

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.002

· 专家论坛 ·

## 肿瘤精准靶向免疫治疗的关键：T细胞受体抗原筛选技术

朱润棣, 李贵登(北京协和医学院中国医学科学院系统医学研究院/苏州系统医学研究所 免疫与炎症全国重点实验室, 江苏 苏州 215123)



**李贵登** 博士、博士生导师, 中国医学科学院苏州系统医学研究所研究员。中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会委员, 中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会委员, 国家自然科学基金项目、国家重点研发计划和科技创新领军人才项目评审专家, *Cancer Lett* 和 *Commun Biol* 编委。曾入选海外高层次青年人才项目和江苏省“高层次创新创业人才引进计划”, 是江苏省自然科学基金“杰出青年基金项目”的获得者。专注于探究肿瘤T细胞免疫的分子机制, 开发新型肿瘤免疫治疗技术和方法, 承担多项国家自然科学基金面上项目以及中国医学科学院创新工程和基础科研项目。以通信/共同通信作者身份在 *Nat Metab*、*Nat Methods*、*Nat Rev Immunol*、*Cell Metab*、*Nat Commun* 和 *Blood* 等国际知名期刊上发表论文10余篇。

**[摘要]** 过继性T细胞疗法在实体瘤治疗中展现了良好的前景, 成为目前肿瘤治疗领域的一大研究热点。其中, TCR-T疗法主要通过T细胞受体(TCR)与抗原肽-主要组织相容性复合体(pMHC)的特异性识别, 进而激活过继性T细胞的抗肿瘤免疫反应。因此, 全面解析TCR所靶向的抗原信息有助于提高TCR-T疗法在临床应用中的有效性及安全性。然而, 高效、高通量的TCR抗原筛选技术的缺乏限制了TCR-T疗法的发展。近年来, 随着高通量测序技术、质谱流式细胞技术和计算生物学的快速发展, 研究人员开发了多种TCR抗原筛选技术用于解析TCR及其特异性识别的抗原信息。本文从抗原定向筛选、TCR定向筛选以及双向筛选三方面对TCR抗原筛选技术进行归纳总结, 系统介绍其优缺点, 展望TCR抗原筛选技术领域的发展前景, 为未来抗原筛选技术的开发提供了新思路。

**[关键词]** 肿瘤; T细胞受体; 抗原; TCR抗原筛选技术; TCR-T疗法

**[中图分类号]** R392.12; R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)01-0010-09

## The key to precise targeted immunotherapy for tumors: T cell receptor antigen screening techniques

ZHU Rundi, LI Guideng (National Key Laboratory of Immunity and Inflammation, Suzhou Institute of Systems Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

**[Abstract]** Adoptive T cell therapy has shown promising prospects in solid tumors and is becoming a major focus in the field of cancer therapy. TCR-T therapy relies on the specific recognition of peptide-major histocompatibility complex (pMHC) by the T cell receptor (TCR), leading to the activation of anti-tumor immune response of adoptive T cells. Therefore, a comprehensive analysis of the information of antigens targeted by TCRs is crucial for improving the efficacy and safety of TCR-T therapy in clinical applications. However, the lack of rapid and high-throughput TCR antigen screening techniques has limited the development of TCR-T therapy. In recent years, with the rapid advancement of high-throughput sequencing technologies, mass spectrometry-based flow cytometry, and computational biology, researchers have developed various TCR antigen screening techniques to decipher the antigen-targeting information of TCRs. This review summarizes TCR antigen screening methods, categorizing them into antigen-directed screening methods, TCR-directed screening methods, and bidirectional screening methods, and systematically introduces their strengths and limitations. Moreover, it delves into the prospects of TCR antigen screening development and provides new insights into the future of this area.

**[Key words]** tumor; T cell receptor (TCR); antigen; TCR antigen screening; TCR-T therapy

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(1): 10-18. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.01.002]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 32270994, No. 32300764); 江苏省杰出青年基金(No. BK20211505); 中国医学科学院医学健康前沿交叉研究专项(No. 2023-I2M-QJ-019)

**[作者简介]** 朱润棣(2000—), 女, 博士生, 主要从事肿瘤免疫相关研究。E-mail: xtzhurundi@student.pumc.edu.cn

**[通信作者]** 李贵登, E-mail: lgd@ism.cams.cn

近年来,过继性T细胞疗法在血液肿瘤临床治疗中疗效显著,已成为最具潜力的肿瘤治疗方式之一<sup>[1]</sup>。其中,TCR-T疗法通过在T细胞中导入靶向肿瘤抗原的T细胞受体(T cell receptor, TCR),赋予T细胞特异识别肿瘤细胞的能力,增强其抗肿瘤免疫反应<sup>[2-4]</sup>。在TCR-T疗法中,所导入TCR的抗原特异性及其交叉反应性与TCR-T的临床治疗效果紧密相关<sup>[5-8]</sup>,因此,深入解析TCR与抗原肽-主要组织相容性复合体(peptide-major histocompatibility complex, pMHC)的配对信息是开发安全、有效的肿瘤免疫疗法的基础。然而,缺乏TCR抗原筛选技术使得TCR-T疗法的发展受到极大的限制,如何快速获取TCR抗原识别信息,得到肿瘤抗原特异性TCR是目前肿瘤免疫治疗领域的一大研究热点。本文总结了近年来开发的多种TCR抗原筛选方法,对它们的优点及其限制性进行归纳,系统地分析其在肿瘤免疫疗法中的作用,强调了该领域面临的挑战,为该领域未来的发展提供策略和新思路。

## 1 利用目的抗原筛选其靶向TCR的方法

随着质谱技术和高通量测序技术的发展<sup>[9-11]</sup>,且得益于生物信息分析技术的日益成熟<sup>[12]</sup>,大量肿瘤来源的潜在突变抗原信息被不断解析出来,成为细胞免疫疗法中的潜在靶点。出于临床治疗上对筛选肿瘤新抗原及靶向肿瘤抗原的高特异性、高亲和力TCR的需求,目前已经开发出多种利用目的抗原对TCR进行筛选的方法。

