

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.05.002

· 基础研究 ·

CRISPR/Cas9 敲除内源 TCR 增强 TCR-T 细胞对 HPV16 阳性宫颈癌 SiHa 细胞的杀伤

冯娟, 李佳涛, 庄娜(重庆大学附属肿瘤医院 肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室, 重庆 400030)

[摘要] **目的:** 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术制备无内源 TCR 的 TCR-T 细胞并鉴定其在体外杀伤 HPV16 阳性宫颈癌 SiHa 细胞的功能。**方法:** 培养健康志愿者外周血 CD8⁺ T 细胞和 Jurkat 细胞, CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 CD8⁺ T、Jurkat 细胞的 TCR 基因, 制备过表达转基因 TCR 的重组慢病毒, 在敲除内源性 TCR 的 CD8⁺ T 和 Jurkat 细胞中用慢病毒过表达转基因 TCR 制备 TCR-T 细胞, 多色 FCM 检测 TCR-T 细胞中 TCR 和 CD3 的表达水平, 荧光素酶活性实验检测 TCR-T 细胞对 HPV16 阳性 SiHa 细胞的杀伤效率。**结果:** CRISPR/Cas9 基因编辑技术高效地敲除了外周血 CD8⁺ T 细胞和 Jurkat 细胞中的 TRAC 和 TRBC 基因, 敲除效率分别为 (81.4±4.5)%、(98.5±0.07)%, 制备的无内源 TCR 的 TCR-T 细胞高效表达转基因 TCR, 在外周血 CD8⁺ T 和 Jurkat 细胞中表达率为 (66.0±17.8)%、(97.3±2.6)%, 敲除内源 TRAC 和 TRBC 基因有效增强 CD8⁺ T 和 Jurkat 细胞膜表达转基因 TCR (均 $P < 0.01$), 敲除内源 TCR 增强 TCR-T 细胞特异性杀伤 HPV16 阳性的 SiHa 细胞 [(71.4±1.0)% vs (35.1±2.0)%, $P < 0.01$]。**结论:** 无内源 TCR 的 TCR-T 细胞显著增强转基因 TCR 的表达和对 HPV16 阳性宫颈癌 SiHa 细胞的靶向杀伤能力, 为提高 TCR-T 细胞的临床疗效提供了实验依据。

[关键词] 宫颈癌; SiHa; CRISPR/Cas9; TCR 敲除; TCR-T 细胞; HPV16

[中图分类号] R737.33; R73-36² **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)05-0373-07

CRISPR/Cas9-mediated endogenous TCR knockout enhances TCR-T cells targeted killing HPV16-positive cervical cancer cells

FENG Juan, LI Jiatao, ZHUANG Na (Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

[Abstract] Objective: To develop TCR-T cells with endogenous TCR knockout based on CRISPR/Cas9 gene editing technology, and to identify their cytotoxicity against cancer cells *in vitro*. **Methods:** Jurkat cells and CD8⁺ T cells from the peripheral blood of healthy volunteers were cultured *in vitro*, and endogenous TCR of the CD8⁺ T and Jurkat cells was knocked out by CRISPR/Cas9 gene editing technique. Transgenic TCR overexpression lentivirus was prepared and transfected into the CD8⁺ T and Jurkat cells with endogenous TCR knockout to prepare TCR-T cells. The expression levels of TCR and CD3 in TCR-T cells were detected by multi-color FCM. The killing efficiency of TCR-T cells against HPV16 positive SiHa cells was determined by luciferase activity assay. **Results:** CRISPR/Cas9 gene editing technique effectively knocked out TRAC and TRBC genes in the peripheral blood CD8⁺ T and Jurkat cells, with a knockout efficiency of (81.4±4.5)%, (98.5±0.07)%, respectively. The obtained TCR-T cells after transfections efficiently expressed transgenic TCR, with an expression rate up to (66.0±17.8)%, (97.3±2.6)%. Knockout of endogenous TRAC and TRBC genes effectively enhanced transgenic TCR expression on cell membrane of CD8⁺ T and Jurkat cells (both $P < 0.01$). Knockout of endogenous TCR enhanced the specific killing of TCR-T cells against HPV16-positive target cells [(71.4±1.0)% vs (35.1±2.0)%, $P < 0.01$]. **Conclusion:** The expression of transgenic TCR in TCR-T cells without endogenous TCR expression was significantly increased, and the targeted killing ability of HPV16-positive cervical cancer SiHa cells was significantly enhanced, which provides experimental basis for improving the clinical therapeutic effect of TCR-T cells.

