

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.018

## 肿瘤过继免疫治疗临床级抗原特异性 T 细胞的研究进展

### Progress of clinical grade antigen-specific T cells for cancer adoptive immunotherapy

胡春晓<sup>1</sup>,冯鹏飞<sup>1</sup>综述;韩双印<sup>1</sup>,朱武陵<sup>2</sup>审阅(1. 郑州大学人民医院 消化内科,河南 郑州 450003;2. 新乡医学院 基础医学院,河南 新乡 453003)

**[摘要]** 抗原特异性 T 细胞是肿瘤过继免疫治疗的核心,靶向性强、杀伤活性高、毒性作用小、疗效卓越的临床级细胞的制备是提高治疗效果的关键。近年来,全封闭自动化 T 细胞分离系统提高了安全性,新型人工抗原提呈方法和  $\gamma c$  家族细胞因子增加了 T 细胞扩增效率,低分化表型 T 细胞的选择提高了有效性,而 T 细胞受体和嵌合抗原受体基因修饰赋予 T 细胞抗原特异性杀伤性能,病毒基因转导和理化基因转染 T 细胞方法的不断改进为基因修饰重定向 T 细胞的抗原特异性提供了保障。越来越多的临床试验展示了令人鼓舞的治疗效果,为肿瘤过继免疫治疗注入了新的生命力。

**[关键词]** 过继免疫治疗;基因修饰;T 细胞受体;嵌合抗原受体

**[中图分类号]** R730.51; R392.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)01-0104-05

过继免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)作为肿瘤治疗方法之一,经历了 30 年的风雨历程。多年来研究者一直致力于提高过继转移 T 细胞的靶向性、杀伤性和持久性,期望通过制备临床级抗原特异性 T 细胞,穿越肿瘤的多重保护屏障,实现对肿瘤细胞的致命追杀。近年来随着肿瘤免疫学理论的发展和技术的进步,从 T 细胞的分离、活化与扩增, T 细胞亚群治疗潜能的发掘,到基因修饰 T 细胞,都为放飞攻克肿瘤的梦想带来了机遇,期待过继免疫治疗为肿瘤治疗带来新的惊喜<sup>[1]</sup>。

### 1 T 细胞的分离、活化与扩增

#### 1.1 T 细胞的分离

正常人外周血含有  $(5 \sim 12.5) \times 10^9$  个 T 淋巴细胞,包括  $(2.5 \sim 8.4) \times 10^9$  CD4<sup>+</sup> T 个细胞和  $(1.5 \sim 4.5) \times 10^9$  CD8<sup>+</sup> 个 T 淋巴细胞,并稳定维持 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞的生理比例在 1.5 左右。T 淋巴细胞中,45% 为初始 T 细胞( naive T cell, T<sub>N</sub> ),2% 为干细胞样记忆 T 细胞( stem cell-like memory T cell, T<sub>SCM</sub> ),15% 为中枢记忆 T 细胞( central memory T cell, T<sub>CM</sub> )和 38% 为效应记忆 T 细胞( effector memory T cell, T<sub>EM</sub> )<sup>[2]</sup>。不断增多的证据表明,体外扩增前对潜在最有效的 T 细胞亚群进行精确的检测和分离能提高肿瘤 AIT 的疗效,因此,分离纯化特定表型的 T 细胞逐渐受到重视。传统的单个核细胞分离方法、密度梯度离心法( Ficoll 或 Percoll 分层液法)和半自动化细胞处理系统(如 CytoMate<sup>TM</sup> 和 Elutra<sup>TM</sup>)均不能有效地分离出特定表型的 T 细胞亚

群,现在多使用免疫磁珠分选仪(如 Isolex 300i 和 Clini-MACS<sup>®</sup>)、流式细胞仪( fluorescence- activated cell sorter, FACS)以及微流体细胞分选设备( Giga-sort<sup>TM</sup> ),通过特异性单克隆抗体或抗原肽-HLA I 复合物识别细胞表面特异性标志物筛选出特定 T 细胞亚群。研究<sup>[3]</sup>表明,识别和选择 CD62、CCR 和 CD45 亚型( CD45RA 表达于幼稚/非活化 T 细胞, CD45RO 表达于记忆/活化 T 细胞)的单克隆抗体分选出的 T<sub>CM</sub>( CD62<sup>hi</sup> CCR7<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> ),因其具有良好的归巢、增殖、应答能力,为肿瘤 AIT 提供了能在体内长期生存的免疫细胞来源。此外,通过定量聚合酶链式反应,筛选体外致敏的、高表达细胞因子的患者外周血淋巴细胞克隆,亦成为一种分离抗原特异性 T 细胞的新途径<sup>[4]</sup>。

