5} M～10^{-12}M。

效应细胞准备：吹匀SCG61 TCR-T，500g，5min离心后去上清，使用T细胞培养基重悬细胞，计数后调整SCG61 TCR-T阳性细胞密度4.0×10^5/ml，按50μl/孔加入效应细胞，吹匀后放入37℃培养箱。共孵育24h后取细胞上清流式检测细胞因子产生水平。

结果显示，SCG61 TCR-T对T2细胞负载10uM～1pM梯度浓度HPV16-E7、HPV31-E7、HPV52-E7多肽识别的EC50值分别是2.4×10^{-9} M、1.8×10^{-8} M和6.8×10^{-9} M(图8)。 表明SCG61 TCR-T对高危型HPV16和HPV52识别能力接近，比HPV31型识别更好。

实施例9：SCG61 TCR-T对免疫缺陷小鼠CaSki移植瘤模型体内药效实验

为了了解SCG61 TCR-T在体内环境中对肿瘤细胞的杀伤作用，实验使用了25只NPG免疫缺陷雌性小鼠，小鼠接种5×10^6 CaSki细胞。10天后，小鼠随机分为五组，其中三组为SCG61 TCR-T低、中、高剂量组，分别经尾静脉单次注射SCG61 TCR-T，剂量依次为2×10^6、6×10^6、2×10^7阳性T 细胞/只；阴性对照组经尾静脉单次注射UT细胞2×10^7 T 细胞/只；与此同时，模型对照组小鼠通过尾静脉注射单次注射等量的受试物溶媒；给药后观察24天。每周测量两次肿瘤长、短径，计算肿瘤体积。

在Day 24，与模型对照组、阴性对照组相比，SCG61 TCR-T低剂量组、中剂量组和高剂量组的肿瘤体积显著降低，且肿瘤抑制率与给药剂量呈正相关(图9)。

上述结果表明，SCG61 TCR-T可明显抑制人宫颈癌CaSki细胞皮下移植瘤体积，其中高剂量2×10^7 T cells /只 SCG61 TCR-T抑制肿瘤效果最显著。

实施例10：表达SCG61-PD1-BB病毒载体构建

SCG61-PD1-BB结构如图10所示，全基因合成HPV TCR-PD1-BB片段编码序列，合成基因经双酶切后插入慢载体构建质粒，构建得到的载体并进行慢病毒包装。SCG61-PD1-BB 由HPV E7 T细胞受体β链可变区(E7 TCR Vβ)、T细胞受体β链恒定区(TCR Cβ)、2A自剪切肽、HPV E7 T细胞受体α链可变区(E7 TCR Vα)、T细胞受体α链恒定区(TCR Cα)以及2A自剪切肽、PD-1胞外区、CD8跨膜区、4-1BB胞内区组成。

实施例11：流式细胞仪检测SCG61-PD1-BB TCR-T和PD-1特异性表达

流式缓冲液配制：DPBS(Gibco, 14190250)、2%FBS(Gibco,10099141)，置4℃冰箱备用。

取SCG61-PD1-BB TCR-T细胞和Mock T细胞(对照组)，流式缓冲液洗涤1次后弃上清，加入PE HLA-A*02:01 HPV E7 Tetramer (MBL，TB-0031-1)、PE-Cy7 anti-human CD4(BIOLEGEND，300512)和PerCP/Cy5.5 anti-human CD8a(BIOLEGEND，301032)，4℃避光孵育60min后流式缓冲液洗涤，重悬，最后流式细胞仪(Beckman CytoFLEX)检测。

结果显示，SCG61-PD1-BB TCR阳性率在60%以上，且CD4+、CD8+T细胞比例基本都保持在50%左右对比Mock T未见差别(图11)，说明SCG61-PD1-BB TCR可稳定表达，新增加的TCR和PD-1序列并未对CD4+、CD8+T细胞的占比造成明显影响。

此外，体外扩增能力显示：SCG61-PD1-BB在第10天左右可扩增100倍以上(图12)，表明TCR和PD-1转染不会对T细胞的增殖和活率造成影响。

实施例12： SCG61-PD1-BB体外肿瘤细胞杀伤能力

实验使用实时细胞分析(RTCA)技术评估SCG61-PD1-BB对靶细胞的杀伤效果。在96孔RTCA板上培养了人宫颈癌Caski细胞(HPV-16 E7+/ PD-L1+)、人头颈部鳞癌SCC-090细胞(HPV-16 E7+/ PD-L1–)和人肝癌HepG2细胞(HPV-16 E7–/ PD-L1–)作为靶细胞，孵育约16小时后加入SCG61-PD1-BB和Mock T共同培养，之后连续观察60小时，并将靶细胞的生存曲线绘制成连续图谱进行对比，杀伤完成后，收集共培养上清进行细胞因子检测。

SCG61-PD1-BB对肿瘤细胞的杀伤(RTCA)

Day 0：取生长状态良好的人宫颈癌CaSki-Luci-GFP细胞(R10细胞完全培养基)、人头颈部鳞癌SCC-090细胞(M10细胞完全培养基)和人肝癌HepG2细胞(M10细胞完全培养基)，消化后调整细胞密度至4×10^5/ml备用，取一块Collagen包被好的RTCA用96孔板，加入50ul/孔相应培养基进行仪器基线测定，再每孔加入密度为4×10^5/ml的靶细胞50ul，静置约5min后上机，连续检测约16h生长曲线；

Day 1：取已测好阳性率和细胞活率的SCG61-PD1-BB TCR-T和Mock T，按照阳性率计算效应细胞数，按照效靶比5:1和1:1，加入效应细胞50ul/孔，上机连续检测杀伤曲线；

Day 3：拷贝RTCA的生长和杀伤曲线，停机收集共培养上清进行细胞因子检测。

结果显示，SCG61-PD1-BB对对表达HPV-16 E7+/PD-L1+的CaSki-Luci-GFP和HPV-16 E7+/ PD-L1–SCC-090均有显著的特异性杀伤作用，且杀伤速度与效靶比呈正相关(图13A)，效靶比5：1半数杀伤时间明显小于效靶比为1:1时。共同培养40小时后，E:T=5:1和E:T=1:1组对阳性靶细胞的杀伤比例均接近100%(图13B)；释放出的IFN-γ和TNF的含量均显著高于Mock T组(图13C、D)；在相同效靶比的情况下，SCG61-PD1-BB对高表达PD-L1的CaSki细胞的半数杀伤时间明显短于对PD-L1阴性的SCC-090细胞的半数杀伤时间，且释放的细胞因子的浓度与杀伤速度呈正相关。结果表明SCG61-PD1-BB对于高表达PD-L1的HPV-16 E7 +肿瘤细胞可能有更强的抗肿瘤作用。

实施例13： SCG61-PD1-BB抗肿瘤效应具有HLA-A*02:01和HPV特异性

为了验证SCG61-PD1-BB对于肿瘤细胞表达HLA-A*02:01和HPV-16 E7的差异是否具有不同的杀伤能力，准备了HLA-A*02:01+/HPV-16 E7+/PD L1+(CaSki细胞)、HLA-A*02:01+/HPV-16 E7+/PD L1–(SCC-090细胞)、HLA-A*02:01＋/HPV-16 E7–/PD L1–(人宫颈癌C-33A细胞)和HLA-A*02:01－/HPV-16 E7+/ PD L1–(人宫颈癌SiHa细胞)四种靶细胞系进行功能实验检测(图14A)。首先将SCG61-PD1-BB和Mock T细胞与上述四种靶细胞进行培养，使用RTCA技术对靶细胞的杀伤效果进行观察，杀伤完成后，收集共培养上清进行细胞因子检测。

SCG61-PD1-BB对肿瘤细胞的杀伤(RTCA)

Day 0：取生长状态良好的CaSki细胞(R10细胞完全培养基)、SCC-090细胞(M10细胞完全培养基)、C-33A细胞(M10细胞完全培养基)和SiHa细胞(M10细胞完全培养基)，消化后调整细胞密度至4×10^5/ml备用，取一块RTCA用96孔板，加入50ul/孔相应培养基进行仪器基线测定，再每孔加入密度为4×10^5/ml的靶细胞50ul，静置约5min后上机，连续检测约16h生长曲线；

Day 1：取已测好阳性率和细胞活率的SCG61-PD1-BB TCR-T和Mock T，按照阳性率计算效应细胞数，按照效靶比1:2，加入效应细胞50ul/孔，上机连续检测杀伤曲线；

