



周鹏辉, 中山大学肿瘤防治中心, 华南恶性肿瘤防治全国重点实验室教授、博士生导师。获得中山大学“百人计划”青年杰出人才、广东省“珠江人才计划”领军人才等荣誉。实验室长期从事肿瘤免疫学和肿瘤免疫治疗研究。主要通过研究免疫系统和肿瘤之间的相互作用, 鉴定肿瘤特异的免疫细胞, 尤其是识别肿瘤抗原的T细胞, 以及肿瘤细胞抵抗免疫攻击的逃逸机制, 从中发现新的治疗靶标, 建立高效的肿瘤免疫治疗新方法。研究成果发表于 *Nature*、*Cell Res*、*PNAS*、*Clin Cancer Res*、*Cancer Immunol Res* 等重要国际期刊。其中部分研究结果已经转化到临床, 开始了I期临床试验(NCT03891706、CXSL2400285)。

## TCR-T细胞治疗实体肿瘤的研究进展

张亚静 周鹏辉\*

(华南恶性肿瘤防治全国重点实验室, 广东省恶性肿瘤临床医学研究中心, 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060)

**摘要** 以基因工程化T细胞为基础的过继性细胞治疗改变了肿瘤免疫治疗的格局, 成为了最有希望攻克癌症的方向。嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法在血液肿瘤的治疗中显示出显著的疗效, 但在实体瘤治疗中至今未有令人满意的结果。T细胞受体工程T细胞(TCR-T)疗法在实体肿瘤的治疗中显示出良好的应用前景。该综述总结了靶向不同肿瘤抗原的TCR-T细胞疗法取得的临床结果, 讨论了TCR-T细胞疗法目前的局限性和面临的挑战。最后, 该文展望了TCR-T疗法的优化策略和未来发展方向。

**关键词** 实体肿瘤; 免疫治疗; 肿瘤抗原; T细胞受体工程T细胞

## Research Progress of TCR-T Cells for the Treatment of Solid Tumors

ZHANG Yajing, ZHOU Penghui\*

(State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Cancer, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

**Abstract** Genetically engineered T-cell therapy has become the most promising approach for the treatment of solid tumors. Although CAR-T (chimeric antigen receptor T-cell) therapy has shown remarkable efficacy in the treatment of hematological malignancies, the efficacy of treating solid tumors remains at low levels. TCR-T (T cell receptor-engineered T cell) therapies have shown encouraging results in the treatment of solid tumors. This review describes the clinical results achieved by TCR-T cell therapies targeting different tumor antigens, and summarizes current limitations and challenges of TCR-T cell therapies. Finally, this study discusses the improving strategies and future directions of TCR-T therapies.

**Keywords** solid tumors; immunotherapy; tumor antigens; T cell receptor-engineered T cell

收稿日期: 2024-12-03

接受日期: 2025-01-24

国家自然科学基金(批准号: 82130086、82192892、82402143)资助的课题

\*通信作者。Tel: 020-39336272, E-mail: zhoup@sysucc.org.cn

Received: December 3, 2024

Accepted: January 24, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82130086, 82192892, 82402143)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-39336272, E-mail: zhoup@sysucc.org.cn

近年来,肿瘤免疫治疗取得了历史性突破。其中免疫检查点抑制剂、细胞治疗、肿瘤疫苗、免疫调节剂等显著改善了肿瘤患者的预后,成功治愈了部分晚期癌症患者,改变了癌症的临床治疗模式。免疫治疗成为了最有希望攻克癌症的方向。然而,很大一部分患者没有从中受益,部分原因是缺少肿瘤特异性效应T细胞。T细胞疗法通过回输大量识别肿瘤抗原的T细胞来获得治疗效果,能够解决由于体内抗肿瘤T细胞数量少和功能不足等缺陷而导致的治疗抵抗<sup>[1]</sup>。T细胞疗法主要包括肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)疗法、嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)疗法和T细胞受体工程T细胞(T cell receptor-engineered T cell, TCR-T)疗法。CAR-T疗法在血液瘤中的疗效已得到验证,目前全球已上市12款治疗血液瘤的CAR-T细胞药物(其中6款在国内上市),但在实体瘤中,由于可用抗原的稀缺性、肿瘤的异质性或肿瘤的免疫抑制导致其效果一直不佳。而TCR-T疗法被认为是治疗实体瘤的有效方式。

迄今为止,已发表的临床数据展现了TCR-T细胞疗法在实体瘤治疗中的巨大潜力。在这篇综述中,我们回顾了目前临床上TCR-T细胞疗法靶向的不同类型的肿瘤抗原以及相应的临床进展。我们还总结了TCR-T细胞疗法在安全性和有效性等方面所面临的挑战,讨论了可能提高疗效的针对性策略,为未来的研究提供了一些方向。

## 1 TCR-T细胞疗法简介

TIL疗法指从肿瘤中分离肿瘤特异性T细胞,离体扩增后再将其输注到患者体内<sup>[2]</sup>,首款TIL细胞药物lifileucel(商品名: Amtagvi)于2024年2月获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准用于治疗晚期黑色素瘤。但TIL治疗仅适用于可切除的肿瘤,并需要分离和扩增足够的T细胞,需要较高的起始T细胞量,因此应用范围有限<sup>[3]</sup>。CAR-T和TCR-T细胞疗法是对T细胞进行基因工程修饰,使其能够特异性识别特定的肿瘤抗原表位(图1)。CAR-T细胞疗法在血液瘤治疗中取得重大突破,目前已经有多款CAR-T细胞药物上市<sup>[4]</sup>。然而, CAR-T细胞在实体瘤中的临床疗效远不如预期,存在多种限制因素,包括可用抗原稀缺、肿瘤异质性或肿瘤免疫抑制微环境等<sup>[5-6]</sup>。

TCR是由二硫键连接的 $\alpha$ 和 $\beta$ 链组成的异二聚体,每个链都有一个可变结构域和一个恒定结构域,可变区可与抗原-主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)复合物结合<sup>[7]</sup>。TCR-T细胞是通过基因工程技术将特异性识别肿瘤抗原的TCR导入T细胞中,使其能够特异性地识别并攻击肿瘤细胞。肿瘤来源的抗原肽由MHC分子呈递到肿瘤细胞表面,TCR-T细胞上的TCR能够识别这种MHC-抗原肽复合物,从而激活T细胞,引发一系列免疫反应,最终导致肿瘤细胞的死亡<sup>[8]</sup>。TCR-T细胞疗法以其独特的优势成为最有潜力的实体瘤治疗方案。首先,TCR-T细胞疗法靶向的抗原库的范围远大于CAR-T细胞。TCR-T细胞识别通过MHC呈现的抗原表位,这些抗原表位可来源于细胞内表达的所有类型蛋白,包括分泌蛋白、膜蛋白和细胞内蛋白等。因此,TCR-T细胞具有广泛的识别靶点,而CAR-T细胞主要识别细胞表面的抗原<sup>[9]</sup>。其次,TCR-T细胞诱导活化所需的表位密度低于经典的CAR-T细胞<sup>[10]</sup>。这种对肿瘤细胞更高的敏感性可能会改善T细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤。另外,适中的亲和力能够弱化TCR-T细胞与靶细胞的长时间结合,可能允许每个TCR-T细胞“扫描”并消除多个抗原呈递的肿瘤细胞。最后,TCR-T具有健全的TCR信号通路,TCR-CD3复合物使TCR-T细胞能够更精细地调控TCR信号,防止T细胞凋亡和耗竭<sup>[11]</sup>(图1)。

