

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.001

· 专家论坛 ·

## 个体化肿瘤特异 TCR 的筛选策略

张超亭, 陆哲明 (北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所 生化与分子生物学研究室 恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室, 北京 100142)



**陆哲明** 博士、研究员、博士生导师, 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所生化与分子生物学研究室主任, 中国抗癌协会病因学分会常委、中国医药质量管理协会细胞治疗质量控制与研究学会委员、中国抗癌协会肿瘤微环境专业委员会委员和北京抗癌协会食管癌专业委员会常委。主要从事肿瘤免疫治疗(包括 CAR-T 细胞疗法、TCR-T 细胞疗法和肿瘤疫苗等)的基础及临床转化研究。主持 4 项国家自然科学基金面上项目和 1 项北京市自然科学基金重点项目。以第一或通信作者身份在 *Mol Cancer*、*Cancer Res*、*J Hematol Oncol*、*J Immunother Cancer*、*Clin Cancer Res*、*J Pathol* 和 *Mol Ther* 等国际权威学术期刊发表 SCI 论文 40 余篇, 参编《*Current Topics in Gastritis*》和《*Epstein-Barr Virus*》。被评为北京大学优秀青年学者和北京市“十百千”卫生人才培养计划(百层次)。获得国家发明专利 2 项。



**张超亭** 博士, 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所生化与分子生物学研究室副研究员, 北京肿瘤防治研究会肿瘤微环境专业委员会常委、北京抗癌协会食管癌专业委员会青年委员。主持 1 项国家自然科学基金青年项目、1 项北京市自然科学基金面上项目和 2 项省部级科研课题。主要从事肿瘤个体化免疫治疗(包括 CAR-T 细胞疗法、TCR-T 细胞疗法和 TIL 疗法)研究。以第一或通信作者身份在 *Mol Cancer*、*J Immunother Cancer*、*Clin Cancer Res* 和 *J Pathol* 等国际权威期刊发表 SCI 论文 10 余篇, 累积影响因子超过 100 分。以主要发明人身份获得 2 项国家发明专利授权, 荣获 2021 年第六届全国临床创新与发明大赛一等奖、北京医学会 2020 年首都青年医学创新与转化大赛二等奖。

**[摘要]** 基因修饰 T 细胞疗法在肿瘤治疗领域取得突破性进展, 主要包括嵌合抗原受体基因修饰 T(chimeric antigen receptor engineered T, CAR-T) 细胞和 T 细胞受体基因修饰 T(T-cell receptor modified T, TCR-T) 细胞。虽然 CAR-T 细胞疗法在血液系统肿瘤治疗领域呈现良好的临床治疗效果, 但 CAR-T 细胞仅能识别肿瘤细胞膜抗原(占细胞全部抗原的比例约 10%), 而 TCR-T 细胞可以识别人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) 提呈的细胞内抗原, 因此 TCR-T 细胞可以识别更多种类的肿瘤抗原, 进而实现对 CAR-T 细胞的合理补充。由于 TCR-T 细胞需要同时识别细胞内抗原和对应的 HLA, 而不同患者的 HLA 分型和表达的肿瘤抗原都可能存在巨大差异, 因此有必要为每个/每类肿瘤患者定制个体化的 TCR-T 细胞, 其中的关键为筛选特异识别肿瘤抗原的 TCR。当前主要有筛选靶向“已知”肿瘤抗原 TCR 和筛选靶向“未知”肿瘤抗原 TCR 的两种策略, 但其各有适用性, 应针对每个患者制定适合的筛选方法, 以制备多种肿瘤特异性 TCR-T 细胞, 从而实现个体化 TCR-T 细胞的肿瘤治疗。

**[关键词]** 肿瘤; T 细胞受体; T 细胞受体基因修饰 T 细胞疗法

**[中图分类号]** R730.51; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)09-0863-06

## Screening strategies for individualized tumor-specific TCR

ZHANG Chaoting, LU Zheming (Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research [Ministry of Education/Beijing], Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China)

