

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.09.001

· 专家论坛 ·

实体肿瘤 TCR-T 治疗研究的现状与面临的挑战

叶春梅^{1,2,3}, 叶韵斌^{1,2,3} (1. 福建医科大学 基础医学院; 2. 福建医科大学附属肿瘤医院暨福建省肿瘤医院; 3. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014)



叶韵斌 主任医师、教授、博士生导师。福建省百千万人才(第二层次)、福建省卫生系统跨世纪人才。福建医科大学附属福建省肿瘤医院肿瘤免疫研究室主任,福建省肿瘤转化医学重点实验室主任,福建省肿瘤免疫治疗质控中心主任。曾留学法国、美国。兼任中国抗癌协会肿瘤生物治疗专委会委员、肿瘤标志物专委会委员,中国生物技术协会生物技术临床应用专委会常委、精准医学分会常委,中国医药质量管理协会细胞治疗质量控制与研究专业委员会常委,福建省免疫学会副理事长,福建省医学会肿瘤学分会委员、器官移植学分会常委、肝病学会分会常委,福建省抗癌协会理事、肿瘤免疫治疗专委会常委等职。主要研究抗肿瘤免疫的机制与临床应用。主持国家自然科学基金项目2项以及省部级课题10项,发表SCI文章50多篇。获福建省科技三等奖4项,福建省医学三等奖1项。

[摘要] T细胞表面含有特异性的T细胞受体(T cell receptors, TCR),能够识别不同的肿瘤抗原,从而实现对癌变细胞的杀伤和清除。TCR工程化T细胞(TCR-engineered T cells, TCR-T)治疗即是通过钩取针对肿瘤细胞的特异性TCR,并应用基因工程技术改造T细胞,输注体内后可达到治疗肿瘤的目的。尽管TCR-T治疗取得一定成果,但是还存在治疗毒性、T细胞浸润有限、抗原特异性不佳等问题,需要不断优化TCR-T治疗的安全性和有效性。因此,本文阐述了目前国内外关于实体肿瘤TCR-T治疗的研究现状以及存在的问题与对策。

[关键词] 实体肿瘤;过继性细胞免疫治疗;TCR工程化T细胞;新抗原

[中图分类号] R730.51;R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)09-0959-09

Current status and challenges of TCR-T therapy in solid tumor

YE Chunmei^{1,2,3}, YE Yunbin^{1,2,3} (1. The School of Basic Medical Science, Fujian Medical University; 2. Cancer Hospital of Fujian Medical University & Fujian Provincial Cancer Hospital; 3. Key Laboratory of Translational Cancer Medicine of Fujian Province, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] T cell receptors (TCR) are specifically expressed on T cell surface, which can recognize different tumor antigens to kill and scavenge cancerous cells. TCR-engineered T cells (TCR-T) therapy is to harbor TCR specific to tumor cells and modify the T cells with genetic engineering techniques to achieve the purpose of treating tumors after transfusion. Despite some achievements in TCR-T therapy, there are still some problems, such as treatment toxicity, limited T cell infiltration and antigen-specific deficiency and so on. So, the safety and effectiveness of TCR-T therapy need to be constantly optimized. Therefore, this paper summarizes the research status of TCR-T therapy for solid tumors in domestic and overseas, as well as the existing problems and countermeasures.

[Key words] solid tumor; adoptive cellular immunotherapy; TCR-engineered T cells (TCR-T); neoantigen

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(9): 959-967. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.09.001]

肿瘤免疫治疗指通过调动患者机体的免疫系统来对抗肿瘤的治疗手段,主要包括免疫检查点抑制剂,以阻断免疫负性信号;肿瘤疫苗,诱导机体的抗肿瘤主动免疫效应;过继性细胞免疫治疗,即通过分离患者自身淋巴细胞或健康供者淋巴细胞,在体外经多种细胞因子和特异性抗原刺激,或经基因修饰后大量扩增成具有肿瘤杀伤性的免疫效应细胞,再输入患者体内抑制肿瘤^[1]。2017年,美国食品和药物管理局(FDA)批准了靶向CD19的CAR-T细胞疗法在

急性淋巴细胞白血病和大B细胞淋巴瘤治疗中应用,开启了肿瘤细胞治疗的新元年。然而,尽管CAR-T

[基金项目] 福建省科技创新联合资金资助项目(No.2018Y9108)。Project supported by the Joint Funds for the Innovation of Science and Technology in Fujian Province (No.2018Y9108)

[作者简介] 叶春梅(1995-),女,硕士生,主要从事肿瘤免疫治疗研究,E-mail: yecm@fjmu.edu.cn

[通信作者] 叶韵斌(YE Yunbin, corresponding author), E-mail: zjyunbin@189.cn

细胞在血液系统肿瘤的治疗已取得良好效果,但对于实体肿瘤的疗效却有限。究其原因,与实体肿瘤相关抗原丢失、肿瘤异质性、CAR-T细胞向肿瘤部位迁移受限等有关^[2]。一般说来,实体肿瘤抗原主要通过主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)提呈并展现于细胞表面,才能被T淋巴细胞的TCR分子识别,继而激发特异性的T细胞免疫,而肿瘤患者体内的肿瘤反应性TCR都有缺陷。因此,应用基因修饰技术,将肿瘤反应性TCR转染至效应性T细胞中,再回输至肿瘤患者体内,能够有效提高T细胞在肿瘤组织中的浸润,并识别与杀伤肿瘤。早在2006年,MORGAN等^[3]构建T细胞识别的黑色素瘤抗原1(melanoma antigen recognized by T cell-1, ART-1)特异性的TCR基因,以逆转录病毒作为基因载体转染黑色素瘤患者T淋巴细胞,并在体外扩增后输注到15例黑色素瘤患者体内,在输入细胞治疗1年后,有2例患者的肿瘤出现了消退,显示了TCR-T在实体瘤中较好的应用前景。本文主要阐述在过继性细胞免疫治疗转移技术背景下实体肿瘤TCR-T治疗的研究现状和存在的问题与解决措施。

1 靶向实体肿瘤TCR-T治疗的研究现状

1.1 靶向肿瘤相关抗原的TCR-T

肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)是指某些肿瘤表面的糖脂或者糖蛋白,其在正常细胞中表达或表达量处于微量水平,然而在肿瘤患者中表达明显升高。例如黑色素瘤相关抗原A-3(melanoma-associated antigen-3, MAGEA-3)、MAGE-A4、糖蛋白100(glycoprotein 100, gp100)、癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)、癌睾抗原1(cancer/testis antigen 1, NY-ESO-1)、P53、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、T淋巴细胞识别的黑色素瘤抗原(melanoma antigen recognized by T cells-1, MART-1)等。这些肿瘤相关抗原,一定程度上能引起患者的T淋巴细胞反应,但T细胞在进入血液循环前经过胸腺阴性选择,使得对自身抗原具有高亲和力的淋巴细胞被清除,造成患者体内靶向肿瘤相关抗原的T细胞亲和力低,不足以有效杀伤肿瘤细胞。因此,如果能够将识别肿瘤相关抗原的TCR基因转染患者T细胞,所获得的TCR-T细胞可大大增强对肿瘤细胞的亲和力,有效杀伤肿瘤。