#### 1.2 T 细胞的活化

T 细胞活化需要 TCR/CD3 复合物以及共刺激分子的双信号刺激。体外的 T 细胞活化,起初单独

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目( No. 81172415, No. 81241077 ),河南省医学重点科技攻关项目( No. 201002014 )。Project supported by the National Natural Science Foundation of China( No. 81172415, No. 81241077 ), and the Key Medical Scientific Project of Henan Province( No. 201002014 )

**[作者简介]** 胡春晓( 1989 - ),女,浙江省金华人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗基础研究, E-mail: hcx319@163.com。冯鹏飞( 1989 - ),男,河南省驻马店人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗基础研究, E-mail: fengpengfein@163.com

**[通信作者]** 韩双印( Han Shuangyin, corresponding author ), E-mail: shuangyinhan@zzu.edu.cn;朱武陵( Zhu Wuling, corresponding author ), E-mail: wulingzhu2009@126.com

使用 CD3 单抗 (OKT-3) 活化 T 细胞,效果不佳;之后,Riddell 等<sup>[5]</sup>提出联合 CD3 单抗、 $\gamma$ -辐照异体外周血单核细胞/临床级 EB 病毒转化的成淋巴饲养细胞(PBMCs/LCL feeder cells)和 IL-2 活化、快速扩增 T 细胞方法(rapid expansion method, REM),该方法已经应用于淋巴瘤、神经胶质瘤、成神经细胞瘤和病毒性疾病的 I/II 期过继免疫治疗临床研究。然而,维护饲养细胞费用昂贵,限制了临床的广泛应用。近年,研究人员尝试用人工抗原提呈细胞(artificial antigen-presenting cells, aAPCs)取代 PBMC/LCL 饲养细胞<sup>[6]</sup>。aAPCs 能提供 T 细胞活化的双信号,有效地活化 T 细胞并提高其持续增殖能力。稳定表达 Fc $\gamma$ R II 和 4-1BBL 的 K562 细胞株(又名 K32 细胞),表面偶联 CD3 与 CD28 单抗后即构成 aAPCs (K32/4-1BBL/CD3/CD28),已证明能促进 T 细胞分泌 IL-2 和 IL-15,维持 CTL 的持续扩增。此外,多种新的 aAPCs 制备方法被建立并成功用于临床试验,如 CD3/CD28 免疫磁珠在体外对 T 细胞扩增达 10 000 倍以上<sup>[7]</sup>;用脂质体构建的 aAPCs 能与 T 细胞形成免疫突触,从而活化 T 细胞<sup>[8]</sup>。然而,aAPCs 优先扩增 CD4<sup>+</sup> T 细胞,需要提供抗原特异性再刺激以提高 CD8<sup>+</sup> T 细胞的优势扩增。

### 1.3 T 细胞的扩增

肿瘤 AIT 的疗效与过继转移 T 细胞的数量相关,长期以来人们一直致力于体外临床级 T 细胞的制备。细胞因子对 T 细胞的体外扩增、分化以及体内的抗肿瘤活性有重要作用。IL-2 是 T 细胞体外扩增最常用的细胞因子,但大剂量使用 IL-2 会导致过继转移后迟发效应细胞的生长,终末分化的 T 细胞长期抗肿瘤作用不佳。近年发现,IL-2 可能通过耗竭记忆性 T 细胞和增加调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)产生负面效应<sup>[9]</sup>,而  $\gamma$ c 家族细胞因子(共有  $\gamma$  chain)如 IL-7、IL-15 及 IL-21 等可能发挥更强、更持久的扩增 T 细胞能力,尤其对 CD8<sup>+</sup> 记忆 T 细胞<sup>[10]</sup>。IL-15 通过  $\beta$  链介导 Jak1 和 Jak3 信号通路促进 T 细胞增殖,还能阻止 Fas 诱导的 T 细胞凋亡(Fas-induced apoptosis);IL-15 $\alpha$  受体可减少活化诱导的细胞死亡(activation induced cell death, AICD);IL-15 扩增的初始 CD8<sup>+</sup> T 细胞能产生表型、功能和代谢上类似 T<sub>CM</sub> 的细胞,回输患者体内后表现出比 IL-2 扩增的 T<sub>EM</sub> 细胞更佳的增殖和抗肿瘤效应<sup>[11]</sup>。同样,IL-21 通过活化 JAK-STAT 信号通路,促进肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞大量增殖并保留低分化表型,动物实验中表现出比 IL-2 和 IL-15 扩增的 T 细胞更强的抗肿瘤能力<sup>[12]</sup>。此外,一些调节 T 细胞分化通