Day 3：拷贝RTCA的生长和杀伤曲线，停机收集共培养上清进行细胞因子检测。

结果显示，效靶比=1：2时SCG61-PD1-BB可特异性识别HLA-A *02:01+/HPV-16 E7+的靶细胞，24小时杀伤率可达到70%以上，并且SCG61-PD1-BB对HPV-16 E7+/PD L1+的杀伤也比对HPV-16 E7+/PD L1-的更强(图14B)；对表达HLA-A*02:01+/HPV-16 E7–和HLA-A*02:01–/HPV-16 E7+的靶细胞无明显杀伤(图14B)，细胞因子的检测结果与杀伤结果高度一致(图14C)。说明SCG61-PD1-BB的抗肿瘤效应具有HLA-A*02:01和HPV-16 E7表达特异性。

SCG61-PD1-BB能够特异性靶向杀伤表达HLA-A*02:01和HPV-16 E7的肿瘤细胞并释放效应性细胞因子，而不识别杀伤仅表达HLA-A*02:01或HPV-16 E7的肿瘤细胞；并且由于SCG61-PD1-BB能将PD-1的抑制信号转换成活化刺激信号，对于高表达PD-L1的HPV-16 E7癌细胞，SCG61-PD1-BB的抗肿瘤作用更加突出。

实施例14： SCG61-PD1-BB在多轮靶细胞刺激后仍保留杀伤和增殖能力

通过多轮肿瘤细胞刺激实验对SCG61-PD1-BB杀伤肿瘤细胞的抗耗竭能力进行了研究。使用RTCA技术对靶细胞的杀伤效果进行观察，在RTCA板铺HPV-16 E7+/PD-L1+(CaSki)和HPV-16 E7+/PD-L1–(SCC-090)靶细胞，培养24h后按效靶比E:T=2:1的比例分别加入SCG61-PD1-BB细胞和Mock T细胞。杀伤4天后收集T细胞，再加入预铺24h靶细胞的RTCA板中进行多轮杀伤，重复上述操作，共进行四次多轮杀伤。

实验数据表明，SCG61-PD1-BB经四次多轮肿瘤细胞刺激后仍对CaSki和SCC-090肿瘤细胞有明显杀伤作用(图15)。

在SCG61-PD1-BB和Mock T细胞培养皿中，以1：1的比例加入CaSki(HPV-16 E7+/ PD-L1+)靶细胞刺激，并每隔2-3天对细胞进行计数。刺激5-7天后调整SCG61-PD1-BB和Mock T

的细胞量，再加入等量的肿瘤细胞，重复上述操作，共进行三次多轮刺激。

实验数据表明，每轮肿瘤细胞刺激后，SCG61-PD1-BB的增殖倍数都明显高于Mock T(图16)。

SCG61-PD1-BB引入了PD-1共刺激融合受体(PD-1辅助序列)，目的是将肿瘤细胞系表面的刹车信号(PD-L1)转变成为刺激信号，从而促进细胞增殖，防止细胞提早进入耗竭状态。结果表明，SCG61-PD1-BB的确能够在多轮肿瘤刺激(模拟T细胞的耗竭环境)后仍维持持久的抗肿瘤作用和增殖活力。

实施例15：SCG61-PD1-BB对人宫颈癌CaSki细胞NPG小鼠皮下异种移植瘤的药效试验

为了了解SCG61-PD1-BB在体内环境中对肿瘤细胞的杀伤作用，实验使用了30只NPG免疫缺陷雌性小鼠。在Day7，小鼠接种CaSki细胞。小鼠随机分为五组，肿瘤体积大小为99.9-133.9 mm^3，其中三组为SCG61-PD1-BB低、中、高剂量组，分别经尾静脉单次注射SCG61-PD1-BB，剂量依次为2×10^6、6×10^6、2×10^7阳性T 细胞/只；阴性对照组经尾静脉单次注射Mock T细胞2×10^7 T 细胞/只；与此同时，模型对照组小鼠通过尾静脉注射单次注射等量的受试物溶媒；给药后观察4周。每周测量两次肿瘤长、短径，计算肿瘤体积。

在Day29，模型对照组、阴性对照组、SCG61-PD1-BB低、中、高剂量组的肿瘤大小分别为761±127 mm^3、674±101 mm^3、444±80 mm^3、466±69 mm^3和206±119 mm^3(图17)。Day8～Day29，阴性对照组动物肿瘤体积虽然低于模型对照组，但无统计学差异($P>0.05$)。与模型对照组相比，Day15～Day25，SCG61-PD1-BB低剂量组的肿瘤体积显著降低($P<0.05$)。与模型对照组相比，Day22、Day25，SCG61-PD1-BB中剂量组的肿瘤体积显著降低($P<0.05$)。与模型对照组相比，Day8～Day29，SCG61-PD1-BB高剂量组的肿瘤体积显著性降低($P<0.01$)。

上述结果表明，SCG61-PD1-BB可明显抑制人宫颈癌CaSki细胞皮下移植瘤体积，其中高剂量2×10^7 T cells /只SCG61-PD1-BB抑制肿瘤效果最显著。

SCG61-PD1-BB对CaSki细胞NPG小鼠皮下异种移植瘤药效试验分组

序号	组别	测试药	给药剂量(阳性T细胞/只)	动物只数
1	模型对照组	溶媒	NA	6
2	阴性对照组	Mock T	2×10^7	6
3	SCG61-PD1-BB低剂量组	SCG61-PD1-BB	2×10^6	6
4	SCG61-PD1-BB中剂量组	SCG61-PD1-BB	6×10^6	6
5	SCG61-PD1-BB高剂量组	SCG61-PD1-BB	2×10^7	6

其中“NA”表示不适用。

实施例16：SCG61-PD1-BB对人头颈部鳞癌SCC-090细胞NCG小鼠皮下异种移植瘤的药效试验

为了了解SCG61-PD1-BB在体内环境中对肿瘤细胞的杀伤作用，实验使用了30只NCG免疫缺陷雌性小鼠。在Day14，小鼠身体右侧接种5×10^6个人头颈鳞癌SCC-090细胞。小鼠随机分为五组，肿瘤大小约为120mm^3，其中三组接受不同剂量的SCG61-PD1-BB(2×10^6个细胞/

只，6×10^6个细胞/只、1.5×10^6个细胞/只)细胞注射，剩余两组作为对照组，分别接受溶媒和Mock T进行试验。实验期间，每周2次进行肿瘤体积测量和体重测量。

给药后Day32，模型对照组、阴性对照组、SCG61-PD1-BB低、中、高剂量组的肿瘤大小分别为1585±72 mm^3，555±72 mm^3，98±34 mm^3，9±6 mm^3，9±8 mm^3(图18)。阴性对照组和SCG61-PD1-BB低、中、高剂量组肿瘤体积均值均显著低于溶媒对照组(P<0.01)；SCG61-PD1-BB低、中、高剂量组肿瘤体积均值均显著低于阴性对照组(P<0.01)。

综上所述，荷人头颈鳞癌SCC-090细胞NCG小鼠，单次静脉回输后，剂量为0.2×10^7 ～1.5×10^7 细胞/只SCG61-PD1-BB对小鼠移植瘤均表现出显著的抑瘤效果。

SCG61-PD1-BB对SCC-090细胞NCG小鼠皮下异种移植瘤药效试验分组

序号	组别	测试药	给药剂量(阳性T细胞/只)	动物只数
1	模型对照组	溶媒	NA	6
2	阴性对照组	Mock T	2×10^7	6
3	SCG61-PD1-BB低剂量组	SCG61-PD1-BB	2×10^6	6
4	SCG61-PD1-BB中剂量组	SCG61-PD1-BB	6×10^6	6
5	SCG61-PD1-BB高剂量组	SCG61-PD1-BB	1.5×10^7	6

其中“NA”表示不适用。

实施例17：SCG61-PD1-BB内源性TCR的错配率

抗体APC Hamster Anti-mTCR β (BD, 553174)可检测SCG61-PD1-BB细胞产品中所有TCR链表达，而PE HLA-A*02:01 HPV E7 Tetramer(MBL, TB-0031-1)检测的则是针对SCG61-PD1-BB细胞产品中的特异性TCR，因此使用该两种抗体对SCG61-PD1-BB细胞产品进行检测，通过计算可得TCR错配率结果。SCG61-PD1-BB错配率=[1-(E7 tetramer+/mTCRβ+)]×100%

结果显示，TCR表达跟MOI(Multiplicity of infection，感染复数：是指慢病毒载体与目标T细胞的比值)呈正相关，这表现在MOI为0.2时，SCG61-PD1-BB的TCR的阳性率仅为22.1%，当MOI为5时，SCG61-PD1-BB的TCR阳性率79.2%(图19)。同时MOI 0.2～5，TCR错配率都低于10%。