研究人员应用TCR-T疗法对多种实体瘤(黑色素瘤、滑膜肉瘤、食管癌等)进行了研究。MORGAN等^[3]学者,在体外将针对MART-1₂₇₋₃₅、gp100₂₀₉₋₂₁₇、NYESO-1₁₅₇₋₁₆₅、p53₂₆₄₋₂₇₂多肽表位的TCR mRNA通过电转染的方法导入到CD8⁺外周血T淋巴细胞,获得抗原特异性TCR-T

后,与负载了相应抗原多肽且HLA分型一致的T2细胞共培养,检测T细胞经活化产生的IFN- γ ,结果显示这些TCR具有抗原识别特异性和HLA限制性。同时,作者将识别MART-1抗原的TCR-T分别回输17例处于进展期的转移性黑色素瘤患者,治疗后有2例患者显示其转移的黑色素瘤的持续客观消退。2010年,ROBBINS等^[4]学者首次开展靶向NY-ESO-1的自体TCR-T治疗转移性黑色素瘤和滑膜细胞肉瘤的临床试验,回输大于 1×10^9 个特异性TCR-T细胞治疗17例肿瘤患者,结果显示6例滑膜细胞肉瘤患者中有4例患者有临床反应,1例患者身上观察到持续18个月的部分反应;表达NY-ESO-1黑色素瘤的11例患者中有5例有临床反应,且有2例表现出1年后仍持续完全消退。2015年,KAGEYAMA等^[5]报道了对表达MAGE-A4抗原的复发性食管癌患者进行的TCR-T的临床试验。将10例复发性食管癌患者分3组,第一组3例每例回输 2×10^8 个特异性TCR-T细胞,第二组4例每例回输 1×10^9 个TCR-T细胞,第三组3例每例回输 5×10^9 个的TCR-T细胞。经TCR-T细胞治疗发现,10例食管癌患者中有5例外周血虽然连续五个月均检测到TCR-T细胞,但未见肿瘤明显消退,究其原因可能是该试验过程未对患者的淋巴细胞做去势处理。因此,随后的研究不仅聚焦于针对各种肿瘤靶点的TCR设计,还在临床研究方案的设计上进行探索。新的TCR-T的研究不断涌现,成为实体瘤细胞免疫治疗的主力军。根据美国ClinicalTrials.gov网站登记收录,已经完成的靶向实体肿瘤TCR-T临床试验(表1)有13个,正在招募的临床试验(表2)有14个,随着对TCR-T过继免疫治疗的临床试验评估,为难治性肿瘤患者带来缓解的希望。基于TCR-T的良好应用前景,许多国内外公司参与TCR-T的研发(表3)。

1.2 靶向病毒抗原的TCR-T

机体遭受病毒感染后,依靠免疫反应可清除大部分病原体,但有些逆转录病毒的基因可整合到人类基因组,其基因产物诱导细胞转化,导致肿瘤发生。另一方面,这类病毒基因产生的蛋白可作为病毒诱发的肿瘤特异性抗原。这些病毒基因编码的抗原,以病毒肽-MHC I类分子复合物模式表达于肿瘤细胞表面,可诱导机体产生抗肿瘤特异性免疫应答。有报道^[6]指出,大约12%的人类癌症是由病毒引起的,如(epstein-barr virus, EBV)病毒诱发的鼻咽癌、人类乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)相关的宫颈癌和乙型肝炎病毒(hepatitis b virus, HBV)感染的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)等。这些病毒诱发的肿瘤细胞,其表面含有病毒多肽(如HPV-E6癌蛋白)与HLA-A限制性表位形成

的复合物,且免疫原性普遍较高,可引起T细胞有效应答^[7]。由此可见,病毒多肽是高特异性的靶向抗原,可诱导针对抗病毒相关肿瘤的细胞免疫,据此可

构建病毒特异性的基因工程化T细胞用于抗肿瘤过继免疫治疗。

表1 已完成/终止的靶向实体肿瘤 TCR-T 的临床试验

注册号	HLA 分型	肿瘤类型	TCR 类型	阶段
NCT00393029	HLA-A*0201	过表达 P53 的转移性癌症	anti-p53 TCR	II 期
NC00610311	HLA-A*0201	转移性黑色素瘤	anti-gp100 ₁₅₄₋₁₆₂ TCR	II 期
NCT00612222	HLA-A*0201	转移性黑色素瘤	anti-MART-1 F5 TCR	II 期
NCT00704938	HLA-A*0201	过表达 P53 的转移性癌症	anti-p53 TCR	II 期
NCT00509496	HLA-A*0201	转移性黑色素瘤	anti-gp100 ₁₅₄₋₁₆₂ TCR	II 期
NCT00509288	HLA-A*0201	转移性黑色素瘤	anti-MART-1 F5 TCR	II 期
NCT00706992	HLA-A*0201	黑色素瘤	anti-MART-1 F5 TCR	II 期
NCT01273181	HLA-A*0201	转移性黑色素瘤	anti-MAGE-A3/12 TCR	I/II 期
NCT02062359	HLA-A*0201	转移性肾细胞癌	anti-NY ESO-1 TCR	II 期
NCT00670748	HLA-A*0201	转移性黑色素瘤	anti-NY ESO-1 TCR	II 期
NCT02280811	HLA-A*0201	转移性肾细胞癌	anti-HPV E6 TCR	I/II 期
NCT01350401	HLA-A*0201	转移性或难治性 HPV16 ⁺ 癌症	anti-NY-ESO-1 _{c259} TCR	I/II 期
NCT01892293	HLA-A201	III/IV 期黑色素瘤	anti-NY-ESO-1 _{c259} TCR	I/II 期
		骨髓瘤		