### 1.1 细胞杀伤、细胞因子检测筛选技术

传统的抗原筛选方法主要依赖于免疫化学发光检测抗原刺激时T细胞的效应功能的强弱<sup>[13]</sup>。当TCR识别其靶向抗原后,T细胞被激活并释放IL-2、IFN- $\gamma$ 等细胞因子,以及颗粒酶与穿孔素,导致靶细胞裂解死亡。其中,酶联免疫斑点(enzyme-linked immunosorbent spot, ELISPOT)技术通过抗体检测T细胞受到抗原刺激后分泌的细胞因子的变化来评估TCR的抗原反应性<sup>[14]</sup>。ELISPOT技术操作简单,灵敏度高,是目前免疫检验中的主导技术<sup>[15]</sup>。但ELISPOT实验中干扰因素较多,计数误差、抗体特异性等均会影响其筛选结果<sup>[16]</sup>。铬释放法是经典的细胞毒性测定方法,通过将T细胞与放射性同位素<sup>51</sup>Cr标记的靶细胞共培养后,检测上清中靶细胞裂解后所释放的<sup>51</sup>Cr放射脉冲数而量化T细胞对靶细胞的特异性杀伤<sup>[17-18]</sup>。铬释放法具有结果准确、重复性高的优点,但由于<sup>51</sup>Cr半衰期较短,难以多次测定,限制了该方法的应用<sup>[19]</sup>。在T细胞中表达活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)-荧

光素酶报告基因,靶细胞与T细胞共培养时,抗原与特异性TCR的结合会启动NFAT信号通路,激活下游荧光素酶的表达。在荧光素酶底物的存在下,荧光素酶催化底物的氧化反应,产生荧光。AARNOUDSE等<sup>[20]</sup>通过检测荧光强度来测定T细胞中荧光素酶活性,以此评估T细胞的抗原特异性。基于NFAT-荧光素酶的筛选方法灵敏度较高、结果重复性好、易于检测且相对安全,已被广泛应用于检测T细胞的杀伤效果。

### 1.2 基于pMHC多聚体的筛选技术

传统的基于T细胞激活鉴定抗原特异性TCR的方法并不能有效地富集或分离这些抗原反应性T细胞。研究者们基于TCR-pMHC识别特异性,开发了一系列TCR抗原筛选技术。TCR与pMHC之间的亲和力较弱,两者的结合半衰期较短,因此,重组的可溶性pMHC单体并不适用于抗原特异性TCR的筛选。通过pMHC多聚化可增强pMHC与TCR之间的结合稳定性<sup>[21]</sup>。其中,pMHC四聚体是由4个pMHC单体分子通过链霉亲和素聚合形成可溶性的四聚体,已成为鉴定抗原特异性T细胞的“金标准”<sup>[22]</sup>。多聚体的优势在于具有较高的特异性和敏感性,可与多种检测分析方式结合使用。与此同时,研究者们开发了多种携带不同标记、标签的pMHC多聚体技术用于高通量抗原特异性TCR的筛选。

#### 1.2.1 荧光标记的pMHC多聚体

通过基因工程技术将MHC I类分子重链的羧基端进行生物素化修饰,并通过荧光标记的链霉亲和素将pMHC单体多聚化。荧光标记的pMHC多聚体通过与T细胞共培养,使携带抗原特异性TCR的T细胞带上荧光,结合荧光显微镜或流式细胞分选技术,实现在单细胞水平上检测、分离或表征抗原特异性T细胞。荧光标记的pMHC多聚体已经被广泛用于抗原特异性T细胞的鉴定、筛选和分离。为了提高抗原特异性T细胞的筛选通量,NEWELL等<sup>[23]</sup>利用4种荧光素排列组合产生15种不同的pMHC染色组合,HADRUP等<sup>[24]</sup>使用8种荧光素对pMHC多聚体进行组合编码,从而可以同时富集约28种特异性T细胞群。虽然通过不同荧光的组合可以在一定程度上提高pMHC多聚体的筛选通量,但是目前有限的荧光数量仍然限制了荧光标记的pMHC多聚体的筛选通量。同时,流式细胞术在进行多个pMHC多聚体筛选时,存在染色强度不同和荧光信号渗漏的干扰。

#### 1.2.2 重金属离子标记的pMHC多聚体

除了结合荧光基团外,pMHC多聚体也可与重金属离子探针缀合,进一步提高抗原特异性T细胞的筛选通量,如用10种金属离子排列组合时可以同时进

行120种抗原肽靶向TCR的筛选。NEWELL等<sup>[25]</sup>利用金属离子偶联的pMHC多聚体及细胞表面蛋白、细胞因子等抗体标记T细胞后,通过质谱流式细胞术检测巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)、EB病毒等病毒抗原特异性T细胞中不同分化亚群的特征。但在抗原筛选方面,重金属离子可能会破坏TCR和pMHC间的相互作用,从而产生假阴性结果<sup>[26]</sup>。