路(PI3K-AKT-mTOR 和 Wnt- $\beta$  连环蛋白通路)的小分子也被评价:如帕雷霉素通过抑制转录因子 T-bet 阻断 mTOR 信号通路,促进 CD8<sup>+</sup> 记忆 T 细胞形成;GSK3 $\beta$  拮抗剂 TWS119 或重组 WNT 蛋白可增强 WNT- $\beta$  信号通路、促进 T<sub>SCM</sub> 及 T<sub>CM</sub> 的形成<sup>[13-14]</sup>。总之,选择  $\gamma$ c 家族细胞因子结合关键信号通路的调节小分子可保持增殖 T 细胞低分化状态,可能成为临床级 T 细胞制备的关键,但是需要更多的实验研究证实。

## 2 T 细胞亚群的治疗潜能

多年来大多数过继免疫治疗使用未经分选的 CD3<sup>+</sup> T 细胞(包括抗原特异性 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T 细胞),然而混合 T 细胞的异质性和多克隆性可能会影响肿瘤 AIT 的效应和安全性,选择最佳治疗潜能的 T 细胞会对治疗产生积极的影响。那么,哪种 T 细胞亚群具有最好的治疗效果呢?

CD8<sup>+</sup> T 细胞一般分为 CD45RA<sup>+</sup> 初始 T 细胞(T<sub>N</sub>)和接触抗原后增殖的 CD45RO<sup>+</sup> 记忆 T 细胞(包括 T<sub>CM</sub> 和 T<sub>EM</sub> 亚群)。研究发现,CD8<sup>+</sup> T 细胞在体外反复刺激分化成早、中、晚 3 期效应 T 细胞(effector T cell, TEEF),中晚期 T<sub>EFF</sub> 回输后,其扩增和存活能力尤其是引起肿瘤回缩能力不如 T<sub>N</sub> 和早期 T<sub>EFF</sub>。为探讨过继转移的 CD8<sup>+</sup> 记忆 T 细胞亚群介导肿瘤应答的能力,研究者将接种肿瘤细胞的小鼠模型分别输注不同亚群的 T 细胞,结果显示在体内 T<sub>CM</sub> 比 T<sub>EM</sub> 有更持久的存活时间和更佳的抗肿瘤效应<sup>[15]</sup>。尽管两种记忆 T 细胞在回输初期均表现出肿瘤回缩的作用,然而只有 T<sub>CM</sub> 能诱导完全反应,接受 T<sub>EM</sub> 的小鼠最终死于不可控制的肿瘤,上述抗肿瘤效应的不同是因为 T<sub>CM</sub> 在体内能够自我更新并分化成效应细胞,而 T<sub>EM</sub> 无此特性<sup>[16]</sup>。Berger 等<sup>[17]</sup>使用 CMV 感染的灵长类动物模型、Wherry 等<sup>[18]</sup>使用 LCMV 感染的小鼠模型也都证实了以上观点。随后 Gattinoni 等<sup>[19]</sup>发现一种兼有干细胞和记忆细胞特性的 T 细胞亚群(T<sub>SCM</sub>),能够自我更新并分化出 T<sub>EFF</sub>、T<sub>CM</sub> 和 T<sub>EM</sub>。T<sub>SCM</sub> 具有类似 T<sub>N</sub> 的表型 CD44<sup>low</sup> CD62L<sup>high</sup>,还表达 Sca-1、Bcl-2、IL-2R $\beta$  和 CXCR3,已经证明 T<sub>SCM</sub> 比 T<sub>CM</sub> 和 T<sub>EM</sub> 具有更强的抗肿瘤效能。如果把缩减肿瘤的有效性作为输注 T 细胞亚群的功能来评价,发现 T 细胞分化状态和抗肿瘤效能之间存在着一种明显的线性关系即: T<sub>SCM</sub> > T<sub>CM</sub> > T<sub>EM</sub><sup>[20]</sup>。以上数据表明过继转移低分化 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群与临床抗肿瘤反应具有相关性,因此未来的