[Key words] cervical cancer; SiHa cell; CRISPR/Cas9; TCR knockout; TCR-T cell; HPV16

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(5): 373-379. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.05.002]

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(No. 82101931); 重庆市自然科学基金(No. cstc2020jcyj-msxmX0086); 中央高校基本科研业务基金(No. 2021CDJYGRH-013)

[作者简介] 冯娟(1990—), 女, 硕士生, 实习研究员, 主要从事肿瘤免疫治疗的研究, E-mail: ovofeng@163.com

[通信作者] 庄娜, E-mail: zhuangna0618@163.com; 李佳涛, E-mail: jiatao_li@163.com

宫颈癌是常见女性生殖系统恶性肿瘤,传统治疗对于进展期、转移以及复发性宫颈癌效果不佳,5年生存率仅为17.3%^[1-2]。高危人乳头瘤病毒16型(HPV16)和18型(HPV18)的持续性感染能诱发宫颈上皮内瘤样病变及宫颈癌^[3-4]。TCR-T细胞疗法是当前治疗实体瘤最具前景的新技术之一^[5-12],因其表达特异靶向抗原的人工合成受体,T细胞能够高效识别且杀伤靶细胞^[13]。靶向HPV16 E6及E7抗原的TCR-T细胞具有清除肿瘤细胞的活性^[14-15]。然而传统HPV相关TCR-T细胞只能介导部分宫颈癌患者的临床反应,因此需要探索更安全有效的TCR-T细胞。目前,TCR-T细胞面临内源性TCR与转基因TCR竞争结合CD3的难题,且二者易错配形成混合型TCR二聚体而引发移植物抗宿主病^[16-17]。有报道^[14,18-21]通过CRISPR/Cas9敲除内源性TCR的 α 和 β 基因,能够有效增强转基因TCR的表达,且几乎消除了TCR错配。2020年报道了首个CRISPR编辑TCR-T细胞在难治性癌症中的安全性和可行性的临床试验^[22]。本研究通过CRISPR/Cas9系统敲除人T细胞内源性TCR,制备了特异靶向HPV16 E7抗原的新型TCR-T细胞,发现外源TCR有效表达于T细胞膜表面,且对HPV16阳性宫颈癌细胞的杀伤能力明显增强。本研究优化了针对HPV16 E7抗原的TCR-T细胞,有利于宫颈癌的临床治疗。此外,通过CRISPR/Cas9技术敲除内源TCR同样适用于其他恶性实体瘤的TCR-T细胞治疗,具有重要的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

人外周血CD8⁺T细胞来自健康志愿者,征得其知情同意并签署知情同意书,研究计划已通过重庆大学附属肿瘤医院伦理委员会审批(批准号:CZLS2023082-A)。HPV16阳性SiHa细胞、Jurkat细胞和293T细胞购于中国科学院细胞库。鼠源PEcy7-CD3、APC-TCR β 、PE-TCR α/β 一抗均购自Biolegend公司,Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28、Lipofectamine[®]3000转染试剂、Cas9 Nuclease 3NLS(Cas9蛋白)均购自Thermo Fisher Scientific公司,质粒无内毒素中提试剂盒购自Qiagen公司,高糖DMEM和RPMI 1640购自Gibco公司,细胞因子IL-2购自PeproTech公司,人CD8微磁珠(CD8⁺T细胞分离试剂盒)购自Miltenyi Biotec公司,Neon电穿孔仪购自Thermo Fisher Scientific公司,Beckman CytoFlex多色流式细胞仪(FCM)和Beckman MoFlo Astrios EQ分选仪器购自Beckman公司,合成靶向TCR分子

的向导RNA(guide RNA,gRNA)序列购自南京金斯瑞公司。TRAC(TCR α)-gRNA序列:5'-GGCAGACAGACTTGTAC-3';TRBC(TCR β)-gRNA序列:5'-GCTCAAACACAGCGACCT-3'。

1.2 人外周血CD8⁺T细胞的分离纯化与细胞培养

使用Ficoll密度梯度离心外周血分离出外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC),再通过CD8⁺T细胞分离试剂盒的磁珠纯化得到CD8⁺T细胞。T细胞置于含50 ng/mL IL-2、10% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺和50 mmol/L β -巯基乙醇的RPMI 1640培养基培养,Jurkat细胞置于含10% FBS的RPMI 1640培养基中培养,HPV16阳性SiHa细胞、293T细胞置于含10% FBS的DMEM培养基中培养。

1.3 CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除CD8⁺T、Jurkat细胞的内源TCR基因

T细胞经过Dynabeads[™] Human T-Activator CD3/CD28刺激活化24 h后,分别将500 ng TRAC-gRNA、TRBC-gRNA和1 μ g Caspase 9蛋白室温下处理20 min,形成核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex,RNP),TRAC-RNP、TRBC-RNP分别与 2×10^5 个CD8⁺T细胞或Jurkat细胞混合后进行电转染,电转染条件为1 600 V、脉冲时间为10 ms,重复3次进行电穿孔后,细胞培养于新鲜完全培养基。72 h后,用相应TCR和CD3流式抗体在4 $^{\circ}$ C下避光处理30 min,多色FCM检测细胞表面TCR和CD3表达水平。