### 1.2.3 DNA条形码标记的pMHC多聚体

随着高通量测序技术的发展,DNA条形码标记的pMHC多聚体应运而生。DNA条形码标记技术是一种利用标准的、有足够变异的、易扩增的短DNA片段进行生物标记和鉴定的方法。通过碱基的重组排列,理论上可获得复杂度高达 $10^{10}$ 的DNA条码用于标记不同的pMHC多聚体,满足了TCR高通量筛选的需求。BENTZEN等<sup>[27]</sup>开发了DNA条形码标记的pMHC十二聚体技术,将生物素化的DNA条形码和pMHC分子附着在携带链霉亲和素的PE标记的葡聚糖骨架上,可以同时检测大于1 000个pMHC反应性T细胞。该技术可灵敏地检测到靶向黑色素瘤的肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen, TSA)的T细胞,并成功从小肺癌患者的肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)及血液中分离出获得靶向新抗原的TCR。此外,ZHANG等<sup>[28]</sup>结合DNA条形码标记的pMHC四聚体与单细胞测序技术开发了四聚体相关TCR测序(TetTCR-Seq)技术。通过对pMHC四聚体标记阳性的T细胞进行测序,同时获得TCR和DNA条形码序列所对应的抗原信息。与荧光标记和重金属离子标记的pMHC多聚体相比,DNA条形码标记的pMHC多聚体极大地提高了TCR抗原筛选技术的通量。

然而,pMHC多聚体筛选技术依然存在局限性。由于这一技术需要预先确定的抗原肽信息,且多肽文库合成费时费力、pMHC多聚体组装不便、生产效率低下等,限制了该技术的应用。

### 1.3 结合微流控的TCR抗原筛选技术

单细胞测序技术的成熟为TCR抗原筛选提供了新的策略和方向。通过结合液滴微流控技术与单细胞测序技术,成功实现了抗原特异性T细胞的精确筛选,同时获得了抗原特异性TCR的序列信息。液滴微流控是一种操控微小体积液体的新技术,微流控系统生成的液滴可作为细胞反应容器,将T细胞与靶细胞包裹其中,独立地进行相互作用,再通过单细胞测序技术获得序列信息。PENG等<sup>[29]</sup>建立了一种使用纳米颗粒(nanoparticle, NP)条形码进行核酸细胞分选(nucleic acid cell sorting, NACS)的方法,该方法通过DNA寡核苷酸将磁性NP与pMHC四聚体连接起来组成pNP,利用磁铁分离pNP结合的细胞和游离

颗粒,并通过DNA条形码匹配特异性抗原信息。研究者用这一技术从黑色素瘤患者体内分离的CD8<sup>+</sup> T细胞中筛选抗原特异性TCR,使用微流控芯片进行单细胞捕获测序与NP纯化,获取肿瘤特异性TCR与pMHC的序列信息。SEGALIN等<sup>[30]</sup>利用液滴微流控技术与NFAT-eGFP荧光报告基因来筛选TCR,用液滴包裹表达荧光报告基因的T细胞与靶细胞至多孔微流控芯片中,当TCR与抗原识别后通过激活下游NFAT通路,使绿色荧光蛋白eGFP表达。对表达eGFP的液滴进行测序后,即可获得抗原特异性TCR的序列。相比于传统的检测技术,微流控技术得益于每个微液滴都是独立的反应单元,避免细胞间相互干扰,提高了检测的灵敏度,而且通过大规模集成的方式大大提高了TCR筛选通量。但是由于液滴包裹效率受泊松分布的影响,T细胞和肿瘤细胞共包裹效率最多为37%,这对实际筛选效率造成了一定影响<sup>[31-32]</sup>。此外,由于液滴中细胞的运动及实时监测期间细胞可能位于不同聚焦平面上,可能会导致荧光强度的测量出现偏差<sup>[30]</sup>。

## 2 利用已知TCR定向筛选被识别的抗原

单细胞测序和免疫组库测序技术的应用积累了大量双链配对的TCR序列信息,并建立了储存这些信息的数据库,包括IMG<sup>[33]</sup>、IEDB<sup>[34]</sup>、VDJdb<sup>[35]</sup>等,但仅通过序列信息无法获知这些“孤儿”TCR的抗原特异性。为了获得这些“孤儿”TCR特异识别的肿瘤抗原信息,研究者利用多种蛋白表达系统,包括噬菌体<sup>[36]</sup>、酵母细胞<sup>[37]</sup>、哺乳动物细胞和病毒<sup>[38-39]</sup>等,构建出多种抗原表位展示文库以实现TCR靶抗原的筛选。

### 2.1 酵母抗原展示技术进行TCR抗原筛选

酵母抗原展示系统利用酵母细胞表面进行蛋白展示。 $\alpha$ -凝集素黏附受体由两种分泌蛋白AGa1和AGa2组成,蛋白质通过与 $\alpha$ -凝集素融合表达从而被展示在酵母细胞的表面<sup>[40]</sup>。酵母抗原展示系统能够高水平表达外源蛋白并进行真核生物的翻译后修饰<sup>[41]</sup>,且遗传操作简单、易于培养,常用于大规模蛋白质的表达。同时,酵母抗原展示系统可结合流式细胞术进行高通量筛选。GEE等<sup>[42]</sup>在酵母细胞上表达pHLA文库,并制备生物素化的可溶性“孤儿”TCR,将酵母抗原展示细胞与可溶性TCR共培养后,洗去未结合的酵母细胞,经4轮筛选,对收集得到的酵母细胞进行测序分析,获得其高丰度的抗原肽序列信息。酵母抗原展示技术最大的优势在于其规模庞大,可展示 $10^{10}$ 数量级的抗原文库,但由于需要预先制备可溶性TCR,还需经过多轮筛选、培养和测序,导致该方

