

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.001

· 专家论坛 ·

重视肿瘤疫苗的免疫反应监测

杨爱珍, 项方, 贾绍昌(解放军第八一医院全军肿瘤中心, 江苏南京 210002)



贾绍昌, 解放军第八一医院肿瘤外科副主任兼生物治疗科主任, 主任医师、兼职教授、博士研究生导师。中国免疫学会肿瘤免疫及细胞治疗分会委员, 中国医师协会外科医师分会委员, 全军结直肠癌专业委员会委员, 全军普通外科专业委员会甲乳学组委员, 南京军区生物技术专业委员会副主任委员, 江苏省抗癌协会肝癌专业委员会委员, 江苏省生物技术学会常务理事, 江苏省食品药品监督管理局特聘专家。从事医疗、教学和科研工作 20 余年, 专攻肿瘤的外科治疗和细胞过继免疫治疗, 2006 年获军队优秀人才特殊津贴。科研成果: 发表专业学术论文 50 余篇, 获军队科技进步二等奖 1 项、江苏省科技进步三等奖 1 项。承担科研课题: 全军医药卫生科研基金“十一五”面上课题 1 项, 全军医药卫生科研基金“十二五”面上课题 1 项, 南京军区重大专项课题 1 项, 江苏省南京市科技发展计划 1 项。E-mail: jiashaochang@sina.com

[摘要] 免疫细胞的激活是肿瘤疫苗治疗后的第一个生物学事件, 标志着肿瘤免疫应答的产生, 因此在临床上监测能反映免疫细胞激活状态的免疫指标对肿瘤疫苗的临床应用非常有意义。目前已建立了多种针对临床免疫反应的监测方法, 但它们的重复性和可比性还面临挑战, 尚缺乏可作为金标准的质量控制措施, 它们与临床反应的关系还尚待大样本的临床验证; 另外, 免疫相关不良反应和肿瘤抗原的扩展也增加了免疫指标判定的复杂性。最近几年, 一些国际学术组织制定了免疫反应监测的评价标准, 提出了关于 T 细胞监测最少信息的计划; 美国 FDA 公布的肿瘤疫苗临床使用指南, 对疫苗免疫反应监测也提出了一系列指导性意见。目前国内业界对肿瘤疫苗的临床免疫反应监测尚缺乏足够的重视, 已开展的监测工作不够规范。本文对肿瘤疫苗的免疫反应监测所面临的问题和挑战进行了分析, 就国内业界如何重视和加强肿瘤疫苗临床免疫反应监测的基础研究和临床试验提出了若干建议, 以期在不久的将来, 我国该领域的工作能迎头赶上国际先进水平。

[关键词] 肿瘤疫苗; 免疫反应; 监测

[中图分类号] R730.51; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-0001-06

Importance of monitoring therapeutic cancer vaccine-mediated immune responses in clinical settings

Yang Aizhen, Xiang Fang, Jia Shaochang (Center of Oncology of People's Liberation Army, 81st Hospital of People's Liberation Army, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

[Abstract] Activation of immune cells is the first biological event after administration of a therapeutic cancer vaccine, thus serving as an indicator of success in the induction of immune response. Therefore, monitoring the activation status of immune cells is of pivotal importance in the clinical application of therapeutic cancer vaccines. Currently, a “gold standard” for monitoring cancer vaccine-mediated immune cell activation is lacking. Although several methods have been developed to measure the clinical immune response, how to improve the reproducibility and comparability of these methods remains a significant challenge and the usefulness of these methods has yet to be further evaluated in clinical studies with a large sample size. Moreover, the complexity of the immune response including inconvenient immune response, immune-related adverse effect and antigen cascade, hampers meaningful comparisons among studies. In recent years, several international working groups have established immune response monitoring standards including the minimal information about T

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目(973 项目)(No. 2013CB945200); 国家自然科学基金资助项目(No. 31371520)。Project supported by the National Key Basic Research Development Program (973 Program) (No. 2013CB945200), and the National Natural Science Foundation of China (No. 31371520)

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140218.1054.001.html>

cell assays (MIATA) proposed by an international team of academic researchers and industry experts, and the clinical considerations for therapeutic cancer vaccines developed by FDA. At present in China, inadequate attention has been paid to the clinical immune response monitoring, and the monitoring methods have not been standardized. This review aims: 1) to analyze the problems and challenges that the cancer immunotherapy monitoring in China faces; and 2) to propose how to enforce and improve the monitoring of immune responses in cancer patients after treatment with cancer vaccines through basic research and clinical trials in China.