表2 正在招募的靶向实体肿瘤 TCR-T 的临床试验

注册号	HLA 分型	TCR 类型	肿瘤类型	研究机构
NCT03648697	HLA-A*0201/ 1101/2402	EBV TCR	转移性鼻咽癌	福建省肿瘤医院
NCT03925896	HLA-A*02/11/24	LMP2 TCR	鼻咽癌	中山大学附属肿瘤医院
NCT03578406	No	HPV E6 TCR	宫颈癌,头颈部鳞状细胞癌	重庆市新桥医院
NCT03891706	NO	TumorTCR	肺癌,黑色素瘤	中山大学附属肿瘤医院
NCT02858310	HLA-A*0201	E7 TCR	HPV16 ⁺ 癌症	美国国立卫生研究院临床中心
NCT03029273	HLA-A*0201	Anti-NY-ESO-1 TCR	非小细胞肺癌	广州医科大学第一附属医院
NCT03431311	HLA-A*02	TGFβRII TCR	结肠癌	挪威奥斯陆大学医学院
NCT03691376	HLA-A*0201 HLA-DP*04	NY-ESO-1 CD8+TCR	顺铂耐药的癌症	美国罗斯维尔癌症中心
NCT03912831	HLA-A*0201	HPV-16 E7 TCR	HPV-16 ⁺ 癌症	美国莫菲特癌症中心/研究所
NCT02719782	HLA-class I	HBV TCR	复发性肝癌	中山大学附属第三医院
NCT03462316	HLA-A*0201	NY-ESO-1 TCR	骨肉瘤/软组织肉瘤	中山大学
NCT03190941	HLA-A*1101	anti-KRAS G12V mTCR	胃结肠癌	美国国立卫生研究院临床中心
NCT03745326	HLA-A*1101	anti-KRAS G12D mTCR	胃结肠癌	美国国立卫生研究院临床中心
NCT03971747	HLA-A*0201	AFP TCR	肝细胞癌	复旦大学附属中山医院
NCT02686372	HLA-A*02	HBV TCR	肝细胞癌	中山大学附属第一医院

表3 靶向实体肿瘤 TCR-T 治疗的研发进展

项目名称	TCR-T 靶点	肿瘤类型	阶段	研发机构	发布时间
ADP-A2M10	MAGE-A10	非小细胞肺癌	I 期	Adaptimmune	2018
ADP-A2M4	MAGE-A4	黑色素瘤,头颈癌	I 期	Adaptimmune	2018
ADP-A2AFP	AFP	黑色素瘤,食管癌,卵巢癌,胃癌,膀胱癌	I 期	Adaptimmune	2018
SPEAR T	NY-ESO-1	滑膜癌,非小细胞肺癌	I/II 期	GSK/Adaptimmune	2017
IMCgp100	IMCgp100	黑色素瘤	I 期	Immuncore	2016
IMCgp100	IMCgp100	黑色素瘤	I/II 期	Immuncore	2017
IMCgp100	IMCgp100	恶性黑色素瘤	I 期	Immuncore	2017
LTCR-H1-1/2/3	HBV	肝细胞癌	I 期	Lion TCR	—
LTCR-N1-1	EBV	鼻咽癌	-	Lion TCR	—
KITE-439	HPV-16-E7	宫颈癌	I 期	Kite Pharma	2019
Kite-718	MAGE A3	膀胱癌,食管癌,宫颈癌等	I 期	Kite Pharma	2019
TAEST16001	NY-ESO-1	实体肿瘤	I/II 期	香雪制药	2019
TCR-T	NY-ESO-1	非小细胞肺癌	I 期	深圳因诺免疫	2018
TCR-T	NY-ESO-1	肺癌,食管癌,黑色素瘤	I 期	宾德生物	2019

高危型别HPV的感染与人宫颈癌、阴道癌、阴茎癌、外阴癌、肛门癌及部分头颈癌有关,这些肿瘤细胞可表达高危型别HPV衍生的与肿瘤发生发展有关的癌蛋白E6和E7^[8]。DRAPER团队^[7]制备了识别HLA-A*0201限制性E6抗原表位的CD8⁺的TCR-T细胞,可特异性杀伤表达E6蛋白的宫颈癌、头颈癌细胞系,为开发针对HPV-16(+)的恶性肿瘤的新型细胞治疗奠定了基础。另有一项研究通过构建靶向MHC-II类限制性E6和E7抗原表位CD4⁺基因工程性T细胞,以提高肿瘤微环境中的免疫应答强度,对CD8⁺T细胞的肿瘤杀伤起到辅助作用,表明针对E6和E7抗原的CD4⁺的TCR-T细胞也可用于治疗HPV-16(+)的宫颈癌和其他恶性肿瘤患者^[9]。DORAN及其同事^[10]用E6-TCR-T治疗12例HPV-16(+)上皮癌患者,其中6例宫颈癌患者,4例肛门癌患者,1例口咽癌患者,1例阴道癌患者。这12例患者回输TCR-T的细胞中位数为 1.05×10^{11} 个。治疗后,其中1例肛门癌肺转移患者的一个肺转移灶完全消退,另一肺转移灶部分消退;另一例肛门癌患者出现持续3个月的肿瘤部分消退。虽然肿瘤缩小的比例和持续的时间不同,但是大多数患者的肿瘤出现部分消退。可见,靶向E6抗原表位的TCR-T细胞在治疗HPV-16(+)相关上皮癌患者时可诱导肿瘤的部分消退。

肝癌的发生与肝炎病毒感染密切相关,在中国,因慢性乙型肝炎诱发的肝癌更是超过90%。由于HBV相关性肝癌的细胞表面表达HBV特异性的抗原表位,TAN等学者^[11]研发靶向肝癌HBV抗原TCR-T,用于治疗2例原发性肝癌肝移植术后复发的患者。患者在治疗第一阶段注射的TCR-T细胞数为 1×10^4 个,治疗持续1个月未出现肝损伤。在治疗的第二、第三阶段持续回输 $(5 \sim 10) \times 10^6$ 个TCR-T细胞。结果显示,2例患者均无明显不良反应,第一例患者的肺转移肿瘤体积1年内减小了83%。因此,HBV的特异性抗原成为近年开发肝癌基因工程修饰的细胞治疗的独特靶点。

已经证实,鼻咽癌的发生发展与EBV感染密切相关。所有未分化鼻咽癌均与EBV感染有关^[12],EBV编码的潜伏膜蛋白2(latent membrane protein 2, LMP2)具有免疫原性,能够诱导CTL反应^[13],提示EBV相关蛋白如LMP2可作为治疗的靶点。据美国ClinicalTrials.gov网站登记显示,有两项针对EBV感染型鼻咽癌TCR-T的临床试验研究,包括福建省肿瘤医院研究团队以及中山大学附属肿瘤医院的团队,都以EBV病毒蛋白LMP2为靶点,构建TCR-T细胞用于治疗中晚期鼻咽癌患者,探索LMP2 TCR-T治疗的安全性和有效性。