法筛选周期相对较长。此外,低亲和力的TCR可能无法通过该方法从文库中获取其同源抗原信息。

## 2.2 基于哺乳动物细胞展示系统进行TCR抗原筛选

### 2.2.1 T-Scan 抗原筛选技术

细胞毒性T淋巴细胞(CTL)识别靶抗原后会释放颗粒酶、穿孔素,诱导靶细胞发生凋亡<sup>[43]</sup>。基于此机制,KULA等<sup>[44]</sup>建立了一种迅速且高通量的TCR抗原筛选技术。他们将1个颗粒酶B(granzyme B, GzB)切割位点插入红外荧光蛋白(infrared fluorescent protein, IFP)中,使IFP可被T细胞释放的GzB水解切割发出荧光,以此为基础构建了一种以GzB特异性切割激活IFP的报告基因。利用该报告基因进行抗原的筛选,当T细胞结合靶细胞上的同源抗原后,被激活的T细胞会向靶细胞释放GzB,从而介导IFP的激活,通过流式细胞术检测分离IFP<sup>+</sup>靶细胞并对其中编码抗原的基因片段进行测序即可获得被TCR识别的抗原。研究者利用T-Scan抗原筛选技术成功从外周血中筛选出多个CMV表位,其中包括4个未被报道的新表位,并对自身免疫性TCR识别的抗原的特征进行了解析。该方法不仅可在全基因组范围内筛选内源提呈的靶抗原,同时结合了pMHC与TCR之间的亲和力及T细胞的功能反应性,并可筛选库容 $10^4 \sim 10^5$ 的表位。虽然T-Scan能够筛选MHC I分子提呈的靶抗原表位,但其筛选MHC II分子所提呈的抗原的有效性仍不明确。

### 2.2.2 信号转导与抗原提呈双功能性TCR抗原筛选技术

报告基因在TCR抗原筛选技术中应用广泛,除了前文提到过的荧光素酶报告基因和GzB启动的荧光蛋白报告基因外,NFAT启动的荧光蛋白报告基因也是一种经典的检测方法。T细胞膜上的TCR在识别靶抗原后激活下游的CD3 $\zeta$ 信号,进而激活下游CaN/NFAT信号通路,NFAT转录因子入核,从而启动TCR下游荧光蛋白基因的表达。然而,靶细胞上的MHC分子缺乏下游信号结构域,无法通过pMHC下游信号直接分离出被TCR所识别的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)。为了解决这一难题,JOGLKAR等<sup>[45]</sup>将T细胞内参与信号转导的CD3 $\zeta$ 结构域及CD28共刺激结构域连接到pMHC分子上形成信号转导和抗原提呈双功能受体(signaling and antigen-presenting bifunctional receptor, SABR)复合物,通过将其表达由NFAT调控表达的GFP Jurkat(NFAT-GFP-Jurkat)细胞中构建SABR细胞系,用于TCR抗原的筛选。SABR上的抗原肽在被其特异性TCR识别后,通过CD3 $\zeta$ 结构域激活NFAT信号通路,启动SABR细胞上GFP的表达,通过分离GFP<sup>+</sup>细胞并测序即可得到某特定TCR所识别的抗原信息。利用SABR,研究者成功从包含来自于108个肿瘤非同义突变的3 251个

HLA-A\*02:01限制性抗原表位文库中筛选出从黑色素瘤患者鉴定得到的肿瘤新抗原特异性TCR的同源抗原。

近期,研究者在该技术的基础上开发了适用于MHC II类分子抗原筛选的方法,可用于大型表位库的筛选,从而获得鼠和人类CD4<sup>+</sup> T细胞的特异性抗原信息。SABR筛选技术能够快速获得TCR识别的抗原序列信息,其筛选通量可达到 $10^6$ ,远高于pMHC多聚体筛选和功能性筛选技术。然而,由于需要经过进行多轮筛选才可获得TCR的抗原信息,导致该方法筛选周期相对较长。

### 2.2.3 pMHC-TCR抗原筛选技术

由于MHC II类分子所呈递肽的多样性比MHC I类分子高几个数量级,因此难以获取CD4<sup>+</sup> T细胞特异性识别的抗原肽信息。KISIELOW等<sup>[46]</sup>通过类似于SABR的方法将小鼠的MHC I类分子与TCR $\alpha\beta$ 的穿膜及胞内信号转导区融合后转入报告细胞中,构建了一种表达pMHC-TCR(MCR)嵌合受体的工程报告细胞,当MCR的pMHC部分被TCR识别结合后,MCR的胞内结构域激活NFAT启动GFP的表达,并成功用于MHC II类抗原表位的筛选。通过这一筛选方法,获得gp61的潜在抗原和反应性TCR序列。然而,对于需经过体内加工的剪接抗原肽、杂合肽或一些翻译后修饰抗原肽可能不适用于MCR技术的筛选,需要进一步改造MCR平台以扩展其抗原肽的筛选范围。

### 2.2.4 基于胞啃的TCR抗原筛选技术

基于哺乳动物细胞的抗原展示平台相比于酵母抗原展示技术而言更接近真实的抗原提呈结构,因此在TCR-pMHC筛选方面更具优势。研究发现,T细胞在和APC形成免疫突触时会提取其一部分表面分子,研究者将其称为胞啃(trogocytosis)现象。胞啃实现了T细胞与APC间膜蛋白的转移,也成为了肿瘤细胞对抗免疫治疗的利器。不仅是T细胞啃走APC上的膜蛋白,APC也会提取T细胞表面的蛋白分子(如TCR)。LI等<sup>[47]</sup>利用该现象构建了一种高通量的TCR抗原筛选平台,他们将T细胞和表达绿色荧光蛋白ZsGreen的APC共培养,通过流式细胞术分选胞啃阳性(ZsGreen<sup>+</sup> TCR<sup>+</sup>)的APC后,利用二代测序(next-generation sequence, NGS)技术获得被TCR识别的抗原序列。研究者成功通过该平台获得从黑色素瘤患者体内分离的新抗原特异性TCR的靶抗原。该方法具有高特异性和灵敏性。胞啃技术可以用来筛选任意HLA类型的TCR所识别的抗原,不仅包括MHC I限制性的抗原-TCR配对,还可以应用于MHC II分子所提呈的抗原-TCR配对,从而可以用来鉴定其他免疫疗法相关的潜在抗原,如应用于自身免疫疾病。