## 2 TCR-T细胞治疗实体瘤的临床进展

抗原选择是开发安全高效的TCR-T细胞疗法的关键。理想的抗原应当具有肿瘤特异性、免疫原性等特征。目前临床试验中靶向的肿瘤抗原分为肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen, TAA)和肿瘤特异性抗原(tumor-specific antigen, TSA)两大类<sup>[3]</sup>(表1)。TAA是在肿瘤组织中过度表达且在正常组织中有限表达的一种抗原,包括癌-睾丸抗原(cancer/testis antigen, CT抗原)、组织分化抗原和过表达抗原。TSA是肿瘤细胞独有表达的蛋白,包括病毒抗原和新抗原,以这些新抗原为靶点进行免疫治疗的毒性风险较低。常见的靶抗原及相关的临床试验见表2。下面将按抗原分类介绍TCR-T细胞疗法的临床进展。

### 2.1 靶向过表达抗原和组织分化抗原

可被T细胞识别的黑色素瘤抗原1(melanoma antigen recognized by T cells, MART-1)、糖蛋白

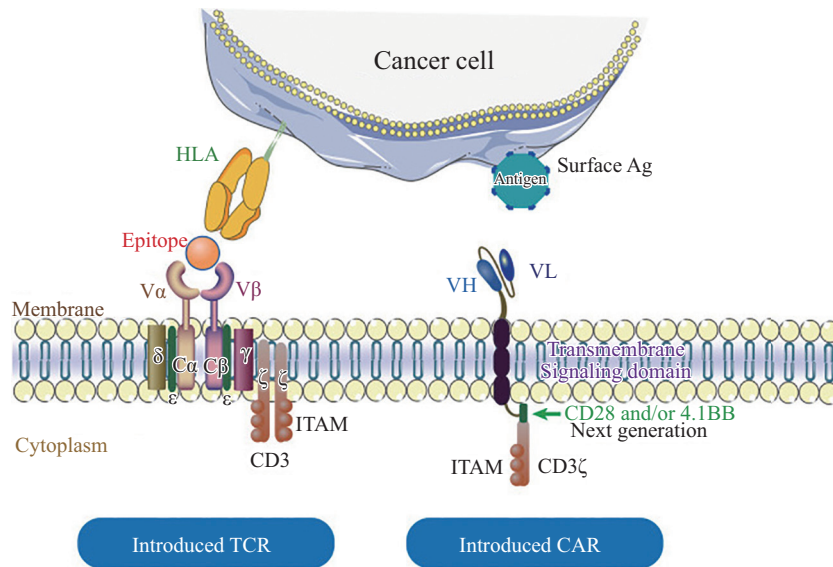


图1 TCR-T细胞和CAR-T细胞识别抗原示意图(根据参考文献[12]修改)

Fig.1 Schematic view of antigen recognition by TCR-T and CAR-T (modified from the reference [12])

表1 TCR识别抗原的分类和特点

Table 1 Classification and characteristics of antigens recognized by TCR

抗原类别 Classification of antigens	正常组织表达 Expression in normal tissue	肿瘤组织表达 Expression in tumor tissue	优缺点 Advantages and disadvantages
TAA Cancer/testis antigen Differentiation antigen Over-expressed antigen	Minor expression	Higher expression	Advantages: essay assessment of expression profile (RNA-seq, IHC); extensive expression in various tumors Disadvantages: risks of on-target/off-tumor toxicity; peripheral and central tolerance
TSA Viral antigen Neoantigen	Almost non-expression	Exclusive expression	Advantages: low toxicity; targets for personalized immunotherapies; non-tolerance Disadvantages: personal bioinformation is required for target selection

100(glycoprotein 100, gp100)或癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)等属于组织分化抗原。目前已有多款以上述抗原为靶点的TCR-T细胞疗法临床项目正在进行中,相关的文献报道显示出这些TCR-T细胞的临床治疗潜力。2022年, FDA批准Tebentafusp用于治疗HLA-A\*02:01型葡萄膜黑色素瘤成年患者,它是一款融合了靶向gp100的可溶性TCR和抗CD3单链可变片段的增强型TCR蛋白药物,开创了TCR治疗肿瘤的先例<sup>[13]</sup>。然而,由于过表达抗原和组织分化抗原在正常组织中低表达,可能会有非肿瘤靶向毒性(on-target/off-tumor)。在一项亲和力和增强的TCR-T细胞治疗MART-1阳性黑色素瘤的临床试验中,由于TCR-T细胞非特异的识别正常黑色素细胞中低表达的MART-1,导致严重的皮肤、眼部和听觉毒性<sup>[14-16]</sup>。在靶向gp100的TCR-T细胞治疗

黑色素瘤的临床试验中观察到类似的结果。在靶向CEA的TCR-T细胞的临床试验中,3名结肠癌患者中只有1名出现了部分反应,但所有患者都出现了严重炎症性结肠炎等副作用<sup>[17]</sup>。其他的TCR-T治疗靶点,例如胰腺癌中的间皮素,目前正处于临床试验(NCT04809766)阶段<sup>[18]</sup>。

过表达抗原的典型例子是甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)。AFP在正常人体内表达水平极低,但在以肝癌为代表的多种恶性肿瘤中高表达<sup>[19]</sup>。Adaptimmune公司开展的靶向AFP的TCR-T治疗肝癌的临床试验(NCT03132792)结果显示,所有患者的最佳反应均为病情稳定(stable disease, SD);高剂量治疗的患者有1名出现血清AFP水平持续降低,并且完全缓解(complete response, CR),另外2名患者疾病进展,但AFP水平均有下降。尚无T细胞相关的靶向或脱靶

表2 TCR-T治疗实体瘤的临床试验  
Table 2 Clinical trials of TCR-T in solid tumors

抗原类型 Classification of antigens	适应症 Indication	抗原 Antigen	临床应答 Clinical response	副作用 Adverse events
Differentiation antigen	Melanoma	MART-1	2 PR (20-21 m); ORR: 11.8%	None
Differentiation antigen	Melanoma	MART-1	6 PR (3-17 m); ORR: 30%	Skin rash (70%), uveitis (55%), hearing loss (50%)
Differentiation antigen	Melanoma	gp100	1 CR (>14 m), 2 PR (3-4 m); ORR: 18.8%	Skin rash (94%), hearing loss (31%), uveitis (25%)
Differentiation antigen	Melanoma	MART-1	2 PR (4-7 m); ORR: 16.7%	Skin rash (83%), hearing loss (33%), uveitis (17%), CRS (8%)
Cancer/testis antigen	Melanoma, sarcoma	NY-ESO1	2 CR (>20 m), 7 PR (3-18 m); ORR: 52.9%	None
Cancer/testis antigen	Melanoma, sarcoma	NY-ESO1	2 PR (9-51 m); ORR: 20%	CRS (10%)
Cancer/testis antigen	Synovial sarcoma	NY-ESO1	1 CR (8 m), 5 PR (4-18 m); ORR: 50%	CRS (41.7%)
Cancer/testis antigen	Synovial sarcoma	NY-ESO1	9 PR (2-13 m); ORR: 30%	NE
Neoantigen	Synovial sarcoma	KRAS G12D	1 PR (> 6 m); ORR: 100%	None
Viral antigen	HPV <sup>+</sup> tumor	HPV16-E6	2 PR (3-6 m); ORR: 16.7%	None
Viral antigen	HPV <sup>+</sup> tumor	HPV16-E7	6 PR (3-9 m); ORR: 50%	None
Cancer/testis antigen	Non-small-cell carcinoma	MAGE-A10	1 PR (6 m); ORR: 9%	ICANS (9.1%)
Viral antigen	HBV <sup>+</sup> liver tumor	HBV	1 PR (27 m); ORR: 12.5%	Liver toxicity (12.5%)
Neoantigen	Metastatic breast tumor	TP53	1 PR (6 m); ORR: 100%	CRS
Cancer/testis antigen	Multiple tumor	MAGE-A3	1 CR (>15 m), 4 PR (4 to >12m); ORR: 56%	ICANS (33%) (2 deaths)
Cancer/testis antigen	Multiple tumor	MAGE-A3	ORR: 0%	Toxic death (100%)
Cancer/testis antigen	Multiple tumor	MAGE-A3	1 CR (>29 m), 3 PR (4 to >18 m); ORR: 23.5%	Hepatitis (12%)
Cancer/testis antigen	Multiple tumor	MAGE-A4	9 PR (NE); ORR: 23.7%	CRS (50%)
Cancer/testis antigen	Multiple tumor	NY-ESO1	ORR: 0%	None

CR: 完全缓解; PR: 部分缓解; ORR: 客观缓解率; m: 月; NE: 非特异性; CRS: 细胞因子风暴; ICANS: 免疫效应细胞相关的神经毒性综合征; HPV: 人乳头瘤病毒; HBV: 乙型肝炎病毒。

CR: complete responses; PR: partial responses; ORR: objective response rate; m: months; NE: not specified; CRS: cytokine release syndrome; ICANS: immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome; HPV: human papillomavirus; HBV: hepatitis B virus.

