



董强刚, 上海交通大学肿瘤研究所研究员。1986年起任职于上海市胸科医院(现上海交通大学附属胸科医院)。曾任上海市胸部肿瘤研究所副所长、上海市肺部肿瘤临床医学中心副主任, 2001年享受国务院特殊津贴。相关研究方向为肺部肿瘤的细胞治疗临床研究。2007年起任上海交通大学肿瘤研究所肿瘤干细胞课题组PI, 从事肺癌等肿瘤干细胞的生物学特性分析及特异性抗原筛选, 2015年退休。现任北京市细胞工程实验室学术委员会副主任, 主持巨细胞病毒(CMV)等的病毒特异性T细胞(VST)研究, 协助北京大学人民医院等开展难治性CMV感染的VST治疗临床研究。曾主持“863”计划肺癌单克隆抗体项目、国家自然科学基金项目及上海市医学发展基金重大项目等课题研究。曾获中国科学院自然科学奖二等奖1项、上海市医学成果奖二等奖1项、上海市科技成果奖三等奖1项和上海市临床医疗技术进步奖三等奖1项。代表性论文发表在*Res Immunol*、*Arch Immunol*、*Arterioscler Thromb Vasc Biol*、*Lung Cancer*、*Oncogene*和*Clin Cancer Res*等杂志上。

抗原特异性T细胞过继免疫治疗的临床研究: 现状与前景展望

董强刚*

(上海交通大学肿瘤研究所, 上海 200030)

摘要 抗原特异性的T细胞治疗用于临床控制病毒感染和恶性肿瘤已有30余年历史, 近年来随着技术进步尤其是遗传工程手段的整合, 这个治疗选项的疗效得到了明显提升。然而, 尽管现有的临床结果令人鼓舞, 但T细胞治疗仍在许多方面需要不断完善, 其中优化T细胞制备增强其重建免疫保护的能力和选择最佳靶标抗原避免不良反应等都是受到免疫学界高度关注的关键。而从临床角度出发, 创建合适的“治疗窗口”和应用“货架型”细胞药物及时满足治疗需求, 则是保障T细胞输注后更好地发挥治疗功能的研究热点。

关键词 T淋巴细胞; 过继免疫治疗; 病毒感染; 恶性肿瘤

Adoptive Immunotherapy with Antigen-Specific T Cells in Clinic: Current Advances and Future Directions

Dong Qianggang*

(Shanghai Jiao Tong University Cancer Institute, Shanghai 200030, China)

Abstract The antigen-specific T cell therapy has been used in clinical treatment of viral infection and malignant tumors during the past three decades. With the technical advances, especially the incorporation of genetic engineering approaches, the therapeutic efficiency of this option increased dramatically. Though the clinical results

*通讯作者。E-mail: qgdong@shsci.org

*Corresponding author. E-mail: qgdong@shsci.org

网络出版时间: 2019-01-17 16:39:25

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190117.1639.008.html>

available are promising, however, the T cell therapy is still to be improved in many aspects. Among these, the optimization of T cell processing protocol to augment their capacity of reconstituting protective immunity and the selection of the best target antigens to avoid toxic reaction receives much attention within the immunologists. In clinical practice, on the other hand, the establishment of suitable “therapeutic windows” and the in-time treatment with “off-the-shelf” cell drugs can be the key points in order to enhance the efficiency.

Keywords T lymphocytes; adoptive immunotherapy; virus infection; malignant tumors

T细胞过继免疫治疗(adoptive T cell immunotherapy), 简称T细胞治疗(T cell therapy), 是指通过输注T淋巴细胞获得临床疗效的一个治疗选项(therapeutic option)。根据不同的抗原识别机制, T细胞治疗可以分为HLA限制性和非限制性两大类, 前者通过T细胞受体(T cell receptor, TCR)识别靶标细胞表面嵌入HLA分子中的肽段抗原表位(epitope), 具有该受体的淋巴细胞包括CD4 T细胞及CD8 T细胞; 后者如T细胞及多克隆激活的CIK细胞等, 其特征是不通过上述TCR识别相关抗原。

CD8 T细胞是适应性免疫(adaptive immunity)的一种关键效应细胞, 主要功能是清除机体中被胞内病原体(如病毒)侵袭损害的体细胞, 但恶性转化的体细胞(即癌细胞)也能够表达可以被该群T细胞识别的抗原表位, 因而其特异性免疫应答在控制肿瘤发生发展过程中具有重要作用。为了便于表述, 本文将CD8 T细胞简称为T细胞。通常这种T细胞治疗涉及三个环节: (1)从体液(如血液)或组织(如肿瘤病灶)中获取T细胞; (2)富集抗原特异性T细胞并规模化培养扩增; (3)输注给患者构建免疫保护机制。根据抗原特异性T细胞的不同富集方式, T细胞治疗已经发展形成了二个分支, 即“天然(natural)”T细胞治疗和“工程(engineered)”T细胞治疗^[1-4]。前者是指从体内直接获取具有抗原特异性TCR的T细胞[又称内源性T细胞(endogenous T cells)], 可用于控制病毒感染及恶性肿瘤; 后者是采用基因工程技术使得T细胞表达抗原特异性的识别受体, 主要研究焦点是控制恶性肿瘤。随着基因工程技术与细胞免疫技术的交叉融合, “工程”T细胞被赋予了诸多独特的生物学特性, 已成为引领本学科发展的主流。

本文简要总结了近30余年来抗原特异性T细胞治疗的主要临床研究成果, 从中分析了这种治疗选项面临的一些挑战并探讨了该领域中值得关注的若干新理念, 与同道们共享。

1 抗原特异性的“天然”T细胞治疗

在机体中抗原特异性的T细胞具有二个重要特征, 一是表达表位特异性的TCR; 二是经嵌入相应肽段(peptide)表位的MHC(HLA)复合物(MHC:peptide complex, pMHC)刺激TCR后能够分泌细胞因子(如IFN等)并表达多种激活标志(如CD137等)。根据这些标志即能够富集到所需的抗原特异性T细胞。

快速扩增方案(rapid expansion protocol, REP)是目前T细胞规模化培养中最常用的技术之一^[5], 该方案需要适量TCR信号(如30 ng/mL功能性CD3抗体)和高浓度IL2(如6 000 IU/mL), 同时提供100倍以上过量的外周血单个核细胞(PBMC)作为饲养细胞(feeder)。在上述条件下培养2周, 通常可以使T细胞数量增加数千倍, 当扩增的细胞数量达到 10^7 或以上时, 即可实施过继治疗。

迄今为止, “天然”T细胞治疗在控制病毒感染和治疗多种类型肿瘤中均显示了确切疗效。

1.1 病毒抗原特异性的T细胞治疗

病毒感染体细胞后, 其基因组(genome)编码的病毒蛋白在宿主细胞内异常表达。这些病毒蛋白经胞质中的蛋白酶体(proteasome)降解形成系列小分子肽段, 其中的抗原表位由TAP(the transporter associated with antigen processing)蛋白转运至内质网(endoplasmic reticulum, ER)中并嵌入MHC-I类分子(即HLA-A、-B、-C), 所形成的pMHC通过高尔基(golgi)体输送到感染细胞表面(图1), 后者即能够被特异性T细胞的相应TCR识别^[6]。

1.1.1 CMV感染的T细胞治疗 目前病毒抗原特异性的T细胞治疗在控制造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)后的巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染方面具有显著疗效。流行病学资料揭示, 健康人群中50%~90%个体曾在幼年期遭遇过CMV的隐匿性感染, 表现为血清学(病毒抗原的特异性抗体)阳性, 但该病毒在宿主细胞中可以长期蛰伏而不复制。在白血病患者中, HSCT前