各种TCR抗原筛选技术的原理及优缺点比较见表1。

表1 TCR抗原筛选技术比较

方法	原理	优点	缺点	参考文献
细胞杀伤、细胞因子检测筛选技术	主要依赖于免疫化学发光检测抗原刺激时T细胞的效应功能的强弱	操作简单,易于检测;准确性高	筛选通量有限	[13-20]
基于pMHC多聚体的筛选技术	通过链霉亲和素将经过生物素化修饰pMHC单体聚合形成可溶性多聚体,增强pMHC与TCR的结合稳定性	具有较高的特异性和敏感性,可与多种检测方法结合使用	筛选通量有限;需预先明确抗原肽的信息;pMHC多聚体组装不便、生产效率低下	[21-28]
酵母抗原展示技术	通过将蛋白质与酵母细胞表面的 $\alpha$ -凝集素黏附受体融合表达,从而将蛋白质展示在酵母细胞的表面	规模庞大,可展示 $10^{10}$ 数量级的抗原文库	需预先制备可溶性TCR;筛选周期较长;低亲和力TCR的应用受限	[40-42]
T-Scan抗原筛选技术	将GzB切割位点插入IFP中并表达于靶细胞。当CTL识别靶细胞后,通过释放GzB水解切割IFP使其发出荧光,从而进行筛选	可在全基因组范围内筛选内源提呈的靶抗原;同时结合了TCR-pMHC的亲合力以及T细胞的功能反应性	无法用于筛选MHC II分子所提呈的抗原	[44]
信号转导与抗原提呈双功能性抗原筛选技术	将CD3 $\zeta$ 和CD28连接到pMHC分子上,pMHC被同源TCR识别后,激活下游NFAT通路,启动GFP的表达	筛选通量高,操作简便	需经过多轮分选,筛选周期较长	[45]
基于胞喟的筛选技术	T细胞与APC形成免疫突触时,APC会提取T细胞表面的蛋白分子。利用这种膜蛋白转移现象,进行抗原筛选	适用于任意HLA类型的TCR所识别的抗原;具有较高筛选通量	需要经过两轮分选,筛选周期相对较长	[47]
基于慢病毒特异性感染的筛选技术	在突变型VSV-G假型慢病毒表面展示外源蛋白,通过其表面展示的靶蛋白与细胞膜上受体相互作用实现细胞特异性感染	灵敏度高,特异性强,通量高,实用性强	仅体现了TCR与抗原的亲合力,忽略了T细胞的功能反应性	[48-49]

### 3 TCR与抗原的库对库双向筛选

尽管上述各种技术都有独特的优势,但由于个体TCR和肿瘤突变抗原的数量巨大,以上TCR抗原筛选技术并不能完全满足实际需求,因此,开发抗原文库对TCR文库的筛选技术具有重要的意义。下面,将主要介绍几种“库对库”的筛选方法。

#### 3.1 基于慢病毒特异性感染的筛选技术

慢病毒感染细胞的第一步是通过包膜蛋白与细胞表面受体结合,与宿主细胞膜融合后释放结构蛋白和病毒RNA,在逆转录酶和整合酶作用下将遗传信息整合进宿主基因组中。DOBSON等<sup>[48]</sup>开发了一种携带荧光蛋白基因的突变型水泡性口炎病毒G蛋白(VSV-G)假型慢病毒感染体系,与野生型VSV-G假型病毒相比,突变型VSV-G(K47Q、R354A)的病毒失去了与细胞表面低密度脂蛋白受体结合的能力,无法感染靶细胞,但保留了膜融合能力。通过在体外病毒生产过程中共表达特定表面结合蛋白的方式,将外源蛋白展示在病毒表面,成为以外源蛋白承担受体结合作用的病毒抗原展示系统。改造后的慢病毒通

过其表面展示的靶蛋白与细胞膜上受体相互作用实现细胞特异性感染。将多种携带不同pMHC的突变型VSV-G病毒混合后,感染表达TCR文库的T细胞群,通过流式细胞术分离被感染的细胞并进行测序,同时获得配对的TCR和抗原的序列信息。YU等<sup>[49]</sup>进一步将荧光蛋白与病毒结构蛋白相融合,使得编码荧光蛋白的基因无需整合到细胞基因组中,在2 h后即可在被感染的细胞表面检测到荧光蛋白,进一步缩短了筛选所需的时间。突变型VSV-G假型病毒展示pMHC文库的技术,解决了先前方法中仅能通过单一抗原或TCR筛选的局限性,实现了TCR文库与抗原文库的双向筛选。基于人类免疫缺陷病毒的慢病毒颗粒能够展示14~100个包膜蛋白分子,因此,与pMHC四聚体相比具有更高的灵敏度,具有特异性强、通量高和实用性强等特点。但是,基于慢病毒特异性感染的筛选技术仅体现了TCR与抗原的亲合力,忽略了TCR的功能反应性。并且,由于该方法抗原库的构建耗时费力,限制了该项技术的应用。

#### 3.2 YAMTAD系统筛选TCR-pMHC相互作用

酵母抗原展示技术筛选方式受可溶性TCR限制,

且筛选周期较长,但相较其他方法而言具有更大的展示规模和筛选通量,可与流式细胞术有效结合。为了改进酵母抗原展示筛选方法,WANG等<sup>[50]</sup>建立了酵母凝集介导的TCR抗原发现(yeast agglutination mediated TCR antigen discovery, YAMTAD)系统。在MAT $\alpha$ 酵母和MAT $\alpha$ 酵母中分别转入TCR-CDR3突变体-报告基因与pMHC突变体基因,同时转入交配启动的荧光报告子。将表达同源TCR与pMHC的酵母细胞共培养,经流式细胞术筛选双荧光的二倍体,通过NGS获得TCR与抗原的基因序列。在YAMTAD系统中,酵母组成型表达TCR和pMHC,与大多数诱导型启动子来激活蛋白表达的方法相比,具有更高的展示效率,并可达到 $10^8$ 的筛选规模。目前,YAMTAD系统对低亲和力相互作用的灵敏度较低,可能会遗漏部分TCR与pMHC的配对信息。