[**Key words**] cancer vaccine; immune response; monitoring

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 1-6]

肿瘤疫苗是利用肿瘤抗原、免疫细胞或其他免疫分子激活自身免疫系统,诱导机体的特异性细胞免疫和体液免疫应答的一种治疗手段,包括多肽疫苗、DNA 疫苗、树突状细胞(dendritic cell, DC)疫苗、单克隆抗体等。近年来,肿瘤疫苗取得了重要进展,如治疗前列腺癌的疫苗 Sipuleucel-T、治疗恶性黑色素瘤的 Ipilimumab 在临床上取得了一定的效果^[1-2],已经被美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市。

肿瘤疫苗发挥作用主要通过 3 个阶段:(1)免疫细胞的激活与分化,通常在治疗后的数天到数周;(2)临床可观察到的反应(如肿瘤大小的变化等),通常是治疗后的数周到数月;(3)转化为潜在生存获益,通常是数月甚至数年^[3]。由于作用机制的不同,肿瘤疫苗疗效评价的一个新标准已经建立并在临床试验中使用^[4]。肿瘤疫苗应用中一个值得关注的问题是对免疫反应的临床监测。免疫细胞的激活是肿瘤疫苗治疗后的第一个生物学事件,标志着肿瘤免疫应答的产生,因此监测这种反应非常有意义。目前已建立了多种用于检测患者免疫反应的方法,主要分为非特异性免疫反应和特异性免疫反应两类。对检测方法的规范化和结果报告的可比性,国际上一些学术组织做了积极的探索,国内也有很多学者正进行着严肃的思考和实践,但相当多的同行对肿瘤疫苗临床免疫反应的监测还缺乏应有的重视,本文以特异性免疫反应为重点,对肿瘤疫苗临床免疫反应监测相关的几个问题作一探讨。

1 非特异性免疫反应的监测

应用较广泛的非特异性免疫反应检测方法包括流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)或流式磁珠阵列(cytometric bead array, CBA)法检测血清细胞因子分泌水平。

在肿瘤患者外周血中 T 淋巴细胞亚群异常,包括 CD4⁺/CD8⁺ 比值、调节性 T 细胞(regulatory T

cell, Treg)比例等异常,说明肿瘤患者的免疫功能处于抑制状态^[5]。细胞因子是由免疫系细胞以及其他类型细胞主动分泌的一类小分子量的可溶性蛋白质,包括 IFN、Th1 和 Th2 型细胞因子、TNF、趋化因子、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)等。在一项脑胶质瘤的 DC 疫苗研究^[6]中,发现 DC 疫苗治疗后,外周淋巴细胞分泌的 IFN- γ 水平显著升高,并且免疫应答(IFN- γ 水平升高 1.5 倍以上)患者的 IFN- γ 对数值与患者的生存期呈正相关,这是首次报道细胞因子与生存期呈现定量关系的文献。最近的一项研究^[7]表明,Th1 细胞分泌的 IFN- γ 和 TNF 通过 CDKN2A-Rb 信号通路对肿瘤细胞造成持久的细胞衰老和生长停滞,说明细胞因子的检测有一定的意义。

2 特异性免疫反应的监测

特异性免疫监测主要是检查患者治疗后是否激发了抗原特异性的 T 细胞,监测方法主要包括:以迟发型超敏反应法(delayed type hypersensitivity, DTH)检测治疗后患者体内是否存在抗原特异性 T 细胞;酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT)、MHC-肽复合物多聚体法(MHC-peptide multimers)和细胞内细胞因子染色法(intracellular cytokine staining, ICCS)检测特异性 T 细胞数量或比例;此外,还可通过检测外周血淋巴细胞的体外杀伤活性检测抗原特异性 T 细胞的功能。