过继免疫治疗临床级抗原特异性细胞支持应用低分化的 CD62L<sup>+</sup>T<sub>SCM</sub>、T<sub>CM</sub> 亚群, 而非 CD62L-T<sub>EM</sub>、T<sub>EFF</sub>。

### 3 T 细胞的抗原特异性修饰

过继转移 T 细胞的肿瘤靶向性与 AIT 疗效密切相关, 临床级抗原特异性 T 细胞的制备面临很大的挑战。近年来, 利用肿瘤特异性 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)和嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰 T 细胞, 赋予 T 细胞肿瘤抗原特异性, 使 T 细胞有效地识别并杀伤肿瘤细胞。

#### 3.1 TCR 修饰 T 细胞

T 细胞的抗原特异性主要由 TCR 决定, 识别肿瘤相关抗原或特异抗原的 TCR 基因  $\alpha/\beta$  链可从高亲和力的人 T 细胞或从接种了肿瘤抗原的人源化小鼠 T 细胞中分离, 将其克隆入载体修饰 T 细胞, 赋予其肿瘤特异性杀伤作用。2006 年 Morgen 等<sup>[21]</sup>采用黑素瘤分化抗原(MART-1)特异性 TCR 转染淋巴细胞 I 期临床试验治疗 17 例转移性黑素瘤, 15 例过继转移患者外周血可检测到超过 10% 的基因修饰 T 细胞持续存在, 2 例患者 1 年后仍可检测到 TCR<sup>+</sup> T 细胞。虽然这项临床试验患者肿瘤应答率不如肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)高, 但为基因修饰 T 细胞免疫治疗奠定了基础。随后的肿瘤睾丸抗原(NY-ESO-1)特异性 TCR 过继免疫治疗临床试验表现出较好的临床效果, 对 11 例高表达 NY-ESO-1 的黑素瘤患者进行回输治疗, 5 例患者的症状得到改善<sup>[22]</sup>。此外, 黑素瘤相关抗原(gp-100)、癌胚抗原(CEA)和 Wilms 肿瘤基因蛋白(WT-1)等肿瘤抗原的特异性 TCR 基因也被用于修饰 T 细胞提高靶向性<sup>[23]</sup>。然而 TCR 基因修饰 T 细胞肿瘤免疫治疗存在一些缺陷, 如许多肿瘤通过下调或缺失 MHC 免疫逃逸; 需要对每位患者 HLA 等位基因进行测定, 以保证 TCR 抗原特异性识别; 基因转导的外源性 TCR 链与内源性 TCR 链间的错配, 可能导致对宿主正常组织的破坏<sup>[24]</sup>。研究人员正通过增加半胱氨酸残基以形成更多的链间二硫键、选择特定的 T 细胞亚群如缺乏  $\alpha\beta$  链的  $\gamma\delta$  T 细胞或病毒特异性 T 细胞作为基因修饰的细胞, 以提高有效性和安全性<sup>[25]</sup>。

#### 3.2 CAR 修饰 T 细胞

嵌合抗原受体是 Eshhar 研究小组<sup>[26]</sup>于 1989 年首次提出, 由识别肿瘤表面抗原的单链抗体(single chain variable fragment, ScFv)和 T 细胞活