毒性的明确报告,也没有方案预设的剂量限制毒性出现,表明靶向AFP的TCR-T疗法安全性良好<sup>[20]</sup>。其他靶点包括人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)<sup>[21]</sup>、人类端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)<sup>[22]</sup>、抗凋亡蛋白如Survivin(也被称为BIRC5)<sup>[23]</sup>等也有研究在进行中。

## 2.2 靶向癌-睾丸抗原

CT抗原在除睾丸和胎盘外的正常组织中不表达,但在多种肿瘤中常有表达,具有高度肿瘤特异性和较强的免疫原性,是一类较为理想的TCR-T细胞治疗靶点。目前已经鉴定了上百种CT抗原,它们分属于MAGE、BAGE、GAGE、SAGE、HAGE、SSX、SCP1、LAGE及NY-ESO-1等十余个基因家族<sup>[24]</sup>。至

今,大多数针对CT抗原的TCR-T细胞临床试验都集中在NY-ESO-1和MAGE-A蛋白家族的成员。

NY-ESO-1是目前研究最多的TCR-T细胞靶点,在临床试验中显示出良好的结果。在软组织肉瘤患者中,靶向NY-ESO-1的TCR-T疗法实现了高达61%的客观缓解率(objective response rate, ORR)<sup>[25]</sup>。在黑色素瘤患者中, NY-ESO-1 TCR-T治疗的ORR范围为20%~60%。在转移性滑膜肉瘤中, NY-ESO-1 TCR-T治疗的ORR为35.7%~66.7%, 3年和5年生存率分别为38%和14%<sup>[25-26]</sup>, 优于程序性死亡1(programmed death receptor 1, PD-1)抑制剂, 后者的ORR仅为10%<sup>[27]</sup>。我国张星教授团队<sup>[28]</sup>针对晚期软组织肉瘤开展的NY-ESO-1 TCR-T治疗的ORR为41.7%。在最近一项小型I期临床试验中,使用CRISPR-Cas9基因编辑工具敲除

NY-ESO-1特异性TCR-T细胞的内源TCR和PD-1, 治疗3名患有不同实体瘤的患者。尽管3名接受治疗的患者均未被观察到临床反应, 但与其他研究NY-ESO-1 TCR-T治疗的试验相比, 经过基因编辑的TCR-T细胞在体内存活的持久性增加<sup>[29]</sup>。

已经在多种肿瘤中展开靶向MAGE家族的TCR-T细胞的临床试验。MORGAN等<sup>[30]</sup>用靶向MAGE-A3的TCR-T细胞治疗了9名实体瘤患者, 获得了56%的ORR(包括1名持续CR), 但导致了严重的神经毒性和2例死亡。回顾性研究发现, MAGE-A3特异性TCR-T细胞也可以识别源自肌连蛋白(TITIN)的表位, TITIN是一种在心肌细胞中表达的蛋白。另一项使用MAGE-A3 TCR-T细胞的临床试验在出现2例治疗相关死亡后暂停<sup>[31]</sup>。最近的研究表明, 靶向MAGE-A3的MHC II类限制性TCR-T显示出更好的临床效果, 在17名实体瘤患者中观察到ORR为25.3%, 无主要毒性<sup>[32]</sup>。

MAGE-A4可用作TCR-T细胞治疗的靶标。靶向MAGE-A4表位的亲和力增强的TCR-T细胞疗法(称为Afami-cel)取得了非常令人鼓舞的结果, 尤其是在肉瘤中。在II期临床试验中, 可评估人群包括33例滑膜肉瘤患者和4例黏液性/圆细胞脂肪肉瘤患者; ORR为39.4%, 疾病控制率为84.8%; 在滑膜肉瘤患者中观察到2个完全缓解病例; 22例患者(59%)出现细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS), 毒性可控<sup>[33-34]</sup>。2024年8月1日, Afami-cel作为首款TCR-T细胞疗法获得美国FDA批准, 用于晚期滑膜肉瘤的治疗, 标志着TCR-T疗法的里程碑式进展<sup>[35]</sup>。此外, ADP-A2M4CD8在Afami-cel的基础上增加了CD8 $\alpha$ 同源二聚体, 用于治疗MAGE-4阳性率较高的其他实体瘤如肺癌、头颈癌、胃食管癌和膀胱癌, 目前正处于临床II期阶段<sup>[36]</sup>。

靶向其他CT抗原[例如KK-LC-1(NCT03778814和NCT05035407<sup>[37]</sup>)或PRAME(NCT03686124<sup>[38]</sup>和NCT02743611)]的TCR-T细胞疗法正处于临床验证阶段, 临床结果尚未公布。

### 2.3 靶向病毒抗原

致癌病毒感染是多种肿瘤发生的重要因素, 病毒诱导的恶性肿瘤约占所有癌症的10%, 包括HPV感染导致的宫颈癌和头颈癌、HBV感染导致的肝癌, 以及EBV感染导致的鼻咽癌等<sup>[39]</sup>。病毒抗原与自身抗原相比, 其免疫原性更高, TCR识别特异性更强,

因此可作为TCR-T细胞治疗的重要靶点。

HPV-E6和HPV-E7抗原是HPV阳性肿瘤治疗中具有吸引力的靶点。在一项使用HPV16-E6 TCR-T细胞治疗转移性HPV相关上皮癌的I期/II期临床试验(NCT02280811)中, 2名患者实现了部分缓解, 4名患者表现为SD, 所有患者均未出现TCR-T细胞输注或细胞因子风暴导致的毒性反应<sup>[40]</sup>。在另一项使用HPV16-E7 TCR-T细胞治疗HPV阳性肿瘤的临床试验中, 在接受了TCR-T细胞输注治疗的12名患者中, 有6名患者表现出客观的肿瘤缓解, 其中3名患者表现出一个或多个肿瘤完全消退<sup>[41]</sup>。这两项研究均取得了积极的临床研究结果, 展现了TCR-T疗法在治疗HPV阳性肿瘤中潜在的应用前景。

HBV感染是导致肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要原因, TCR-T细胞疗法在HBV相关HCC治疗中展现了潜在的应用前景。2019年报道了2例HBV相关HCC患者在接受了HBV抗原特异性TCR-T细胞治疗后, 患者血清肿瘤标志物AFP水平都显著降低, 其中1例患者的6个肺部转移病灶中有5个显著缩小<sup>[42]</sup>。随后由王福生院士团队<sup>[43]</sup>开展的靶向HBV抗原的特异性TCR-T细胞(LioCyx-M004)治疗HCC的I期临床试验(NCT03899415), 评估了LioCyx-M004对8名HLA-A\*02:01和HLA-CW\*08:01基因型的晚期HBV相关HCC患者的疗效和安全性。1名患者实现了持续27.7个月的部分缓解, 另外有3名受试者达到SD状态, 其中2例SD分别维持了3个月和9.4个月; 受试者总生存期(overall survival, OS)中位数为33.1个月<sup>[43]</sup>。这些结果表明, HBV特异性TCR-T细胞具有良好的抗病毒能力和体内耐受性。