综上所述，新增加的TCR和PD-1序列基本不会造成错配现象而引起潜在安全风险。

实施例18：SCG61-PD1-BB HPV-16 E7表位肽关键氨基酸识别及亲和力

本研究旨在通过丙氨酸筛查库技术将HPV-16 E7表位肽中每个氨基酸残基分别单独突变为A(丙氨酸)，来分辨某一特定位点氨基酸对TCR亲和力及活性的影响，以明确SCG61-PD1-BB在靶抗原肽中的识别位点。T2细胞是HLA-A*02:01阳性的T、B淋巴细胞杂交瘤细胞。让T2细胞负载突变后的多肽，37℃培养箱孵育后加入SCG61-PD1-BB，24小时后检测上清中细胞因子IFN-γ分泌。

通过研究SCG61-PD1-BB特异性识别T2负载不同浓度梯度的HPV-16 E7表位肽后，分泌细胞因子的能力可以评价SCG61-PD1-BB体外与HPV-16 E7表位肽-MHC复合物的结合功能活性。

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

多肽准备：多肽各取1管2mg，用190μl DMSO溶解，终浓度为10mM，10mM 取3μl使用297μl TCM稀释至100μM，再依次进行10倍梯度稀释至1nM，具体信息见下表。

序号	多肽名称	多肽序列	纯度
1	E7	YMLDLQPET(SEQ ID NO:21)	>98%
2	E7-Y1A	AMLDLQPET(SEQ ID NO:22)	>98%
3	E7-M2A	YALDLQPET(SEQ ID NO:23)	>98%
4	E7-L3A	YMADLQPET(SEQ ID NO:24)	>98%
5	E7-D4A	YMLALQPET(SEQ ID NO:25)	>98%
6	E7-L5A	YMLDAQPET(SEQ ID NO:26)	>98%
7	E7-Q6A	YMLDLAPET(SEQ ID NO:27)	>98%
8	E7-P7A	YMLDLQAET(SEQ ID NO:28)	>98%
9	E7-E8A	YMLDLQPAT(SEQ ID NO:29)	>98%
10	E7-T9A	YMLDLQPEA(SEQ ID NO:30)	>98%

靶细胞准备：取传代数次后生长状态良好的T2细胞，500g/5min离心后去上清，使用R10细胞完全培养基重悬细胞，计数后按取2.4×10^6的T2细胞用12ml TCM培养基重悬，取96孔U底板，按100μl/孔加入T2细胞，2×10^4/孔；按照浓度梯度加入对应的多肽溶液，使其终浓度为：10^{-5} M～10^{-12} M；将96孔U底板放入37度培养箱孵育2小时后加入效应细胞。

效应细胞准备：吹匀SCG61-PD1-BB，计数后3.6×10^6细胞用6ml T细胞培养基重悬，使SCG61-PD1-BB阳性细胞调整细胞密度4×10^5/ml，按50μl/孔加入效应细胞，吹匀后放入37℃培养箱，共孵育24h后取共培养上清，流式检测细胞因子分泌。

结果显示，SCG61-PD1-BB与2/4/5/6号位氨基酸突变的HPV-16 E7多肽孵育后细胞因子分泌显著降低(图20)，确认2/4/5/6识别位点为的4个关键氨基酸。这4个关键氨基酸残基被认为在TCR与HPV-16 E7表位肽直接结合或控制HPV-16 E7表位肽的空间结构中起到关键作用。

T2细胞负载10^{-5} M～10^{-12} M浓度范围的HPV-16 E7表位肽后，与SCG61-PD1-BB共孵育，IFN-γ分泌量与负载的HPV-16 E7表位肽浓度成正相关；而Mock T则不能识别T2细胞负载的HPV-16 E7表位肽。SCG61-PD1-BB识别HPV-16 E7表位肽的半数最大效应浓度(Concentration For 50% Of Maximal Effect, EC50)为6.76×10^{-10}M(图21)。结果表明，SCG61-PD1-BB能够识别HPV-16 E7表位肽的关键结合位点并有较强的结合功能活性。

实施例19：SCG61-PD1-BB细胞在荷CaSki细胞NPG小鼠体内的扩增情况

为了解SCG61-PD1-BB在体内环境中持续扩增的数据，实验构建了荷CaSki宫颈癌细胞NPG免疫缺陷小鼠模型，以模拟在清淋化疗状态下接受SCG61-PD1-BB细胞后在体内的扩增情况。

于Day 0时将18只小鼠分为三组，并接受不同剂量的SCG61-PD1-BB(2×10^6个细胞/只，6×10^6个细胞/只、2×10^7个细胞/只)细胞尾静脉注射，此后每间隔7天采集小鼠外周血，采用

荧光定量PCR法检测病毒载体拷贝数(VCN)并收集数据绘制成血液中SCG61-PD1-BB含量的变化图。

试验结果显示，不同剂量的SCG61-PD1-BB细胞在动物体内均能看到明显的扩增，三组小鼠血液VCN在第21天的数值分别为40.35±37.88、44.53±44.10、397.50±65.78 copies/μg gDNA(图22)。回输2×10^7个细胞SCG61-PD1-BB的小鼠血液中VCN明显高于他两个剂量组。

如上数据表明SCG61-PD1-BB在小鼠体内能完成免疫重构，并且在体内长期存续并扩增，且SCG61-PD1-BB在体内的扩增有一定的剂量依赖性。

序号	组别	测试药	给药剂量(阳性T细胞/只)	第21天 VCN(copies/μg gDNA)	动物只数
1	SCG61-PD1-BB低剂量组	SCG61-PD1-BB	2×10^6	40.35±37.88	6
2	SCG61-PD1-BB中剂量组	SCG61-PD1-BB	6×10^6	44.53±44.10	6
3	SCG61-PD1-BB高剂量组	SCG61-PD1-BB	2×10^7	397.50±65.78	6

实施例20：SCG61-PD1-BB细胞在荷CaSki细胞NPG小鼠中的组织分布

实验使用了荷CaSki细胞NPG免疫缺陷雌性小鼠。Day 0尾静脉注射SCG61-PD1-BB每只小鼠2×10^7个细胞，分别于给药前、给药后Day1、Day7、Day14、Day21和Day28采集全血和组织，组织包括心、肝、脾、肺、肾、肿瘤、大脑、眼球及视神经、卵巢、子宫、膀胱、胃、骨骼肌和尾静脉注射部位，通过荧光定量PCR法进行组织分布研究。

结果显示，除了肿瘤组织，其它组织的VCN回输后随着时间的推移均在逐渐下降；在肿瘤组织中维持着比较高的VCN，Day7达到峰值8.22×10^4 copies/μg gDNA，之后有所下降，在Day28有开始逐渐升高，Day28达到2.25×10^4 copies/μg gDNA。SCG61-PD1-BB细胞在肿瘤组织、肺、脾、全血、注射部位和肝脏中有较高的暴露量，从大到小依次为肿瘤、肺脏、脾脏、尾静脉注射部位、全血、肝脏、心脏、左眼球及视神经、子宫，其VCN分别为6.98×10^5、5.04×10^5、2.87×10^5、9.84×10^4、6.78×10^4、2.26×10^4、9.32×10^3、2.81×10^3、2.12×10^3 days*(copies/μg gDNA)(图23)。因为小鼠尾静脉注射后到达的第一个器官为肺脏，故在肺脏中有较高的暴露量；脾脏为造血器官，SCG61-PD1-BB经回输后定植于脾脏进行体内扩增，因此脾脏中有较高的暴露量；在膀胱、胃、骨骼肌、肾脏、大脑和卵巢中没有分布。

如上数据表明SCG61-PD1-BB在回输体内后，能够特异性聚集在肿瘤组织；肺脏和脾脏因血流量丰富有较高的暴露量；其它的脏器研究药物的暴露较弱且均为一过性。

实施例21：表达SCG61-TGF-BB病毒载体构建

SCG61-TGF-BB结构原理如图24所示，全基因合成HPV TCR-TGF-BB片段编码序列，合成基因经双酶切后插入慢载体构建质粒，构建得到的载体并进行慢病毒包装。SCG61-TGF-BB 由HPV E7 T细胞受体β链可变区(E7 TCR Vβ)、T细胞受体β链恒定区(TCR Cβ)、2A自剪切肽、HPV E7 T细胞受体α链可变区(E7 TCR Vα)、T细胞受体α链恒定区(TCR Cα)以及2A