#### 4 TCR-T的临床应用

开发用于筛选肿瘤抗原和其特异性TCR的方法,有助于拓展TCR-T的应用范围,推动TCR-T临床应用的发展。目前,TCR-T的临床应用主要基于两种识别机制:一是将识别肿瘤相关抗原的TCR,例如NY-ESO-1特异性的1G4 TCR,表达在患者自身来源的T细胞上<sup>[51-52]</sup>;二是针对患者体内突变形成的TSA的个性化治疗。基于高通量测序获得肿瘤细胞非同义突变的信息,结合生物信息学预测算法识别潜在的肿瘤抗原<sup>[53-54]</sup>。通过对TIL进行筛选并测序,获得肿瘤特异性TCR序列,之后将其表达在患者自体T细胞上,构建靶向肿瘤特异性抗原的工程化T细胞,经体外扩增后回输到患者体内启动抗肿瘤免疫应答。目前,通过全外显子测序获得肿瘤非同义突变信息,并利用串联迷你基因将其导入靶细胞进而筛选肿瘤新抗原的方法,已成功应用于结直肠癌、转移性黑色素瘤和上皮性癌症的临床试验<sup>[55]</sup>。

TCR-T作为当前免疫治疗的研究热点,临床试验的数量逐年增加。2004年美国国立卫生研究院发起首个TCR-T试验,到目前为止,国际临床试验注册平台(ClinicalTrials.gov)上已列出242项TCR-T临床试验,并且部分已展现出良好的临床效果。MENG等<sup>[56]</sup>报道了HBV-TCR-T细胞免疫治疗对不符合肝移植标准的晚期HBV相关肝细胞癌(HBV-HCC)患者的安全性和有效性。在接受HBV-TCR-T细胞回输治疗后,8例中有2例观察到轻微不良反应,所有患者的循环HBV DNA负荷均降低甚至稳定在无法检测的水平。2021年的一项临床研究,使用针对HPV-16 E7的TCR-T,用于治疗转移性人乳头状瘤病毒相关上皮癌,12例患者中有6例观察到肿瘤消退,3例患者表

现出一种或多种肿瘤的完全消退<sup>[57]</sup>。这些临床研究证明,靶向病毒抗原的TCR-T疗法对病毒相关肿瘤具有良好的临床治疗效果。

然而,多项TCR-T的临床结果表明,TCR存在交叉反应性和脱靶毒性等限制,影响了临床治疗的安全性。例如,黑色素瘤相关抗原(melanoma-associated antigen, MAGE)家族是目前靶向抗原的研究热点,但在一项针对MAGE-A3的TCR-T临床试验中,9例患者中有2例在接受TCR-T治疗后出现神经系统毒性导致死亡,1例出现帕金森样症状<sup>[58]</sup>。其原因为该TCR还同时识别能够在人脑中表达的MAGE-A12表位,导致神经细胞的损害,引发了严重的脱靶效应。因此,目前开发出基于计算机预测的技术,用于根据免疫肽组学数据库预测交叉反应风险。FONSECA等<sup>[59]</sup>提出了以多肽或TCR为中心的预测方案,用于预测基于T细胞的免疫疗法的脱靶毒性风险。在以多肽为中心的的方案中,得分最高的前50种肽中验证病例的富集水平为63%,而以TCR为中心的方案富集水平高达82%。这一技术为TCR-T临床前脱靶毒性的评估提供了理论依据,降低了交叉反应的风险。另外,目前绝大多数TCR工程化改造均通过提高TCR与pMHC之间的亲和力的方式来提高T细胞反应性,但过高的亲和力具有脱靶毒性的风险<sup>[60-62]</sup>。因此,ZHAO等<sup>[63]</sup>利用蛋白质之间相互作用的逆锁键,在不改变TCR与pMHC之间亲和力的情况下,增强了TCR的信号强度,成功获得具有肿瘤杀伤功能且安全无脱靶毒性的TCR工程化突变体。

#### 5 结 语

近年来,过继性细胞免疫治疗的迅猛发展已经彻底改变了肿瘤治疗格局,其中TCR-T疗法因在治疗实体瘤方面具有极大潜力而备受关注。全面解析TCR及其所识别的靶抗原信息是开发靶向肿瘤新抗原的TCR-T疗法的基础。目前已开发多种TCR抗原筛选技术用于解析TCR及其同源抗原的配对信息,为TCR-T细胞免疫治疗的开发和应用奠定了坚实基础。本文对目前已有的TCR抗原筛选技术进行系统、全面地回顾,总结了这些方法的优点与不足之处,同时阐述了基于计算生物学技术开发的多种TCR抗原预测方法在临床免疫治疗中的应用。

TCR抗原筛选技术在进步之余仍存在着一些挑战,如抗原与TCR间的结合亲和力低、TCR-pMHC识别的交叉反应性、非特异性识别的干扰以及MHC II限制性TCR抗原筛选方法有限等等。随着未来生物信息学和大数据的发展、单细胞测序技术的不断成熟及人工智能深度学习等技术的发展,TCR抗原筛选技术