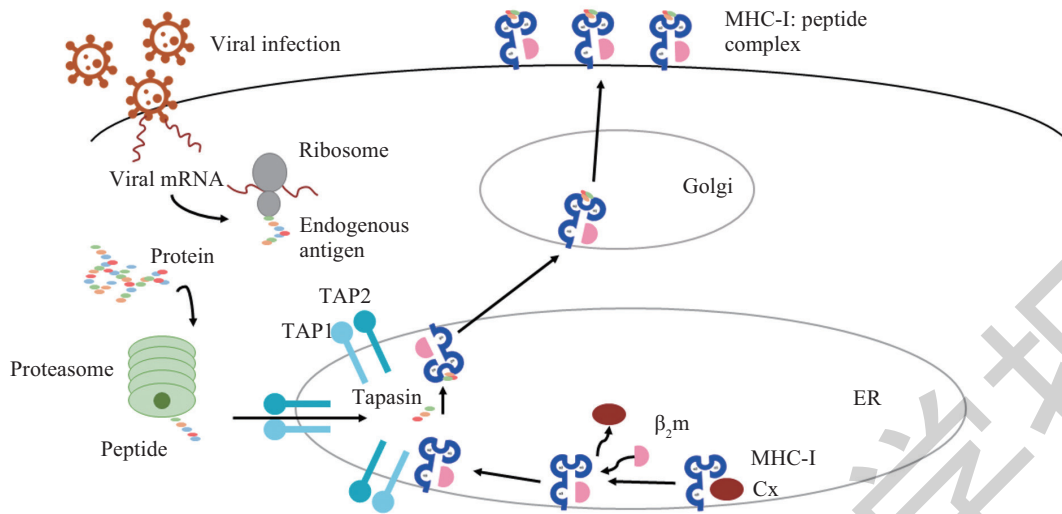


图1 病毒感染时的特异性抗原表达

Fig.1 The expression of specific antigens during viral infection

的骨髓(myeloablative)化疗导致特异性免疫保护机制严重毁损, HSCT术后潜伏在HSCT供者(donor)和/或受者(recipient)体细胞中的CMV便被唤醒(reactivation)导致病毒复制、播散或形成CMV病^[7-9]。在缺乏有效的T细胞免疫保护机制的情况下, 临床抗病毒药物治疗的疗效欠佳。对那些难治性(refractory)的病毒感染患者, 输注CMV特异性T细胞(CMV-specific T cells, CMVST)能够快速重建免疫保护机制, 70%~90%患者的病毒载量可以降低 ≥ 2 个量级甚至完全转阴。此外, 当HSCT供、受者之一为血清学阳性时, 在HSCT的同时输注CMVST具有免疫保护作用, 可以有效降低术后病毒感染的风险。这种免疫预防(prophylaxis)策略目前在欧美国家已进入临床应用阶段^[10-12]。

个别实体肿瘤如多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)也伴随CMV感染^[13]。GBM是一种高度恶性的脑肿瘤, 现有的治疗选项包括手术、放疗和化疗等, 但治疗后复发率高。GBM复发的患者预后极差, 中位生存时间(median survival time, MST)为3~6个月, 患者生存很少超过1年^[14]。对CMV血清学阳性的GBM复发患者, T细胞治疗是一个潜在选项, 如近期的一项小样本(11例患者入组)临床试验显示, CMVST治疗后的中位PFS(无进展生存时间)为246天, 中位OS达到403天, 1年生存率超过60%^[15], 研究结果令人瞩目。

1.1.2 EBV感染的T细胞治疗 EB病毒(Epstein Barr virus, EBV)具有与CMV类似的流行病学特征,

但EBV属于致癌病毒, 当感染淋巴细胞(T、B和NK细胞)后可以引起细胞恶性转化, 如HSCT后EBV感染的B细胞异常增生可以导致PTLD(posttransplant lympho-proliferative disorder), 而PTLD是继发淋巴瘤的一个高风险因子^[16-18], 因此, 在HSCT术后输注EBV特异性T细胞(EBV specific T cells, EBVST)能够治疗PTLD, 其中一项大样本(101例患者入组)临床研究结果揭示, 预防性输注EBVST后15年内没有出现PTLD病例^[19-20]。此外, 当EBV诱发淋巴瘤后, EBVST治疗也显示良好疗效^[21], 其中疗效最为显著的是ENKTCL(extranodal NK/T-cell lymphoma)。ENKTCL属于结外淋巴瘤, 在鼻咽部多发。ENKTCL表达EBV相关抗原(如EBER-1等), 对放疗和化疗敏感, 但治疗后容易出现耐药复发。对复发/难治性(relapsed/refractory)ENKTCL选择含天冬酰胺酶(L-asparaginase)的联合化疗方案, 5年生存率约为50%^[22]。一项小样本探索性临床研究(11例患者入组)结果显示, 对复发/难治性ENKTCL采用EBVST治疗, 随访4年发现, PFS和OS分别达到90%和100%, 说明临床疗效非常明显^[23]。

EBV也能够感染上皮细胞并且病毒基因组可以在一些实体肿瘤(如鼻咽癌和胃癌)中被检测到。在近10年来报道的3项鼻咽癌临床研究中, EBVST治疗均显示了确切疗效^[24-26], 其中作为一线治疗, 化疗联合EBVST治疗的有效率达到71.4%, 2年及3年OS分别为62.9%和37.1%^[25]。

1.1.3 HPV感染的T细胞治疗 人乳头状瘤病毒

(human papillomavirus, HPV)作为一种最常见的性传播病原体之一,其持续感染是引起女性生殖道肿瘤尤其是宫颈癌的高风险因子^[27]。在我国宫颈癌中,HPV感染以HPV16、18、33、52和58等病毒亚型占优势,其中HPV16感染率约为50%^[28]。HPV属于环状双链DNA病毒,其基因组(约8 Kb)编码6个早期蛋白(E1、E2、E4、E5、E6和E7)和2个晚期蛋白(L1和L2)。HPV首先感染宫颈黏膜复层上皮中的基底细胞(basal cells),当病毒DNA整合到细胞基因组时,只有E6和E7基因持续表达,这2个病毒蛋白分别与p53和RB等结合发挥促癌作用。随着基底细胞分化,L1和L2基因开始表达并引起病毒装配和释放^[29]。

近年来,多价HPV疫苗已用于宫颈癌的免疫预防,这种HPV疫苗主要是由L1衣壳蛋白(capsid protein)组成的病毒样颗粒(virus-like particles),其功能是诱导特异性的体液免疫应答阻断病毒扩散,但缺点是对基底细胞中的E6/E7抗原缺乏免疫效应,因而对宫颈癌的治疗没有疗效^[30]。要获得临床疗效必须刺激高效的E6/E7抗原特异性T细胞免疫应答,一项探索性临床研究采用HPV16-E6特异性T细胞治疗复发/难治性宫颈癌,发现输注此类T细胞后9例患者中2例完全缓解(complete remission, CR)、1例部分缓解(partial remission, PR),显示了较好疗效^[31]。