1.4 制备过表达转基因TCR的重组慢病毒载体

将pMDLg/RRE、pRSV-Rev、vsvg和pCDH-CMV-TCR等4种质粒混合于Opti-MEM液中室温下处理15 min,然后与Lipofectamine 3000混合,室温下处理20 min后滴加到293T细胞中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养过夜后换上完全培养基,36 h后收集含慢病毒载体的上清液,用0.45 μ m孔径的滤网过滤上清液去除细胞碎片,用PEG 6 000浓缩重组慢病毒。

1.5 在敲除内源性TCR的CD8⁺T、Jurkat细胞中转染过表达转基因TCR慢病毒制备TCR-T细胞

T细胞经过Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28刺激活化24 h后,电穿孔递送TRAC-RNP、TRBC-RNP,36 h后通过CD3磁珠负向选择培养于24孔板中,将10感染复数的转基因TCR慢病毒或者阴性对照慢病毒加入到T细胞中,以32 $^{\circ}$ C、1 500 \times g水平离心2 h,慢病毒转导72 h后用FCM检测细胞TCR阳性率。经过7 d扩增后,FCM分选GFP和鼠APC-TCR β 双阳性的TCR-T细胞。

1.6 多色 FCM 检测 TCR-T 细胞中 TCR 和 CD3 的表达水平

离心收集转染后 T 细胞, 用 Zombie Green、anti-CD3-PEcy7、anti-mouse TCR β -APC、anti-human TCR α / β -PE 抗体液重悬 T 细胞, 冰上避光处理 30 min, 用 MACS 溶液漂洗, 600 \times g 离心收集荧光抗体标记的 T 细胞, 加入 300 μ L MACS 溶液重悬, 多色 FCM 分析转染细胞中 TCR 和 CD3 的表达水平。

1.7 荧光素酶活性实验检测 TCR-T 细胞对 HPV16 阳性 SiHa 细胞的杀伤率

构建共表达 HLA-A*02:01 和荧光素酶的 HPV16 阳性 SiHa 细胞, 将稳定表达转基因 TCR-T 细胞(效应细胞)以效靶比 5:1 和 10:1 与 SiHa 靶细胞混合培养, 18 h 后, 每孔加入等体积的荧光素酶底物, 1 000 \times g 室温下离心 20 min, 取 100 μ L 上清液于白板中测定其相对光单位(relative light unit, RLU)。杀伤效率=(1 - 靶细胞和效应细胞共培养孔 RLU/靶细胞孔的 RLU) \times 100%。

1.8 统计学处理

各实验均独立重复 3 次。用 GraphPad Prism 6 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功敲除 CD8⁺ T 细胞和 Jurkat 细胞中 TRAC 和 TRBC 基因

分别在 TRAC 和 TRBC 的外显子上设计了 gRNA (图 1A), 通过电穿孔同时递送 TRAC-RNP 和 TRBC-RNP 到外周血 CD8⁺ T 细胞和 Jurkat 细胞, 进而切割内源性 TCR 的 α 和 β 基因。4 d 后用多色 FCM 检测内源 TCR 敲除情况。结果表明, CRISPR/Cas9 技术能够高效敲除 Jurkat 细胞 [图 1B; (98.5 \pm 0.07)% vs (4.4 \pm 2.5)%, $P<0.01$] 和 CD8⁺ T 细胞 [图 1C; (81.4 \pm 4.5)% vs (3.1 \pm 1.1)%, $P<0.01$] 的 TCR, 使其不表达 TCR。FCM 结果显示, CRISPR/Cas9 介导 Jurkat 细胞(图 1B)和 CD8⁺ T 细胞(图 1C)内源 TCR 缺失抑制了 CD3 的表达。

2.2 成功制备无内源 TCR 的 TCR-T 细胞

成功构建了鼠源恒定区的转基因 TCR 慢病毒载体且获得高滴度的病毒(图 2A), 慢病毒感染 Jurkat 和外周血 CD8⁺ T 细胞 72 h 后, 用 FCM 检测转基因 TCR 表达。结果表明, Jurkat(图 2B)和外周血 CD8⁺ T 细胞(图 2C)膜上的 CD3 和 TCR 均能高表达, 两组 Jurkat 细胞的 CD3 阳性率为

(97.3 \pm 2.6)% vs (3.5 \pm 2.1)% ($P<0.01$), 两组 CD8⁺ T 细胞的 CD3 阳性率为 (66.0 \pm 17.8)% vs (3.1 \pm 3.4)% ($P<0.05$)。结果说明 TCR-T 细胞制备完成, 且电穿孔 RNP 转导不影响转基因 TCR 的阳性率。

2.3 敲除内源 TRAC 和 TRBC 基因有效增强 T 细胞中 TCR 的表达

通过慢病毒将 9 个转基因 TCR 分别导入到野生型 CD8⁺ T 细胞和内源 TCR 敲除的 CD8⁺ T 细胞中, FCM 检测结果显示, 敲除 T 细胞内源 TCR 极大地增强转基因 TCR 在膜上的表达(图 3A)。荧光强度分析证实敲除内源 TRAC 和 TRBC 基因能有效增强 T 细胞表达转基因 TCR [图 3B; (5 749.8 \pm 3 790.6) vs (2 163.8 \pm 1 914.0) RLU, $P<0.01$]。