化基序组成, 以非 MHC 限制的方式结合肿瘤抗原, 启动并活化下游级联反应, 特异性杀伤肿瘤细胞。第一代 CAR 由肿瘤抗原特异性 ScFv 和免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)构成, 第二代和三代 CAR 引入了共刺激分子, 如 CD28、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)和 ICOS(inducible costimulator)等, 旨在提高过继转移 CAR<sup>+</sup> T 细胞的杀伤性持久性<sup>[27]</sup>。CAR 修饰 T 细胞的抗肿瘤作用在众多的体外试验和动物实验中得到证实, 临床疗效和安全性正在进行之中(www.clinicaltrials.gov)。CAR<sup>+</sup> T 细胞在血液系恶性肿瘤的临床试验成绩卓著。June 研究小组<sup>[28]</sup>用第二代 CD19-CAR(ScFvCD19-CD137-CD3 $\zeta$ )修饰 T 细胞治疗慢性淋巴细胞白血病(Chronic lymphocytic leukemia, CLL), 接受治疗的 3 例患者 2 例达完全缓解(complete response, CR), CAR<sup>+</sup> T 细胞在体内扩增超过 1 000 倍, 维持有效治疗活性达 6 个月以上, 部分 CAR<sup>+</sup> T 细胞甚至以记忆细胞形式存在。来自 7 个研究中心的结果表明, CD19-CAR 修饰的 T 细胞治疗白血病和淋巴瘤的 CR 率达 25%<sup>[29]</sup>。此外, 靶向 CD20、CD22、CD30、CD33 的 CAR<sup>+</sup> T 细胞在血液系肿瘤治疗作用也在研究之中。CAR 修饰 T 细胞在实体肿瘤的临床研究中也取得了进展。靶向二唾液酸神经节苷脂(disialoganglioside, GD2)和 L1 细胞黏附分子(L1CM)的 CAR<sup>+</sup> T 细胞 I/II 期临床试验治疗儿童成神经细胞瘤, Louis 等<sup>[30]</sup>用第一代 GD2-CAR 修饰 EB 病毒反应性 T 细胞治疗 11 例患者中 3 例出现 CR。尽管 CAR 修饰 T 细胞在肿瘤免疫治疗中具有诱人的前景, 但临床试验也出现了细胞因子风暴(cytokine storm)、脱靶效应(off-site on-target effect)和移植物抗宿主病等潜在的风险, 研究者正在采取措施克服安全性问题。

### 4 T 细胞基因转导方法

高效与安全的基因转导方法对临床级肿瘤抗原特异性 T 细胞的制备非常重要。因为体外扩增 T 细胞是 AIT 治疗的必要步骤, 稳定的染色体嵌入式基因修饰方法将会优于短暂或瞬时表达的基因转导方法。近年来围绕 T 细胞的病毒基因转导方法和理化基因转染方法都取得了可喜的进步。

#### 4.1 病毒载体转导方法

病毒载体最大的优点是转染效率高, 在 T 细胞基因修饰中得到较多的应用。逆转录病毒(retrovirus)是第一个批准用于临床的病毒载体,

T 细胞转导效率达 20% ~ 60%。Scholler 等<sup>[31]</sup>最近报告了来自 3 个临床试验的 200 例患者长达 11 年的临床观察,逆转录病毒修饰 T 细胞在 98% 患者中能够长期的追踪到,且没有发现插入突变导致的细胞恶性转化,但是逆转录病毒载体不能转染非增殖细胞(如 T<sub>N</sub> 细胞)而影响其转导效率。慢病毒(lentivirus)能感染增殖期及静止期的多种类型细胞,感染效率接近 100%,随着安全性的进一步提高,在临床试验中应用日益增多<sup>[32]</sup>。June 等<sup>[28]</sup>采用 Lentigen 公司的慢病毒包装系统能够达到临床要求的病毒滴度和纯度,在 CAR 修饰 T 细胞治疗血液系肿瘤中得到了很好的应用;Circosta 等<sup>[33]</sup>利用慢病毒载体介导 MART-1-TCR 修饰 CD8<sup>+</sup> T<sub>N</sub> 细胞达到 34% ~ 45% 的转导效率。此外,Ad5/F35 腺病毒载体能够达到 10% 静息 T 细胞和 30% ~ 45% 活化 T 细胞的转导效率,有望成为候选的病毒载体<sup>[34]</sup>。泡沫病毒(foamy virus)载体可能比逆转录病毒和慢病毒有安全优势,因为野生型泡沫病毒对人类及其他灵长类动物没有致病性,可能很快进入临床试验<sup>[35]</sup>。