1.2 肿瘤抗原特异性的T细胞治疗

恶性肿瘤中除了上述病毒抗原外,还存在二类特异性抗原,即癌-睾丸抗原(cancer-testes antigens, CT抗原)和突变抗原(mutant antigens, 又称neo-antigens, Neo抗原)。CT抗原是一个由110余个基因编码的蛋白家族,其中约30个编码基因位于X染色体尤其是在q24-28区和p11.2-11.4区。这些抗原在正常组织中选择性表达于睾丸生殖细胞,由于生殖细胞缺乏HLA因而CT抗原不能被T细胞识别。但在恶性肿瘤中,CT抗原和HLA分子同时表达则可以被T细胞有效识别^[32]。Neo抗原是在癌变过程中蛋白编码区基因发生突变后形成的一类变异蛋白,这种基因突变在正常体细胞中均不存在,因而Neo抗原被认为是一种高度特异性的肿瘤抗原^[33]。

在肿瘤微环境中,CT/Neo抗原可以激活TIL(tumor-infiltrated lymphocytes),如最近的研究证明,在黑色素瘤(melanoma)的TIL细胞群中分别存在CT抗原(如MART-1和gp100等)和Neo抗原(如TTC37_{A692V}和ENTPD4_{P85L}等)特异性的CD8 T细胞亚

群^[34],这些肿瘤反应性(tumor-reactive)T细胞也表达若干T细胞的激活相关标志如CD137和PD-1等^[35-36]。培养扩增TIL后实施过继免疫治疗是目前应用广泛的一个治疗选项^[37-38],在黑色素瘤的大样本(93例患者入组)临床研究中,TIL细胞治疗被证明可以使超过50%的转移性患者获得客观疗效(包括PR或CR),5年OS为29%,其中CR患者的5年OS达到93%^[39]。而在结直肠癌(colorectal cancer)的个案研究中,Neo抗原(如KRAS_{G12D})特异性TIL细胞治疗可使肺部转移病灶明显消退^[40]。

除了癌变组织外,上述反应性T细胞还能够在肿瘤引流淋巴结(tumor-draining lymph nodes, TDLN)中检测到,富集这些T细胞也可以进行过继免疫治疗。如在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中,从手术摘除的TDLN中培养扩增T细胞并用于术后过继治疗,能够显著延缓肿瘤复发并改善患者预后^[41]。这项随机对照III期临床研究揭示,术后化疗组(50例)的5年PFS和OS分别为26.2%和48.3%;化疗联合T细胞治疗组(51例)的5年PFS和OS分别提升至41.4%和81.4%,二组间差异极其显著(P 值分别为0.001 3和0.002 7)。

总体而言,上述抗原作为肿瘤治疗靶标尚存在若干需要克服的障碍。如CT抗原是在个体发育过程中曾经表达的抗原,T细胞经过胸腺选择后体内很少保留具有高亲和性TCR的细胞克隆,此类T细胞富集扩增后通常疗效不够理想。Neo抗原是在癌变过程中形成的一种新颖肿瘤抗原,可以激发高效的T细胞免疫应答,但此类抗原具有明显的个体差异性,即使是患相同组织类型的肿瘤,不同个体的Neo抗原也有明显不同。因而靶向此类抗原的T细胞治疗需强调精准医疗的理念。

2 抗原特异性的“工程”T细胞治疗

临床上制约“天然”T细胞制备的主要因素有二个,一是靶标抗原特异性T细胞的含量甚微(如在外周血中,单一表位特异性T细胞仅占CD8 T细胞总数的1/10⁵),富集此类T细胞的技术难度很大;二是特异性T细胞亚群对相应抗原的亲合力(avidity)存在明显差异,其中低亲合力的T细胞亚群不足以激发高效免疫保护功能。“工程”T细胞技术的发展在很大程度上克服了上述障碍。首先,借助基因改造技术可以研制出高亲和性(affinity)的抗原识别受体,由此获得

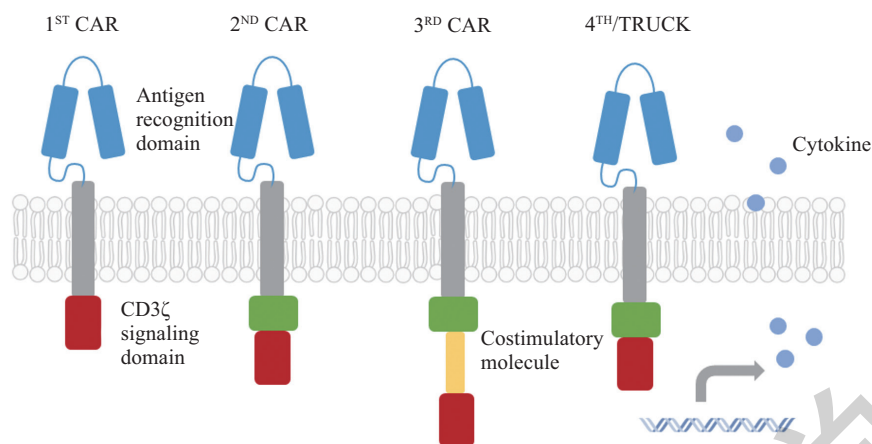


图2 嵌合抗原受体的设计

Fig.2 The design of chimeric antigen receptors

的T细胞更能发挥治疗功能; 其次, 通过优化基因转染工艺能够显著提高抗原特异性T细胞的占比^[42]。

根据抗原识别受体的不同构建工艺, “工程”T细胞分为嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)和T细胞受体T细胞(TCR-T)两大类。

2.1 CAR-T细胞治疗

嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)是将单链抗体(ScFv)的基因编码序列与T细胞多个信号转导基序(motif)的编码序列串联后形成, 其中的信号转导基序可以从CD3、CD28和CD137等分子中选择。通常将CAR-T细胞分为4代^[43], 其中进入临床研究的主要是第2代CAR-T细胞, 特征是CAR重组基因串联了CD3和CD28/CD137的信号转导基序(图2)。

当上述重组基因载体在T细胞中表达后, ScFv识别靶细胞表面的相应抗原, 然后通过多个信号途径使得T细胞激活并发挥效应功能。因而与“天然”T细胞相比, CAR-T细胞具有以下特征: (1)直接识别细胞表面的靶标抗原而不受MHC(HLA)限制, 由此可以规避因癌细胞下调HLA表达而引起的免疫逃逸; (2)CAR与相应抗原结合后可以同时激活CD3-TCR和共刺激受体(如CD28和CD137等)的下游信号通路, 使得细胞增殖和效应功能更加明显。

目前CAR-T细胞治疗B细胞恶性肿瘤已取得了令人瞩目的临床疗效。此类血液系肿瘤源自骨髓中前B细胞(pre-B cells)的恶性转化, 其特征之一是高度表达B细胞的谱系(lineage)表面标志CD19, 由于该抗原在正常组织的其他体细胞中均不表达, 因而靶标抗原具有显著的肿瘤特异性。2017年, 美国

食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了2个靶向CD19的CAR-T细胞药物, 即tisagenlecleucel和axicabtagene ciloleucel, 进入临床应用, 这些CAR-T细胞治疗急性淋巴母细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)的II期临床结果显示, 客观有效率(objective response rate, ORR)均达到80%左右, 其中50%~60%的患者获得CR^[44-45]。国内开展此类CAR-T细胞治疗的临床试验累计达到57项, 但研究结果尚待报道^[46]。此外, 靶向血液系肿瘤其他表面抗原的CAR-T细胞治疗研究也在进行之中, 这类抗原中值得关注的有多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)之BCMA(B cell maturation antigen)和急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)之CD123等^[46-47]。