2.4 敲除内源 TCR 有效增强 TCR-T 细胞对癌细胞的特异性杀伤能力

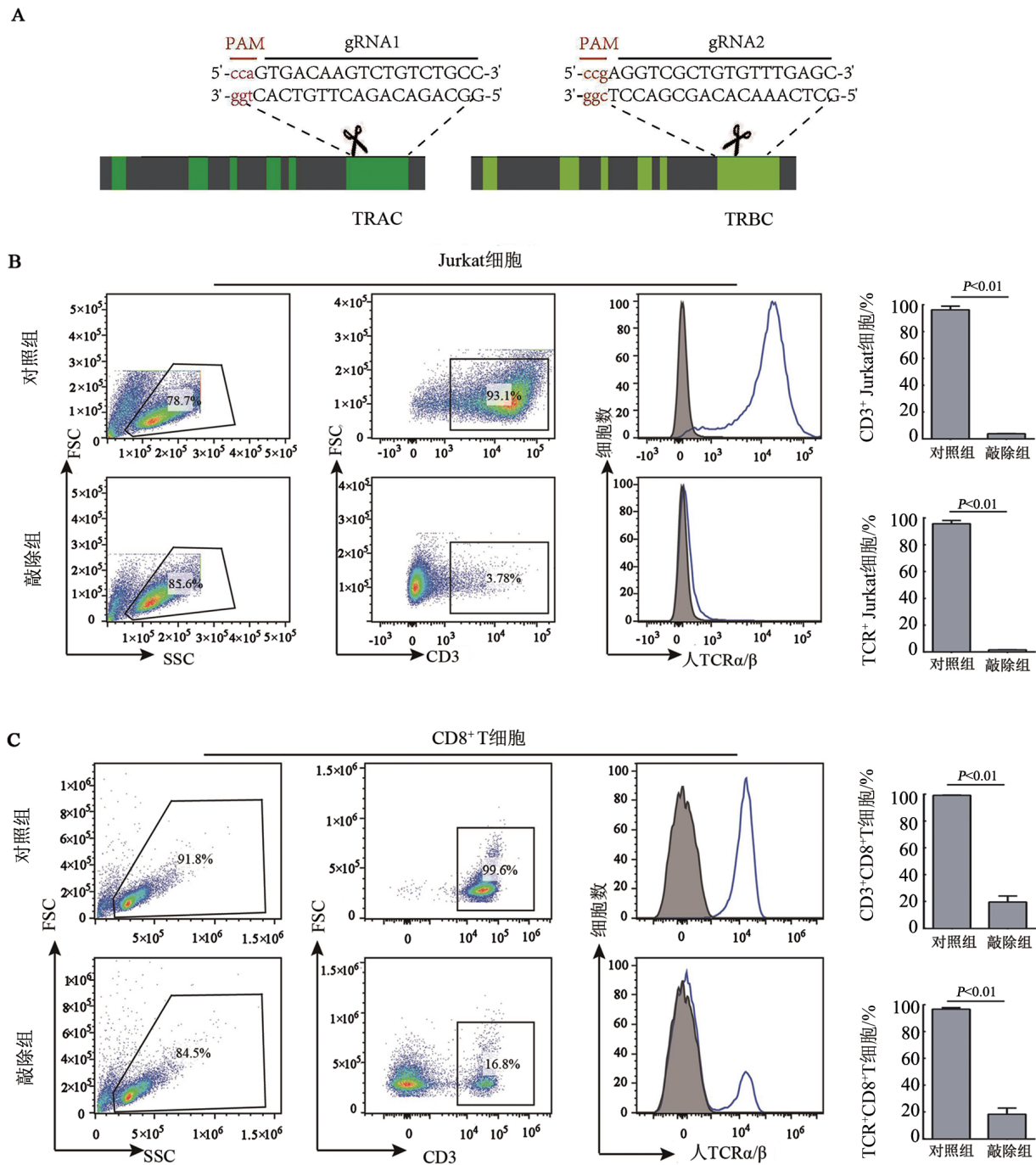
荧光素酶活性实验结果(图 4A)显示, HPV16 E7 TCR 在野生型 CD8⁺ T 细胞膜表面低表达。在效靶比 5:1 的情况下, 用野生型 CD8⁺ T 细胞制备的 TCR-T 细胞对靶细胞 SiHa-HLA-A*02:01 和对照组 SiHa-Ctrl、SiHa-HLA-A*11:01 的杀伤率分别为 (26.7 \pm 0.2)%、(24.4 \pm 0.9)%、(10.2 \pm 0.8)% ($P>0.05$); 在效靶比 10:1 的情况下的杀伤率分别为 (35.1 \pm 2.0)%、(16.5 \pm 0.3)%、(23.1 \pm 1.0)% ($P>0.05$), 表明制备的 TCR-T 细胞具有微弱的特异性杀伤靶细胞功能。无内源 TCR 的 CD8⁺ T 细胞毒性实验结果(图 4B)显示, 在效靶比 5:1 的情况下, 制备的 TCR-T 细胞对靶细胞 SiHa-HLA-A*02:01 和对照组 SiHa-Ctrl、SiHa-HLA-A*11:01 的杀伤率分别为 (39.8 \pm 13.6)%、(10.2 \pm 3.9)%、(9.9 \pm 2.7)% ($P<0.01$); 在效靶比 10:1 的情况下, 其杀伤率分别是 (71.4 \pm 1.0)%、(6.3 \pm 1.1)%、(4.8 \pm 2.0)% ($P<0.01$), 可见对靶细胞的杀伤显著强于对照细胞。结果表明, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除内源 TCR 的 TCR-T 细胞, 能明显增强特异性识别并杀伤 HPV16 阳性的宫颈癌 SiHa 细胞。