在临床上对靶向其他病毒抗原的TCR-T细胞疗法进行了测试, 例如MCPyV特异性TCR-T细胞治疗PD-1抑制剂难治性转移性默克尔细胞癌的初步结果显示ORR为25%, 5例患者中有1例表现出混合反应<sup>[44]</sup>。在采用分泌PD-1抗体的靶向EBV的TCR-T细胞治疗晚期鼻咽癌患者的I/II期临床试验(NCT04139057)中, 接受治疗的6名患者中有2例患者(33.3%)被评为PR, 其中1例患者的缓解持续时间长达9个月; 3例患者评为SD; 对于所有患者, 药代动力学分析显示, 外周血中的TCR-T细胞水平在输注后3~14天达到峰值, 最长持续时间为180天<sup>[45]</sup>。其他一些靶向EBV的TCR-T细胞治疗EBV相关鼻咽癌的临床试验(NCT03925896、NCT04509726、

NCT03648697)也在进行中。

## 2.4 靶向突变新抗原

肿瘤突变新抗原是由肿瘤起始遗传事件或整体遗传不稳定性相关的非同义突变引起的<sup>[46]</sup>。这些突变抗原产生的新表位能被特定人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)分子递呈,并在不同患者之间共享。

*KRAS*基因是至今研究最为清楚的肿瘤驱动基因之一,*KRAS*突变发生在多种肿瘤包括90%的胰腺导管腺癌<sup>[47]</sup>、40%的结直肠癌<sup>[48]</sup>、20%~40%的肺癌<sup>[49]</sup>、30%的非小细胞肺癌<sup>[50]</sup>和3%~5%的鳞状细胞癌<sup>[49]</sup>中,目前被作为TCR-T治疗靶点研究最多的是G12D和G12V。ROSENBERG团队<sup>[51]</sup>报道了靶向*KRAS*-G12D突变抗原的特异性TCR-T细胞治疗1名转移性胰腺癌患者的积极临床研究结果,治疗后第6个月患者的肿瘤病灶消失了72%,回输的TCR-T细胞占患者所有循环外周血T细胞的2%以上,没有毒性描述。靶向*KRAS*-G12V突变的TCR-T细胞也处于临床试验(NCT03190941)中<sup>[52]</sup>。

在一项靶向*TP53*突变的TCR-T细胞临床研究中,1例乳腺癌患者在接受了*p53*-R175H突变特异性的TCR-T细胞治疗后,出现了毒性有限的部分反应。然而,由于MHC I类分子表达缺失,导致患者病情在6个月后进展<sup>[53-54]</sup>。此外,有研究筛选并鉴定出识别HLA-A\*03:01患者共享的PIK3CA-Mut公共新抗原的TCR。工程化的PIK3CA-Mut特异性TCR-T细胞在携带PIK3CA-Mut肿瘤的小鼠中显示出显著的抗肿瘤活性,而在野生型PIK3CA肿瘤中则没有<sup>[55]</sup>。总之,这些结果表明了使用TCR-T细胞疗法靶向突变癌症驱动因子的新抗原的临床意义。

## 3 TCR-T细胞治疗的障碍

### 3.1 非特异性细胞毒性

临床上已描述了与TCR-T细胞治疗相关的几种毒性。首先是非肿瘤靶向毒性,这与靶抗原(主要是TAAs)在正常组织中的表达有关。在以MART-1和gp100为靶点的TCR-T细胞疗法的临床试验中发生眼部、皮肤和听觉毒性,是由于黑素细胞中表达TAA所致的<sup>[14-15]</sup>。另一项研究发现在以CEA为靶标的TCR-T细胞治疗的患者中出现的严重急性结肠炎,原因是CEA在正常肠道细胞中的表达<sup>[17]</sup>。其次是脱靶且靶向非肿瘤细胞(off-target/off-tumor)毒性,即

TCR识别正常细胞上与靶抗原不同的抗原。如前所述,在靶向MAGE-A3的亲力和增强型TCR-T细胞的临床试验中,TCR-T细胞也能识别来自MAGE-A12或TITIN蛋白的表位,导致4名患者死亡<sup>[30-31,56]</sup>。此外,外源TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链可分别与内源TCR $\beta$ 和TCR $\alpha$ 链配对,从而产生新的和具有潜在交叉反应能力的TCR<sup>[57]</sup>。

### 3.2 T细胞耗竭和功能障碍

由于持续的肿瘤抗原刺激,肿瘤特异性T细胞会逐渐失去效应功能,缺失记忆T细胞特征,这一现象被称为T细胞耗竭。耗竭的T细胞的特点是效应功能丧失,抑制性受体表达增高且持续表达,共刺激分子CD28丢失,表观遗传和代谢方式改变等<sup>[58]</sup>。TCR-T细胞疗法的临床试验中面临的主要障碍之一是被回输的T细胞存活时间短,这与T细胞的快速耗竭有关<sup>[59]</sup>。除了慢性的TCR刺激外,在肿瘤微环境中还有多种免疫抑制因素会影响T细胞分化并驱动T细胞耗竭发生,包括细胞因子环境、营养剥夺和暴露于免疫抑制分子。肿瘤微环境中的Treg、MDSC和TAM等免疫抑制细胞,通过分泌IL-10、IL35和TGF- $\beta$ 等免疫抑制因子<sup>[60-61]</sup>、高表达PD-L1和低表达共刺激配体等<sup>[62-63]</sup>,共同促进T细胞耗竭。此外,肿瘤微环境中高水平的精氨酸酶<sup>[64]</sup>和吲哚胺-吡咯2,3-双加氧酶<sup>[65-66]</sup>,会导致精氨酸和色氨酸等的缺失,可能进一步损害T细胞的代谢适应性,并改变T细胞的激活和分化程序。

### 3.3 肿瘤免疫逃逸

肿瘤细胞直接逃逸免疫监视机制之一是肿瘤细胞上MHC I类分子的缺失或减少,从而阻止TCR-T细胞识别目标表位。MHC I类分子表达的缺失可由不同机制导致,包括HLA基因本身的缺失或突变、 $\beta$ -2-微球蛋白或参与抗原递呈的基因突变、杂合性缺失或肿瘤细胞中HLA基因的表现遗传沉默。有两项临床试验描述了HLA杂合性缺失(HLA LOH),使用的是针对*KRAS*<sup>[67]</sup>或*p53*<sup>[68]</sup>突变新表位的特异性TIL。另一项针对乳腺癌患者*p53*突变的临床试验显示,TCR-T细胞治疗6个月后肿瘤复发,肿瘤细胞表达完整的*p53*,并出现含有HLA-A\*02:01基因座的6号染色体杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)<sup>[54]</sup>。在一项临床试验中也描述了HLA基因的表现遗传沉默,复发后肿瘤测序未检测到HLA突变或LOH,但使用去甲基化药物5-氮胞苷处理后,HLA分子的表达得以

恢复<sup>[69]</sup>。在一项使用靶向HPV16-E7抗原的TCR-T细胞治疗无反应或复发的肿瘤患者的临床试验中,也显示出肿瘤组织HLA-A\*02:01表达受损<sup>[41]</sup>。此外,由于对肿瘤抗原的免疫应答导致肿瘤细胞表面抗原减少或丢失,也会使肿瘤细胞得以逃避宿主的免疫攻击。

共刺激分子的缺乏也是肿瘤逃逸的原因之一。越来越多的研究表明,共刺激分子作为第二信号对T细胞充分活化具有重要的作用。而肿瘤细胞几乎不表达共刺激分子,因此,即使肿瘤细胞能直接提呈肿瘤抗原给T细胞,也不能充分激活T细胞,导致T细胞免疫无应答甚至诱导耐受<sup>[70]</sup>。