因此,构建靶向病毒抗原的特异性基因工程化T

细胞,可用于病毒相关肿瘤患者的过继免疫治疗,是将来抗肿瘤细胞治疗研发的重要方向。

1.3 靶向肿瘤新抗原的TCR-T

大部分的肿瘤都带有体细胞基因突变,这是癌症的起因。在肿瘤细胞基因编码区域发生的突变可以导致蛋白质改变,可产生肿瘤特异性抗原(也称为“新抗原”)。突变产生的肽段经酶切、转运,最后与MHC分子高亲和力结合并提呈在肿瘤细胞表面,可被特异性TCR所识别。由于正常组织不存在这些体细胞突变,因而针对新抗原特异性的T细胞不受中央和外周耐受性的影响,不易导致对正常组织的损伤^[14]。因此,以肿瘤新抗原为靶点的TCR-T细胞具有独特的应用前景。

1.3.1 以个体化新抗原为靶点的TCR-T细胞治疗

肿瘤新抗原唯独存在于具有该突变基因的肿瘤细胞表面,具有个体特异性。据报道^[15],在结直肠癌和胃癌患者中因微卫星不稳定移码突变导致TGFBR2的形成,靶向新抗原TGF β RII的HLA-A2特异性的TCR-T在小鼠模型中被证明能显著抑制大肠癌的生长及延长小鼠生存期。2019年RENA等^[16]学者在颈部鳞状细胞癌患者中筛选出个体肿瘤体细胞突变的新抗原肽,成功地鉴定出识别非同义突变MAGOHB_{G17A}和ZCCHC14_{P368L}新抗原表位多肽的特异性TCR,构建这两种特异性TCR并导入到健康供者T淋巴细胞中。结果显示,靶向MAGOHB_{G17A}表位的TCR-T能被明显激活,同时在患者肿瘤微环境中发现存在针对MAGOHB_{G17A}新抗原特异性CD8⁺的效应T细胞。然而靶向ZCCHC14_{P368L}表位的TCR-T未被激活,原因可能是小鼠TCR恒定区与人源TCR可变区的嵌合使得克隆的特异性TCR抗原识别位点的结构受到了轻微影响,这可能降低了TCR与HLA新抗原复合物的亲和力。MATSUDA等^[17]学者从7例卵巢癌患者的癌症组织中鉴定出14个候选新抗原肽,然后从一个健康供体中成功诱导出3种新抗原特异性T细胞,并鉴定其TCR序列,构建了针对RFC5_{K160N}、BRAP_{R543C}、GINS1_{I87V}新抗原表位的TCR-T;研究结果显示这些T细胞能识别出带有新抗原的靶细胞,并以抗原剂量依赖的方式显示细胞毒性。LIU团队^[18]也对初步治疗的上皮性卵巢癌EOC患者进行全外显子和转录组进行测序分析,确定候选新抗原,并通过分析肿瘤和外周血中自发的新抗原特异性T细胞反应,评估优选新抗原的免疫原性;同时,构建出针对两个癌症相关突变基因NUP214和JAK1特异的TCR-T,体外试验证明这种特异性T细胞具有新抗原反应活性。将个体化新抗原TCR-T细胞用于患者的特异性治疗,对于难治性晚期恶性肿瘤患者是一种具有吸引力的治疗选择。目前新抗原TCR-T治疗还

处于临床前的研究状态,需要不断努力探索,有望用于患者的个体化治疗。

1.3.2 以共同新抗原为靶点的 TCR-T 细胞治疗
产生共同新抗原的基因突变频率高,不只限于个体,其他肿瘤患者也有可能发生突变而产生相同的新抗原。例如,在肿瘤发生发展的过程中 TP53 基因经常发生突变,40%~50%的癌症患者存在 TP53 突变,具有 TP53 突变的癌症通常具有单核苷酸变异,包括 R175、G245、R248、R249、R273 和 R282 位点的突变^[19]。TP53 的突变与肿瘤细胞的生长优势有关,使这些突变成为理想的新抗原靶点。由此,LO 等^[19]从转移性结直肠癌患者肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TILs)中筛选出 TP53 HLA-A*0201 特异性 TCR,构建出针对癌症共同新抗原 TP53p. R175H 的 TCR-T。用含有 TP53p. R175H 突变的 HLA-A*0201 型卵巢癌、子宫癌和骨髓瘤细胞系,以及结肠癌、乳腺癌和白血病细胞系作为靶细胞检测 TCR-T 的杀伤活性,证明其能产生较强的免疫反应。由此表明针对 TP53 中发现的共同突变表位的新抗原性 TCR-T,有很大希望可能有益于含有该特异性突变的患者的治疗。要不断寻找其他共同新抗原以及开展严谨的临床前和临床试验,寄希望共同新抗原性 TCR-T 能受益于更多的患者。

2 实体肿瘤 TCR-T 治疗面临的挑战

2.1 实体肿瘤 TCR-T 治疗的毒性

2.1.1 靶标毒性(on-target toxicity) 靶标毒性是指 TCR-T 细胞攻击肿瘤细胞的同时也攻击表达 TCR-T 靶向抗原的正常细胞,使得健康组织受损。JOHNSON 等^[20]将针对 MART-1: 27-35 (DMF5) 表位的 TCR-T 细胞治疗 20 例转移性黑色素瘤患者,回输大于 1×10^9 个 TCR-T 细胞,治疗后发现 14 例患者出现不同程度的皮疹,11 例患者出现眼睛葡萄膜炎,10 例患者的听力受损。作者另将针对 gp100: 154-162 表位的 TCR-T 用于治疗 16 例转移性黑色素瘤患者,回输特异性 TCR-T 的细胞数量大于 1.5×10^9 个。结果显示,有 13 例患者也出现不同程度的广泛的红斑性皮疹,4 例患者出现眼睛损伤,5 例患者耳朵受损及听力丧失。究其原因,可能是正常黑色素细胞也表达 MART-1: 27~35 和 gp100: 154~162 表位,导致 TCR-T 细胞对正常组织发起攻击所致。2011 年, PARKHURST 团队^[21]应用针对 CEA₆₉₁₋₆₉₉ 的自体 TCR-T 治疗 3 例转移性结直肠癌患者,3 例患者接受了 $(2 \sim 4) \times 10^8$ 个 TCR-T 细胞的输注后出现严重的炎症性结肠炎,说明 TCR-T 细胞对正常肠细胞发起了攻击,提示 TCR-T 的靶标毒性以及肿瘤相关抗原 CEA 作为癌症免疫治疗靶点的局限性。