虽然肿瘤疫苗通过激活机体的免疫反应发挥抗肿瘤作用,但患者接受肿瘤疫苗治疗后的临床疗效是否与免疫反应直接相关目前尚无定论,检测方法的不一致可能是一个重要原因。Leffers 等^[8]利用 P53 多肽疫苗治疗 20 例卵巢癌的 II 期临床试验中,ELISPOT 方法检测 P53 特异性 T 细胞,未发现临床疗效与 T 细胞反应的相关性。而 Weiner 等^[9]利用 gp100、MART-1、tyrosinase 的混合多肽疫苗联合 GM-CSF、IFN- α 2b 治疗 120 例晚期恶性黑色素瘤的 II 期临床试验中,ELISPOT 检测发现特异性免疫反应的患

者其总生存期较无特异性免疫反应的患者明显延长(21.3 vs 13.4个月, $P = 0.046$),提示患者多肽疫苗治疗后的生存期与免疫反应相关。

相对于其他繁琐的检测方法,DTH是相对简单和直观的检测方法,仅凭肉眼就能观察到结果。对43例晚期恶性黑色素瘤患者进行DC疫苗治疗后,发现DTH阳性的患者有更长的无进展生存期(22 vs 7个月, $P = 0.0017$)和总生存期(33 vs 11个月, $P = 0.0014$),说明DTH结果与临床反应有一定的关系^[10]。另外一项研究^[11]表明,DTH似乎与临床反应没有联系,研究者在肿瘤疫苗治疗之前就对肿瘤患者(恶性黑色素瘤12例,肾癌22例)进行了DTH检测,发现DTH阳性患者的疾病进展时间较DTH阴性的患者显著延长($P = 0.0049$),肿瘤疫苗治疗后,之前DTH阴性的患者有部分患者DTH转化为阳性,说明激发了特异性的细胞免疫,但DTH阳性和阴性患者的疾病进展时间没有显著差别($P = 0.4430$),似乎说明DTH与临床获益没有明显的相关性。另一项针对600多例恶性黑色素瘤DC疫苗治疗的研究^[12]表明,由于DTH阳性的患者近50%评价为进展,DTH似乎与临床反应没有统计学的相关性($P = 0.18$),而ELISPOT阳性有更高的临床有效率,与临床反应有统计学的相关性($P = 0.0004$)。

采用两种或多种免疫指标检测比一种免疫指标可能更有说服力,如前列腺癌患者接受Sipuleucel-T治疗后,相对于治疗前,患者治疗后第4周和第13周的IFN- γ ELISPOT阳性比例和抗原刺激指数(³H释放试验)都有显著提高^[13]。对Sipuleucel-T三个临床试验的前列腺癌患者的回顾性分析($n = 737$)进一步表明,Sipuleucel-T治疗后抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)激活比例、ELISPOT阳性比例、抗原刺激指数、部分细胞因子、趋化因子及针对负载抗原的抗体滴度均有显著变化^[14]。

由于免疫指标的复杂性,与临床反应相关的研究还缺乏大样本的资料,国际癌症治疗性疫苗临床试验工作组(cancer vaccine clinical trial working group, CVCTWG)对免疫反应监测的建议^[15]是:(1)尽可能多地从每个患者收集到最大许可的样本数量以供检测和重复测试;(2)应当采集系列样本至少应包括基线和2个跟踪时间点在内的3个时间点;(3)建立的检测方法应能够重现,在不同的实验室能得到验证(可不要求与临床反应建立起相关性);(4)至少应采用2种以上的检测方法;(5)对试验人群的免疫应答频率和强度应事先界定。

3 特异性免疫反应监测面临的挑战

特异性免疫反应监测的方法已经确立,但特异性免疫反应监测重复性和可比性不高。主要原因:(1)存在很多不同版本的方法;(2)不同的实验室结果相差较大;(3)方法需要多个步骤导致结果变化;(4)很多实验室没有严格的质量和过程的控制;(5)大多数的报告缺少关键的信息。在一项多中心检测试验^[16]中,实验室间的检测结果存在显著差异,影响了数据的可重复性,且不能对不同研究之间进行有意义的比较。总之,目前缺乏一种可作为金标准的基于特异性免疫反应检测方法的质量控制措施^[17]。在多个学术组织的支持下,大规模国际性免疫监测专业评判小组计划得以实施,主要方法包括ELISPOT和HLA-多肽多聚体,其目标是为在临床试验中实施免疫检测的实验室提供一种外部质量保证流程,并协调分析性能^[18-19]。该计划的实施不是为了提供标准操作程序,而是为规范化检测提供持续改进的建议,如凋亡细胞的排除、用于背景消减的预测试血清的使用以及计算机化斑点评估中的质量控制等^[21-23]。研究^[24]表明,采用规范化的建议进行特异性T细胞的检测能减少差异,提高特异性T细胞的检测质量。随着流式技术的发展,对T细胞的多参数检测成为可能,一些学者也在探讨流式细胞术检测CTL相关分子(同时检测CD107、穿孔素、颗粒酶B、CD154等)的规范化检测建议。