**[Abstract]** Genetically engineered T cell immunotherapy has made breakthroughs in the field of tumor therapy, including chimeric antigen receptor engineered-T (CAR-T) cells and T cell receptor modified-T (TCR-T) cells. Although CAR-T cell therapy presents an attractive clinical efficacy on treatment of hematological tumors, CAR-T cells can only recognize tumor cell membrane antigens

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81972880, No. 82003246)。Project supported by the Natural Science Foundation of China (No. 81972880, No. 82003246)

**[作者简介]** 张超亭(1988—)男, 博士, 副研究员, 主要从事个体化肿瘤免疫治疗研究, E-mail: chaotingzhang@bjmu.edu.cn

**[通信作者]** 陆哲明(LU Zheming, corresponding author), E-mail: Luzheming@bjmu.edu.cn

(accounting for approximately 10% of all cellular antigens); However, TCR-T cells can recognize intracellular antigens presented by human leukocyte antigens (HLAs), so TCR-T cells can recognize more types of tumor antigens, and then realize a reasonable supplement to CAR-T cells. TCR-T cells needs to recognize both intracellular antigens and corresponding HLAs, while the HLA types and tumor antigens in different patients may present huge difference, therefore, it is necessary to customize individualized TCR-T cells for each/each type of cancer patient, in which screening the TCR that specifically recognizes tumor antigens is the key point. Currently, there are two main strategies for screening TCR, targeting "known" tumor antigens and targeting "unknown" tumor antigens, and each has its own applicability. A suitable screening method should be developed for each patient to prepare a variety of tumor-specific TCR-T cells, so as to achieve individualized TCR-T cell therapy for tumor treatment.

**[Key words]** tumor; T cell receptor; T cell receptor modified-T cell (TCR-T cell)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(9): 863-868. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.001]

基因修饰T细胞(genetically engineered T cell)疗法在肿瘤治疗领域取得突破性进展,主要包括嵌合抗原受体基因修饰T(chimeric antigen receptor engineered-T, CAR-T)细胞和T细胞受体基因修饰T(T cell receptor modified-T, TCR-T)细胞<sup>[1-3]</sup>。该技术是通过获取患者或供体外周血T细胞,将其进行基因工程修饰,使T细胞表达能识别肿瘤抗原的嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR),从而激活并引导T细胞识别和杀伤肿瘤细胞<sup>[3]</sup>。CAR-T细胞疗法在血液系统肿瘤治疗领域呈现良好的临床治疗效果,最近两款CD19 CAR-T细胞产品已在中国上市,用于治疗二线或以上系统性治疗后复发或难治性大B细胞淋巴瘤成人患者。但是,由于CAR-T细胞只能识别肿瘤细胞膜抗原,而细胞膜抗原占细胞全部抗原的比例约10%<sup>[4]</sup>,因此实体瘤理想靶点的缺失是导致CAR-T细胞疗法在实体瘤治疗领域进展缓慢的重要原因<sup>[1,5]</sup>。与之相反,TCR-T细胞可以特异识别人白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)提呈的细胞内抗原,由于细胞内抗原种类显著多于细胞膜抗原,因此TCR-T细胞可以识别更多种类的肿瘤抗原,进而实现对识别细胞膜抗原CAR-T细胞的合理补充<sup>[6-8]</sup>。由于TCR-T细胞需要同时识别细胞内抗原和对应的HLA,而且不同患者的HLA分型和表达的肿瘤抗原都可能存在巨大差异,因此有必要为每个/每类肿瘤患者定制个体化的TCR-T细胞,其关键为筛选特异识别肿瘤抗原的TCR。