#### 4.2 理化基因转染方法

理化基因转染方法操作简单、安全性好、免疫原性低,但转染效率低于病毒载体。近年,以睡美人(sleeping beauty, SB)和 Piggybac 为代表的转座子系统<sup>[36-37]</sup>(transposon-based system)提高了理化方法的转染效率。转座子系统含有两个质粒,一个编码转座酶,另一个是两端携带有反向重复序列(IR/DRs)的目的基因。转座酶识别基因组的 IR/DRs 重复序列,将目的基因整合到靶细胞。SB 系统在 CAR 修饰 T 细胞研究中能达到 30% 的基因转染效率,展示出良好的应用前景<sup>[38]</sup>。Piggybac 系统能够同时转导多个基因,使被修饰的细胞获得多重功能表型<sup>[39]</sup>。然而和其他的整合型基因转导方法一样,转座子系统也存在插入突变风险,但迄今为止尚未发现插入突变相关的临床报道。锌指蛋白核酸酶(zinc finger nuclease)是最近开发的基因转导方法,它是通过锌指蛋白的位点识别、核酸酶的定点切割、细胞的修复机制来实现的,其在 T 细胞基因修饰中的作用正在研究之中<sup>[40]</sup>。

## 5 结语

临床级抗原特异性 T 细胞制备的进展重燃了人们对 AIT 的信心,尤其是基因修饰 T 细胞临床研究的成就加速了其从实验室到临床的转化。未来的

过继免疫治疗将会根据细胞表型分选最佳治疗潜质的 T 细胞亚群,优化培养条件,保持增殖 T 细胞的低分化状态,提高基因转导效率,增强 T 细胞的抗肿瘤效能,为临床治疗提供靶向性强、杀伤活性高、毒性作用小、疗效卓越的临床级细胞产品。随着研究的深入,相信过继免疫治疗将会给肿瘤患者带来福祉。

## [参考文献]

- [1] Rosenberg SA. Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127): 127ps8.
- [2] Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. Sorting through subsets: Which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? [J]. *J Immunother*, 2012, 35(9): 651-660.
- [3] Digiusto DL, Cooper L. Preparing clinical grade Ag-specific T cells for adoptive immunotherapy trials [J]. *Cytotherapy*, 2007, 9(7): 613-629.
- [4] Kammula US, Serrano OK. Use of high throughput qPCR screening to rapidly clone low frequency tumor specific T-cells from peripheral blood for adoptive immunotherapy [J]. *J Transl Med*, 2008, 6(1): 60.
- [5] Berger C, Turtle CJ, Jensen MC, et al. Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2): 224-232.
- [6] Turtle CJ, Riddell SR. Artificial antigen presenting cells for use in adoptive immunotherapy [J]. *Cancer J*, 2010, 16(4): 374-381.
- [7] Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation [J]. *J Transl Med*, 2010, 8(1): 104.
- [8] Koffeman E, Keogh E, Klein M, et al. Identification and manipulation of antigen specific T-cells with artificial antigen presenting cells [J]. *Methods Mol Med*, 2007, 136(1): 69-86.
- [9] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 13-25.
- [10] Yang S, Ji Y, Gattinoni L, et al. Modulating the differentiation status of ex vivo-cultured anti-tumor T cells using cytokine cocktails [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(4): 727-736.
- [11] Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory sT<sub>EM</sub> T cells from naive precursors [J]. *Blood*, 2013, 121(4): 573-584.
- [12] Hinrichs CS, Spolski R, Paulos CM, et al. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8<sup>+</sup> T cells for adoptive immunotherapy [J]. *Blood*, 2008, 111(11): 5326-5333.
- [13] Rao RR, Li Q, Odunsi K, et al. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8<sup>+</sup> T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin [J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 67-78.