3 讨论

宫颈癌是最常见的女性生殖恶性肿瘤之一, 高危型 HPV 持续性感染是诱发宫颈上皮内瘤样病变及宫颈癌发生发展的主要因素。传统手段(手术、放疗及化疗等)仍是目前首选的治疗方案, 但对于进展期、转移以及复发性宫颈癌治疗效果不佳。因此, 探索安全有效的治疗模式在提高进展期、转移以及复发性宫颈癌的术后生存率已成为近年来宫颈癌研究领域中的重点之一。

近年来,个体化免疫靶向治疗已成为治疗实体瘤最具有前景的新技术。HINRICHS 课题组研究^[15-16]发现,靶向识别 HPV16 E6 及 E7 抗原相关的 TCR 制备的 TCR-T 细胞能够在体外及小鼠瘤荷模型中杀伤肿瘤细胞,然而并不能彻底清除体内肿瘤。进一步的临床试验表明,TCR-T 细胞仅介导部分宫颈癌患者的临床反应。本研究也发现,外周血

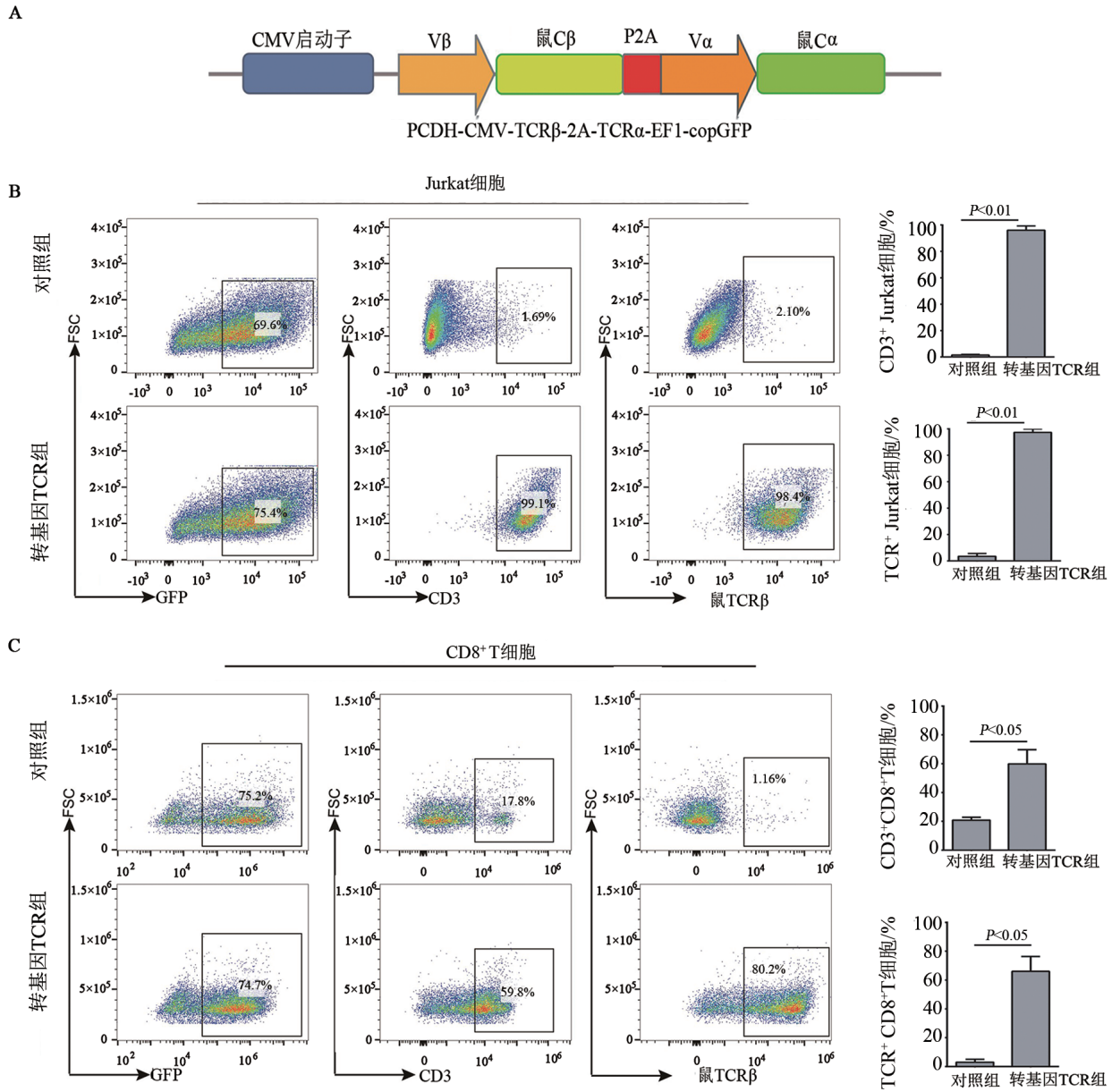
CD8⁺ T 细胞膜表面不能有效高表达转基因 TCR,且影响识别杀伤 HPV16 阳性的宫颈癌 SiHa 细胞。因此研发安全有效的 TCR-T 细胞以特异性靶向识别且杀伤 HPV16 阳性的宫颈癌细胞,可为进展期、转移以及复发性 HPV 病毒阳性宫颈癌患者提供有效的治疗方案。