## 1 筛选靶向“已知”肿瘤抗原的TCR

理想的肿瘤抗原在肿瘤细胞高表达,而在正常细胞不表达,同时能引起机体产生免疫应答。目前“已知”的肿瘤抗原主要分为三类:肿瘤相关抗原、病毒抗原和突变抗原。首先,肿瘤相关抗原是指在肿瘤细胞或正常细胞上存在的抗原分子,其并非肿瘤细胞所特有,在部分正常细胞低表达,而在肿瘤细胞高表达,因此称为肿瘤相关抗原,包括CEA、MART-1、MAGA-A3和NY-ESO-1等<sup>[9-10]</sup>。其次,多种致癌病毒会

直接导致肿瘤的发生,比如人乳头状病毒(human papilloma virus, HPV)会导致宫颈癌和头颈癌的发生,EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)会导致鼻咽癌和霍奇金淋巴瘤的发生,因此病毒感染肿瘤细胞后表达的病毒抗原为潜在的TCR-T细胞治疗的靶点<sup>[11-14]</sup>。最后,肿瘤的发生发展过程中会产生许多体细胞突变抗原,而这些突变抗原仅在肿瘤细胞表达而不在正常细胞表达,因此为TCR-T细胞潜在治疗靶点<sup>[15-17]</sup>。

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-肽四(多)聚体技术是传统的检测和筛选“已知”肿瘤抗原对应的T细胞的方法。通过“已知”肿瘤抗原和对应的HLA分子合成的多聚体直接与外周血T细胞或肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)共孵育后,通过流式细胞术直接分选多聚体结合的T细胞,然后进行单细胞TCR测序获得对应的肿瘤特异TCR。此技术针对上述肿瘤抗原,均有成功的报道。POLLACK等<sup>[18]</sup>报道NY-ESO-1<sub>157-165</sub>抗原肽和HLA-A\*02:01组成的四聚体可以直接从NY-ESO-1阳性肉瘤患者外周血T细胞中筛选靶向NY-ESO-1<sub>157-165</sub>的T细胞。针对病毒抗原,应用多聚体技术筛选靶向巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)和EBV等病毒抗原表位的T细胞和TCR<sup>[19-20]</sup>。针对突变抗原,部分研究<sup>[21-22]</sup>通过对HLA-A\*02:01阳性肿瘤患者进行全外显子和转录组测序,筛选突变抗原并与HLA-A\*02:01分子组成多聚体,利用该多聚体从HLA-A\*02:01阳性健康供体的外周血T细胞中筛选出靶向肿瘤患者突变抗原的T细胞和TCR。

MHC-肽四(多)聚体技术需要预先确定肿瘤抗原表位和对应的HLA分子亚型,但是不同患者的HLA分型不同进而导致表达同一肿瘤抗原的不同患者识别的肿瘤抗原表位亦不相同。因此,上述方法一般适用于具有高频HLA亚型的患者,比如HLA-A\*02:01和HLA-A\*11:01,但是中国人群中最高频的HLA-A\*11:01亚型所占比例不足20%<sup>[23]</sup>,实践上亟须探索无需预先