自剪切肽、TGFβRII胞外区、CD8跨膜区、4-1BB胞内区组成，其中TCR恒定区经过序列改造来减少内源TCR错配。

实施例22：流式细胞仪检测SCG61-TGF-BB TCR-T特异性表达及表型检测

流式缓冲液配制：DPBS(Gibco, 14190250)、2%FBS(Gibco,10099141)，置4℃冰箱备用。

取SCG61-TGF-BB TCR-T、SCG61 TCR-T和Mock T细胞(对照组)，用流式缓冲液洗涤1次后弃上清，加入PE HLA-A*02:01 HPV E7 Tetramer (MBL，TB-0031-1)、APC mTCRβ(BD，553174)、APC Anti-hTGF-βRII(Biolegend，399706)和BV421 Mouse anti-hCD8a(BD，743064)，4℃避光孵育60min后流式缓冲液洗涤，重悬，最后流式细胞仪(Beckman CytoFLEX)检测。

结果显示，SCG61 TCR和SCG61-TGF-BB TCR的E7 Tetramer阳性率在90%以上，并且SCG61-TGF-BB可特异表达TGF-βRII，两者的CD8+T细胞比例未见明显差别(图25)。说明SCG61和SCG61-TGF-BB均可稳定表达，新增加的TCR序列和41-BB序列并未对CD8+T细胞的占比造成明显影响。

取SCG61-TGF-BB TCR-T和Mock T细胞(对照组)，用流式缓冲液洗涤1次后弃上清，按下表加入抗体，4℃避光孵育60min后流式缓冲液洗涤，重悬，最后流式细胞仪(Beckman CytoFLEX)检测。

试剂名称	厂家	货号
PE HLA-A*02:01 HPV E7 Tetramer	MBL	TB-0031-1
APC mTCRβ	BD	553174
APC Anti-hTGF-βRII	Biolegend	399706
BV421 Mouse anti-hCD8a	BD	743064
BV510 Mouse Anti-hCD45	BD	563204
BB700 Rat Anti-hCCR7	BD	566437
PE-Cy7 Anti-hCD223 (LAG-3)	Biolegend	369310
BV421 Mouse Anti-hCD279 (PD-1)	BD	562516
FITC Mouse Anti-hCD4	BD	566911
APC Anti-hCD25	Biolegend	302610
BV421 Mouse Anti-hCD127	BD	562436

结果显示，SCG61-TGF-BB TCR-T 维持高CD8比例和记忆亚群Tscm+Tcm比例，以及低PD-1和Treg比例(图26)。

实施例23：SCG61-TGF-BB 针对不同亚型HPV功能评价

HPV是一类具有高宿主特异性和亲和力的无包膜双链环状DNA病毒。本实验主要针对全球感染亚型率最高为HPV16高危型和HPV52型。对应的HPV-E7是主要的致癌蛋白，序列见图27。实验通过T2细胞负载不同浓度的HPV16-E7、HPV52-E7多肽，检测共培养的细胞因子分泌；以及构建表达HPV16-E7、HPV52-E7的HepG2细胞系，研究SCG61-TGF-BB是否能够识别被靶细胞内源性加工递呈的HPV16-E7、HPV52-E7表位肽，评价其对不同亚型的HPV功能。

SCG61-TGF-BB对T2负载不同亚型HPV-E7多肽共孵育实验

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

靶细胞准备：取传代数次后生长状态良好的T2细胞，500g，5min离心后去上清，使用R10细胞完全培养基重悬细胞，计数后，取96孔U底板，按100μl/孔加入T2细胞，2×10^4/孔，阴性对照组各孔加入100ul TCM培养基；按照浓度梯度加入对应的HPV16-E7、HPV52-E7多肽溶液，使其终浓度为：10^{-5} M～10^{-12}M。

效应细胞准备：吹匀SCG61-TGF-BB和Mock T，500g，5min离心后去上清，使用T细胞培养基重悬细胞，计数后调整SCG61-TGF-BB阳性细胞密度4.0×10^5/ml，按50μl/孔加入效应细胞，吹匀后放入37℃培养箱。共孵育24h后取细胞上清流式检测细胞因子产生水平。

SCG61-TGF-BB对表达不同亚型HPV-E7的HepG2细胞的杀伤(RTCA)

M10细胞完全培养基配制：DMEM (Gibco,11965-092)、10% FBS (Gibco,10099141)、1% Sodium Pyruvate (Gibco, 11360070)、1%HEPES (Gibco, 15630080)、1%NEAA (Gibco, 11140-050)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

靶细胞铺板：Day0取包被的96孔RTCA板，加入50μl M10培养基，放入37℃培养箱，检测基线。取靶细胞 (HepG2、HepG2-HPV16-E7-LG、HepG2-HPV52-E7-LG)，消化后，离心弃上清，用M10细胞完全培养基重悬，计数后，取RTCA板，按50μl/孔加入各靶细胞，4×10^4/孔，空白孔加入50μl T细胞培养基，晃匀后放入37℃培养箱RTCA上机。

加入效应细胞：Day0复苏SCG61-TGF-BB和Mock T细胞，晃匀后放入37℃培养箱。Day1吹匀细胞，计数后按阳性率，以效靶比2：1、1：2和1:8加入效应细胞，50μl/孔。放入37℃培养箱RTCA上机，开始实验。Day2 取下RTCA板，按20uL/孔，小心吸取24h培养上清，检测细胞因子。将RTCA板放回37℃培养箱继续实验，Day3-Day4按照细胞杀伤情况结束实验，取下RTCA板。

结果显示，SCG61-TGF-BB对T2细胞负载10uM～1pM梯度浓度HPV16-E7、HPV52-E7多肽具有相似的亲和度，两者的EC50值分别是8.39×10^{-9}和8.82×10^{-9}(图27)；并且SCG61-TGF-BB 在效靶比2：1和1:2时能够完全清除HPV16-E7、HPV52-E7阳性靶细胞，72小时杀伤都均在90%以上；在效靶比1：8时，对HPV16-E7阳性靶细胞杀伤依旧超过60%，SCG61-TGF-BB对阴性靶细胞没有杀伤(图28)，细胞因子IFN-γ和TNF的检测结果与杀伤结果高度一致(图29)；Mock T对靶细胞都没有功能。

综上，SCG61-TGF-BB对高危型HPV16和HPV52，无论是T2细胞负载多肽还是细胞系内源性表达的表位肽，均有明显的抗肿瘤活性，因此，将HPV基因型16和52作为目标人群纳入标准可能会使更广泛的患者受益。

实施例24：SCG61-TGF-BB 机理验证对pSMAD2/3通路的抑制作用

肿瘤微环境中存在许多免疫抑制机制，可能会阻碍过继性转移T细胞的功效。其中一种机制是由TGF-β介导的，TGF-β是肿瘤细胞和浸润性抑制免疫细胞分泌的细胞因子，直接抑制效应T细胞的活性。效应T细胞表达TGF-β受体TGFBRI和TGFBRII，暴露于TGF-β的T细胞诱导这些受体的异二聚化和主要TGF-β信号介质SMAD2和SMAD3的磷酸化，磷酸化的SMAD蛋白诱导一个抑制性转录程序，最终导致细胞因子产生减少，细胞毒性降低，以及在抗原刺激下增殖失败。本实验通过加入TGF-β孵育后检测胞内SMAD2/3磷酸化程度，验证SCG61-TGF-BB对TGF信号通路的抑制作用

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

流式缓冲液配制：DPBS(Gibco, 14190250)、2%FBS(Gibco,10099141)，置4℃冰箱备用。

TCR-T细胞准备：吹匀SCG61-TGF-BB和Mock T，500g离心5min后去上清，使用T细胞培养基重悬细胞，计数后调整细胞密度至1.0×10^6/ml，设置2组复孔，按1 ml/孔，加入24孔板，其中一组加入10ng/ml TGFβ，另外一组作为对照，吹匀后放入37℃培养箱。共孵育1h后收获细胞上机进行流式检测。

取SCG61 TCR-T和SCG61-TGF-BB TCR-T细胞，用流式缓冲液洗涤1次后弃上清，加入PE Hamster Anti-mTCRβ(BD，553172)、BV421 Mouse Anti-hCD8(BD，743064)和Ghost Dye Red 710(TONBO，13-0871-T100)，4℃避光孵育60min后，流式缓冲液洗涤，离心，加入37℃预热的BD PhosFlow Fix Buffer I(BD，557870)，37℃避光固定15min，流式缓冲液洗涤，离心，加入4℃预冷的BD PhosFlow Perm Buffer III(BD，558050)，4℃避光破膜60min，流式缓冲液洗涤，离心，加入AF647 Mouse Anti-pSmad2/3(BD，562696)，4℃避光孵育60min，流式缓冲液洗涤，离心重悬，最后流式细胞仪(Beckman CytoFLEX)检测。