A: 以 CRISPR/Cas9 技术敲除 TRAC 和 TRBC 靶点的设计; B: FCM 检测 Jurkat 细胞膜上 CD3 和 TCR 的表达;

C: FCM 检测人外周血 CD8⁺ T 细胞的内源 CD3 和 TCR 在膜上的表达水平

图 1 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 CD8⁺ T、Jurkat 细胞的内源 TCR 基因



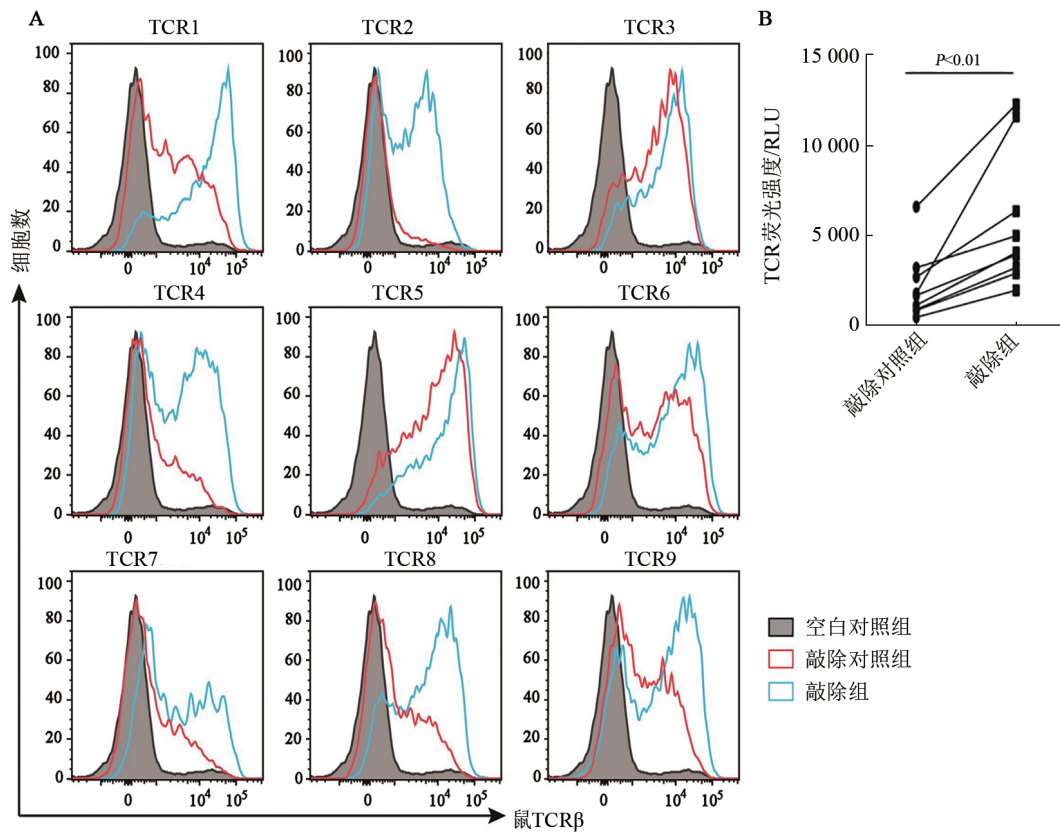
A: 转基因 TCR 载体构建示意图; B: FCM 检测 Jurkat 细胞中慢病毒转染效率及 CD3 和转基因 TCR 在细胞膜上的表达水平;