## 4 TCR-T细胞疗法的优化策略

### 4.1 毒性预测增强TCR-T疗法的安全性

临床前水平评估TCR交叉反应的策略至关重要,尤其是当TCR序列经过修饰时。交叉反应表位的初步评估可先进行丙氨酸扫描<sup>[23,71]</sup>或突变定位扫描(X-scan)<sup>[72]</sup>,对在人类蛋白质组中潜在的交叉反应肽进行排查。此外,还有研究开发出了评估TCR交叉反应的无偏方法。位置扫描合成组合库(positional scanning synthetic combinatorial libraries, PS-SCLs)由数万亿个肽组成,每一个天然多肽都固定多个连续的氨基酸不变,其余位点由其他19种氨基酸随机组合而成<sup>[73-75]</sup>。然后将PS-SCLs筛选结果与蛋白质数据库进行比较,以预测潜在的交叉反应表位。其他方法,如评估原代细胞系的TCR-T细胞细胞毒性<sup>[72]</sup>或评估不同组织中原位pMHC复合物的存在(免疫肽组学和基于TCR的组织学分析),也可能有助于预测毒性。

针对外源性TCR可能与内源性TCR错配的问题,研究者提出了不同的解决方案。有报道将人类TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链的恒定区被相应的鼠类TCR $\alpha$ 和TCR $\beta$ 链的恒定区取代能避免错误配对,而且在临床上不会导致毒性<sup>[76]</sup>。利用CRISPR-Cas9技术在内源TRAC基因座上敲入外源TCR,不仅可规避配对错误的问题,也可防止CD3复合物与内源性TCR竞争性结合<sup>[77-78]</sup>。类似地,另一个研究报道运用另一种基因编辑技术——锌指核酸酶技术,也同样能成功地将HLA-A\*02:01/NY-ESO-1特异性TCR转入TRAC基因座<sup>[79]</sup>。其他的方案包括保守区少量氨基酸替换<sup>[80]</sup>、密码子优化<sup>[81]</sup>、增加二硫键<sup>[82-83]</sup>、加入疏水突变<sup>[84]</sup>、

去除N-糖基化位点<sup>[85]</sup>、TCR结构域互换<sup>[86]</sup>、将转基因TCR表达为TCR-CD3 $\zeta$ 融合蛋白<sup>[87]</sup>、使用单链TCR格式<sup>[88-89]</sup>以及可变区框架突变<sup>[90]</sup>等。

### 4.2 降低耗竭增强TCR-T细胞有效性

普遍认为回输具有干细胞记忆表型的工程T细胞(stem cell-like memory T cells, Tscm)可提高T细胞在体内的持久性和长期抗肿瘤疗效<sup>[91]</sup>。为了使TCR-T产品含有更多Tscm,可以从naïve T细胞开始优化培养条件在体外分化和扩增Tscm<sup>[92]</sup>。在T细胞扩增过程中,向培养基中补充IL-7和IL-15可促进中枢记忆表型的产生并增强抗肿瘤功能<sup>[93]</sup>;研究发现,IL-7可诱导记忆T细胞表达甘油通道AQP9(aquaporin 9),AQP9能摄取甘油用于脂肪酸酯化和合成甘油三酯,有利于T细胞存活<sup>[94]</sup>。其他研究表明,IL-21与IL-15在增强细胞功能和抗肿瘤效果方面具有协同潜力<sup>[95-96]</sup>;在IL-21培养基中培养的T细胞脂肪酸氧化作用强于糖酵解作用,在扩增过程中偏向于保持Tscm表型<sup>[97]</sup>。综上,在培养基中补充细胞因子可对T细胞代谢和表型产生深远影响,并可用于产生自我更新和分化能力更强的细胞群。迄今为止,细胞治疗领域还没有统一的扩增培养基条件。通过调整关键代谢物的水平来优化扩增条件,可以产生出在肿瘤微环境中更持久的细胞产品,并使其在免疫抑制条件下保留更多的抗肿瘤功能。

在免疫检测点引起的耗竭方面,TCR-T细胞与ICIs联合治疗可以避免T细胞衰竭。例如,在一项针对p53新抗原的临床试验中,部分患者在输注后被观察到高比例的PD-1<sup>+</sup>抗原特异性T细胞<sup>[54]</sup>,随后给予pembrolizumab治疗。在一项旨在治疗EBV相关头颈部鳞状细胞癌的临床试验中,对分泌抗PD-1抗体的TCR-T细胞进行了测试。还有临床报道通过CRISPR-Cas9技术敲除PDCDI基因(编码PD1)同样可增强TCR-T细胞的抗肿瘤免疫力<sup>[29]</sup>。类似地,通过基因编辑把IL-12插入到PDCDI基因中使其诱导性表达以增强TCR-T细胞功能也在小鼠模型上得到验证<sup>[98]</sup>。

此外,共刺激分子和细胞因子在抑制T细胞耗竭过程中也有重要作用。仅是共表达全长4-1BB就能增加TCR-T细胞的细胞因子分泌水平、增殖能力和持久性,从而增强其抗肿瘤活性<sup>[99]</sup>。在CD3 $\zeta$ 的C-端融合CD28或4-1BB胞内域也同样可提高TCR-T细胞在体外和体内的活率和扩增能力<sup>[100-101]</sup>。某些

细胞因子信号对 TCR-T 细胞也起积极作用, 有研究报道过表达 IL-7 和 CCL-19 可促进 TCR-T 细胞长期记忆的形成, 增强 TCR-T 细胞的抗肿瘤功效, 并在与抗 PD-1 抗体治疗联合时能产生更好的免疫响应<sup>[102]</sup>。最近由我国侯金林团队<sup>[103]</sup>报道的表达自激活 IL-21 受体的 TCR-T 在接受肿瘤抗原刺激时能够维持更多的干细胞样特征以及更低的耗竭水平。

### 4.3 基因改造修饰拮抗肿瘤微环境抑制

为了克服肿瘤细胞下调 HLA 表达引起的免疫逃逸, 研究者们开发了不同的方法来提高 TCR 对低密度抗原的识别能力, 如 TCR 上 pMHC 识别位点的随机突变、噬菌体展示, 或通过人源化小鼠筛选高亲和力的 TCR。然而, 提高 TCR 亲和力是一把双刃剑<sup>[104]</sup>。亲和力过强的 TCR 可能会导致 T 细胞在识别目标抗原后提早衰竭, 从而限制对肿瘤细胞的连续识别。逆锁键(catch bond)理论有助于克服以上问题, ZHAO 等<sup>[105]</sup>揭示逆锁键工程可以获得高效力、低亲和力的 TCR, 能调节 TCR 信号强度且不引入脱靶毒性。然而, 单一的 TCR 修饰并不足以使 T 细胞的抗肿瘤活性最大化。

实体肿瘤微环境通过多种复杂的机制协同抑制 T 细胞杀伤肿瘤的效能, 从调控 T 细胞浸润、功能、分化、凋亡和耗竭等多个方面影响 T 细胞攻击肿瘤的能力。2014 年, *Nature* 上发表的第一个在体内肿瘤微环境中对 T 细胞进行高通量 shRNA 文库筛选的研究结果, 揭示了大量肿瘤微环境调控 T 细胞的信号通路和关键的基因靶点, 为通过基因改造修饰提高 T 细胞抵抗实体肿瘤微环境能力提供了新的思路和方法<sup>[106]</sup>。然而, 近年来通过靶向 1~2 个信号通路来提高 TCR-T、CAR-T 治疗实体肿瘤疗效的方案, 并未取得令人满意的结果。这体现了实体肿瘤微环境免疫抑制机制的复杂性和多重性。因此, 未来可能需要通过同时靶向多个关键的信号通路和靶点, 才有可能全面提高 TCR-T、CAR-T 细胞治疗实体肿瘤的效能。