CAR-T细胞治疗实体肿瘤的研究进展比较缓慢, 主要制约因素之一是癌细胞表面缺乏特异性的肿瘤抗原^[48]。迄今, 报道的CAR-T细胞靶向10余种不同抗原, 试用于肺癌、肝癌、胃癌和肠癌等常见肿瘤的治疗(图3)。但总体而言毒副作用比较严重, 其中具有显效低毒特性的案例包括靶向EGFRvIII、IL13R2和间皮素(mesothelin, MSLN)等靶标抗原。

EGFRvIII和IL13R2在正常脑组织中不表达, 因而被认为是GBM的2个适宜靶标抗原。EGFRvIII是表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)编码基因缺失了外显子2~7所形成的变异体, 在GBM中的发生率约为30%^[49]。IL13R2是细胞因子IL13的诱饵受体(decoy receptor), 该受体缺乏信号转导功能, 其作用是与IL13R1竞争结合配体从而

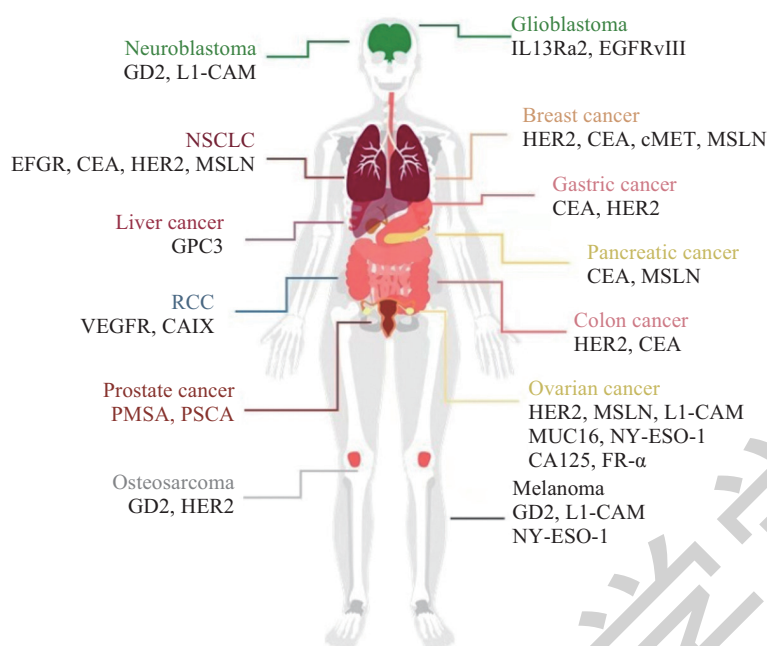


图3 CAR-T细胞治疗实体肿瘤的临床研究

Fig.3 The clinical trials of CAR-T cell therapy for solid tumors

限制IL13的免疫效应,在GBM中IL13R2过表达约占50%^[50]。采用颅内定位注射的方式进行CAR-T细胞治疗被证明是安全可行的,也观察到了临床疗效,其中靶向EGFRvIII治疗(10例)后中位OS为251天,靶向IL13R2治疗(3例)后分别存活了8.6~13.9个月^[51-52]。另有1例GBM患者接受了颅内定位注射和侧脑室注射CAR-T细胞(靶向IL13R2),显示对颅内的原发和转移病灶均具有确切疗效^[53]。

MSLN由位于染色体16p13.3区的*MSLN*基因编码,其转录的mRNA包含1 884个碱基,表达的前体蛋白含628个氨基酸(分子量为69 kDa),后者裂解形成40 kDa的膜结合型MSLN和31 kDa的可溶性片段[称为MPF(megakaryocyte-potentiating factor)]。MSLN在正常组织中仅选择性表达在胸膜、腹膜和心包膜的间皮细胞表面,但MSLN在多种实体肿瘤中明显表达,其中阳性率较高的有胸膜恶性间皮瘤(85%~90%)、胰腺癌(80%~85%)、肺癌(60%~65%)、卵巢癌(60%~65%)和胃癌(50%~55%)等^[54-55]。因而与CD19类似,MSLN非常适合作为靶标抗原用于CAR-T细胞治疗。目前,MSLN特异性CAR-T细胞治疗胸膜恶性间皮瘤、胰腺癌、卵巢癌、NSCLC和乳腺癌等正在进行临床试验,已报道的I期临床试验结果均未发现严重不良事件,其中1例胸膜恶性间皮瘤和3例胰腺癌患者显示SD(stable disease)^[55-57]。

总体而言, CAR-T细胞作为实体肿瘤的治疗选项仍有待探索,其中除了选择适宜靶标抗原外,还需要克服三个主要障碍,即(1)维持CAR-T细胞输注后能够在体内活跃增殖并长期生存; (2)驱动CAR-T细胞定向迁移进入肿瘤病灶; (3)消除肿瘤微环境对CAR-T细胞的免疫抑制效应^[58]。

2.2 TCR-T细胞治疗

T细胞通过TCR特异性识别靶细胞表面的相应pMHC从而发挥免疫效应。然而,从体液或组织中富集此类T细胞培养扩增存在若干限制因素,一是不易获得高亲和性TCR⁺ T细胞;二是经体外培养扩增的T细胞输注后难以在受者体内长期生存。克服这些障碍一个直观的解决方式是将TCR编码基因克隆后进行基因工程改造使之具有高亲和性,然后高效导入T细胞避免较长时间的扩增培养。这种TCR工程T细胞(TCR-engineered T cells, TCR-T)显然与“天然”T细胞一样,具备特异性靶向所有细胞蛋白抗原的潜能,其优点是此类TCR与相应抗原的亲合力较高并且在T细胞表面的表达密度也高,因而疗效更明显^[59]。

迄今,TCR-T细胞治疗主要靶向HLA-A*02:01等位点递呈的CT抗原表位,如MART-1、gp100和MAGE-A3/4等,选择治疗的肿瘤包括黑色素瘤、滑膜肉瘤、多发性骨髓瘤、食管癌和结直肠癌^[60-61]。

但临床研究发现, 此类抗原表位的肿瘤特异性不足, 输注TCR-T细胞后会出现令人意外的严重毒副反应^[62], 其中具有显效低毒特性的一个案例是靶向NY-ESO-1。纽约-食管鳞癌-1(New York-esophageal squamous cell carcinoma-1, NY-ESO-1)抗原由位于染色体Xq28区的CTAG1B基因编码, 其转录的mRNA约747 bp, 表达的蛋白含180个氨基酸。NY-ESO-1抗原在各种正常组织中几乎不表达, 因而作为肿瘤抗原的特异性很好。在恶性肿瘤中, NY-ESO-1抗原表达频率较高的有神经母细胞瘤、滑膜肉瘤、黑色素瘤、卵巢癌和骨髓瘤等^[63]。在一项探索性临床研究中, NY-ESO-1特异性TCR-T细胞用于治疗18例滑膜肉瘤和20例黑色素瘤, 此38例都属于晚期转移性肿瘤患者, 免疫组化检测显示NY-ESO-1为强阳性, TCR-T细胞均采用患者的外周血T细胞进行制备。TCR-T细胞治疗滑膜肉瘤后有效率为61%(11/18例), 3年及5年生存率分别为38%和14%; TCR-T细胞治疗黑色素瘤的有效率为55%(11/20例), 3年及5年生存率均为33%^[64]。此外, 此类TCR-T细胞治疗晚期多发性骨髓瘤的一项I/II期临床试验也取得了明显疗效, 20例患者在HSCT后2天接受TCR-T细胞治疗, 其中14例(70%)CR, 2例优于PR(病灶缩小 $\geq 90\%$), 2例PR, 总体有效率达到80%, 随访显示中位PFS为19.1个月^[65]。上述临床试验均未观察到严重不良事件, 毒性反应多为患者可以耐受或仅需对症处理。