C: FCM 检测外周血 CD8⁺ T 细胞中慢病毒感染效率及 CD3 和转基因 TCR 在细胞膜上的表达水平

图2 重组慢病毒感染制备无内源 TCR 的 TCR-T 细胞中转基因 TCR 和 CD3 的表达水平

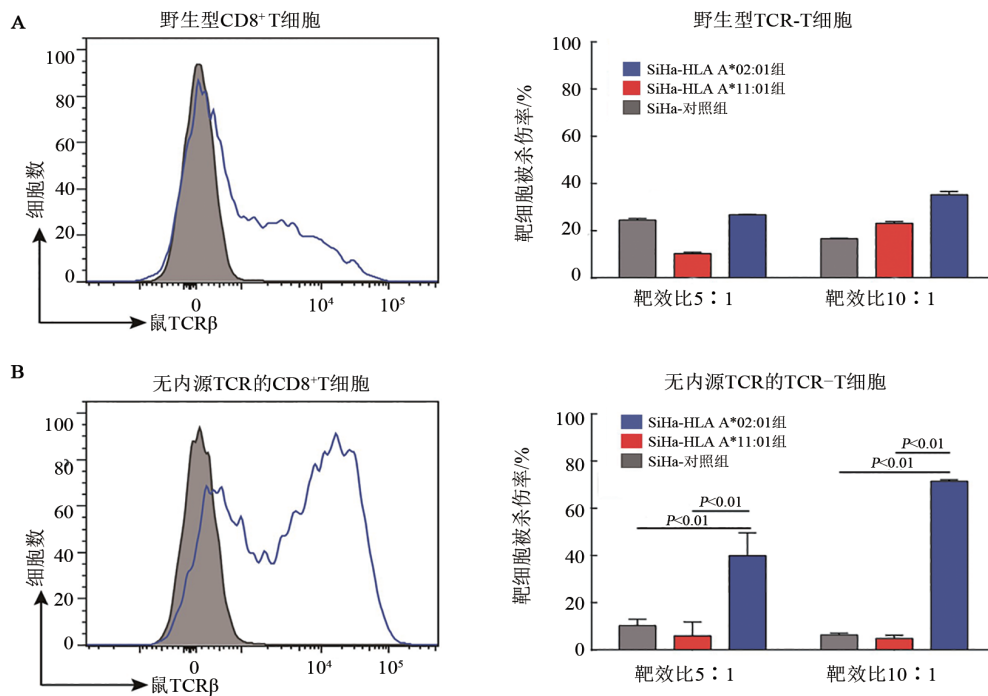
为了优化转基因 TCR 的靶向识别和杀伤效应, 本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除内源性 TCR 的 α 和 β 基因, 构建内源 TCR 不表达的 T 细胞, 避免内源性 TCR 与转基因 TCR 竞争结合 CD3, 以及二者易错配形成非天然混合型 TCR 二聚体。体外实验发现, CRISPR 基因编辑介导转基因 TCR 有效表达于 T 细胞膜表面。此外, 杀伤实验结果显示, 无内源 TCR 的 T 细胞制备的靶向识别 HPV16 E7 抗原的 TCR-T 细胞能够高效特异性识别杀伤 HPV16 阳性的宫颈癌 SiHa 细胞。

综上所述, 本研究采用基于 RNP 形式的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术制备无内源 TCR 表达的 TCR-T 细胞, 可在体外实验中显著提高靶向识别 HPV16 E7 抗原的 TCR 表达及增强 TCR-T 细胞特异性靶向杀伤能力。本研究提供了高效靶向识别 HPV16 E7 抗原的 TCR-T 细胞制作方法, 有望为进展期、转移及复发性宫颈癌患者提供更强治疗手段。此外, CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除内源 TCR 策略同样适用于其他恶性实体瘤的个体化 TCR-T 细胞的研发, 具有重要的临床应用前景。



A: FCM 检测 9 个转基因 TCR 在野生型 CD8⁺ T 细胞和内源 TCR 敲除的 CD8⁺ T 细胞中表达水平; B: 各组细胞中 TRBC 荧光强度统计图

图 3 无内源 TCR 的 TCR-T 细胞膜表达 TCR 的水平



A: FCM 检测野生型 CD8⁺ T 细胞中转基因 HPV16 E7 TCR 的膜表达水平和野生型 TCR 的 TCR-T 细胞对靶细胞的杀伤能力; B: FCM 检测 CRISPR/Cas9 技术介导无内源 TCR 的 CD8⁺ T 细胞中转基因 HPV16 E7 TCR 的膜表达水平及其对靶细胞的杀伤能力

图 4 TCR-T 细胞膜转基因 TCR 的表达水平和体外杀伤靶细胞的能力

[参考文献]