尽管采用一些规范化建议,特异性T细胞检测结果的报告仍然可能不一致,导致结果间的不可比较。这是因为除了规范化检测,样品的取样方式(如不同抗凝剂对结果的影响)、检测方法(处理方法、使用抗体、培养过程、流式补偿调节、统计学方法等)和实验室环境等对结果均有一定的影响。为了便于比较,结果报告需要有统一的格式。为此,一项关于T细胞检测的最少信息(minimal information about T-cell assays, MIATA)计划已经公布^[25-27],为免疫检测试验结果的可比性提供可能。MIATA是为T细胞检测报告的一致性提供最少信息的标准,通过建立一个最小的报告框架,使得数据具有重复性,可以相互比较。MIATA包含如下内容:样品、检测方法、数据获取、结果、实验室环境。目前MIATA提供胞内染色、ELISPOT和多聚体检测的报告模板,一系列支持文档包括术语的定义、MIATA指南、结果报告等可从网站(www.miataproject.org)上获取。MIATA已经获得一些欧美免疫学学术组织的支持^[28],一些基于MIATA报告格式的文献已经开始

发表^[29-31]。最少信息标准已经在一些其他检测如高通量的基因芯片检测中获得了成功(minimum information about microarray experiments, MIAME), MIAME 已经成为一些生物医学杂志的强制要求, 如果没有遵循 MIAME 的规定, 有关基因芯片的数据难以在一些高水平杂志上发表。一些杂志(如 *Onco Immunol*), 自 2013 年第 2 期起已经加入 MIATA 开展的活动, 将来可能会强制要求投稿者采用 MIATA 的推荐格式。MIATA 的长期目标是适时建立人类免疫检测数据注解框架, 建立一个数据库, 使之成为人类免疫计划(human immunology project) 的一部分^[32]。MIATA 还是比较新的概念, 有可能成为国际通用的格式, 作者建议国内的临床医师、基础医学工作者和业界人士, 在肿瘤疫苗的临床研究设计中, 要考虑遵守规范化检测的建议和 MIATA 的报告格式, 这样有利于国际交流和提高临床试验水平。

4 免疫特异性不良反应

由于有时候肿瘤疫苗引起的不良反应很弱, 难以用 CTCAE V4.0 标准去评判, 一些难以检测的不良反应往往容易被忽视。有学者在不良反应中引入了“麻烦的免疫反应”(inconvenient immune response) 的概念^[27-34]。一些临床研究发现, 肿瘤疫苗治疗有时候诱导了过量的非特异性记忆细胞, 这些非特异性记忆细胞可能会取代先前已经存在的有益的免疫细胞, 这对机体的影响是灾难性的, 导致肿瘤的加速进展。这主要是由于人体的免疫系统的容量和组成是相对恒定的, 不同的细胞要互相竞争有限的空间^[34]。“麻烦的免疫反应”不仅包括非特异性的免疫反应, 也包括无效的杀伤。作者认为, 非“个性化”的肿瘤疫苗、使用异体肿瘤细胞作为抗原的疫苗更容易激发“麻烦的免疫反应”, 主要是因为它们可能激发了非针对自身肿瘤细胞的 T 细胞。“麻烦的免疫反应”检测不易, 往往容易被忽视。“麻烦的免疫反应”提示, 选择合适的靶点、合适的患者非常重要^[35]。

此外, 一般认为肿瘤疫苗可观测到的不良反应比较轻微, 但在免疫检验点抗体类疫苗(CTLA-4 单抗、PD-1 单抗和 PD-L1 单抗等) 的临床研究中, 发现一些患者的器官会发生临床上可观测到的自身免疫损伤, 包括致命性药疹、大肠炎、淋巴细胞性垂体炎、胰腺炎、淋巴结肿大、内分泌失调等, 这类不同于传统化疗药物的不良反应被称为免疫相关的不良事件(immune-related adverse events, irAE), 其发生主要与 T 细胞的过度激活和扩增有关^[2, 36-37]。值得注意