TCR-T细胞治疗的主要制约因素是人群中HLA等位基因表达复杂, 靶向单个HLA位点(如HLA-A*02:01)、单个抗原表位的TCR-T细胞仅适用于少部分患者, 实施此类T细胞治疗的大样本临床研究难度很大。此外, 高效TCR编码基因通常要从治疗显效的TIL细胞中筛查, 而制备此类T细胞需要前期的大量研究积累。国内缺少长期坚持TIL细胞研究的医疗科研机构, 故而开展此项研究尚不多见。

3 T细胞治疗的若干新理念

3.1 功能基因组重编程

临床研究揭示, T细胞治疗显效者具有二个特征, 一是输注的T细胞能够植入(engraft)淋巴造血器官并长期生存; 二是此类T细胞在体内遭遇相应抗原后具备快速增殖能力。有研究组曾采用基因芯片检测技术筛查T细胞的功能基因组, 发现具备长期生存能力的T细胞具有特征性基因标签(signature), 其中

包括细胞因子受体IL7R(CD127)和共刺激受体CD28等^[66]。而在CAR-T细胞治疗临床研究中观察到具有CD45RA⁺CCR7⁺表型的T细胞输注后, 增殖与生存能力最强^[67]。上述鉴定的表型标志及生存特性与一个具有干细胞特性的T细胞亚群吻合, 这个细胞亚群称为T记忆干细胞(T memory stem cells, T_{SCM})^[68]。

T_{SCM}是抗原激活初始T细胞(naïve, T_N)后最早形成的一个记忆T细胞亚群, 在外周血中的数量为T细胞总数的2%~3%, 表型特征为CD8⁺CD95⁺CD45RA⁺CD27⁺CD28⁺CD62L⁺CCR7⁺, T_{SCM}也表达IL7受体CD127和IL15受体CD122, 典型特征自我更新(self-renewal)、多潜能性(multipotency)和长寿命(longevity)^[69-70]。因此, 在保证抗原特异性的前提下, 富集T_{SCM}实施过继治疗有助于高效重建免疫防御机制^[71-72]。

T_N细胞是在胸腺中发育成熟后释放入血的T细胞亚群, T_N遭遇抗原后发生一系列变化, 其中涉及转录调控、表观遗传调控和代谢调控等。这些变化的基础是相关基因表达及相关蛋白功能按时空顺序发生了改变, 因而统称功能基因组重编程(reprogramming)。应用T细胞重编程原理操控T_N细胞, 借此可以在体外培养过程中富集到T_{SCM}, 目前较常用的方式是用小分子抑制剂调控Wnt和mTOR等信号通路^[70,73-76]。此外, 记忆T细胞尤其是中央型记忆细胞(T central memory cells, T_{CM})具有分化可塑性(plasticity), 日本课题组最近报道, 约80%的T_{CM}在Notch信号作用下能够转换成为T_{SCM}(称为iT_{SCM})^[77]。

3.2 “货架型”细胞药物

“货架型(off-the-shelf, OTS)”T细胞是指经过预研制(pre-generated)并低温保存的抗原特异性T细胞, 其显著临床价值是作为细胞药物(cell drugs)能在数天内完成输注, 可以及时满足治疗需求^[78]。OTS型T细胞已在病毒特异性T细胞(virus-specific T cells, VST)及CAR-T细胞研究中引起了高度关注。

OTS型VST(如CMVST和EBVST)可以采集健康志愿者的外周血进行制备后冻存。当患者(如HSCT受者)的HLA位点之一可以被上述VST的TCR特异性识别时, 输注该OTS-VST是安全的, 不会出现明显不良反应包括GVHD, 而疗效与HSCT供者来源的同类T细胞没有明显差异。这种OTS-VST细胞治疗已在欧美等国的知名医院广泛开展^[11,19,79-85]。

OTS型CAR-T细胞也可以采集健康志愿者的外

周血进行制备后冻存。此类CAR-T细胞具有2种抗原识别受体,其中一种受体是人为导入的CAR,而另一种受体是原有的TCR,后者可以识别患者HLA分子而引起免疫损伤如GVHD。此外,患者免疫系统也可以识别OTS型CAR-T表面HLA而出现排异反应^[78]。克服上述障碍的途径之一是采用基因编辑技术遗传清除(genetically delete)T细胞的TCR和/或HLA编码基因,形成“通用型(universals)CAR-T细胞CAR-T细胞^[86-87]。

3.3 增效减毒

T细胞治疗作为一个疾病干预措施,安全性始终是第一位的。只有在安全的基础上提高疗效,患者才能真正获益。总体而言,“天然”T细胞治疗是比较安全的,很少出现严重毒副反应,但疗效通常也不够理想。经过基因改造后,“工程”T细胞的临床疗效得到了明显提升,但常出现一些患者不能耐受的毒性,如细胞因子风暴和“非瘤击靶”效应等。

细胞因子风暴(cytokine storm)又称细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS),是CAR-T细胞治疗中经常观察到的一种严重不良事件,发生率为30%~94%^[88]。CRS主要表现为炎症性细胞因子(如IL2、IL6、IL8、IL10、IFN和TNF等)异常分泌,出现高热、低血压和多脏器功能受损或衰竭等临床症状。CRS的发病机制尚不完全清楚,但与CAR-T细胞的击靶效应(on-target effect),即CAR结合相应靶标抗原后过度释放细胞因子,及随后引起的旁观者(bystander)细胞激活密切相关,这类旁观者细胞包括免疫细胞和血管内皮细胞等,通常重度CRS多伴随内皮细胞激活^[89]。

非瘤击靶(on-target/off-tumor)毒性是由于正常组织的体细胞受到了输注的T细胞免疫攻击所致。这种毒副作用的形成机制与T细胞抗原识别受体的亲和性(affinity)相关,如具有高亲和性TCR的T细胞治疗后虽然抗癌效应明显,但也常引起非瘤击靶毒性造成自身免疫病^[90-91]。该机制可以解释一部分临床研究中观察到的毒性,如在CT抗原MART-1特异性的TCR-T细胞治疗黑色素瘤时观察到葡萄膜炎和失聪,虽然该TCR是从经过治疗证明安全有效的患者TIL中克隆获得的,但制备TCR-T细胞后却发现眼球和内耳的MART-1⁺色素细胞受到了攻击。类似毒性现象也见于CAR-T细胞治疗,例如,HER2/neu细胞因子受体是乳腺癌的抗体靶向治疗(herceptin)的

重要靶标,但该抗原特异性CAR-T细胞治疗却引起受试者死亡,其致死原因是心、肺、胃、肠等上皮细胞均能够表达HER2,输注的CAR-T细胞受其刺激导致免疫攻击。这种非瘤击靶毒性案例亦见于癌胚抗原(CEA)、碳酸酐酶(CAIX)、B细胞抗原(CD19和CD20)等。

非瘤击靶毒性的另一个形成机制是TCR-T细胞识别靶标抗原表位的TCR与体细胞的其他抗原表位发生交叉反应,如CT抗原MAGE-A3特异性的TCR-T细胞治疗黑色素瘤和骨髓瘤时观察到神经和心脏毒性,原因是该TCR与脑组织的MAGE-A12和心肌细胞的肌联蛋白(titin)具有交叉反应。