结果显示，对比SCG61 TCR，SMAD2/3的磷酸化在SCG61-TGF-BB阳性细胞中几乎没有上调，并且CD4+/CD8+亚群中pSMAD2/3激活和未激活的比例也基本一致(图30)。说明SCG61-TGF-BB通过阻断TGF-β诱导SMAD2/3磷酸化的能力来保护T细胞免受TGF-β的影响。

实施例25：SCG61-TGF-BB在TGFβ1条件下对T2负载多肽的功能验证

实验使用T2细胞，负载不同浓度梯度的HPV-16 E7表位肽，分2组，其中一组加入10ng/ml TGF-β1，孵育2小时后加入效应细胞，37℃共孵育24小时，收集上清检测细胞因子IFN-γ分泌，验证TGF-β1对于杀伤功能的影响。

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱

中备用。

靶细胞准备：取传代数次后生长状态良好的T2细胞，500g/5min离心后去上清，使用R10细胞完全培养基重悬细胞，计数后按取2.4×10^6的T2细胞用12ml TCM培养基重悬，取96孔U底板，按100μl/孔加入T2细胞，2×10^4/孔；按照浓度梯度加入对应的多肽溶液，使其终浓度为：100nM和10nM；分2组，其中一组加入TGF-β1，另一组作为对照，将96孔U底板放入37度培养箱孵育2小时后加入效应细胞。

效应细胞准备：吹匀SCG61 TCR-T和SCG61-TGF-BB TCR-T，计数后3.6×10^6细胞用6ml T细胞培养基重悬，使SCG61-TGF-BB阳性细胞调整细胞密度4×10^5/ml，按50μl /孔加入效应细胞，吹匀后放入37℃培养箱，共孵育24h后取共培养上清，流式检测细胞因子分泌。

结果显示，在未加入TGF-β1时，SCG61 TCR-T和SCG61-TGF-BB TCR-T对T2细胞负载100nM和10nM HPV-16 E7表位肽的杀伤功能基本一致；加入TGF-β1时SCG61 TCR-T的功能受到抑制，而SCG61-TGF-BB的细胞因子分泌能力对比未加入时更强(图31)，因为SCG61-TGF-BB利用慢病毒载体对T细胞进行基因修饰，该慢病毒载体编码识别肿瘤细胞上HLA-A*02:01提呈的HPV E7肽的TCR和TGF-β受体II外域与4-1BB内域融合的开关受体，将免疫抑制细胞因子TGF-β结合转化为共刺激信号，对于模拟的肿瘤微环境存在的高TGF环境，SCG61-TGF-BB功能不仅未收到抑制，还表现出更强的抗肿瘤作用。

实施例26：SCG61-TGF-BB在TGFβ1条件下对体外肿瘤细胞杀伤能力

实验使用实时细胞分析(RTCA)技术评估SCG61-TGF-BB在TGFβ1条件下对靶细胞的杀伤效果。在96孔RTCA板上培养了人宫颈癌Caski细胞作为靶细胞，分2组，其中一组加入10ng/ml TGF-β1，孵育约16小时后加入效应细胞共同培养，之后连续观察约48小时，并将靶细胞的生存曲线绘制成连续图谱进行对比，杀伤完成后，收集共培养上清进行细胞因子检测。

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

Day 0：取生长状态良好的人宫颈癌CaSki细胞(R10细胞完全培养基)，消化后调整细胞密度至4×10^5/ml备用，取一块RTCA 96孔板，加入50ul/孔相应培养基进行仪器基线测定，再每孔加入密度为4×10^5/ml的靶细胞50ul，静置约5min后上机，连续检测约16h生长曲线；

Day 1：取已测好阳性率和细胞活率的SCG61 TCR-T、SCG61-TGF-BB TCR-T和Mock T，按照阳性率计算效应细胞数，按照效靶比2.5:1和1:2，加入效应细胞50ul/孔，上机连续检测杀伤曲线；

Day 2：收集24h共培养上清进行细胞因子检测；

Day 3：停机拷贝RTCA的生长和杀伤曲线。

结果显示，共同培养48小时后，在加入10ng/ml TGF-β1条件下，SCG61-TGF-BB对肿瘤

细胞有显著的特异性杀伤作用，且杀伤比例与效靶比呈正相关；而SCG61在高效靶比(2.5：1)时对肿瘤细胞有明显抑制作用；两个效靶比下SCG61-TGF-BB的细胞因子释放均显著高于SCG61组(图32)，表明SCG61-TGF-BB 在TGFβ1条件下对有更强的抗肿瘤作用。

实施例27：SCG61-TGF-BB在TGFβ1条件下对肿瘤耗竭进行的靶细胞多轮刺激试验

实验模拟肿瘤微环境存在的TGFβ1导致的免疫细胞抑制现象，通过多轮肿瘤细胞刺激实验模拟体内T细胞耗竭的状况，对SCG61和SCG61-TGF-BB杀伤肿瘤细胞的能力进行了对比，以验证TGF-BB辅助序列的作用。

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

Day 0：取生长状态良好的人宫颈癌CaSki细胞(R10细胞完全培养基)，消化后调整细胞密度至4×10^5/ml备用，取一块RTCA 96孔板，加入50ul/孔相应培养基进行仪器基线测定，再每孔加入密度为4×10^5/ml的靶细胞50ul，静置约5min后上机，连续检测约16h生长曲线；

Day 1：取已测好阳性率和细胞活率的SCG61 TCR-T、SCG61-TGF-BB TCR-T和Mock T，按照阳性率计算效应细胞数，按照效靶比1:2，加入效应细胞50ul/孔，上机连续检测杀伤曲线；

Day 3：按Day 0相同操作，铺板第2块RTCA板靶细胞，置37℃培养箱培养约16h；

Day 4：取下第一块RTCA板，将效应细胞转移至第二块RTCA板相同位置，上机连续检测杀伤曲线；

Day 7：停机拷贝RTCA的杀伤曲线，收集24h共培养上清进行细胞因子检测。

结果显示，在加入10ng/ml TGF-β1条件下，SCG61-TGF-BB对首次刺激的肿瘤细胞有显著的特异性杀伤作用，SCG61对肿瘤细胞有显著的抑制作用；第二轮刺激时，SCG61-TGF-BB对肿瘤细胞的半数杀伤时间显著缩短，而SCG61的杀伤作用明显减弱。多轮刺激下SCG61-TGF-BB的细胞因子释放，在加入与未加入TGF-β1条件下，均显著高于SCG61组(图33)，显示SCG61-TGF-BB在TGFβ1条件下对有更强的抗肿瘤作用。SCG61-TGF-BB通过慢病毒载体编码识别HPV16和HPV52 E7(表位11-19)的TCR (HLA-A*02:01)和一个开关受体进行基因修饰，通过TGF-β受体II (TGFBRII)外域与4-1BB内域融合，将免疫抑制因子TGFβ结合转化为共刺激信号，从而防止T细胞凋亡，改善衰竭，增强持久性。结果表明，SCG61-TGF-BB能够在多轮肿瘤刺激(模拟T细胞的耗竭环境)后仍维持持久的抗肿瘤作用。

实施例28：SCG61-TGF-BB在TGFβ1条件下靶细胞多轮刺激后增殖能力检测

通过多轮肿瘤细胞刺激实验对SCG61-TGF-BB杀伤肿瘤细胞的扩增能力进行了研究。实验计数SCG61 TCR-T、SCG61-TGF-BB TCR-T和Mock T，用不添加IL-2的培养基重悬后，按1×10^6/ml密度，1ml/孔加入24孔板，加入10ng/ml TGF-β1，按效靶比1:1加入靶细胞HepG2-E7；刺激5天后，计数，调整效应细胞数量，再次加入等量的靶细胞进行刺激；期间每隔2-3天对

细胞计数，计算其增殖倍率。

实验数据表明，每轮肿瘤细胞刺激后，SCG61-TGF-BB的增殖倍数都明显高于SCG61 TCR-T和Mock T(图34)。

实施例29：SCG61-TGF-BB对人多肽库交叉反应性

人类TCR库显示固有的交叉反应性，多达108个独特的TCR将提供超过10^{15}个潜在肽的识别。在临床试验中，TCR交叉反应性将导致其意外靶向健康人体组织，造成严重毒性。已知SCG61-TGF-BB识别的HPV16 E711-19表位肽的关键氨基酸位点为2/4/5/6。通过生物信息学算法预测，并对人源多肽库进行BLAST 序列比对，共发现18条多肽序列包含与E7表位肽一致的6个氨基酸残基(包含5个氨基酸残基加一个保守氨基酸残基)。用Expitope 2.0分析固定序列的4个关键片段aa 2/4/5/6，有2个片段有4个氨基酸残基不匹配，14个片段有5个氨基酸残基不匹配。实验使用T2细胞负载上述多肽后与SCG61-TGF-BB共孵育，检测上清中IFN-γ含量，研究SCG61-TGF-BB与这些多肽是否有交叉反应性，判断是否有潜在脱靶可能性，为非临床安全性研究提供支持和依据。