明确患者的具体抗原表位和对应的HLA分型的肿瘤特异TCR的筛选方法。基于此,笔者团队和其他团队提出一种无需预先已知患者具体的肿瘤抗原表位和HLA亚型的筛选肿瘤特异TCR的方法:用“已知”肿瘤抗原在体外刺激外周血T细胞或TIL,经流式细胞术筛选表达激活标志物(CD137、IFN- $\gamma$ 、IL-2等)的T细胞或刺激后频率显著增加的T细胞,进而通过单细胞TCR测序获得对应的肿瘤特异TCR。多项研究<sup>[24-25]</sup>报道,通过将负载突变抗原肽的抗原提呈细胞与自体TIL体外共孵育,通过流式细胞术筛选表达T细胞激活标志物(OX40和CD137)的T细胞并克隆对应的TCR。上述研究首次证明CD8和CD4阳性T细胞均能单独识别和杀伤对应肿瘤细胞并展示显著的临床抗肿瘤效果。进一步,MALEKZADEH等<sup>[26]</sup>发现负载突变抗原的抗原提呈细胞不但可以激活对应的TIL,而且可以激活这些患者对应的外周血T细胞,通过激活标志物筛选并获得突变抗原特异T细胞和TCR。该研究还发现在部分患者的外周血T细胞和TIL中可以筛选出相同的肿瘤特异TCR,而在部分患者的外周血T细胞中筛选出的TCR未在TIL中筛选出。鉴于大部分肿瘤患者中肿瘤特异T细胞比例较低,尤其外周血中肿瘤特异T细胞比例更低,笔者课题组<sup>[27]</sup>前期通过将负载EB病毒LMP2A抗原肽的DC体外刺激T细胞,通过14 d的体外刺激,LMP2A特异T细胞的比例显著增加,进而分离出LMP2A特异T细胞和对应TCR。上述研究显示,“已知”肿瘤抗原体外刺激外周血T细胞或TIL,可以通过流式细胞术筛选表达激活标志物(CD137、IFN- $\gamma$ 、IL-2等)的T细胞或刺激后频率显著增加的T细胞,进而通过单细胞TCR测序获得对应的肿瘤特异TCR,该方法无需预先已知患者具体的肿瘤抗原表位和HLA亚型,即可在患者外周血T细胞或TIL中筛选肿瘤特异TCR。与外周血T细胞相比,虽然TIL中肿瘤特异T细胞比例较高,但是部分肿瘤特异TIL会发生免疫功能耗竭,无法表达激活标志物,从而难以通过该方法筛选出肿瘤特异T细胞和TCR。尽管外周血T细胞中肿瘤特异T细胞比例较低,但是其总的T细胞种类显著多于TIL而且绝大部分外周血T细胞的免疫功能正常,因此肿瘤抗原多次体外刺激外周血T细胞后,可以实现肿瘤特异T细胞的显著富集,进而可能筛选出TIL未能筛选出的肿瘤特异T细胞和TCR。可见,外周血T细胞与TIL在肿瘤特异TCR筛选方面可以形成优势互补。

随着单细胞TCR测序技术的成熟,上述筛选方法可以通过流式细胞术分选肿瘤特异T细胞后,通过单细胞测序即可获得对应TCR。但是部分患者肿瘤特异T细胞比例低于流式细胞术检测灵敏度,同时部分

肿瘤特异T细胞虽然被激活但其激活蛋白表达量较低,无法被对应流式抗体识别,均可能导致肿瘤特异T细胞和TCR筛选失败。为提高筛选肿瘤特异TCR的灵敏度,在上述肿瘤抗原与外周血T细胞或TIL共孵育后,无需流式细胞术分选激活的T细胞,而是将其直接进行高通量转录组和TCR组单细胞测序,通过转录组确定表达激活标志物的T细胞,联合TCR组测序分析,进而获得对应T细胞的TCR,即为肿瘤特异TCR。该方法利用高通量单细胞转录组的测序结果显著提高激活标志物的检测灵敏度,预期筛选出更多种类的肿瘤特异T细胞和TCR。LU等<sup>[28]</sup>首先报道通过四周时间完成TIL的体外培养和扩增,将其与负载突变抗原的抗原提呈细胞体外共孵育,然后直接进行单细胞转录组和TCR组测序,转录组测序结果识别高表达IFN- $\gamma$ 或IL-2等激活标志物的T细胞,进而通过单细胞TCR测序结果获得对应T细胞的TCR,由此成功筛选肿瘤特异TCR。但上述方法TIL体外扩增培养不仅增加筛选肿瘤特异TCR的时间,而且多克隆TIL经过4周的体外扩增可能会导致部分肿瘤特异T细胞丢失,该团队进一步改良上述方法。他们将患者肿瘤组织裂解后直接分离其中的TIL,然后与负载突变抗原肽的提呈细胞共孵育,并进行单细胞转录组和TCR组测序筛选突变抗原特异T细胞和TCR,该筛选方法预期会筛选出更多种类肿瘤特异TCR<sup>[29]</sup>。利用高通量单细胞转录组测序结果能够识别转录水平较低的激活基因,比流式抗体检测激活标志物的方法具有更高的灵敏度。此外,由于不同T细胞激活标志物的表达水平存在一定异质性<sup>[30]</sup>,基于单个T细胞激活标志物表达进行筛选,可能导致准确性的下降,因此针对单细胞转录组测序结果可以开展多个激活标志物的联合分析,预期会取得更准确的筛选结果。