为了增强“工程”T细胞的抗癌疗效和减轻毒副反应,目前已经提出了多项改进措施,择要列举一二。

一是提高肿瘤靶标抗原的特异性,如完善抗原识别受体(CAR及TCR)的筛查平台,降低此类受体出现“非瘤击靶”毒性的风险^[92];或采用全基因组测序技术鉴定肿瘤患者的个体性Neo抗原,从中构建新颖的抗原识别受体^[93]。

二是驱使“工程”T细胞穿越肿瘤屏障并克服肿瘤微环境的免疫抑制效应。如在导入CAR基因的同时附加趋化因子受体和/或细胞因子的编码基因^[43],或者首先采用基因编辑技术“卸载(knockdown)”T细胞免疫抑制受体(如PD-1)的编码基因,然后导入CAR基因^[94-95]。

三是在“工程”T细胞内设置“安全开关(safety switch)CAR-T细胞,如导入可诱导型的自杀基因(suicide gene),包括单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-TK)和可诱导型半胱天冬酶-9(inducible caspase-9)等。其特点是当T细胞治疗遇到紧急情况(如CRS等)危及生命时,可以通过注射相应药物启动这个自爆装置将体内的CAR-T细胞有效杀灭^[96]。

然而,诸如此类的改进措施能否达到预期临床目标,仍有待评估。有兴趣的读者可以参阅相关文献。

3.4 多学科综合治疗

T细胞治疗与其他治疗手段有机整合是长期以来受到高度关注的一个研究领域,尤其在肿瘤治疗中,任何一种治疗选项“单打独斗”均不能期待能够获得持续性疗效。因此,多学科综合治疗仍是获得最佳疗效的必经之路。

T细胞治疗在肿瘤负荷较小时更容易奏效。因此,应当尽量选择各种治疗方式(如手术、放疗、化疗和靶向治疗等)将肿瘤负荷降至最小,由此创造一个“治疗窗口(therapeutic window)”CAR-T细胞让T细胞发挥清除“残留病灶(residual disease)”CAR-T细胞的功能。如日本开展的NSCLC术后T细胞治疗研究^[41]。

目前T细胞治疗多选择复发/难治性的晚期肿瘤,此时肿瘤负荷较大,这就需要尽可能降低体内免疫抑制细胞如调节性T细胞(Treg)等对T细胞疗效的影响,如采用清淋(lymphocyte-depleting)化疗的方式与T细胞治疗组合。清淋化疗的另一个潜在作用是促进体内IL7和IL15等细胞因子分泌,从而提高输注后的T细胞生存能力。这种组合在黑色素瘤的TIL治疗中已有丰富的经验^[37-39]。

此外,消除肿瘤内免疫抑制微环境对T细胞的干扰,作为一种治疗新理念也倍受推崇。例如,TCR识别相应pMHC后不可避免地诱导T细胞表达抑制性受体如PD-1,而癌细胞可以表达PD-1配体如PD-L1,后者与PD-1结合将导致T细胞失能(energy)甚至耗竭(exhaustion),从而成为肿瘤逃逸免疫监管的一个重要机制。因此,T细胞治疗与现有的ICB(immune checkpoint blockade)方案组合可以发挥协同抗癌效应。

4 总结与展望

T细胞治疗恶性肿瘤正在进入一个前所未有的高速发展阶段,以近年来CAR-T细胞药物获准临床试验为标志,全球知名制药企业和众多生物技术公司纷纷涌入这一领域,大量资金和技术人才积聚推动了肿瘤免疫学的学科发展。毋庸置疑,免疫治疗将成为控制恶性肿瘤(尤其是实体肿瘤)的一项新兴技术,其中抗原特异性T细胞制备工艺的革新和临床治疗方案的优化是最可预期的热点。值得指出的是,T细胞治疗用于肿瘤病灶的局部减荷,效果不及外科手术、高能放疗和分子靶向治疗。然而,一旦建立了肿瘤特异性免疫保护机制,这种治疗选项预期能够有效控制抗原阳性细胞播散,从而改善患者预后。显而易见,肿瘤多学科治疗的基本原则应该是博采众长,合理组合,因人而异。

T细胞治疗控制病毒感染是得到临床广泛认可的治疗选项,特别是在HSCT后,T细胞治疗能够有效

控制难治性的CMV感染,使患者明显获益。这些成功案例也将推动其他类型病毒感染(如EBV和HPV等)的T细胞治疗临床研究。目前的发展趋势是优化“货架型”T细胞尤其是干细胞型T_{SCM}的制备,此类新颖细胞药物不仅能使患者及时获得治疗机会,而且有望使疗效得到明显改善。

我国在T细胞治疗方面具有长期的研究积累和坚实的技术人才基础,目前国家鼓励产学研医协同打造免疫细胞治疗等产业集群,可以期待经过不懈努力,我国终将赶超国际先进水平。

致谢——

感谢上海赛傲生物技术有限公司迟楠、诸兵、洪嘉洋诸位博士在资料收集和撰写中的大力帮助。

参考文献 (References)

- 1 Jeras M, Bricl I, Zorec R, Svajger U. Induction/engineering, detection, selection, and expansion of clinical-grade human antigen-specific CD8 cytotoxic T cell clones for adoptive immunotherapy. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 1-15.
- 2 Houghtelin A, Bollard CM. Virus-specific T cells for the immunocompromised patient. *Front Immunol* 2017; 8: 1-11.
- 3 Kunert A, Debets R. Engineering T cells for adoptive therapy: outsmarting the tumor. *Curr Opin Immunol* 2018; 51: 133-9.
- 4 Mo Z, Du P, Wang G, Wang Y. The multi-purpose tool of tumor immunotherapy: gene-engineered T cells. *J Cancer* 2017; 8(9): 1690-703.
- 5 Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, *et al.* Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988; 319(25): 1676-80.
- 6 Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsmann BA, Rock KL. The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules. *Annu Rev Immunol* 2017; 35: 149-76.
- 7 Collins-McMillen D, Buehler J, Peppenelli M, Goodrum F. Molecular determinants and the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Viruses* 2018; 10(8): 444.
- 8 Blyth E, Withers B, Clancy L, Gottlieb D. CMV-specific immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation. *Virulence* 2016; 7(8): 967-80.
- 9 Takenaka K, Nishida T, Asano-Mori Y, Oshima K, Ohashi K, Mori T, *et al.* Cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia who survived to day 100 after transplantation: the Japan society for hematopoietic cell transplantation transplantation-related complication working group. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(11): 2008-16.
- 10 Luo XH, Chang YJ, Huang XJ. Improving cytomegalovirus-