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™ Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

多肽准备：1-36号共36条多肽各取1管2mg，分别用150ul～200ul DMSO溶解，终浓度为10mM，具体信息见下表。

序号	多肽名称	多肽序列	纯度
1	E7-11-19	YMLDLQPET(SEQ ID NO:31)	>98%
2	E7-SH3GLB1	YMLDLQKQL(SEQ ID NO:32)	>98%
3	E7-SBK3	GLLDLDPET(SEQ ID NO:33)	>98%
4	E7-ZNF236	AMLDLEPQH(SEQ ID NO:34)	>98%
5	E7-GLIS1	SGLGLQPET(SEQ ID NO:35)	>98%
6	E7-TNS1	LMLDLEPAS(SEQ ID NO:36)	>98%
7	E7-SNAP91	DLLDLQPDF(SEQ ID NO:37)	>98%
8	E7-GCN1	MGLDLQPDL(SEQ ID NO:38)	>98%
9	E7-LPIN3	AGADLQPDT(SEQ ID NO:39)	>98%
10	E7-GHDCI3	LGLNLQPEQ(SEQ ID NO:40)	>98%
11	E7-GHDCI1	ELLNLQPEQ(SEQ ID NO:41)	>98%
12	E7-PCDHA9	LSYELQPET(SEQ ID NO:42)	>98%
13	E7-ITGA2B	YILDIQPQG(SEQ ID NO:43)	>98%
14	E7-TRIM66	PVSDMQPET(SEQ ID NO:44)	>98%
15	E7-L1CAM	TQWDLQPDT(SEQ ID NO:45)	>98%
16	E7-PTPRS	VITNLQPET(SEQ ID NO:46)	>98%
17	E7-COL12A1	MEINLQPET(SEQ ID NO:47)	>98%
18	E7-SACS	NRLDLQPDL(SEQ ID NO:48)	>98%
19	E7-AHNAK2	ISGDLQPDT(SEQ ID NO:49)	>98%

20	E7-ITSN2	YMADLQLVV(SEQ ID NO:50)	>98%
21	E7-ERC2	TMLDLQAQL(SEQ ID NO:51)	>98%
22	E7-ACTN1	AMEDLQDTF(SEQ ID NO:52)	>98%
23	E7-GOLGA3	AMTDLQNML(SEQ ID NO:53)	>98%
24	E7-ACTN2	AMEDLQDMF(SEQ ID NO:54)	>98%
25	E7-UTP14A	QMIDLQNLL(SEQ ID NO:55)	>98%
26	E7-KAT2B	FMADLQRVF(SEQ ID NO:56)	>98%
27	E7-PCNT	EMEDLQNQF(SEQ ID NO:57)	>98%
28	E7-ARHGEF17	GMEDLQAPL(SEQ ID NO:58)	>98%
29	E7-CD68	FMQDLQQKV(SEQ ID NO:59)	>98%
30	E7-ITIH2	QMDDLQDFL(SEQ ID NO:60)	>98%
31	E7-FAM71B	SMGDLQRQL(SEQ ID NO:61)	>98%
32	E7-SLC9A3	LMGDLQIGL(SEQ ID NO:62)	>98%
33	E7-DAB2IP	SMVDLQDAR(SEQ ID NO:63)	>98%
34	E7-DHRSX	NMDDLQSSA(SEQ ID NO:64)	>98%
35	E7-ICA1	NMKDLQASL(SEQ ID NO:65)	>98%
36	S20-28	FLLTRILTI(SEQ ID NO:66)	>98%

靶细胞准备：取传代数次后生长状态良好的T2细胞，500g离心5min后去上清，使用R10培养基重悬细胞，计数后取96孔U底板，按100μl/孔加入T2细胞，2×10^4/孔；分别按照10uM和1uM加入11ul对应的1～36号多肽溶液，使其终浓度为：1uM和100nM；将96孔U底板放入37℃培养箱孵育2小时后加入效应细胞。

效应细胞准备：吹匀SCG61-TGF-BB，计数后按阳性率调整细胞密度4.0×10^5/ml，按50μl/孔加入效应细胞，吹匀后放入37℃培养箱。共孵育约24h后取细胞流式检测细胞因子水平。

结果显示，使用2个多肽浓度梯度(1uM和100nM), 均能刺激SCG61-TGF-BB对负载E711-19多肽的T2细胞显著分泌细胞因子IFN-γ，但对阴性对照组S20-28多肽以及34条实验组多肽均未检测细胞因子分泌，表明SCG61-TGF-BB对人自身抗原肽库中与E711-19一致性最高的(6个氨基酸相同或者5个氨基酸加一个保守氨基酸)的多肽都不存在交叉反应性(图35)，对人自身抗原肽库中包含4个关键氨基酸基序的多肽都没有交叉反应。表明SCG61-TGF-BB针对人体自身内源性抗原多肽的潜在脱靶毒性风险很低。

实施例30：SCG61-TGF-BB动物实验批次对靶细胞的体外杀伤功能

实验使用实时细胞分析(RTCA)技术评估SCG61-TGF-BB动物实验批次在对靶细胞的体外杀伤功能。在96孔RTCA板上培养了Caski-E7和HepG2-E7细胞作为靶细胞，孵育约16小时后加入效应细胞共同培养，收集24h共培养上清进行细胞因子检测，之后连续观察至48-60小时，将靶细胞的生存曲线绘制成连续图谱进行对比。

M10细胞完全培养基配制：DMEM (Gibco,11965-092)、10% FBS (Gibco,10099141)、1% Sodium Pyruvate (Gibco, 11360070)、1%HEPES (Gibco, 15630080)、1%NEAA (Gibco, 11140-050)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

R10细胞完全培养基配制：RPMI1640 (Gibco,22400-089)、10% FBS (Gibco,10099141)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

T细胞培养基配制：CTS™ OpTmizer™ +Supplement(Gibco,A379040-01)、5%CTS™

Immune Cell SR (Gibco, A25961-01)+2% Glutamax(Gibco, A12860-01)，颠倒混匀置于4℃冰箱中备用。

Day 0：取生长状态良好的人宫颈癌CaSki-E7细胞(R10细胞完全培养基)和HepG2-E7(M10细胞完全培养基)，消化后调整细胞密度至4×10^5/ml备用，取一块包被的RTCA 96孔板，加入50ul/孔相应培养基进行仪器基线测定，再每孔加入密度为4×10^5/ml的靶细胞50ul，静置约5min后上机，连续检测约16h生长曲线；

Day 1：取已测好阳性率和细胞活率的SCG61-TGF-BB TCR-T和Mock T，按照阳性率计算效应细胞数，按照效靶比2:1、1:2和1:8，加入效应细胞50ul/孔，上机连续检测杀伤曲线；

Day 2：收集24h共培养上清进行细胞因子检测；

Day 3：停机拷贝RTCA的生长和杀伤曲线。

结果显示，SCG61-TGF-BB在效靶比2:1和1:2时，对Caski-E7有显著的特异性杀伤作用，且杀伤比例与效靶比呈正相关；SCG61-TGF-BB在效靶比2:1、1:2和1:8时，能够完全清除HepG2-E7细胞，且杀伤比例和时间与效靶比呈正相关；上述效靶比下SCG61-TGF-BB细胞因子IFN-γ检测结果与杀伤结果高度一致(图36)；Mock T对靶细胞都没有功能。

综上，SCG61-TGF-BB对Caski-E7和HepG2-E7在体外均有明显的杀伤和抗肿瘤活性，为后续的非临床实验提供支持和剂量依据。

实施例31：SCG61-TGF-BB在免疫缺陷小鼠CaSki-E7移植瘤模型的体内杀伤扩增和存续

为了解SCG61-TGF-BB在体内环境中对CaSki-E7肿瘤细胞的杀伤扩增和存续，实验使用了23只NPG免疫缺陷雌性小鼠，Day-7在小鼠接种CaSki-E7细胞。小鼠随机分为五组，其中三组为SCG61-TGF-BB低、中、高剂量组，在Day0分别经尾静脉单次注射SCG61-TGF-BB，剂量依次为2×10^6、7×10^6、2×10^7阳性T 细胞/只；阴性对照组经尾静脉单次注射Mock T细胞2×10^7 T 细胞/只；与此同时，模型对照组小鼠通过尾静脉注射单次注射等量的受试物溶媒；给药后观察4周。每周测量两次肿瘤长、短径，计算肿瘤体积，每周采集动物外周血检测SCG61-TGF-BB TCR-T细胞扩增和存续情况。