TAA 是非特异性抗原,存在自身免疫毒性,需要不断优化、寻找 TCR-T 治疗的最佳靶向抗原。

2.1.2 脱靶毒性(off-target toxicity) 脱靶毒性是指 TCR-T 细胞无法区分肿瘤细胞表面特异性抗原和正常细胞抗原,损伤了表达与靶点相似抗原表位的健康组织。2013 年 MORGAN 等^[22]将抗 MAGE-A3 表位的 TCR-T 细胞治疗 1 例滑膜肉瘤、1 例食管癌、7 例黑色素瘤共 9 例患者。每例患者回输大于 10×10^9 个 TCR-T 细胞治疗后,有 2 例患者出现了严重的中枢神经系统损害而引起癫痫、昏迷至死亡。这可能是 TCR-T 细胞交叉识别了正常大脑细胞中表达的 MAGE-A 家族成员 MAGE-A12 抗原表位,导致神经元细胞被破坏的严重的脱靶毒性。同年, LINETTE 等^[23]学者也报道了 TCR-T 的脱靶毒性。作者使用 HLA-A*01 限制性的靶向 MAGE-A3 表位的 TCR-T 治疗骨髓瘤和黑色素瘤 2 例患者,分别输入 5.09×10^9 和 10×10^9 个 MAGE-A3-TCR-T 细胞,结果患者出现严重的心肌损伤后均发生死亡,考虑可能是由于 TCR-T 细胞识别心脏横纹肌细胞中表达的肉瘤蛋白 titin 而引起的交叉反应,提示靶向肿瘤相关抗原的 TCR-T 可能具有严重且不易预测的脱靶和器官特异性毒性。因此,构建出的 TCR-T 细胞需不断优化以减少脱靶毒性。

2.2 肿瘤抑制性微环境

肿瘤微环境对 T 细胞的抑制主要表现在以下 3 个方面:(1)T 细胞浸润抑制。肿瘤微环境中趋化 T 细胞浸润的 CXCL9、CXCL10、CXCL11 等趋化因子和 ICAM-1 黏附分子的表达下降以及肿瘤组织血管异常,影响 T 细胞迁移、黏附、外渗从而阻碍了 T 细胞向肿瘤浸润^[24]。(2)低氧抑制。低氧不仅上调 Tregs 细胞 Foxp3 分子的表达,而且刺激了 PD-L1 在肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)、骨髓来源的抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)中的表达,PD-L1/PD-1 的相互作用导致了 T 细胞凋亡^[25]。低氧的微环境使得钾离子和酸性水平增高导致 T 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 减少,从而降低 T 细胞活性^[26]。(3)抑制性分子表达增多。一方面, TME 中的免疫抑制细胞,如未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, iDCs)、Tregs、MDSCs、TAMs 等^[27]通过分泌 IL-10、TGF β 等免疫抑制因子,降低抗原提呈细胞表面共刺激因子 CD80、CD86 的表达,抑制 CD8⁺T 淋巴细胞的对癌细胞的识别与杀伤;另一方面,活化 T 细胞表达的抑制性受体 PD-1、CTLA-4、Fas 与肿瘤细胞或者基质细胞表面配体 PD-L1、CD28、FasL 相互作用而传递免疫抑制信号,抑制 T 细胞功能或者诱导 T 细胞凋亡。

2.3 肿瘤的异质性

肿瘤异质性是指肿瘤在生长过程中,经过多次分

裂增殖,其子细胞呈现出分子生物学或基因方面的改变,从而使肿瘤的生长速度、侵袭能力、对药物的敏感性、预后等各方面产生差异。造成恶性肿瘤异质性的原因主要包括癌细胞基因突变、表观遗传学改变、基因拷贝数变异等遗传水平的变异^[28]。在肿瘤形成过程每一个分裂的细胞基因组都会发生改变,使得不同类型的肿瘤、同一类型的肿瘤、同一肿瘤的不同细胞都不相同,这种广泛的异质性是抗肿瘤治疗和长期控制疾病的主要障碍^[29]。肿瘤细胞基因改变克隆进化的异质性限制了T淋巴细胞抗肿瘤治疗的有效性。例如,在一项以新抗原为靶点的T淋巴细胞治疗黑色素瘤患者的试验中,发现T细胞识别的新抗原可通过等位基因丢失或者表达减少的方法而选择性地从肿瘤细胞中丢失^[30]。在另一项研究中发现,肿瘤增殖过程中 $\beta 2$ 微球蛋白基因发生点突变、缺失或杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)^[31],导致肿瘤细胞抗原提呈失活。在异质性复杂的细胞群中,一些肿瘤细胞选择性地使HLA基因发生突变或者丢失导致免疫逃逸。TRAN等^[32]学者,将针对KRAS G12D突变的T淋巴细胞用于治疗结肠直肠癌患者,在疾病进展的患者中发现特异性T细胞识别肿瘤所必须的HLA基因出现缺失。据报道^[33],肿瘤细胞基因突变产生新抗原,在肿瘤的扩增和转移过程中克隆性新抗原随着携带含有突变区域染色体的缺失而丢失,而亚克隆性新抗原则由于其他优势亚克隆细胞的生长而丢失。由此可知,实体肿瘤异质性也可能限制TCR-T细胞特别是以新抗原为靶点的TCR-T细胞的功能。

3 优化实体肿瘤TCR-T治疗安全性的策略

3.1 靶向抗原的选择

抗原的存在是肿瘤患者T细胞活化和募集的主要原因。良好的靶抗原应具有肿瘤形成相关性、肿瘤组织特异性、免疫原性等特性。关于TCR-T细胞治疗的靶向抗原的选择主要有3种:(1)TAA。目前TCR-T的临床研究多数以TAA为靶点,这种TCR-T细胞可识别大部分肿瘤细胞能够带来疾病的缓解,但同时识别自身正常细胞,引起靶向毒性。因此,在以TAA为靶点的TCR-T细胞治疗患者时,应该评估患者的治疗效益和损伤,确保T细胞的输入数量在安全剂量范围内。(2)病毒抗原。病毒抗原属于外来抗原,高度特异,能引起机体产生免疫应答,抗肿瘤效果好,是TCR-T治疗的良好靶向抗原^[34]。因此,以病毒抗原为靶点的TCR-T细胞可治疗病毒感染引起的肿瘤。(3)新抗原。肿瘤细胞表面的新抗原能被TCR识别,产生免疫应答^[35]。新抗原只存在于突变的肿瘤组织中,

安全性高、免疫原性强、中枢免疫耐受低,新抗原可作为TCR-T细胞治疗优先选择的靶向抗原。但是,研究结果表明只有1%~2%的肿瘤突变新抗原能与MHC分子结合从而被T细胞识别^[36],表明新抗原特异性T细胞对于突变负荷低的肿瘤组织识别有限。因此,以共同新抗原、覆盖大部分肿瘤亚克隆性新抗原、驱动突变新抗原为靶点构建TCR-T细胞,有望于提升新抗原TCR-T的治疗效果,使更多患者获益。