## 5 个性化 TCR-T 细胞治疗实体瘤

由于肿瘤基因突变是随机发生的, 大部分肿瘤特异性抗原是每个患者所特有的, 传统的 TCR-T 细胞治疗开发流程受到限制, 因此个性化 TCR-T 细胞疗法的开发具有重要意义。

2022 年, 中山大学肿瘤防治中心周鹏辉教授团队<sup>[107]</sup>通过单细胞 mRNA 测序 (scRNA-seq) 和 TCR

测序 (TCR-seq) 等方法鉴定和表征了肿瘤中识别肿瘤新生抗原的 T 细胞, 发现了肿瘤新生抗原特异 T 细胞特有的分子标志物, 并建立了准确鉴定和快速分离肿瘤新生抗原特异 T 细胞的方法。该方法能准确鉴定并进一步克隆这些肿瘤特异性 T 细胞的 TCR 并用于生成个性化的 TCR-T 细胞, 能够特异靶向患者的肿瘤抗原, 并有效治疗患者来源的异种移植瘤 (patient-derived xenograft, PDX)。该疗法目前已处于 IIT 临床试验 (NCT03891706) 中, 以进一步验证其安全性和有效性。同期, MANDL 团队<sup>[108]</sup>报道了一项使用 CRISPR 基因编辑创建个性化 TCR-T 细胞治疗的临床试验结果。该研究分别从 16 名受试者的血液中分离、克隆和验证新抗原特异性 TCR。之后将新抗原特异性 TCR 导入患者自身 T 细胞, 同时删除内源性 TCR 基因制备成 TCR-T 细胞。5 例患者表现为 SD, 其他 11 例患者出现疾病进展。这种个性化的 TCR-T 疗法与抗 PD-1 抗体的联合治疗目前正处于临床试验 (NCT03970382<sup>[109]</sup> 和 NCT04520711) 中。ROSENBERG 团队<sup>[110]</sup>也公布了一项个性化新抗原 TCR-T 细胞治疗转移性结直肠癌的 II 期临床试验 (NCT03412877) 中期结果。接受治疗的 7 名患者中, 有 3 名患者出现短期的 PR, 包括肝脏、肺部和淋巴结的转移病灶缩小, 中位无进展生存期为 4.6 个月。尽管这些个性化 TCR-T 疗法的临床获益有限, 但这些研究证明了个性化 TCR-T 细胞疗法的可行性, 并为后续开发优化的个性化 TCR-T 细胞疗法提供了更多依据。此外, 近期发表的一篇研究论文表示, 从 scRNA-seq 数据中预测肿瘤反应性 T 细胞受体可实现个性化 T 细胞疗法。该研究结合高通量 TCR 克隆和反应性验证来训练 predicTCR, 能根据单个 TIL 的 RNA-seq 识别单个肿瘤反应性 TIL<sup>[111]</sup>。与以前基于基因组富集的方法相比, predicTCR 能更好地识别不同癌症 TIL 中的肿瘤反应性 TCR, 将特异性和灵敏度 (几何平均数) 从 0.38 提高到 0.74。利用这种方法能在短短几天内预测肿瘤反应性 TCR, 并确定 TCR 克隆型的优先次序, 从而加快个性化 T 细胞疗法的生产。

## 6 结论和展望

过继性细胞疗法的出现开创了肿瘤免疫治疗的新时代, TCR-T 细胞疗法以其独特的优势, 成为了实体瘤治疗的重要手段之一, 但其广泛应用仍需要深入的基础研究作为支撑。在这篇综述中, 我们展



示了TCR-T细胞疗法在临床中的表现,总结和重新审视了目前仍面临的诸多挑战以及可能的应对策略,为进一步增加TCR-T细胞疗法的临床获益提供了参考。随着肿瘤免疫学和基因工程技术的进步,TCR-T细胞疗法与免疫检查点抑制剂、细胞因子、靶向特定受体的单抗以及APC疫苗等免疫治疗方法相结合,可能会有利于改善肿瘤微环境、增强T细胞的持久性、延缓T细胞的耗竭,从而提高TCR-T细胞的疗效。此外,涉及多基因敲除和个体化治疗的新的基因工程方法将进一步增加TCR-T细胞的治疗潜力,降低TCR-T疗法的毒性风险。可以预期,在未来TCR-T细胞疗法将成为实体瘤治疗的重要组成部分,为巨大的治疗需求提供解决方案。

### 参考文献 (References)

- [1] MALLET M, BOULOS R E, ALCAZER V, et al. Tumour burden and antigen-specific T cell magnitude represent major parameters for clinical response to cancer vaccine and TCR-engineered T cell therapy [J]. *Eur J Cancer*, 2022, 171: 96-105.
- [2] ROSENBERG S A, SPIESS P, LAFRENIERE R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *Science*, 1986, 233(4770): 1318-21.
- [3] MANFREDI F, CIANCIOTTI B C, POTENZA A, et al. TCR redirected T cells for cancer treatment: achievements, hurdles, and goals [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1689.
- [4] HOLSTEIN S A, LUNNING M A. CAR T-cell therapy in hematologic malignancies: a voyage in progress [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 107(1): 112-22.
- [5] ANTONANA-VILDOSOLA A, ZANETTI S R, PALAZON A. Enabling CAR-T cells for solid tumors: rage against the suppressive tumor microenvironment [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2022, 370: 123-47.
- [6] RODRIGUEZ-GARCIA A, PALAZON A, NOGUERA-ORTEGA E, et al. CAR-T cells hit the tumor microenvironment: strategies to overcome tumor escape [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1109.
- [7] DONG D, ZHENG L, LIN J, et al. Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex [J]. *Nature*, 2019, 573(7775): 546-52.
- [8] ROSSJOHN J, GRAS S, MILES J J, et al. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 169-200.
- [9] GAO G F, RAO Z, BELL J I. Molecular coordination of alphabeta T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(8): 408-13.
- [10] CHANDRAN S S, KLEBANOFF C A. T cell receptor-based cancer immunotherapy: emerging efficacy and pathways of resistance [J]. *Immunol Rev*, 2019, 290(1): 127-47.
- [11] WU L, WEI Q, BRZOSTEK J, et al. Signaling from T cell receptors (TCRs) and chimeric antigen receptors (CARs) on T cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(6): 600-12.
- [12] ZHAO Q, JIANG Y, XIANG S, et al. Engineered TCR-T cell immunotherapy in anticancer precision medicine: pros and cons [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 658753.
- [13] DHILLON S. Tebentafusp: first approval [J]. *Drugs*, 2022, 82(6): 703-10.
- [14] CHODON T, COMIN-ANDUIX B, CHMIELEWSKI B, et al. Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(9): 2457-65.
- [15] 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): 535-46.
- [16] ROHAAN M W, GOMEZ-EERLAND R, VAN DEN BERG J H, et al. MART-1 TCR gene-modified peripheral blood T cells for the treatment of metastatic melanoma: a phase I/IIa clinical trial [J]. *Immunooncol Technol*, 2022, 15: 100089.
- [17] 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): 620-6.
- [18] CHIOREAN E G, CHAPUIS A, COVELER A L, et al. Phase I study of autologous transgenic T cells expressing high affinity mesothelin-specific T-cell receptor (TCR; FH-TCR TMSLN) in patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (mPDA) [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(4\_suppl): TPS779.
- [19] MONTAL R, ANDREU-OLLER C, BASSAGANYAS L, et al. Molecular portrait of high alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: implications for biomarker-driven clinical trials [J]. *Br J Cancer*, 2019, 121(4): 340-43.
- [20] RODDY H, MEYER T, RODDIE C. Novel cellular therapies for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers*, 2022, 14(3): 504.
- [21] MEYERHUBER P, CONRAD H, STARCK L, et al. Targeting the epidermal growth factor receptor (HER) family by T cell receptor gene-modified T lymphocytes [J]. *J Mol Med*, 2010, 88(11): 1113-21.
- [22] ZHANG Y, LI Y. T cell receptor-engineered T cells for leukemia immunotherapy [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 2.
- [23] ARBER C, FENG X, ABHYANKAR H, et al. Survivin-specific T cell receptor targets tumor but not T cells [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 157-68.
- [24] GORDEEVA O. Cancer-testis antigens: unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 53: 75-89.
- [25] ROBBINS P F, KASSIM S H, TRAN T L, 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 [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(5): 1019-27.
- [26] 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): 917-24.
- [27] TAWBI H A, BURGESS M, BOLEJACK V, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(11): 1493-501.
- [28] PAN Q, WENG D, LIU J, et al. Phase I clinical trial to assess