的是, 在 1 项^[38] 1 513 名患者参与的 MUC1 多肽疫苗的 III 期临床试验中, 约 3% 的患者观察到 irAE, 其中 2 名患者为 3 ~ 4 级, 提示先前由于观察样本较小, 肿瘤疫苗的 irAE 可能被忽视了。由于 irAE 不同于传统的细胞毒药物, 临床医师在肿瘤疫苗的临床应用中, 有必要引起足够的重视, 必要时需要免疫科医师的介入。这类不良事件尚缺乏预测因子, 免疫指标是否与 irAE 有关, 临床免疫指标检测是否可以预测 irAE 的发生, 作者认为, 其发生机制提示的 T 细胞免疫反应的检测可能提供有益的线索, 这是很重要的研究课题, 值得进一步研究。

但是也有些研究观察到所谓的抗原扩展(antigen spreading 或 antigen cascade), 如一项研究^[39]表明: 晚期乳腺癌和卵巢癌患者接种 Her-2/neu 或 MUC-1 多肽负载的 DC, 50% 的患者可检测到抗原特异性 CTL; 不仅如此, 在接种了 7 次 MUC-1 多肽负载 DC 的患者体内可检测到针对 CEA 和 MAGE-3 的特异性 T 细胞免疫反应; 而接种了 Her-2/neu 多肽负载 DC 的患者体内可检测到针对 MUC-1 的特异性 T 细胞免疫反应, 说明针对某种特定的肿瘤抗原的肿瘤疫苗可在体内引起抗原扩展。其他一些研究^[40-42]也观察到了肿瘤抗原扩展现象。抗原扩展的原因可能是针对某种肿瘤抗原的 CTL 裂解了肿瘤细胞, 裂解的肿瘤细胞可以作为抗原激发针对其他抗原的 CTL, 从而引起肿瘤抗原扩展^[43]。“麻烦的免疫反应”、免疫相关不良事件和抗原扩展增加了肿瘤疫苗特异性免疫反应的复杂性, 有时候区别起来似乎有些难度, 需要更多的研究加以区别, 需要不同临床科室医师和基础医学研究者的通力合作, 也提示在设计肿瘤疫苗的时候应从多方面考虑。

5 FDA 肿瘤疫苗使用指南的指导意义

2011 年 11 月, 美国 FDA 公布了使用肿瘤疫苗的一个指导原则“Guidance for industry-clinical considerations for therapeutic cancer vaccines”^[44]。在这个指导原则中, 对早期临床试验(I 期) 和晚期临床试验(II、III 期) 需要关注的问题提出了多项建议, 其中包括监视免疫功能、生物标记分子、终点评价指标、统计学方面、延迟效应等。对免疫功能监测的描述要点是: 免疫功能在早期探索性临床试验中非常重要, 目标是对疗效建立“原理验证性”, 确定肿瘤疫苗的免疫原性; 在晚期临床试验中, 可以尝试建立免疫功能和临床疗效的关系; 推荐采用最重要的免疫指标, 如果可能, 至少采用 2 个免疫指标。检测的方法应包括控制变异的措施、检测的参数, 如检测条

件、敏感性、特异性、是否体外扩增、阳性对照、阴性对照、cutoff值、统计学方法等,应该加以详细描述。对于检测是否激发了特异性的免疫反应,推荐检测T细胞、抗体和DTH,并设立对照。这些意见为肿瘤疫苗的临床免疫监测提供了指导。