- [ 14 ] Gattinoni L, Zhong XS, Palmer DC, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8<sup>+</sup> memory sT<sub>EM</sub> cells [ J ]. *Nat Med*, 2009, 15( 7 ): 808-813.
- [ 15 ] Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102( 27 ): 9571-9576.
- [ 16 ] Berger C, Jensen MC, Lansdorf PM, et al. Adoptive transfer of effector CD8<sup>+</sup> T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates [ J ]. *J Clin Invest*, 2008, 118( 1 ): 294-305.
- [ 17 ] Berger C, Turtle CJ, Jensen MC, et al. Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity [ J ]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21( 2 ): 224-232.
- [ 18 ] Sarkar S, Teichgräber V, Kalia V, et al. Strength of stimulus and clonal competition impact the rate of memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation [ J ]. *J Immunol*, 2007, 179( 10 ): 6704-6714.
- [ 19 ] Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with sT<sub>EM</sub> cell-like properties [ J ]. *Nat Med*, 2011, 17( 10 ): 1290-1297.
- [ 20 ] Klebanoff CA, Gattinoni L, Palmer DC, et al. Determinants of successful CD8<sup>+</sup> T cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17( 16 ): 5343-5352.
- [ 21 ] Goff SL, Johnson LA, Black MA, et al. Enhanced receptor expression and *in vitro* effector function of a murine-human hybrid MART-1-reactive T cell receptor following a rapid expansion [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59( 10 ): 1551-1560.
- [ 22 ] Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1 [ J ]. *J Clin Oncol*, 2011, 29( 7 ): 917-924.
- [ 23 ] Stone JD, Kranz DM. Role of T cell receptor affinity in the efficacy and specificity of adoptive T cell therapies [ J ]. *Front Immunol*, 2013, 4( 2 ): 244.
- [ 24 ] Govers C, Sebestyen Z, Coccoris M, et al. T cell receptor gene therapy: Strategies for optimizing transgenic TCR pairing [ J ]. *Trends Mol Med*, 2010, 16( 2 ): 77-87.
- [ 25 ] Hebeisen M, Oberle SG, Presotto D, et al. Molecular insights for optimizing T cells receptor specificity against cancer [ J ]. *Front Immunol*, 2013, 4( 1 ): 154.
- [ 26 ] Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86( 24 ): 10024-10028.
- [ 27 ] Han EQ, Li XL, Wang CR, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and challenges [ J ]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6( 1 ): 47.
- [ 28 ] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia [ J ]. *N Engl J Med*, 2011, 365( 8 ): 725-733.
- [ 29 ] Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors [ J ]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10( 5 ): 267-276.
- [ 30 ] Louis CU, Savoldo B, Dotti G, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma [ J ]. *Blood*, 2011, 118( 23 ): 6050-6056.
- [ 31 ] Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells [ J ]. *Sci Transl Med*, 2012, 4( 132 ): 132-153.
- [ 32 ] Segura MM, Mangion M, Gaillet B, et al. New developments in lentiviral vector design, production and purification [ J ]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13( 7 ): 987-1011.
- [ 33 ] Circosta P, Granziero L, Follenzi A, et al. T cell receptor( TCR ) gene transfer with lentiviral vectors allows efficient redirection of tumor specificity in naive and memory T cells without prior stimulation of endogenous TCR [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20( 12 ): 1576-1588.
- [ 34 ] Schroers R, Hildebrandt Y, Hasenkamp J, et al. Gene transfer into human T lymphocytes and natural killer cells by Ad5/F35 chimeric adenoviral vectors [ J ]. *Exp Hematol*, 2004, 32( 6 ): 536-546.
- [ 35 ] Trobridge GD, Horn PA, Beard BC, et al. Large animal models for foamy virus vector gene therapy [ J ]. *Viruses*, 2012, 4( 12 ): 3572-3588.
- [ 36 ] Maiti SN, Huls H, Singh H, et al. Sleeping beauty sysT<sub>EM</sub> to redirect T-cell specificity for human applications [ J ]. *J Immunother*, 2013, 36( 2 ): 112-123.
- [ 37 ] Nakazawa Y, Saha S, Galvan DL, et al. Evaluation of long-term transgene expression in piggyBac-modified human T lymphocytes [ J ]. *J Immunother*, 2013, 36( 1 ): 3-10.
- [ 38 ] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, et al. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using sleeping beauty sysT<sub>EM</sub> and artificial antigen presenting cells [ J ]. *PLoS One*, 2013, 8( 5 ): e64138.
- [ 39 ] Saha S, Nakazawa Y, Huye LE, et al. Piggy Bac transposon sysT<sub>EM</sub> modification of primary human T cells [ J ]. *J Vis Exp*, 2012, ( 69 ): e4235.
- [ 40 ] Maier DA, Brennan AL, Jiang S, et al. Efficient clinical scale gene modification via zinc finger nuclease-targeted disruption of the HIV co-receptor CCR5 [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2013, 24( 3 ): 245-258.

[ 收稿日期 ] 2013 - 09 - 05

[ 修回日期 ] 2013 - 12 - 28

[ 本文编辑 ] 韩丹