## 2 筛选靶向“未知”肿瘤抗原的TCR

虽然通过靶向“已知”肿瘤抗原进行肿瘤特异TCR筛选已取得一定进展,但是该方法存在一些不足。首先,肿瘤相关抗原由于在部分正常组织表达,那些识别靶向肿瘤相关抗原的高亲和力T细胞可能早期被机体清除,而仅能筛选出亲和力较弱的T细胞及对应的TCR;其次,由于病毒阳性肿瘤在全部肿瘤中所占比例较低,通过病毒抗原筛选对应肿瘤特异TCR的方法适用范围有限;最后,虽然大部分肿瘤均表达大量突变抗原,但仅约1%突变抗原可以诱发T细胞免疫反应,因此通过突变抗原筛选肿瘤特异TCR的方法不仅筛选出的肿瘤特异TCR数目少而且成功率低。基于上述通过“已知”肿瘤抗原筛选肿瘤特异

TCR的不足,学者们考虑是否可以无需为每位患者预先确定肿瘤抗原,而是直接从患者外周血或TIL获取肿瘤特异T细胞及对应TCR。

笔者和其他团队提出筛选靶向“未知”肿瘤抗原的TCR的方法:通过患者的肿瘤标本培养相应的原代肿瘤细胞或类器官,与外周血T细胞或TIL共孵育后,通过流式细胞术筛选表达激活标志物(CD137、IFN- $\gamma$ 、IL-2等)的T细胞,对其进行单细胞TCR测序获得对应的肿瘤特异TCR。笔者课题组<sup>[31]</sup>前期研究中,将食管癌患者的原代肿瘤细胞与对应的TIL体外共孵育,通过CD137的表达筛选激活的肿瘤特异T细胞,并完成对应TCR的体外克隆和鉴定。DIJKSTRA等<sup>[32]</sup>报道50%结直肠癌患者和30%非小细胞肺癌患者的类器官与对应外周血T细胞进行为期2周的体外刺激,可以实现肿瘤特异T细胞的富集,并通过CD107a或IFN- $\gamma$ 表达在富集后的T细胞中筛选肿瘤特异T细胞。上述研究显示,在肿瘤患者原代肿瘤细胞或类器官中的具体肿瘤抗原未知的情况下,通过体外刺激TIL和外周血T细胞依然可以获得对应的肿瘤特异T细胞和TCR。此外,肿瘤穿刺标本即可满足类器官的培养要求,而且结直肠癌和肺癌类器官构建的成功率高达70%。因此针对靶向“未知”肿瘤抗原可以实现高效获得肿瘤特异T细胞和TCR。

与上述筛选靶向“已知”肿瘤抗原的TCR的方法类似,可以通过流式细胞术分选肿瘤特异T细胞,进而通过单细胞测序获得对应TCR,但是部分患者肿瘤特异T细胞比例低于流式细胞术检测灵敏度或者激活蛋白表达量低于流式抗体识别范围,可能导致这部分肿瘤特异T细胞和TCR筛选失败。为提高上述方法筛选肿瘤特异TCR的灵敏度,将原代肿瘤细胞与外周血T细胞或TIL共孵育后,无需流式细胞术分选激活的T细胞,而是将其直接进行高通量转录组和TCR组单细胞测序,通过转录组确定表达激活标志物的T细胞,进而通过TCR组获得对应T细胞的TCR(肿瘤特异TCR),该方法利用高通量单细胞转录组的测序结果可以显著提高激活标志物的检测灵敏度,进而筛选出更多种类的肿瘤特异T细胞和TCR。笔者团队纳入2例非小细胞肺癌患者,为每位患者培养原代肿瘤细胞和对应的TIL,并将其体外共孵育后直接进行单细胞转录组和TCR组测序,通过激活标志物的转录组水平筛选肿瘤特异T细胞并通过单细胞TCR测序结果识别这些肿瘤特异TCR。通过该方法为每位患者筛选出3种肿瘤特异TCR,并通过体内外功能试验证明其对应的TCR-T细胞具备特异识别和杀伤肿瘤细胞的能力(未发表数据)。