6 结 语

肿瘤疫苗临床免疫反应监测的方法是免疫学研究中常用的一些方法,但其用于临床免疫反应的监测需要至少解决两个问题:一是检测的规范化,二是检测结果报告的一致性。一些国际学术组织做了有益的探索,提出了规范化检测的建议和MIATA,未来研究将集中于选择重复性高的检测手段、免疫反应与临床反应的关系、免疫特异性不良反应、抗原扩展、最少信息标准等方面,这些问题的解决将有利于提高和保证临床研究的质量,有利于各项临床试验的比较,进而推动肿瘤疫苗的发展。目前,国内研究者往往注重临床指标的改善,而忽视了免疫指标的重要性。国内研究者还应对以下几个方面的问题要有足够重视:(1)国内研究者鲜见参与国际学术组织的合作计划。作者建议可由相关学术组织牵头,介绍引入相关标准,集中优势资源,有条件的研究单位应联合起来积极参与相关国际合作计划,参与制定相关标准,以国际标准引领未来。(2)国内研究者进行免疫反应的检测,应尽早遵循规范化检测建议和MIATA,这有利于国际交流和提高研究质量。(3)不同临床科室医师,包括肿瘤科、免疫科等,应该和基础研究工作者、药学工作者、统计学家通力合作,在肿瘤疫苗临床试验方案的设计时要考虑目前发展的最新动态,并做好预案,做到与国际接轨,否则无法在国际上占有一席之地。幸运的是,肿瘤疫苗临床免疫反应监测的规范化也是最近几年得以重视和发展,国内同行努力遵循国际规范化监测建议,积极参与相关国际学术计划的实施,必将全面促进国内肿瘤疫苗的临床研究水平,从而有力地推动我国肿瘤防治事业的发展。

[参 考 文 献]

[1] Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(5): 411-422.

[2] Hodi FS, O' Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(8): 711-723.

[3] Hoos A, Eggermont AM, Janetzki S, et al. Improved endpoints for cancer immunotherapy trials [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102

(18): 1388-1397.

[4] Nishino M, Giobbie-Hurder A, Gargano M, et al. Developing a common language for tumor response to immunotherapy: Immune-related response criteria using unidimensional measurements [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(14): 3936-3943.

[5] Maecker HT. The role of immune monitoring in evaluating cancer immunotherapy [M]. *Cancer drug discovery and development: Immunotherapy of cancer*. Totowa: Humana Press, 2005: 59-72.

[6] Wheeler CJ, Black KL, Liu G, et al. Vaccination elicits correlated immune and clinical response in glioblastoma multiforme patients [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5955-5964.

[7] Braumüller H, Wieder T, Brenner E, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence [J]. *Nature*, 2013, 494(7437): 361-365.

[8] Leffers N, Lambeck AJ, Gooden MJ, et al. Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(9): 2104-2113.

[9] Kirkwood JM, Lee S, Moschos SJ, et al. Immunogenicity and anti-tumor effects of vaccination with peptide vaccine ⁺/₋ granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and /or IFN- α 2b in advanced metastatic melanoma: Eastern cooperative oncology group phase II trial E1696 [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(4): 1443-1451.

[10] Lopez MN, Pereda C, Segal G, et al. Prolonged survival of dendritic cell- vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor β -expressing T cells [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(6): 945-952.

[11] Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, et al. Dendritic cell-tumor hybrid vaccination for metastatic cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(12): 1111-1118.

[12] Engell-Noerregaard L, Hansen TH, Andersen MH, et al. Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma: assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(1): 1-14.

[13] Beer TM, Bernstein GT, Corman JM, et al. Randomized trial of autologous cellular immunotherapy with Sipuleucel-T in androgen dependent prostate cancer [J]. *Clinic Cancer Res*, 2011, 17(13): 4558-4567.

[14] Sheikh NA, Petrylak D, Kantoff PW, et al. Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: An analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(1): 137-147.

[15] Hoos A, Parmiani G, Hege K, et al. A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics [J]. *J Immunother*, 2007, 30(1): 1-15.

[16] Hoos A, Eggermont AM, Janetzki S, et al. Improved endpoints for cancer immunotherapy trials [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(18): 1388-1397.

[17] Britten CM, Janetzki S, van der Burg SH, et al. Toward the harmonization of immune monitoring in clinical trials: Quo vadis?