将获得更高的准确度与灵敏度,并进一步缩短TCR抗原筛选的周期,提高其筛选效率,降低筛选成本,为细胞免疫治疗开创崭新的未来。

### [参考文献]

- [1] LI F S, SHAO X M, LIU D H, *et al.* Vascular disruptive hydrogel platform for enhanced chemotherapy and anti-angiogenesis through alleviation of immune surveillance[J/OL]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (9): 1809[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9505154/>. DOI: 10.3390/pharmaceutics14091809.
- [2] WEDAGEDERA J R, BURROUGHS N J. T-cell activation: a queuing theory analysis at low agonist density[J]. *Biophys J*, 2006, 91(5): 1604-1618. DOI: 10.1529/biophysj.105.066001.
- [3] ZHAO Q J, JIANG Y, XIANG S X, *et al.* Engineered TCR-T cell immunotherapy in anticancer precision medicine: pros and cons[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 658753[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8042275/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.658753.
- [4] TANEMOTO S, SUJINO T, MIYAMOTO K, *et al.* Single-cell transcriptomics of human gut T cells identifies cytotoxic CD4<sup>+</sup>CD8A<sup>+</sup> T cells related to mouse CD4 cytotoxic T cells[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 977117[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36353619/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.977117.
- [5] WALSH S R, BASTIN D, CHEN L, *et al.* Type I IFN blockade uncouples immunotherapy-induced antitumor immunity and autoimmune toxicity[J/OL]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2): 518-530 [2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355222/>. DOI: 10.1172/JCI121004.
- [6] ZENG Z H, TUNG C H, ZU Y L. Aptamer-equipped protamine nanomedicine for precision lymphoma therapy[J/OL]. *Cancers*, 2020, 12(4): 780[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32218299/>. DOI: 10.3390/cancers12040780.
- [7] ICHIKI Y, SHIGEMATSU Y, BABA T, *et al.* Development of adoptive immunotherapy with KK-LC-1-specific TCR-transduced  $\gamma\delta$ T cells against lung cancer cells[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(11): 4021-4030. DOI: 10.1111/cas.14612.
- [8] 刘莎莎, 田永贵, 张毅. 免疫细胞疗法在实体瘤治疗中的挑战与对策[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(9): 781-790. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.09.001.
- [9] CHONG C, COUKOS G, BASSANI-STERNBERG M. Identification of tumor antigens with immunopeptidomics[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(2): 175-188[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/41269/>. DOI: 10.1038/s41587-021-01038-8.
- [10] LIMA N M, FERNANDES B L M, ALVES G F, *et al.* Mass spectrometry applied to diagnosis, prognosis, and therapeutic targets identification for the novel coronavirus SARS-CoV-2: a review[J/OL]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1195: 339385[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8687343/>. DOI: 10.1016/j.aca.2021.339385.
- [11] CAI R J, ZHAO F, ZHOU H Y, *et al.* A tumor-associated autoantibody panel for the detection of non-small cell lung cancer[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1056572[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36531074/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.1056572.
- [12] RAO A A, MADEJSKA A A, PFEIL J, *et al.* ProTECT-prediction of T-cell epitopes for cancer therapy[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 483296[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7683782/>. DOI: 10.3389/fimmu.2020.483296.
- [13] MI Y, HAGAN C T 4th, VINCENT B G, *et al.* Emerging nano-/microapproaches for cancer immunotherapy[J/OL]. *Adv Sci*, 2019, 6(6): 1801847[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425500/>. DOI: 10.1002/adv.201801847.
- [14] MCCUTCHEON M, WEHNER N, WENSKY A, *et al.* A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes[J]. *J Immunol Methods*, 1997, 210(2): 149-166. DOI: 10.1016/s0022-1759(97)00182-8.
- [15] HU-LIESKOVAN S, BHAUMIK S, DHODAPKAR K, *et al.* SITC cancer immunotherapy resource document: a compass in the land of biomarker discovery[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000705[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33268350/>. DOI: 10.1136/jitc-2020-000705.
- [16] LEE M J, LEE S Y, CHO S, *et al.* Feasibility of serum CGRP measurement as a biomarker of chronic migraine: a critical reappraisal[J/OL]. *J Headache Pain*, 2018, 19(1): 53[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6045522/>. DOI: 10.1186/s10194-018-0883-x.
- [17] MARK C, CZERWINSKI T, ROESSNER S, *et al.* Cryopreservation impairs 3-D migration and cytotoxicity of natural killer cells [J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5224[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7568558/>. DOI: 10.1038/s41467-020-19094-0.
- [18] KAWAKAMI Y, ELIYAHU S, DELGADO C H, *et al.* Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(9): 3515-3519[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC43610/>. DOI: 10.1073/pnas.91.9.3515.
- [19] CERIGNOLI F, ABASSI Y A, LAMARCHE B J, *et al.* *In vitro* immunotherapy potency assays using real-time cell analysis[J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193498[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29499048/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0193498.
- [20] AARNOUDSE C A, KRÜSE M, KONOPITZKY R, *et al.* TCR reconstitution in Jurkat reporter cells facilitates the identification of novel tumor antigens by cDNA expression cloning[J]. *Int J Cancer*, 2002, 99(1): 7-13. DOI: 10.1002/ijc.10317.
- [21] WOODHAM A W, ZEIGLER S H, ZEYANG E L, *et al.* *In vivo* detection of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by immuno-positron emission tomography[J/OL]. *Nat Methods*, 2020, 17(10): 1025-1032[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7541633/>. DOI: 10.1038/s41592-020-0934-5.
- [22] LIN J, NIE H, TUCKER P W, *et al.* Controlled major histocompatibility complex-T cell receptor signaling allows efficient generation of functional, antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells from embryonic stem cells and thymic progenitors[J/OL]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(9): 2709-2720[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928123/>. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0707.
- [23] NEWELL E W, KLEIN L O, YU W, *et al.* Simultaneous detection of many T-cell specificities using combinatorial tetramer staining [J/OL]. *Nat Methods*, 2009, 6(7): 497-499[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2731062/>. DOI: 10.1038/nmeth.1344.