- specific T cell reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *J Immunol Res* 2014; 2014: 1-12.
- 11 Koehne G, Hasan A, Doubrovina E, Prockop S, Tyler E, Wasilewski G, *et al.* Immunotherapy with donor T cells sensitized with overlapping pentadecapeptides for treatment of persistent cytomegalovirus infection or viremia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015; 21(9): 1663-78.
 - 12 Blyth E, Clancy L, Simms R, Ma CK, Burgess J, Deo S, *et al.* Donor-derived CMV-specific T cells reduce the requirement for CMV-directed pharmacotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2013; 121(18): 3745-58.
 - 13 Solomon IH, Ramkissoon SH, Milner DA, Jr., Folkert RD. Cytomegalovirus and glioblastoma: a review of evidence for their association and indications for testing and treatment. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 233(11): 994-8.
 - 14 Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, *et al.* Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; 23(10): 1985-96.
 - 15 Schuessler A, Smith C, Beagley L, Boyle GM, Rehan S, Matthews K, *et al.* Autologous T-cell therapy for cytomegalovirus as a consolidative treatment for recurrent glioblastoma. *Cancer Res* 2014; 74(13): 3466-76.
 - 16 Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update. *Front Oncol* 2018; 8: 1-16.
 - 17 Bornkamm GW, Hammerschmidt W. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356(1408): 437-59.
 - 18 Tse E, Kwong YL. Epstein Barr virus-associated lympho-proliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp Mol Med* 2015; 47: 1-7.
 - 19 Vickers MA, Wilkie GM, Robinson N, Rivera N, Haque T, Crawford DH, *et al.* Establishment and operation of a good manufacturing practice-compliant allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic cell bank for the treatment of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 402-10.
 - 20 Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, Hale GA, Rousseau A, Smith CA, *et al.* Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2010; 115(5): 925-35.
 - 21 Bollard CM, Gottschalk S, Torrano V, Diouf O, Ku S, Hazrat Y, *et al.* Sustained complete responses in patients with lymphoma receiving autologous cytotoxic T lymphocytes targeting Epstein-Barr virus latent membrane proteins. *J Clin Oncol* 2014; 32(8): 798-808.
 - 22 Yamaguchi M, Miyazaki K. Current treatment approaches for NK/T-cell lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2017; 57(3): 98-108.
 - 23 Cho SG, Kim N, Sohn HJ, Lee SK, Oh ST, Lee HJ, *et al.* Long-term outcome of extranodal NK/T cell lymphoma patients treated with postremission therapy using EBV IMP1 and LMP2a-specific CTLs. *Mol Ther* 2015; 23(8): 1401-9.
 - 24 Straathof KC, Bollard CM, Popat U, Huls MH, Lopez T, Morriss MC, *et al.* Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes. *Blood* 2005; 105(5): 1898-904.
 - 25 Chia WK, Teo M, Wang WW, Lee B, Ang SF, Tai WM, *et al.* Adoptive T-cell transfer and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic and/or locally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Mol Ther* 2014; 22(1): 132-9.
 - 26 Huang J, Fogg M, Wirth LJ, Daley H, Ritz J, Posner MR, *et al.* Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for recurrent, metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2017; 123(14): 2642-50.
 - 27 Gao G, Smith DI. Human papillomavirus and the development of different cancers. *Cytogenet Genome Res* 2016; 150: 185-93.
 - 28 Xu QX, Zhang ZY. High-risk human papillomavirus genotypes in cervical lesions and vaccination challenges in China. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(6): 2193-7.
 - 29 Conway MJ, Meyers C. Replication and assembly of human papillomaviruses. *J Dent Res* 2009; 88(4): 307-17.
 - 30 Skeate JG, Woodham AW, Einstein MH, Da Silva DM, Kast WM. Current therapeutic vaccination and immunotherapy strategies for HPV-related diseases. *Hum Vaccin Immunother* 2016; 12(6): 1418-29.
 - 31 Stevanovic S, Draper LM, Langhan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, *et al.* Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol* 2015; 33(14): 1543-50.
 - 32 Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2009; 100(11): 2014-21.
 - 33 Bobisse S, Foukas PG, Coukos G, Harari A. Neoantigen-based cancer immunotherapy. *Ann Transl Med* 2016; 4(14): 262.
 - 34 Kelderman S, Heemskerk B, Fanchi L, Philips D, Toebes M, Kvistborg P, *et al.* Antigen-specific TIL therapy for melanoma: A flexible platform for personalized cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 2016; 46(6): 1351-60.
 - 35 Seliktar-Ofir S, Merhavi-Shoham E, Itzhaki O, Yunger S, Markel G, Schachter J, *et al.* Selection of shared and neoantigen-reactive T cells for adoptive cell therapy based on CD137 separation. *Front Immunol* 2017; 8: 1-14.
 - 36 Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009; 114(8): 1537-44.
 - 37 Weber J, Atkins M, Hwu P, Radvanyi L, Sznol M, Yee C, *et al.* White paper on adoptive cell therapy for cancer with tumor-infiltrating lymphocytes: a report of the CTEP subcommittee on adoptive cell therapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(7): 1664-73.
 - 38 Rohaan MW, van den Berg JH, Kvistborg P, Haanen J. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *J Immunother Cancer* 2018; 6(1): 1-16.
 - 39 Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(13): 4550-7.
 - 40 Tran E, Robbins PF, Lu YC, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, *et al.* T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer. *N Engl J Med* 2016; 375(23): 2255-62.
 - 41 Kimura H, Matsui Y, Ishikawa A, Nakajima T, Iizasa T. Randomized controlled phase III trial of adjuvant

- chemoimmunotherapy with activated cytotoxic T cells and dendritic cells from regional lymph nodes of patients with lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2018; 67(8): 1231-8.
- 42 Thaxton JE, Li Z. To affinity and beyond: harnessing the T cell receptor for cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 2014; 10(11): 3313-21.
 - 43 Xu D, Jin G, Chai D, Zhou X, Gu W, Chong Y, *et al.* The development of CAR design for tumor CAR-T cell therapy. *Oncotarget* 2018; 9(17): 13991-4004.
 - 44 Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, *et al.* Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378(5): 439-48.
 - 45 Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, *et al.* Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2531-44.
 - 46 Liu B, Song Y, Liu D. Clinical trials of CAR-T cells in China. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 1-10.
 - 47 Boyiadzis MM, Dhodapkar MV, Brentjens RJ, Kochenderfer JN, Neelapu SS, Maus MV, *et al.* Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance. *J Immunother Cancer* 2018; 6(1): 1-12.
 - 48 Schmidts A, Maus MV. Making CAR T cells a solid option for solid tumors. *Front Immunol* 2018; 9: 1-10.
 - 49 Ren PP, Li M, Li TF, Han SY. Anti-EGFRvIII Chimeric antigen receptor-modified T cells for adoptive cell therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des* 2017; 23(14): 2113-6.
 - 50 Sengupta S, Thaci B, Crawford AC, Sampath P. Interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma immunotherapy. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 1-8.
 - 51 O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A, Melenhorst JJ, Mansfield K, Morrisette JJD, *et al.* A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci Transl Med* 2017; 9: 1-16.
 - 52 Brown CE, Badie B, Barish ME, Weng L, Ostberg JR, Chang WC, *et al.* Bioactivity and safety of IL13Ralpha2-redirected chimeric antigen receptor CD8⁺ T cells in patients with recurrent glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21(18): 4062-72.
 - 53 Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, *et al.* Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N Engl J Med* 2016; 375(26): 2561-9.
 - 54 Pastan I, Hassan R. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. *Cancer Res* 2014; 74(11): 2907-12.
 - 55 Morello A, Sadelain M, Adusumilli PS. Mesothelin-targeted CARs: driving T cells to solid tumors. *Cancer Discov* 2016; 6(2): 133-46.
 - 56 Beatty GL, Haas AR, Maus MV, Torigian DA, Soulen MC, Plesa G, *et al.* Mesothelin-specific chimeric antigen receptor mRNA-engineered T cells induce anti-tumor activity in solid malignancies. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(2): 112-20.
 - 57 Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, *et al.* Activity of mesothelin-specific chimeric antigen receptor T cells against pancreatic carcinoma metastases in a phase 1 trial. *Gastroenterology* 2018; 155(1): 29-32.
 - 58 Beatty GL, O'Hara M. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of solid tumors: Defining the challenges and next steps. *Pharmacol Ther* 2016; 166: 30-9.
 - 59 Schmitt TM, Stromnes IM, Chapuis AG, Greenberg PD. New strategies in engineering T-cell receptor gene-modified T cells to more effectively target malignancies. *Clin Cancer Res* 2015; 21(23): 5191-7.
 - 60 Barrett DM, Grupp SA, June CH. Chimeric Antigen receptor- and TCR-modified T cells enter main street and wall street. *J Immunol* 2015; 195(3): 755-61.
 - 61 Kunert A, Straetemans T, Govers C, Lamers C, Mathijssen R, Sleijfer S, *et al.* TCR-engineered T cells meet new challenges to treat solid tumors: choice of antigen, T cell fitness, and sensitization of tumor milieu. *Front Immunol* 2013; 4: 1-16.
 - 62 Ping Y, Liu C, Zhang Y. T-cell receptor-engineered T cells for cancer treatment: current status and future directions. *Protein Cell* 2018; 9(3): 254-66.
 - 63 Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, Hendrickx W, Dermime S, Bedognetti D, *et al.* NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: current perspectives. *Front Immunol* 2018; 9: 1-14.
 - 64 Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, *et al.* A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 2015; 21(5): 1019-27.
 - 65 Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, *et al.* NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 2015; 21(8): 914-21.
 - 66 Chandran SS, Paria BC, Srivastava AK, Rothermel LD, Stephens DJ, Kammula US. Tumor-specific effector CD8⁺ T cells that can establish immunological memory in humans after adoptive transfer are marked by expression of IL7 receptor and c-myc. *Cancer Res* 2015; 75(16): 3216-26.
 - 67 Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, *et al.* Closely related T-memory stem cells correlate with *in vivo* expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood* 2014; 123(24): 3750-9.
 - 68 Morrot A. Human stem memory T cells (TSCM) as critical players in the long-term persistence of immune responses. *Ann Transl Med* 2017; 5(5): 120.
 - 69 Costa Del Amo P, Lahoz-Beneytez J, Boelen L, Ahmed R, Miners KL, Zhang Y, *et al.* Human TSCM cell dynamics *in vivo* are compatible with long-lived immunological memory and stemness. *PLoS Biol* 2018; 16(6): 1-22.
 - 70 Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, *et al.* A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 2011; 17(10): 1290-7.
 - 71 Morrot A. Lifelong protection mediated by stem cell-like CD8⁺ T memory subset cells (Tscm) induced by vaccination. *Ann Transl Med* 2016; 4(11): 1-3.
 - 72 Flynn JK, Gorry PR. T cell therapies-are T memory stem cells the answer? *Ann Transl Med* 2015; 3(17): 1-5.
 - 73 Sabatino M, Hu J, Sommariva M, Gautam S, Fellowes V, Hocker JD, *et al.* Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8⁺ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood* 2016; 128(4): 519-28.