- [1] HANCOCK G, HELLNER K, DORRELL L. Therapeutic HPV vaccines[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2018, 47: 59-72. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.09.008.
- [2] DEPUYDT C E, BEERT J, BOSMANS E, *et al.* Human Papillomavirus (HPV) virion induced cancer and subfertility, two sides of the same coin[J]. *Facts Views Vis Obgyn*, 2016, 8(4): 211-222.
- [3] BADARACCO G, VENUTI A, SEDATI A, *et al.* HPV16 and HPV18 in genital tumors: significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness[J]. *J Med Virol*, 2002, 67(4): 574-582. DOI: 10.1002/jmv.10141.
- [4] ARBYN M, BRYANT A, BEUTELS P, *et al.* Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors[J/OL]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2011, 2011(4): CD009069[2023-01-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176676/>. DOI: 10.1002/14651858.CD009069.
- [5] VALDESPINO V, GORODEZKY C, ORTIZ V, *et al.* HPV16-specific cytotoxic T lymphocyte responses are detected in all HPV16-positive cervical cancer patients[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(1): 92-102. DOI: 10.1016/j.ygyno.2004.08.052.
- [6] ADACHI K, KANO Y, NAGAI T, *et al.* IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 346-351. DOI: 10.1038/nbt.4086.
- [7] HOU B, TANG Y, LI W H, *et al.* Efficiency of CAR-T therapy for treatment of solid tumor in clinical trials: a meta-analysis[J/OL]. *Dis Markers*, 2019, 2019: 3425291[2023-01-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30886654/>. DOI: 10.1155/2019/3425291.
- [8] ISHIHARA M, KITANO S, KAGEYAMA S, *et al.* NY-ESO-1-specific redirected T cells with endogenous TCR knockdown mediate tumor response and cytokine release syndrome[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(6): e003811[2023-01-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35768164/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-003811.
- [9] RAPOPORT A P, STADTMAUER E A, BINDER-SCHOLL G K, *et al.* NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma[J]. *Nat Med*, 2015, 21(8): 914-921. DOI: 10.1038/nm.3910.
- [10] XIA Y, TIAN X P, WANG J T, *et al.* Treatment of metastatic non-small cell lung cancer with NY-ESO-1 specific TCR engineered-T cells in a phase I clinical trial: a case report[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(6): 6998-7007. DOI: 10.3892/ol.2018.9534.
- [11] ZHANG Y K, LIU Z P, WEI W, *et al.* TCR engineered T cells for solid tumor immunotherapy[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2022, 11(1): 1-11. DOI: 10.1186/s40164-022-00291-0.
- [12] ZHANG Z W, JIANG D Q, YANG H, *et al.* Correction: Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 235[2023-01-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32300103/>. DOI: 10.1038/s41419-020-2450-z.
- [13] ZHAO L J, CAO Y J. Engineered T cell therapy for cancer in the clinic[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2250[2023-01-01]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02250>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02250.
- [14] ANDERSON K G, VOILLET V, BATES B M, *et al.* Engineered adoptive T-cell therapy prolongs survival in a preclinical model of advanced-stage ovarian cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(9): 1412-1425. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0258.
- [15] JIN B Y, CAMPBELL T E, DRAPER L M, *et al.* Engineered T cells targeting E7 mediate regression of human papillomavirus cancers in a murine model[J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3(8): e99488[2023-01-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29669936/>. DOI: 10.1172/jci.insight.99488.
- [16] DRAPER L M, KWONG M L M, GROS A, *et al.* Targeting of HPV-16+ epithelial cancer cells by TCR gene engineered T cells directed against E6[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(19): 4431-4439. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3341.
- [17] VAN LOENEN M M, DE BOER R, AMIR A L, *et al.* Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(24): 10972-10977. DOI: 10.1073/pnas.1005802107.
- [18] SHAO H W, ZHANG W F, HU Q L, *et al.* TCR mispairing in genetically modified T cells was detected by fluorescence resonance energy transfer[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 3951-3956. DOI: 10.1007/s11033-010-0053-y.
- [19] LEGUT M, DOLTON G, ALI MIAN A, *et al.* CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells[J]. *Blood*, 2018, 131(3): 311-322. DOI: 10.1182/blood-2017-05-787598.
- [20] MORTON L T, REIJMERS R M, WOUTERS A K, *et al.* Simultaneous deletion of endogenous TCR $\alpha\beta$ for TCR gene therapy creates an improved and safe cellular therapeutic[J]. *Mol Ther*, 2020, 28(1): 64-74. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.10.001.
- [21] Personalized TCR T cells enabled by CRISPR[J/OL]. *Cancer Discov*, 2023, 13(1): 6-7[2023-01-01]. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-nb2022-0071>. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-nb2022-0071.
- [22] XUE S A, CHEN Y, VOSS R H, *et al.* Enhancing the expression and function of an EBV-TCR on engineered T cells by combining Sc-TCR design with CRISPR editing to prevent mispairing[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(12): 1275-1277. DOI: 10.1038/s41423-020-0396-9.

[收稿日期] 2023-01-18

[修回日期] 2023-04-12

[本文编辑] 向正华, 沈志超