- [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(3): 285-288.
- [18] Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, et al. For the elispot proficiency panel of the CVC immune assay working group 2007. Results and harmonization guidelines from two large-scale international elispot proficiency panels conducted by the cancer vaccine consortium (CVC/SVI) [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(3): 303-315.
- [19] Britten CM, Gouttefangeas C, Schoenmaekers-Welters MJP, et al. The CIMT-Monitoring panel: A two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes by structural and functional assays [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57(3): 289-302.
- [20] Britten CM, Janetzki S, Ben-Porat L, et al. Harmonization guidelines for HLA-peptide multimer assays derived from results of a large scale international proficiency panel of the cancer vaccine Consortium (CVC) [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(10): 1701-1713.
- [21] Moodie Z, Price L, Gouttefangeas C, et al. Response definition criteria for ELISPOT assays revisited [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(10): 1489-1501.
- [22] Mander A, Gouttefangeas C, Ottensmeier C, et al. Serum is not required for *ex vivo* IFN- γ ELISPOT: A collaborative study of different protocols from the European CIMT immunoguiding program [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(4): 619-627.
- [23] Attig S, Price L, Janetzki S, et al. A critical assessment for the value of markers to gate-out undesired events in HLA-peptide multimer staining protocols [J]. *J Transl Med*, 2011, 9(1): 108.
- [24] van der Burg SH, Kalos M, Gouttefangeas C, et al. Harmonization of immune biomarker assays for clinical studies [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(108): 108ps44.
- [25] Janetzki S, Britten CM, Kalos M, et al. "MIATA"-minimal information about T cell assays [J]. *Immunity*, 2009, 31(4): 527-528.
- [26] Britten CM, Janetzki S, van der Burg SH, et al. Minimal information about T cell assays: The process of reaching the community of T cell immunologists in cancer and beyond [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(1): 15-22.
- [27] Britten CM, Janetzki S, Butterfield LH, et al. T cell assays and MIATA: The essential minimum for maximum impact [J]. *Immunity*, 2012, 37(1): 1-2.
- [28] Janetzki S, Hoos A, Melief CJ, et al. Structured reporting of T cell assay results [J]. *Cancer Immunol*, 2013, 13(1): 13.
- [29] Laske K, Shebzukhov YV, Grosse-hovest L, et al. Alternative variants of human HYDIN are novel cancer-associated antigens recognized by adaptive immunity [J]. *Cancer Immunol Res*, 2013, 1(3): 190-200.
- [30] Boer MC, van Meijgaarden KE, Bastid J, et al. CD39 is involved in mediating suppression by mycobacterium bovis BCG-activated human CD8⁺ CD39⁺ regulatory T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(7): 1925-1932.
- [31] de Vos van Steenwijk PJ, van Poelgeest MI, Ramwadhoebe TH, et al. The long-term immune response after HPV16 peptide vaccination in women with low-grade pre-malignant disorders of the uterine cervix: A placebo-controlled phase II study [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, Epub ahead of print.
- [32] Leslie M. Immunology uncaged [J]. *Science*, 2010, 327(5973): 1573.
- [33] Sasada T, Komatsu N, Suekane S, et al. Overcoming the hurdles of randomised clinical trials of therapeutic cancer vaccines [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(9): 1514-1519.
- [34] Mochizuki K, Sato Y, Tsuda N, et al. Immunological evaluation of vaccination with pre-designated peptides frequently selected as vaccine candidates in an individualized peptide vaccination regimen [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(1): 121-131.
- [35] Noguchi M, Kakuma T, Uemura H, et al. A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine plus low dose estramustine phosphate (EMP) versus standard dose EMP in patients with castration resistant prostate cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(7): 1001-1009.
- [36] Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2455-2465.
- [37] Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(2): 134-144.
- [38] Butts C, Socinski MA, Mitchell PL, et al. Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): A randomised, double-blind, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(1): 59-86.
- [39] Brossart P, Wirths S, Stuhler G, et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells [J]. *Blood*, 2000, 96(9): 3102-3108.
- [40] Seavey MM, Paterson Y. Anti-angiogenesis immunotherapy induces epitope spreading to Her-2/neu resulting in breast tumor immunoeediting [J]. *Breast Cancer*, 2009, 1(1): 19-30.
- [41] Nesslinger NJ, Ng A, Tsang KY, et al. A viral vaccine encoding prostate-specific antigen induces antigen spreading to a common set of self-proteins in prostate cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(15): 4046-4056.
- [42] Corbière V, Chapiro J, Stroobant V, et al. Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1253-1262.
- [43] Gulley JL. Therapeutic vaccines: The ultimate personalized therapy? [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2013, 9(1): 219-221.
- [44] FDA. Guidance for industry: Clinical considerations for therapeutic cancer vaccines [M]. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/default.htm>.
- [收稿日期] 2013 - 11 - 22 [修回日期] 2014 - 02 - 01
- [本文编辑] 韩丹