虽然类器官或原代肿瘤细胞体外刺激对应的T

细胞可以获得肿瘤特异T细胞和TCR,但仍然需要构建患者的类器官和原代肿瘤细胞,是否有方法可以实现无需任何肿瘤抗原刺激,而直接在肿瘤患者TIL或外周血T细胞中筛选肿瘤特异T细胞和TCR。OLIVEIRA等<sup>[33]</sup>将黑色素瘤患者肿瘤组织裂解成单细胞,然后对其中T细胞进行单细胞转录组和TCR组测序,发现免疫耗竭T细胞中超过80%为肿瘤特异T细胞并完成TCR克隆和TCR-T细胞功能验证,因此在黑色素瘤患者中,可以直接筛选免疫耗竭TIL和对应的TCR(肿瘤特异TCR)。同时,PASETO等<sup>[34]</sup>报道在12例黑色素瘤患者中的11例患者中均发现,CD8和PD-1共阳性T细胞中最高频的5种TCR都可以特异识别肿瘤细胞。但是SCHEPER团队<sup>[35]</sup>发现,虽然黑色素瘤患者中高频PD-1阳性TIL中肿瘤特异T细胞比例较高,但是在结直肠癌和卵巢癌患者中,高频PD-1阳性TIL中肿瘤特异T细胞的比例低于5%。DUHEN等<sup>[36]</sup>纳入4例黑色素瘤患者和2例头颈鳞状细胞癌患者,通过流式细胞术为每位患者分选CD39和CD103共阳性的TIL,发现其中肿瘤特异T细胞所占比例在黑色素瘤患者和头颈鳞状细胞癌患者中分别为70%和25%。上述研究结果显示,虽然多项报道根据多个T细胞标志物在黑色素瘤患者TIL中可以直接筛选肿瘤特异T细胞和TCR,但是在大部分上皮来源的实体瘤患者中直接筛选肿瘤特异T细胞和TCR的方法依然成功率较低。

### 3 结 语

目前虽然已有多种筛选肿瘤特异TCR的方法,但是每种筛选方法都有其适用条件。因此,为实现个体化TCR-T细胞治疗,需针对每个肿瘤患者制定适合的肿瘤特异TCR的筛选方法。由于肿瘤抗原在实体瘤存在显著的异质性表达,多种肿瘤特异TCR的筛选是解决肿瘤异质性的关键,因此针对每例患者实际情况制定多种适合的TCR筛选策略,将其成功制备个体化的肿瘤特异TCR-T细胞和其他疗法联合应用,达到攻克实体瘤的目标。

### [参 考 文 献]

- [1] ONCOLOGY T L. CAR T-cell therapy for solid tumours[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(7): 893. DOI:10.1016/S1470-2045(21)00353-3.
- [2] WESTIN J R, KERSTEN M J, SALLES G, et al. Efficacy and safety of CD19-directed CAR-T cell therapies in patients with relapsed/refractory aggressive B-cell lymphomas: Observations from the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND trials[J]. *Am J Hematol*, 2021, 96(10): 1295-1312. DOI:10.1002/ajh.26301.
- [3] ELLIS G I, SHEPPARD N C, RILEY J L. Genetic engineering of T cells for immunotherapy[J]. *Nat Rev Genet*, 2021, 22(7): 427-447.