序号	组别	测试药	给药剂量 (阳性T细胞/只)	动物只数
1	模型对照组	溶媒	N/A	4
2	阴性对照组	Mock T	2×10^7	4
3	SCG61-TGF-BB低剂量组	SCG61-TGF-BB	2×10^6	5
4	SCG61-TGF-BB中剂量组	SCG61-TGF-BB	7×10^6	5
5	SCG61-TGF-BB高剂量组	SCG61-TGF-BB	2×10^7	5

其中“NA”表示不适用。

结果显示，Day22模型对照组，阴性对照组和SCG61-TGF-BB低、中、高剂量组的肿瘤体积分别为1266.94±104.49、1229.65±225.45、1117.53±165.11、581.24±249.42和117.73±31.32 mm^3，其中SCG61-TGF-BB低、中、高剂量组的肿瘤体积抑制率分别为11.79%、54.12%

和90.71%，可见SCG61-TGF-BB对肿瘤体积的抑制呈剂量依赖性。

给药1周后，SCG61-TGF-BB高剂量(2.0×10^7 TCR-T细胞/动物)显著抑制肿瘤细胞增殖(P=0.00001, P<0.05)；中剂量(7×10^6 TCR-T细胞/动物)也显著抑制肿瘤细胞的增殖(P=0.055)，但2周后2/5小鼠出现反弹；低剂量(2×10^6 TCR-T细胞/动物)可在2周内控制肿瘤生长，但5/5小鼠最终无法抑制肿瘤(图37)。回输后Day7，动物外周血中的SCG61-TGF-BB TCR-T扩增达到顶峰，细胞数量与剂量呈正相关，并随时间逐渐降低(图38)。

在实验条件下，SCG61-TGF-BB经静脉给药(0.7 ～ 2.0×10^7 TCR-T细胞/只动物)显著抑制CaSki-E7-LG肿瘤细胞的增殖，有效剂量最低(0.7×10^7 TCR-T细胞/只动物)。

实施例32：SCG61-TGF-BB在免疫缺陷小鼠HepG2-E7-LG移植瘤模型的体内杀伤扩增和存续

为了解SCG61-TGF-BB在体内环境中对HepG2-E7-LG肿瘤细胞的杀伤扩增和存续，实验使用了25只NPG免疫缺陷雌性小鼠，Day-7在小鼠接种HepG2-E7-LG细胞。小鼠随机分为五组，其中三组为SCG61-TGF-BB低、中、高剂量组，在Day0分别经尾静脉单次注射SCG61-TGF-BB，剂量依次为2×10^6、7×10^6、2×10^7阳性T 细胞/只；阴性对照组经尾静脉单次注射Mock T细胞2×10^7 T 细胞/只；与此同时，模型对照组小鼠通过尾静脉注射单次注射等量的受试物溶媒；给药后观察4周。每周测量两次肿瘤长、短径，计算肿瘤体积，每周采集动物外周血检测SCG61-TGF-BB TCR-T细胞扩增和存续情况。

序号	组别	测试药	给药剂量 (阳性T细胞/只)	动物只数
1	模型对照组	溶媒	N/A	5
2	阴性对照组	Mock T	2×10^7	5
3	SCG61-TGF-BB低剂量组	SCG61-TGF-BB	2×10^6	5
4	SCG61-TGF-BB中剂量组	SCG61-TGF-BB	7×10^6	5
5	SCG61-TGF-BB高剂量组	SCG61-TGF-BB	2×10^7	5

其中“NA”表示不适用。

结果显示，Day22模型对照组、阴性对照组和SCG61-TGF-BB低、中、高剂量组的肿瘤体积分别为2400.34±726.22、1986.19±720.41、1252.83±202.74、439.02±365.64和132.34±175.87 mm^3，其中SCG61-TGF-BB低、中、高剂量组的肿瘤体积抑制率分别为47.81%、81.71%和94.49%(图39)，可见SCG61-TGF-BB中、高剂量组能显著抑制肿瘤细胞的增殖($P < 0.05$)，且对肿瘤体积的抑制呈剂量依赖性。

回输后Day7，动物外周血中的SCG61-TGF-BB TCR-T扩增达到顶峰，细胞数量与剂量呈正相关，并随时间逐渐降低(图40)。

在实验条件下，SCG61-TGF-BB经静脉给药(0.7 ～ 2.0×10^7 TCR-T细胞/只动物)显著抑制HepG2-E7-LG肿瘤细胞的增殖，有效剂量最低(0.7×10^7 TCR-T细胞/只动物)。

靶向HPV的新一代TCR-T疗法，将靶向 HPV-16 E7的T细胞受体和PD-1或TGFβRII共刺激融合受体转导入T细胞，特异性识别和杀伤HPV-16感染的细胞，适用于人乳头瘤病毒(HPV)导致的多种恶性肿瘤，包括宫颈癌、头颈癌、肛门癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌等。通过靶向HPV感染特有的抗原表达杀灭肿瘤细胞并同步清除病毒感染。

体外研究显示，靶向HPV增强型TCR-T细胞TCR特异表达且错配率较低。靶向HPV增强型TCR-T细胞能够识别HPV-16和HPV-52表位肽的关键结合位点并有较强的结合功能活性。靶向HPV增强型TCR-T细胞对表达HLA-A*02:01和HPV-16/52 E7阳性的肿瘤细胞有特异性杀伤作用，效靶比越高，肿瘤杀伤能力越强，释放的细胞因子越多。靶向HPV增强型TCR-T细胞不识别杀伤HLA-A*02:01阴性或HPV-16 E7阴性的肿瘤细胞，表明其靶向的特异性和安全性。靶向HPV增强型TCR-T细胞能够在多轮肿瘤刺激后仍维持其抗肿瘤作用和增殖能力。

体内研究显示，不同剂量的靶向HPV增强型TCR-T细胞在不同HPV-16 E7阳性肿瘤NCG小鼠CDX模型中均显示出对肿瘤的生长有明显的抑制作用。接受高剂量组(2×10^7个细胞)靶向HPV增强型TCR-T细胞的小鼠显示了显著的抑瘤作用，中、低剂量组的小鼠也显示了一定的抑瘤作用。这代表着靶向HPV增强型TCR-T细胞在小鼠体内能保持其抗癌作用。

综上，临床前试验结果已初步证实靶向HPV增强型TCR-T细胞良好的安全性和对HPV-16 E7+靶细胞的杀伤作用，本药物的临床前动物试验使用剂量达到2×10^7 靶向HPV增强型TCR-T细胞仍未观察到明显的毒副反应，支持进一步在人体中探索其安全性和耐受剂量。

以上对本申请进行了详细介绍，本文中应用了具体个例对本申请的原理及实施方式进行了阐述，以上实施例的说明只是用于帮助理解本申请的方法及其核心思想；同时，对于本领域的技术人员，依据本申请的思想，在具体实施方式及应用范围上均会有改变之处，综上，本说明书内容不应理解为对本申请的限制。

权 利 要 求

1.一种经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述经修饰的免疫细胞包含靶向 HPV E7 抗原的 T 细胞受体(TCR)和转换刺激分子。

2. 根据权利要求 1 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 TCR 包含 TCRα 链可变域和 TCRβ 链可变域；其中，

所述 TCRα 链可变域的 αCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示，或其变体，其中一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换；和；

所述 TCRβ 链可变域的 βCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，或其变体，其中一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换。

3. 根据权利要求 2 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 TCRα 链可变域包含互补决定区 αCDR1、αCDR2 和 αCDR3，且所述 TCRβ 链可变域包含互补决定区 βCDR1、βCDR2 和 βCDR3，其中：

αCDR1、αCDR2 和 αCDR3 分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 所示，βCDR1、βCDR2 和 βCDR3 分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 6 所示；或 CDR 变体，其中一个或多个 CDR 中的一个或两个氨基酸被其它氨基酸替换。

4. 根据权利要求 2 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 TCRα 链可变域包含与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列；和/或

所述 TCRβ 链可变域包含与 SEQ ID NO：8 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列。5. 根据权利要求 1 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述经修饰的免疫细胞表达以下结构：