3.2 降低脱靶毒性

降低脱靶效应的方法有3种:(1)选择最优靶向抗原。良好的靶向抗原特异性好,有利于减少实体肿瘤TCR-T治疗的毒性,同时提升治疗效率。(2)适当提升TCR和pMHC亲和力。SCHMID等^[37]将针对HLA-A(*0201/NY-ESO-1(157-165)的一系列TCRs进行亲和力评估,将具有不同亲和力的TCRs转导T细胞。结果显示,当TCR与pMHC的亲和力低于阈值($K_D < 5 \mu\text{mol/L}$)时,TCR-T细胞生物学反应(如T细胞表面分子聚集、细胞内信号转导、增殖和靶细胞裂解)之间具有很强的正向相关性,因此合理设计不超过亲和力阈值的TCR用于TCR-T的治疗,在提升T细胞功能同时避免了交叉反应。(3)敲除内源性TCR基因。TCR-T细胞表达的外源TCR和内源TCR可能发生错配,导致TCR-T细胞可能具有不可预测的脱靶毒性和杀伤效率不足等特点。因此,将内源性TCRs敲除可能可以减少TCR-T治疗出现的脱靶毒性^[38]。

3.3 TCR-T载体的选择

尽管目前大部分构建CAR-T、TCR-T都以慢病毒作为载体,尚未见明确的风险,但由于慢病毒基因可随机整合至T细胞染色体,可能发生插入突变、脱落、获得免疫原性等,从而导致T细胞基因表达缺陷、癌基因被激活的可能性,存在潜在的生物安全风险^[39]。由此,用更安全有效的载体替代慢病毒装载TCR基因也是努力的方向。睡美人(sleeping beauty, SB)转座系统可以通过分子剪切和粘帖机制对哺乳动物细胞进行遗传修饰,SB转座子能够识别反向末端重复序列(inverted terminal repeat, ITRs),将目的基因整合到宿主基因组中^[40]。目前SB修饰的CAR-T细胞治疗B细胞恶性淋巴瘤的临床试验已见报道^[40]。BARRETT等^[41]利用SB转座子系统构建的新抗原TCR-T能对同源突变的肿瘤细胞系产生功能反应。由于SB转座子系统成本低,生产速度快,属于非病毒载体而降低了生物安全风险,因此SB修饰的特异性TCR是个体化新抗原T细胞治疗的良好载体。除此之外,多重人工核酸酶基因编辑技术如CRISPR/Cas9^[42]以及用于CAR-T治疗的RNA编辑技术可能可以作为非病毒载体^[43],用于TCR-T细胞的构建。

4 提高实体肿瘤 TCR-T 治疗疗效的策略

4.1 改善肿瘤微环境免疫抑制

免疫抑制的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)阻碍了T细胞的功能。为了提高T细胞活性,可以从3个方向努力:(1)使用免疫检查点抑制剂。CLTA-4和PD-1抑制剂是增强T细胞功能的有效途径^[44]。例如,在一项以NY-ESO-1为靶向抗原的TCR-T治疗小鼠肺癌的研究中,TCR-T细胞与抗PD-1抗体联合使用,可增强其疗效^[45]。(2)阻止Fas/FasL引起的T细胞凋亡。根据YAMAMOTO等^[46]学者报道,T细胞中导入与Fas有关的显性负性受体(dominant negative receptors, DNRs)基因,可以防止小鼠和人的T细胞发生FasL诱导的凋亡作用,增强T细胞的抗肿瘤免疫的持久性,该方法可能为增强过继转移性T细胞的持久性和生存能力提供了一种新的通用策略。(3)增强T细胞浸润。一方面,基于趋化因子及其受体对于T细胞在肿瘤组织中浸润的重要性,将趋化因子受体基因导入T细胞中可以改善T细胞的浸润。如在黑色素瘤和结肠腺癌小鼠模型中,将表达CXCR2(CXCL1的同源受体)的基因载体转导T细胞,能够增强T细胞向肿瘤的迁移,从而提高了小鼠的存活率^[47]。趋化因子CXCL9、CXCL10和CXCL11在吸引表达CXCR3受体的肿瘤特异性淋巴细胞浸润实体肿瘤起了重要作用^[48],因此将CXCR3的病毒载体导入T细胞也能增强T细胞浸润肿瘤组织。另一方面,增加肿瘤血管黏附分子的表达使血管正常化,也有利于T细胞浸润。如内皮素B受体抑制剂BQ-788能增强血管内皮细胞ICAM-1的表达,有利于肿瘤周围T细胞外渗,提升对荷瘤小鼠的使血管正常治疗疗效^[49]。在一项ACT联合hgp₂₅₋₃₃疫苗治疗的小鼠实验中,用抗VEGF抗体化,不仅能增加肿瘤特异性T细胞募集,而且减少FasL表达,提高了治疗效果^[50]。此外,为减少微环境中pH值失调对T细胞的功能抑制,使用抗酸药奥美拉唑可以降低肿瘤细胞以及TAMs的侵袭力和生存力,增强了T细胞抗肿瘤免疫功能^[51]。

4.2 选择合适的细胞群

T细胞分许多亚群,包括CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、Tregs,以及按分化程度由低到高的初始T细胞(naive T cell, T_N)、干细胞样记忆T细胞(T stem cell memory, T_{SCM})、中央记忆T细胞(central memory T cell, T_{CM})、效应记忆T细胞(effector memory T cell, T_{EM})、和效应T细胞(effector T cell, T_{EFF})^[52]。由于机体内免疫细胞的异质性以及不同免疫细胞之间的协同作用,在肿瘤免疫治疗中,单独使用某一类基因工程性T细胞可能不是最佳方案,而选择合适的不同类型的T细胞亚群可提

高TCR-T疗效并维持T细胞活性。相关策略包括:(1)输入适当比例的CD4⁺T。在一项以CD19为靶向抗原的CAR-T细胞治疗32例非霍奇金B细胞淋巴瘤患者得临床试验中,研究者制备了CD8⁺/CD4⁺比例为1:1的CAR-T细胞用于治疗,其体内的T细胞扩增数量和持续时间均增加,减缓疾病进展^[53]。因此,适当比例的CD4⁺细胞亚群的存在,可能可以提升TCR-T的治疗效果。(2)输入包含记忆性的TCR-T细胞。记忆性T细胞持续时间长、往淋巴结迁移的能力强、抗原激活阈值比初始T细胞低等特点使得记忆性T细胞有较好的抗肿瘤作用^[52]。细胞因子白细胞介素-7(IL-7)、IL-15、IL-21是促进记忆T细胞形成的重要因子。研究发现,添加IL-15、IL-21可以增强靶向gp100的TCR-T细胞的抗肿瘤作用^[54],而IL-12能使T细胞的持久性和抗肿瘤效果提高10~100倍^[55]。通过细胞因子IL-7、IL-15、IL-21的刺激作用,可以将T_N诱导为T_{SCM}或者T_{CM}用于抗肿瘤过继性细胞治疗,能够提升其疗效^[56]。甚至在细胞因子IL-7、IL-21联合CD3/CD28共刺激分子基础上,加入糖原合酶-3 β 抑制剂TWS119能够更好地诱导T_N,并获得临床级别T_{SCM}^[57],为基因工程记忆性T细胞的构建提供更合适的细胞载体。因此,通过改善细胞培养条件,可诱导出更大比例的记忆性T细胞,用于构建具备记忆样特性的TCR-T细胞,从而增强并维持T细胞的抗肿瘤活性。