- 74 Alvarez-Fernandez C, Escriba-Garcia L, Vidal S, Sierra J, Briones J. A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy. *J Transl Med* 2016; 14(1): 1-10.
- 75 Scholz G, Jandus C, Zhang L, Grandclement C, Lopez-Mejia IC, Sonesson C, *et al.* Modulation of mTOR signalling triggers the formation of stem cell-like memory T Cells. *EBio Medicine* 2016; 4: 50-61.
- 76 Pilipow K, Scamardella E, Puccio S, Gautam S, De Paoli F, Mazza EM, *et al.* Antioxidant metabolism regulates CD8⁺ T memory stem cell formation and antitumor immunity. *JCI Insight* 2018; 3(18): 1-18.
- 77 Kondo T, Imura Y, Chikuma S, Hibino S, Omata-Mise S, Ando M, *et al.* Generation and application of human induced-stem cell memory T cells for adoptive immunotherapy. *Cancer Sci* 2018; 109(7): 2130-40.
- 78 Torikai H, Cooper LJ. Translational implications for off-the-shelf immune cells expressing chimeric antigen receptors. *Mol Ther* 2016; 24(7): 1178-86.
- 79 Eiz-Vesper B, Maecker-Kolhoff B, Blasczyk R. Adoptive T-cell immunotherapy from third-party donors: characterization of donors and set up of a T-cell donor registry. *Front Immunol* 2012; 3: 1-9.
- 80 O'Reilly RJ, Prockop S, Hasan AN, Koehne G, Doubrovina E. Virus-specific T-cell banks for 'off the shelf' adoptive therapy of refractory infections. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51(9): 1163-72.
- 81 Leen AM, Bollard CM, Mendizabal AM, Shpall EJ, Szabo P, Antin JH, *et al.* Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2013; 121(26): 5113-23.
- 82 Tischer S, Priesner C, Heuft HG, Goudeva L, Mende W, Barthold M, *et al.* Rapid generation of clinical-grade antiviral T cells: selection of suitable T-cell donors and GMP-compliant manufacturing of antiviral T cells. *J Transl Med* 2014; 12: 1-18.
- 83 Gary R, Aigner M, Moi S, Schaffer S, Gottmann A, Maas S, *et al.* Clinical-grade generation of peptide-stimulated CMV/EBV-specific T cells from G-CSF mobilized stem cell grafts. *J Transl Med* 2018; 16(1): 1-15.
- 84 Qian C, Campidelli A, Wang Y, Cai H, Venard V, Jeulin H, *et al.* Curative or pre-emptive adenovirus-specific T cell transfer from matched unrelated or third party haploidentical donors after HSCT, including UCB transplantations: a successful phase I/II multicenter clinical trial. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 1-14.
- 85 Withers B, Blyth E, Clancy LE, Yong A, Fraser C, Burgess J, *et al.* Long-term control of recurrent or refractory viral infections after allogeneic HSCT with third-party virus-specific T cells. *Blood Adv* 2017; 1(24): 2193-205.
- 86 Jung IY, Lee J. Unleashing the therapeutic potential of CAR-T cell therapy using gene-editing technologies. *Mol Cells* 2018; 41(8): 717-23.
- 87 Zhao J, Lin Q, Song Y, Liu D. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells. *J Hematol Oncol* 2018; 11(1): 1-9.
- 88 Porter D, Frey N, Wood PA, Weng Y, Grupp SA. Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel. *J Hematol Oncol* 2018; 11(1): 1-12.
- 89 Shimabukuro-Vornhagen A, Godel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlosser HA, Schlaak M, *et al.* Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* 2018; 6(1): 1-14.
- 90 Watanabe K, Kuramitsu S, Posey AD, Jr., June CH. Expanding the therapeutic window for CAR T cell therapy in solid tumors: the knowns and unknowns of CAR T cell biology. *Front Immunol* 2018; 9: 1-12.
- 91 Miller AM, Bahmanof M, Zehn D, Cohen EEW, Schoenberger SP. Leveraging TCR affinity in adoptive immunotherapy against shared tumor/self antigens. *Cancer Immunol Res* 2018; 7(1): 40-9.
- 92 Kunert A, Obenaus M, Lamers CH, Blankenstein T, Debets R. T-cell receptors for clinical therapy: *in vitro* assessment of toxicity risk. *Clin Cancer Res* 2017; 23(20): 6012-20.
- 93 Bethune MT, Joglekar AV. Personalized T cell-mediated cancer immunotherapy: progress and challenges. *Curr Opin Biotechnol* 2017; 48: 142-52.
- 94 Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1-10.
- 95 Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res* 2017; 23(9): 2255-66.
- 96 Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, *et al.* Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med* 2011; 365(18): 1673-83.