- safety and efficacy of NY-ESO-1-specific TCR T cells in HLA-A\*02:01 patients with advanced soft tissue sarcoma [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(8): 101133.
- [29] STADTMAUER E A, FRAIETTA J A, DAVIS M M, et al. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer [J]. *Science*, 2020, 367(6481): eaba7365.
- [30] 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*, 2013, 36(2): 133-51.
- [31] 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): 863-71.
- [32] LU Y C, PARKER L L, LU T, et al. Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor targeting the cancer germline antigen MAGE-A3 [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(29): 3322-9.
- [33] HONG D S, VAN TINE B A, BISWAS S, et al. Autologous T cell therapy for MAGE-A4<sup>+</sup> solid cancers in HLA-A\*02<sup>+</sup> patients: a phase 1 trial [J]. *Nat Med*, 2023, 29(1): 104-14.
- [34] D'ANGELO S P, ARAUJO D M, ABDUL RAZAK A R, et al. Afamitresgene autoleucel for advanced synovial sarcoma and myxoid round cell liposarcoma (SPEARHEAD-1): an international, open-label, phase 2 trial [J]. *Lancet*, 2024, 403(10435): 1460-71.
- [35] MULLARD A. FDA approves first TCR-engineered T cell therapy, for rare soft-tissue cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(10): 731.
- [36] MOORE K, OAKNIN A, RAY-COQUARD I, et al. A phase 2 study (GOG-3084) of ADP-A2M4CD8 TCR T-cell therapy, alone or in combination with nivolumab, in patients with recurrent ovarian cancers [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2023, 33(Suppl 3): A407.
- [37] NORBERG S, VON EUW E M, PARRY G, et al. A phase I trial of T-cell receptor gene therapy targeting KK-LC-1 for gastric, breast, cervical, lung and other KK-LC-1 positive epithelial cancers [J]. *J Clin Oncol*, 40(16\_suppl): TPS2678.
- [38] WERMKE M, ALSDORF W, ARAUJO D, et al. Abstract PR018: IMA203 TCR-T targeting PRAME demonstrates potent anti-tumor activity in patients with different types of metastatic solid tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2023, 22(12\_Supplement): PR018.
- [39] ZAPATKA M, BOROZAN I, BREWER D S, et al. The landscape of viral associations in human cancers [J]. *Nat Genet*, 2020, 52(3): 320-30.
- [40] DORAN S L, STEVANOVIC 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): 2759-68.
- [41] 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): 419-25.
- [42] 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): 1862-76, e9.
- [43] MENG F, ZHAO J, TAN A T, et al. Immunotherapy of HBV-related advanced hepatocellular carcinoma with short-term HBV-specific TCR expressed T cells: results of dose escalation, phase I trial [J]. *Hepatology*, 2021, 15(6): 1402-12.
- [44] VEATCH J, PAULSON K, ASANO Y, et al. Merkel polyoma virus specific T-cell receptor transgenic T-cell therapy in PD-1 inhibitor refractory Merkel cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 40(16\_suppl): 9549.
- [45] JIA Q, PENG L, CHEN G, et al. TCR-T cells armored with immune checkpoint blockade in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma: the first-in-human phase 1/2 trial [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(16\_suppl): 6047.
- [46] KAST F, KLEIN C, UMANA P, et al. Advances in identification and selection of personalized neoantigen/T-cell pairs for autologous adoptive T cell therapies [J]. *Oncoimmunology*, 2021, 10(1): 1869389.
- [47] PIRLOG R, CALIN G A. KRAS mutations as essential promoters of lymphangiogenesis via extracellular vesicles in pancreatic cancer [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(14): e161454.
- [48] ZHU G, PEI L, XIA H, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 143.
- [49] RECK M, CARBONE D P, GARASSINO M, et al. Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches [J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(9): 1101-10.
- [50] ARBOUR K C, RIZVI H, PLODKOWSKI A J, et al. Treatment outcomes and clinical characteristics of patients with KRAS-G12C-mutant non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(8): 2209-15.
- [51] LEIDNER R, SANJUAN SILVA N, HUANG H, et al. Neoantigen T-cell receptor gene therapy in pancreatic cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(22): 2112-9.
- [52] BROWN T J, REISS K A, O'HARA M H. Advancements in systemic therapy for pancreatic cancer [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2023, 43: e397082.
- [53] MALEKZADEH P, PASETTO A, ROBBINS P F, et al. Neoantigen screening identifies broad TP53 mutant immunogenicity in patients with epithelial cancers [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 1109-14.
- [54] KIM S P, VALE N R, ZACHARAKIS N, et al. Adoptive cellular therapy with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and T-cell receptor-engineered T cells targeting common p53 neoantigens in human solid tumors [J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(8): 932-46.
- [55] CHANDRAN S S, MA J, KLATT M G, et al. Immunogenicity and therapeutic targeting of a public neoantigen derived from mutated PIK3CA [J]. *Nat Med*, 2022, 28(5): 946-57.
- [56] CAMERON B J, GERRY A B, DUKES J, et al. Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(197): 197ra03.
- [57] VAN LOENEN M M, DE BOER R, AMIR A L, et al. Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoreactivity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(24): 10972-7.
- [58] BAESSLER A, VIGNALI D A A. T cell exhaustion [J]. *Annu Rev Immunol*, 2024, 42(1): 179-206.
- [59] CHAPUIS A G, ROBERTS I M, THOMPSON J A, et al. T-cell