5 结 语

传统的免疫细胞过继治疗,主要是增加了效应细胞的数量,对于效应细胞杀伤特异性的提高十分有限。TCR-T是利用基因工程技术合成识别肿瘤抗原的TCR基因载体转染T细胞,不仅增强效应细胞的数量,而且极大提高靶向实体肿瘤的特异性和T细胞的杀伤能力,使得TCR-T能有效精准地杀伤肿瘤。同时,与肿瘤相关抗原的TCR-T相比,针对肿瘤细胞突变的新抗原TCR-T更有可能使难治性实体肿瘤患者获益。尽管TCR-T细胞治疗的研究兴起为肿瘤患者疾病的缓解带来了希望,但是TCR-T治疗实体肿瘤还存在许多挑战,希望通过不断优化TCR-T的制备工艺,针对不同肿瘤和不同患者筛选合适的靶标,开展更多的临床前研究及临床试验,为TCR-T的临床应用奠定基础。

[参 考 文 献]

- [1] MELLMAN I, COUKOS G, DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 480-489. DOI:10.1038/nature10673.
- [2] STOIBER S, CADILHA B L, BENMEBAREK M R, et al. Limitations in the design of chimeric antigen receptors for cancer therapy [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 472-497. DOI:10.3390/cells8050472.
- [3] MORGAN R A, DUDLEY M E, WUNDERLICH J R, et al. Cancer

- regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes[J]. *Science*, 2006, 314(5796): 126-129. DOI: 10.1126/science.1129003.
- [4] ROBBINS P F, MORGAN R A, FELDMAN S A, 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. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.2537.
- [5] KAGEYAMA S, IKEDA H, MIYAHARA Y, et al. Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2268-2277. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1559.
- [6] MESRI E A, FEITELSON M A, MUNGER K. Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis[J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(3): 266-282. DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.011.
- [7] DRAPER L M, KWONG M L, GROS A, et al. Targeting of HPV16+ 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.
- [8] GARBUGLIA A R, LAPA D, SIAS C, et al. The use of both therapeutic and prophylactic vaccines in the therapy of papillomavirus disease[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 188-201. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00188.
- [9] SCHOLTEN K B, TURKSMA A W, RUIZENDAAL J J, et al. Generating HPV specific T helper cells for the treatment of HPV induced malignancies using TCR gene transfer[J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 147-158. DOI: 10.1186/1479-5876-9-147.
- [10] DORAN S L, STEVANOVIĆ S, ADHIKARY S, et al. T-cell receptor gene therapy for human papillomavirus-associated epithelial cancers: a first-in-human, phase I/II study[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(30): 2759-2768. DOI: 10.1200/jco.18.02424.
- [11] TAN A T, YANG N, LEE KRISHNAMOORTHY T, et al. Use of expression profiles of HBV-DNA integrated into genomes of hepatocellular carcinoma cells to select T cells for immunotherapy[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(6): 1862-1876. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.01.251.
- [12] SHANNON-LOWE C, RICKINSON A. The global landscape of EBV-associated tumors[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 713-735. DOI: 10.3389/fonc.2019.00713.
- [13] GE Y, ZHOU Z, WANG X, et al. In vitro evaluation of the therapeutic effectiveness of EBV-LMP2 recombinant adenovirus vaccine in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109626-109633. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109626.
- [14] LU Y C, ROBBINS P F. Cancer immunotherapy targeting neoantigens[J]. *Semin Immunol*, 2016, 28(1): 22-27. DOI: 10.1016/j.smim.2015.11.002.
- [15] INDERBERG E M, WALCHLI S, MYHRE M R, et al. T cell therapy targeting a public neoantigen in microsatellite instable colon cancer reduces in vivo tumor growth[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(4): e1302631[2020-8-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5414866/>. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1302631.
- [16] REN L, LEISEGANG M, DENG B, et al. Identification of neoantigen-specific T cells and their targets: implications for immunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(4): e1568813[2020-8-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6422382/>. DOI: 10.1080/2162402x.2019.1568813.
- [17] MATSUDA T, LEISEGANG M, PARK J H, et al. Induction of neoantigen-specific cytotoxic T cells and construction of T-cell receptor-engineered T cells for ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(21): 5357-5367. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0142.
- [18] LIU S, MATSUZAKI J, WEI L, et al. Efficient identification of neoantigen-specific T-cell responses in advanced human ovarian cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 156. DOI: 10.1186/s40425-019-0629-6.
- [19] LO W, PARKHURST M, ROBBINS P F, et al. Immunologic recognition of a shared p53 mutated neoantigen in a patient with metastatic colorectal cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(4): 534-543. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0686.
- [20] JOHNSON L A, MORGAN R A, DUDLEY M E, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen[J]. *Blood*, 2009, 114(3): 535-546. DOI: 10.1182/blood-2009-03-211714.
- [21] PARKHURST M R, YANG J C, LANGAN R C, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(3): 620-626. DOI: 10.1038/mt.2010.272.
- [22] MORGAN R A, CHINNASAMY N, ABATE-DAGA D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2013, 36(2): 133-151. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182829903.
- [23] LINETTE G P, STADTMAUER E A, MAUS M V, et al. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma[J]. *Blood*, 2013, 122(6): 863-871. DOI: 10.1182/blood-2013-03-490565.
- [24] VIGNALI D, KALLIKOURDIS M. Improving homing in T cell therapy[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 36: 107-116. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.06.009.
- [25] NOMAN M Z, DESANTIS G, JANJI B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced mdsc-mediated T cell activation[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5): 781-790. DOI: 10.1084/jem.20131916.
- [26] EIL R, VODNALA S K, CLEVER D, et al. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function[J]. *Nature*, 2016, 537(7621): 539-543. DOI: 10.1038/nature19364.
- [27] SPRINGUEL L, LONEZ C, ALEXANDRE B, et al. Chimeric anti-receptor-T cells for targeting solid tumors: Current challenges and existing strategies[J]. *BioDrugs*, 2019, 33(5): 515-537. DOI: 10.1007/s40259-019-00368-z.
- [28] CASWELL D R, SWANTON C. The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome[J]. *BMC Med*, 2017, 15(1): 133-141. DOI: 10.1186/s12916-017-0900-y.
- [29] TURAJLIC S, SOTTORIVA A, GRAHAM T, et al. Resolving genetic heterogeneity in cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(7): 404-416. DOI: 10.1038/s41576-019-0114-6.
- [30] VERDEGAAL E M, DE MIRANDA N F, VISSER M, et al. Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions[J]. *Nature*, 2016, 536(7614): 91-95. DOI: 10.1038/nature18945.
- [31] ZARETSKY J M, GARCIA-DIAZ A, SHIN D S, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9): 819-829. DOI: 10.1056/NEJ-