- DOI:10.1038/s41576-021-00329-9.
- [4] GARBER K. Driving T-cell immunotherapy to solid tumors[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(3): 215-219. DOI:10.1038/nbt.4090.
- [5] KIRTANE K, ELMARIAH H, CHUNG C H, et al. Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: review of the literature and challenges ahead[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(7): e002723[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8311333/>. DOI:10.1136/jitc-2021-002723.
- [6] SUN Y M, LI F G, SONNEMANN H, et al. Evolution of CD8<sup>+</sup> T cell receptor (TCR) engineered therapies for the treatment of cancer[J/OL]. *Cells*, 2021, 10(9): 2379[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8469972/>. DOI:10.3390/cells10092379.
- [7] 卢畅畅, 杜娟. KRAS 突变与胰腺癌个体化免疫治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(7): 746-750. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.015.
- [8] TSIMBERIDOU A M, VAN MORRIS K, VO H H, et al. T-cell receptor-based therapy: an innovative therapeutic approach for solid tumors[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 102[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8243554/>. DOI: 10.1186/s13045-021-01115-0.
- [9] CABALLERO O L, CHEN Y T. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11): 2014-2021. DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01303.x.
- [10] PARK T S, GROH E M, PATEL K, et al. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 in primary and metastatic cancers[J/OL]. *J Immunother*, 2016, 39(1): 1-7[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453128/>. DOI:10.1097/CJI.000000000000101.
- [11] TASHIRO H, BRENNER M K. Immunotherapy against cancer-related viruses[J/OL]. *Cell Res*, 2017, 27(1): 59-73[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5223233/>. DOI: 10.1038/cr.2016.153.
- [12] NAGARSHETH N B, NORBERG S M, SINKOE A L, et al. TCR-engineered T cells targeting E7 for patients with metastatic HPV-associated epithelial cancers[J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 419-425. DOI:10.1038/s41591-020-01225-1.
- [13] WISSKIRCHEN K, KAH J, MALO A, et al. T cell receptor grafting allows virological control of Hepatitis B virus infection[J/OL]. *J Clin Invest*, 2019, 129(7): 2932-2945[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6597229/>. DOI:10.1172/JCI120228.
- [14] SANTANA-DAVILA R, BHATIA S, CHOW L Q. Harnessing the immune system as a therapeutic tool in virus-associated cancers[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(1): 106-112. DOI:10.1001/jamaoncol.2016.4574.
- [15] JARDIM D L, GOODMAN A, DE MELO GAGLIATO D, et al. The challenges of tumor mutational burden as an immunotherapy biomarker[J/OL]. *Cancer Cell*, 2021, 39(2): 154-173[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7878292/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.10.001.
- [16] LEKO V, ROSENBERG S A. Identifying and targeting human tumor antigens for T cell-based immunotherapy of solid tumors[J/OL]. *Cancer Cell*, 2020, 38(4): 454-472[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7737225/>. DOI:10.1016/j.ccell.2020.07.013.
- [17] EBRAHIMI N, AKBARI M, GHANAATIAN M, et al. Development of neoantigens: from identification in cancer cells to application in cancer vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2021: 1-15. DOI:10.1080/14760584.2021.1951246.
- [18] POLLACK S M, JONES R L, FARRAR E A, et al. Tetramer guided, cell sorter assisted production of clinical grade autologous NY-ESO-1 specific CD8(+) T cells[J]. *J Immunother Cancer*, 2014, 2(1): 36. DOI:10.1186/s40425-014-0036-y.
- [19] KNABEL M, FRANZ T J, SCHIEMANN M, et al. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer[J]. *Nat Med*, 2002, 8(6): 631-637. DOI:10.1038/nm0602-631.
- [20] COBBOLD M, KHAN N, POURGHEYSARI B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers[J/OL]. *J Exp Med*, 2005, 202(3): 379-386[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2213070/>. DOI:10.1084/jem.20040613.
- [21] STRØNEN E, TOEBES M, KELDERMAN S, et al. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires[J]. *Science*, 2016, 352(6291): 1337-1341. DOI:10.1126/science.aaf2288.
- [22] ALI M, FOLDVARI Z, GIANNAKOPOULOU E, et al. Induction of neoantigen-reactive T cells from healthy donors[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(6): 1926-1943. DOI:10.1038/s41596-019-0170-6.
- [23] ZHOU F S, CAO H Z, ZUO X B, et al. Deep sequencing of the MHC region in the Chinese population contributes to studies of complex disease[J]. *Nat Genet*, 2016, 48(7): 740-746. DOI:10.1038/ng.3576.
- [24] 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.
- [25] TRAN E, TURCOTTE S, GROS A, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4<sup>+</sup> T cells in a patient with epithelial cancer[J]. *Science*, 2014, 344(6184): 641-645. DOI:10.1126/science.1251102.
- [26] MALEKZADEH P, YOSSEF R, CAFRI G, et al. Antigen experienced T cells from peripheral blood recognize p53 neoantigens[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(6): 1267-1276. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-19-1874.
- [27] ZHANG C T, TAN Q, LI S C, et al. Induction of EBV latent membrane protein-2A (LMP2A) -specific T cells and construction of individualized TCR-engineered T cells for EBV-associated malignancies[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(7): e002516[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8252876/>. DOI:10.1136/jitc-2021-002516.
- [28] LU Y C, ZHENG Z L, ROBBINS P F, et al. An efficient single-cell RNA-seq approach to identify neoantigen-specific T cell receptors[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(2): 379-389. DOI:10.1016/j.ymthe.2017.10.018.
- [29] LU Y C, ZHENG Z L, LOWERY F J, et al. Direct identification of neoantigen-specific TCRs from tumor specimens by high-throughput single-cell sequencing[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(7): e002595[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8320258/>. DOI:10.1136/jitc-2021-002595.
- [30] PARKHURST M R, ROBBINS P F, TRAN E, et al. Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers[J/OL]. *Cancer Discov*, 2019, 9(8): 1022-1035[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7138461/>. DOI:10.1158/2159-8290.CD-18-1494.
- [31] TAN Q, ZHANG C, YANG W, et al. Isolation of T cell receptor specifically reactive with autologous tumour cells from tumour-infiltrating lymphocytes and construction of T cell receptor engineered T cells for esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Immunother*