A. T 细胞受体(TCR)，所述 TCR 特异性靶向 HPV 的 E7 抗原多肽；

优选的，所述 TCR 能够结合由 HLA-A*02 呈递的 HPV E7 抗原多肽, 更优选的，所述 TCR 能够结合由 HLA-A*02:01 呈递的 HPV E7 抗原多肽；更优选的，所述多肽包含氨基酸序列 YMLDLQPET 或 YILDLQPET，

和

B. 转换刺激分子，所述转换刺激分子包含：胞外结构域(ECD) 、跨膜区(TM)和胞内结构域(ICD)，其中，所述 ECD 选自免疫抑制分子的 ECD，所述 ICD 选自共刺激分子的 ICD。

6. 根据权利要求 5 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述转换刺激分子包含：

免疫抑制蛋白的细胞外结构域 (ECD)，其中所述 ECD 与介导免疫细胞激活信号的共刺激分子的细胞内结构域(ICD)融合；其中所述免疫抑制蛋白的细胞外结构域与其免疫抑制因子或配体结合在所述经修饰的免疫细胞中产生免疫细胞激活信号而非免疫细胞失活信号。

7. 根据权利要求 6 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述免疫抑制蛋白是包括 PD-1、CTLA4，BTLA，TIM3，TIGIT，TGFβ 受体以及其他任意具有免疫抑制功能或与免疫抑制信号通路相关的蛋白中的任意一种蛋白或其组合，且所述免疫抑制蛋白的 ECD 序列可存在至少一个氨基酸突变；和/或

所述共刺激分子包含：CD28、4-1BB、ICOS、CD27、IL-12R、CD3、OX40 蛋白中的任意一种蛋白或其组合，且所述共刺激分子 ICD 序列可存在至少一个氨基酸突变。

8. 根据权利要求 6 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 ECD 为 TGFβ 受体 II ECD；所述 TGFβ 受体 II ECD 序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

9. 根据权利要求 6 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 ECD 为 PD-1 ECD；更优选地，所述 PD-1 ECD 序列存在一个氨基酸突变，132 位的丙氨酸突变为亮氨酸;最优选地，所述 ECD 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

10.根据权利要求 6 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 ICD 为 4-1BB ICD；更优选地，所述 4-1BB ICD 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

11. 根据权利要求 5 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 TCR 包含 TCRα 链和 TCRβ 链，所述 TCRα 链可变域包含与 SEQ ID NO: 7 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列；和/或

所述 TCRβ 链可变域包含与 SEQ ID NO：8 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求 6 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述 ECD 和所述 ICD 通过跨膜区序列连接；优选地，所述跨膜区包含选自以下的蛋白的跨膜结构域：T 细胞受体的 α，β 或 ζ 链，CD28，CD3ε，CD45，CD4，CD5，CD8，CD9，CD16，CD22，CD33，CD37，CD64，CD80，CD86，CD134，CD137 和 CD154 及其组合，且所述跨膜区序列可存在至少一个氨基酸突变；更优选地，所述跨膜区序列为 CD8 跨膜区序列；更优选地，所述 CD8 跨膜区序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

13. 根据权利要求 12 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述的免疫细胞包括所述靶向 HPV E7 抗原 TCR 和结构为 PD1(ECD)-CD8(TM)-4-1BB(ICD)的转换刺激分子，更优选地，所述的免疫细胞包含由 SEQ ID NO：15 所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 12 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述的免疫细胞包括所述靶向 HPV E7 抗原 TCR 和结构为 TGFβRII (ECD)-CD8(TM)- 4-1BB (ICD)的转换刺激分子，更优选地，所述的免疫细胞包含由 SEQ ID NO：17 所示的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 3 或权利要求 7 所述的经修饰的免疫细胞，其特征在于，所述免疫细胞选自淋巴细胞、树突状细胞、单核/巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞；优选地，所述免疫细胞为 T 细胞。

16. 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子包含编码权利要求 1-4 任一项中所述的 TCR 的核酸序列。

17. 如权利要求 16 所述的核酸分子，其特征在于，所述的核酸分子进一步编码权利要求 1-14 任一项中所述的转换刺激分子的核酸序列。

18. 一种载体，其特征在于，所述的载体包含权利要求 16 或 17 所述的核酸分子。

19.一种药物组合物，其特征在于，所述组合物含有药学上可接受的载体以及权利要求1-15任一项所述的经修饰的免疫细胞、权利要求16或17所述的核酸分子、权利要求18所述的载体。

20. 权利要求1-15任一项所述的经修饰的免疫细胞、权利要求16或17所述的核酸分子、权利要求18所述的载体或权利要求19所述的药物组合物在制备用于预防或治疗由HPV感染所引发的相关疾病的药物中的用途。

21. 根据权利要求20所述的用途，其特征在于，所述HPV感染相关疾病包含人乳头瘤病毒(HPV)导致的多种恶性肿瘤，包括宫颈癌，口咽癌、头颈癌，阴道癌、外阴癌、阴茎癌和肛门癌所组成的一种或多种。

22. 一种靶向HPV的E7抗原的T细胞受体或其片段，其特征在于，所述T细胞受体或其片段包含选自下组的TCRα链可变域和TCRβ链可变域：

(1)所述TCR α链可变域包含以下3个CDR：SEQ ID NO: 1所示的αCDR1，SEQ ID NO: 2所示的αCDR2，和SEQ ID NO: 3所示的αCDR3，或替换其中1或2个氨基酸的上述CDR变体；和

(2)所述TCR β链可变域包含以下3个CDR：SEQ ID NO: 4所示的βCDR1，SEQ ID NO: 5所示的βCDR2，和SEQ ID NO: 6所示的βCDR3，或替换其中1或2个氨基酸的上述CDR变体。

23. 根据权利要求22所述的T细胞受体或其片段，其特征在于，所述TCR α链可变域包含以下3个CDR：SEQ ID NO: 1所示的αCDR1，SEQ ID NO: 2所示的αCDR2，和SEQ ID NO: 3所示的αCDR3；和

所述TCR β链可变域包含以下3个CDR：SEQ ID NO: 4所示的βCDR1，SEQ ID NO: 5所示的βCDR2，和SEQ ID NO: 6所示的βCDR3。

24. 根据权利要求22所述的T细胞受体或其片段，其特征在于，所述 TCR α链可变域包含与SEQ ID NO: 7具有至少90%序列相同性的氨基酸序列；和/或

所述TCR β链可变域包含与SEQ ID NO：8具有至少90%序列相同性的氨基酸序列。

25. 根据权利要求22所述的T细胞受体或其片段，其特征在于，能够结合由HLA-A*02呈递的HPV E7抗原多肽, 更优选的，能够结合由HLA-A*02:01呈递的HPV E7抗原多肽。

26. 根据权利要求25所述的T细胞受体或其片段，其特征在于，所述多肽包含氨基酸序列YMLDLQPET或YILDLQPET。

27. 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子包含编码权利要求22-26任一项所述的T细胞受体或其片段的核酸序列或其互补序列。

28. 一种载体，其特征在于，所述的载体包含权利要求27所述的核酸分子，其中所述载体选自质粒、二元载体、DNA载体、mRNA载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、基于转座子的载体和人工染色体。

29.一种分离的多肽，其由根据权利要求27所述的核酸分子或根据权利要求28所

述的载体编码。

30.一种分离的细胞，其特征在于，所述细胞中包含权利要求 22-26 任一项所述的 T 细胞受体或其片段、权利要求 27 所述的核酸分子、权利要求 28 所述的载体或权利要求 29 所述的多肽，优选的，所述细胞包含由 SEQ ID NO：13 所示的氨基酸序列。

31.一种药物组合物，其特征在于，所述组合物含有药学上可接受的载体以及权利要求 22-26 任一项所述的 T 细胞受体或其片段、权利要求 27 所述的核酸分子、权利要求 28 所述载体、权利要求 29 所述的多肽、或权利要求 30 所述的细胞。

32.权利要求 22-26 任一项所述的 T 细胞受体或其片段、权利要求 27 所述的核酸分子、权利要求 28 所述载体、权利要求 29 所述的多肽、权利要求 30 所述的细胞或权利要求 31 所述的药物组合物在制备用于预防或治疗由 HPV 感染所引发的相关疾病的药物中的用途。

33. 如权利要求 32 所述的用途，其特征在于，所述 HPV 感染相关疾病包含人乳头瘤病毒(HPV)导致的多种恶性肿瘤，包括宫颈癌，口咽癌、头颈癌，阴道癌、外阴癌、阴茎癌和肛门癌所组成的一种或多种。