- Moa1604958.
- [32] TRAN E, ROBBINS P F, LU Y C, et al. T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer[J]. *N. Engl. J. Med.*, 2016, 375(23): 2255-2262. DOI:10.1056/NEJMoa1609279.
- [33] ANAGNOSTOU V, SMITH K N, FORDE P M, et al. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(3):264-276. DOI: 10.1158/2159-8290.Cd-16-0828.
- [34] HINRICHS C S, RESTIFO N P. Reassessing target antigens for adoptive T-cell therapy[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(11): 999-1008. DOI:10.1038/nbt.2725.
- [35] LENG Q, TARBE M, LONG Q, et al. Pre-existing heterologous T-cell immunity and neoantigen immunogenicity[J/OL]. *Clin Transl Immunology*, 2020, 9(3): e01111 [2020-8-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7085466/>. DOI:10.1002/cti2.1111.
- [36] YAMAMOTO T N, KISHTON R J, RESTIFO N P. Developing neoantigen-targeted T cell-based treatments for solid tumors[J]. *Nat Med*, 2019, 25(10):1488-1499. DOI:10.1038/s41591-019-0596-y.
- [37] SCHMID D A, IRVING M B, POSEVITZ V, et al. Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function[J]. *J Immunol*, 2010, 184(9): 4936-4946. DOI: 10.4049/jimmunol.1000173.
- [38] KATSUHARA A, FUJIKI F, AOYAMA N, et al. Transduction of a novel hla-drb1*04:05-restricted, WT1-specific tcr gene into human CD4⁺ T cells confers killing activity against human leukemia cells[J/OL]. *Anticancer Res.*, 2015, 35(3): 1251-1261[2020-8-14]. <http://ar.iiarjournals.org/content/35/3/1251.long>.
- [39] SCHAMBACH A, ZYCHLINSKI D, EHRNSTROEM B, et al. Biosafety features of lentiviral vectors[J]. *Hum. Gene Ther.*, 2013, 24(2): 132-142. DOI:10.1089/hum.2012.229.
- [40] CHICAYBAM L, ABDO L, BONAMINO M H. Generation of CAR⁺ T lymphocytes using the sleeping beauty transposon system [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2086: 131-137. DOI: 10.1007/978-1-0716-0146-4_9.
- [41] DENIGER D C, PASETTO A, TRAN E, et al. Stable, nonviral expression of mutated tumor neoantigen-specific T-cell receptors using the sleeping beauty transposon/transposase system[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(6):1078-1089. DOI:10.1038/mt.2016.51.
- [42] OSBORN M J, WEBBER B R, KNIPPING F, et al. Evaluation of TCR gene editing achieved by talens, CRISPR/CAS9, and megatal nucleases[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 570-581. DOI: 10.1038/mt.2015.197.
- [43] BARRETT D M, LIU X, JIANG S, et al. Regimen-specific effects of rna-modified chimeric antigen receptor T cells in mice with advanced leukemia[J]. *Hum. Gene Ther.*, 2013, 24(8): 717-727. DOI: 10.1089/hum.2013.075.
- [44] ZHANG J X, WANG L Y. The emerging world of TCR-T cell trials against cancer: A systematic review[J]. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2019, 18:153303381983106. DOI:10.1177/1533033819831068.
- [45] MOON E K, RANGANATHAN R, ERUSLANOV E, et al. Blockade of programmed death 1 augments the ability of human T cells engineered to target NY-ESO-1 to control tumor growth after adoptive transfer[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(2):436-447. DOI:10.1158/1078-0432.Ccr-15-1070.
- [46] YAMAMOTO T N, LEE P H, VODNALA S K, et al. T cells genetically engineered to overcome death signaling enhance adoptive cancer immunotherapy[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(4): 1551-1565. DOI: 10.1172/JCI121491.
- [47] PENG W, YE Y, RABINOVICH B A, et al. Transduction of tumor-specific T cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(22):5458-5468. DOI:10.1158/1078-0432.Ccr-10-0712.
- [48] OLDHAM K A, PARSONAGE G, BHATT R I, et al. T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: A role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6[J]. *Eur. Urol.*, 2012, 61(2):385-394. DOI:10.1016/j.eururo.2011.10.035.
- [49] BUCKANOVICH R J, FACCIABENE A, KIM S, et al. Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy[J]. *Nat Med*, 2008, 14(1):28-36. DOI:10.1038/nm1699.
- [50] SHRIMALI R K, YU Z, THEORET M R, et al. Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(15):6171-6180. DOI:10.1158/0008-5472.Can-10-0153.
- [51] KUCHUK O, TUCCITTO A, CITTERIO D, et al. Ph regulators to target the tumor immune microenvironment in human hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(7): e1445452[2020-8-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993489/>. DOI:10.1080/2162402x.2018.1445452.
- [52] SARKAR I, PATI S, DUTTA A, et al. T-memory cells against cancer: Remembering the enemy[J]. *Cell Immunol*, 2019, 338: 27-31. DOI:10.1016/j.cellimm.2019.03.002.
- [53] TURTLE C J, HANAFI L A, BERGER C, et al. Immunotherapy of non-hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8⁺ and CD4⁺ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(355): 355ra116. DOI:10.1126/scitranslmed.aaf8621.
- [54] POUW N, TREFFERS-WESTERLAKEN E, KRAAN J, et al. Combination of IL-21 and IL-15 enhances tumour-specific cytotoxicity and cytokine production of TCR-transduced primary t cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59(6): 921-931. DOI: 10.1007/s00262-010-0818-0.
- [55] RUBINSTEIN M P, SU E W, SURIANO S, et al. Interleukin-12 enhances the function and anti-tumor activity in murine and human CD8(+) T cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(5): 539-549. DOI:10.1007/s00262-015-1655-y.
- [56] CIERI N, CAMISA B, COCCHIARELLA F, et al. Il-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors[J]. *Blood*, 2013, 121(4): 573-584. DOI:10.1182/blood-2012-05-431718.
- [57] SABATINO M, HU J, SOMMARIVA M, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8⁺ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies[J]. *Blood*, 2016, 128(4): 519-528. DOI:10.1182/blood-2015-11-683847.

[收稿日期] 2020-07-18

[修回日期] 2020-08-14

[本文编辑] 韩丹, 沈志超