- Cancer, 2019, 7(1): 232. DOI:10.1186/s40425-019-0709-7.
- [32] DIJKSTRA K K, CATTANEO C M, WEEBER F, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids[J/OL]. Cell, 2018, 174(6): 1586-1598.e12[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6558289/>. DOI:10.1016/j.cell.2018.07.009.
- [33] OLIVEIRA G, STROMHAUG K, KLAEGER S, et al. Phenotype, specificity and avidity of antitumour CD8<sup>+</sup> T cells in melanoma[J]. Nature, 2021, 596(7870): 119-125. DOI: 10.1038/s41586-021-03704-y.
- [34] PASETTO A, GROS A, ROBBINS P F, et al. Tumor- and neoantigen-reactive T-cell receptors can be identified based on their frequency in fresh tumor[J/OL]. Cancer Immunol Res, 2016, 4(9): 734-743[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5010958/>. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-16-0001.
- [35] SCHEPER W, KELDERMAN S, FANCHI L F, et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers[J]. Nat Med, 2019, 25(1): 89-94. DOI: 10.1038/s41591-018-0266-5.
- [36] DUHEN T, DUHEN R, MONTLER R, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors[J/OL]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2724[2021-09-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6045647/>. DOI: 10.1038/s41467-018-05072-0.

[收稿日期] 2021-09-06

[修回日期] 2021-09-15

[本文编辑] 党瑞山