- therapy using interleukin-21-primed cytotoxic T-cell lymphocytes combined with cytotoxic T-cell lymphocyte antigen-4 blockade results in long-term cell persistence and durable tumor regression [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(31): 3787-95.
- [60] MIRLEKAR B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF-beta, IL-4, and IL-35: its implications in cancer immunotherapy [J]. *SAGE Open Med*, 2022, 10: 20503121211069012.
- [61] PROPPER D J, BALKWILL F R. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(4): 237-53.
- [62] NOMAN M Z, DESANTIS G, JANJI B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation [J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5): 781-90.
- [63] YI J S, COX M A, ZAJAC A J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion [J]. *Immunology*, 2010, 129(4): 474-81.
- [64] MARULLO R, CASTRO M, YOMTOUBIAN S, et al. The metabolic adaptation evoked by arginine enhances the effect of radiation in brain metastases [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(45): eabg1964.
- [65] PATASKAR A, CHAMPAGNE J, NAGEL R, et al. Tryptophan depletion results in tryptophan-to-phenylalanine substituents [J]. *Nature*, 2022, 603(7902): 721-7.
- [66] ZHAI L, SPRANGER S, BINDER D C, et al. Molecular pathways: targeting IDO1 and other tryptophan dioxygenases for cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(24): 5427-33.
- [67] 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): 2255-62.
- [68] 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): 534-43.
- [69] PAULSON K G, VOILLET V, MCAFEE M S, et al. Acquired cancer resistance to combination immunotherapy from transcriptional loss of class I HLA [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3868.
- [70] GILES J R, GLOBIG A M, KAECH S M, et al. CD8<sup>+</sup> T cells in the cancer-immunity cycle [J]. *Immunity*, 2023, 56(10): 2231-53.
- [71] JARAVINE V, MOSCH A, RAFFEGGERST S, et al. Exptope 2.0: a tool to assess immunotherapeutic antigens for their potential cross-reactivity against naturally expressed proteins in human tissues [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 892.
- [72] BORDER E C, SANDERSON J P, WEISSENSTEINER T, et al. Affinity-enhanced T-cell receptors for adoptive T-cell therapy targeting MAGE-A10: strategy for selection of an optimal candidate [J]. *Oncoimmunology*, 2019, 8(2): e1532759.
- [73] NINO-VASQUEZ J J, ALLICOTTI G, BORRAS E, et al. A powerful combination: the use of positional scanning libraries and biometrical analysis to identify cross-reactive T cell epitopes [J]. *Mol Immunol*, 2004, 40(14/15): 1063-74.
- [74] RUBIO-GODOY V, DUTOIT V, ZHAO Y, et al. Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL [J]. *J Immunol*, 2002, 169(10): 5696-707.
- [75] PINILLA C, RUBIO-GODOY V, DUTOIT V, et al. Combinatorial peptide libraries as an alternative approach to the identification of ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 5153-60.
- [76] COHEN C J, ZHAO Y, ZHENG Z, et al. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8878-86.
- [77] LEGUT M, DOLTON G, MIAN A A, et al. CRISPR-mediated TCR replacement generates superior anticancer transgenic T cells [J]. *Blood*, 2018, 131(3): 311-22.
- [78] ROTH T L, PUIG-SAUS C, YU R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting [J]. *Nature*, 2018, 559(7714): 405-9.
- [79] MASTAGLIO S, GENOVESE P, MAGNANI Z, et al. NY-ESO-1 TCR single edited stem and central memory T cells to treat multiple myeloma without graft-versus-host disease [J]. *Blood*, 2017, 130(5): 606-18.
- [80] SOMMERMEYER D, UCKERT W. Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells [J]. *J Immunol*, 2010, 184(11): 6223-31.
- [81] SCHOLTEN K B, KRAMER D, KUETER E W, et al. Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells [J]. *Clin Immunol*, 2006, 119(2): 135-45.
- [82] COHEN C J, LI Y F, EL-GAMIL M, et al. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8): 3898-903.
- [83] KUBALL J, DOSSETT M L, WOLFL M, et al. Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells [J]. *Blood*, 2007, 109(6): 2331-8.
- [84] HAGA-FRIEDMAN A, HOROVITZ-FRIED M, COHEN C J. Incorporation of transmembrane hydrophobic mutations in the TCR enhance its surface expression and T cell functional avidity [J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5538-46.
- [85] KUBALL J, HAUPTROCK B, MALINA V, et al. Increasing functional avidity of TCR-redirectioned T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(2): 463-75.
- [86] BETHUNE M T, GEE M H, BUNSE M, et al. Domain-swapped T cell receptors improve the safety of TCR gene therapy [J]. *eLife*, 2016, 5: e19095.
- [87] SEBESTYEN Z, SCHOOTEN E, SALS T, et al. Human TCR that incorporate CD3zeta induce highly preferred pairing between TCRalpha and beta chains following gene transfer [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7736-46.
- [88] WILLEMSSEN R A, WEIJTENS M E, RONTELTAP C, et al. Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(16): 1369-77.
- [89] STONE J D, HARRIS D T, SOTO C M, et al. A novel T cell receptor single-chain signaling complex mediates antigen-specific T cell activity and tumor control [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2014, 63(11): 1163-76.
- [90] THOMAS S, MOHAMMED F, REIJMERS R M, et al. Framework engineering to produce dominant T cell receptors with enhanced antigen-specific function [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4451.
- [91] GATTINONI L, LUGLI E, JI Y, et al. A human memory T cell

- subset with stem cell-like properties [J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1290-7.
- [92] 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): 573-84.
- [93] CHA E, GRAHAM L, MANJILI M H, et al. IL-7 + IL-15 are superior to IL-2 for the *ex vivo* expansion of 4T1 mammary carcinoma-specific T cells with greater efficacy against tumors *in vivo* [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 122(2): 359-69.
- [94] CUI G, STARON M M, GRAY S M, et al. IL-7-induced glycerol transport and TAG synthesis promotes memory CD8<sup>+</sup> T cell longevity [J]. *Cell*, 2015, 161(4): 750-61.
- [95] ZENG R, SPOLSKI R, FINKELSTEIN S E, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8<sup>+</sup> T cell expansion and function [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(1): 139-48.
- [96] LI Y, CONG Y, JIA M, et al. Targeting IL-21 to tumor-reactive T cells enhances memory T cell responses and anti-PD-1 antibody therapy [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 951.
- [97] LOSCHINSKI R, BOTTCHE M, STOLL A, et al. IL-21 modulates memory and exhaustion phenotype of T-cells in a fatty acid oxidation-dependent manner [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(17): 13125-38.
- [98] KIM S, PARK C I, LEE S, et al. Reprogramming of IL-12 secretion in the PDCD1 locus improves the anti-tumor activity of NY-ESO-1 TCR-T cells [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1062365.
- [99] DANIEL-MESHULAM I, HOROVITZ-FRIED M, COHEN C J. Enhanced antitumor activity mediated by human 4-1BB-engineered T cells [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(12): 2903-13.
- [100] LAH S, KIM S, KANG I, et al. Engineering second-generation TCR-T cells by site-specific integration of TRAF-binding motifs into the CD247 locus [J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(4): e005519.
- [101] MIYAO K, TERAOKA S, OKUNO S, et al. Introduction of genetically modified CD3zeta improves proliferation and persistence of antigen-specific CTLs [J]. *Cancer Immunol Res*, 2018, 6(6): 733-44.
- [102] TOKUNAGA Y, SASAKI T, GOTO S, et al. Enhanced antitumor responses of tumor antigen-specific TCR T cells genetically engineered to produce IL7 and CCL19 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21(1): 138-48.
- [103] ZHU W, ZHANG Z, CHEN J, et al. A novel engineered IL-21 receptor arms T-cell receptor-engineered T cells (TCR-T cells) against hepatocellular carcinoma [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 101.
- [104] CAMPILLO-DAVO D, FLUMENS D, LION E. The quest for the best: how TCR affinity, avidity, and functional avidity affect TCR-engineered T-cell antitumor responses [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1720.
- [105] ZHAO X, KOLAWOLE E M, CHAN W, et al. Tuning T cell receptor sensitivity through catch bond engineering [J]. *Science*, 2022, 376(6589): eabl5282.
- [106] ZHOU P, SHAFFER D R, ALVAREZ ARIAS D A, et al. *In vivo* discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment [J]. *Nature*, 2014, 506(7486): 52-7.
- [107] HE J, XIONG X, YANG H, et al. Defined tumor antigen-specific T cells potentiate personalized TCR-T cell therapy and prediction of immunotherapy response [J]. *Cell Res*, 2022, 32(6): 530-42.
- [108] FOY S P, JACOBY K, BOTA D A, et al. Non-viral precision T cell receptor replacement for personalized cell therapy [J]. *Nature*, 2023, 615(7953): 687-96.
- [109] CHMIELOWSKI B, EJADI S, FUNKE R, et al. A phase Ia/Ib, open-label first-in-human study of the safety, tolerability, and feasibility of gene-edited autologous NeoTCR-T cells (NeoTCR-P1) administered to patients with locally advanced or metastatic solid tumors [J]. *J Clin Oncol*, 38(15\_suppl): TPS3151.
- [110] PARKHURST M, GOFF S L, LOWERY F J, et al. Adoptive transfer of personalized neoantigen-reactive TCR-transduced T cells in metastatic colorectal cancer: phase 2 trial interim results [J]. *Nat Med*, 2024, 30(9): 2586-95.
- [111] TAN C L, LINDNER K, BOSCHERT T, et al. Prediction of tumor-reactive T cell receptors from scRNA-seq data for personalized T cell therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2024, 43(1): 134-42.