- [24] HADRUP S R, BAKKER A H, SHU C J, *et al.* Parallel detection of antigen-specific T-cell responses by multidimensional encoding of MHC multimers[J]. *Nat Methods*, 2009, 6(7): 520-526. DOI: 10.1038/nmeth.1345.
- [25] NEWELL E W, SIGAL N, BENDALL S C, *et al.* Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8<sup>+</sup> T cell phenotypes[J/OL]. *Immunity*, 2012, 36(1): 142-152[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3752833/>. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.002.
- [26] WANG S, CAO J, JIA W D, *et al.* Single molecule observation of hard-soft-acid-base (HSAB) interaction in engineered *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA) nanopores[J/OL]. *Chem Sci*, 2019, 11(3): 879-887[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8146584/>. DOI: 10.1039/c9sc05260g.
- [27] BENTZEN A K, MARQUARD A M, LYNGAA R, *et al.* Large-scale detection of antigen-specific T cells using peptide-MHC- I multimers labeled with DNA barcodes[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(10): 1037-1045. DOI: 10.1038/nbt.3662.
- [28] ZHANG S Q, MA K Y, SCHONNESEN A A, *et al.* High-throughput determination of the antigen specificities of T cell receptors in single cells[J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2018, 2018: 10.1038/nbt.4282[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30418433/>. DOI: 10.1038/nbt.4282.
- [29] PENG S M, ZARETSKY J M, NG A H C, *et al.* Sensitive detection and analysis of neoantigen-specific T cell populations from tumors and blood[J]. *Cell Rep*, 2019, 28(10): 2728-2738.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.106.
- [30] SEGALINY A I, LI G D, KONG L S, *et al.* Functional TCR T cell screening using single-cell droplet microfluidics[J]. *Lab Chip*, 2018, 18(24): 3733-3749. DOI: 10.1039/c8lc00818c.
- [31] LIU H R, LI M, WANG Y, *et al.* Improving single-cell encapsulation efficiency and reliability through neutral buoyancy of suspension [J/OL]. *Micromachines*, 2020, 11(1): 94[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31952228/>. DOI: 10.3390/mi11010094.
- [32] YAGHOUBI M, SAIDI M S, GHADAMI S, *et al.* An interface-particle interaction approach for evaluation of the co-encapsulation efficiency of cells in a flow-focusing droplet generator[J/OL]. *Sensors*, 2020, 20(13): 3774[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7374427/>. DOI: 10.3390/s20133774.
- [33] CUN Y N, SHI L, KULSKI J K, *et al.* Haplotypic associations and differentiation of MHC class II polymorphic Alu insertions at five loci with HLA-DRB1 alleles in 12 minority ethnic populations in China [J/OL]. *Front Genet*, 2021, 12: 636236[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34305999/>. DOI: 10.3389/fgene.2021.636236.
- [34] VETTER J, SCHALLER S, HEINZEL A, *et al.* ImmunoDataAnalyzer: a bioinformatics pipeline for processing barcoded and UMI tagged immunological NGS data[J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2022, 23(1): 21[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34991455/>. DOI: 10.1186/s12859-021-04535-4.
- [35] MORIS P, PAUW J D, POSTOVSKAYA A, *et al.* Current challenges for unseen-epitope TCR interaction prediction and a new perspective derived from image classification[J/OL]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(4): bbaa318[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8294552/>. DOI: 10.1093/bib/bbaa318.
- [36] WADOWIAK M, PACZESNY J, RAZA S. Enhancing the stability of bacteriophages using physical, chemical, and nano-based approaches: a review[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(9): 1936. DOI: 10.3390/pharmaceutics14091936.
- [37] KAJIWARA K, AOKI W, KOIKE N, *et al.* Development of a yeast cell surface display method using the SpyTag/SpyCatcher system[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11059[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/340401114/>. DOI: 10.1038/s41598-021-90593-w.
- [38] CHEN D, ZHAO Y J, LI M Y, *et al.* A general Fc engineering platform for the next generation of antibody therapeutics[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1901-1917. DOI: 10.7150/thno.51299.
- [39] DEERING R P, BLUMENBERG L, LI L J, *et al.* Rapid TCR: Epitope Ranker (RAPTER): a primary human T cell reactivity screening assay pairing epitope and TCR at single cell resolution[J/OL]. *Sci Rep*, 2023, 13: 8452[2023-10-24]. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35710-7>. DOI: 10.1038/s41598-023-35710-7.
- [40] ADAMS J J, NARAYANAN S, LIU B Y, *et al.* T cell receptor signaling is limited by docking geometry to peptide-major histocompatibility complex[J/OL]. *Immunity*, 2011, 35(5): 681-693[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3253265/>. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.09.013.
- [41] KERR E D, CABOCHE C H, PEGG C L, *et al.* The post-translational modification landscape of commercial beers[J/OL]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15890[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34354100/>. DOI: 10.1038/s41598-021-95036-0.
- [42] GEE M H, HAN A, LOFGREN S M, *et al.* Antigen identification for orphan T cell receptors expressed on tumor-infiltrating lymphocytes[J/OL]. *Cell*, 2018, 172(3): 549-563.e16[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5786495/>. DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.043.
- [43] KUNDURA L, CEZAR R, ANDRÉ S, *et al.* Low perforin expression in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during the acute phase of severe SARS-CoV-2 infection predicts long COVID[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1029006[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36341327/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1029006.
- [44] KULA T, DEZFULIAN M H, WANG C I, *et al.* T-scan: a genome-wide method for the systematic discovery of T cell epitopes[J/OL]. *Cell*, 2019, 178(4): 1016-1028.e13[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6939866/>. DOI: 10.1016/j.cell.2019.07.009.
- [45] JOGLEKAR A V, LEONARD M T, JEPPESSON J D, *et al.* T cell antigen discovery via signaling and antigen-presenting bifunctional receptors[J]. *Nat Methods*, 2019, 16(2): 191-198. DOI: 10.1038/s41592-018-0304-8.
- [46] KISIELOW J, OBERMAIR F J, KOPF M. Deciphering CD4<sup>+</sup> T cell specificity using novel MHC-TCR chimeric receptors[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(5): 652-662. DOI: 10.1038/s41590-019-0335-z.
- [47] LI G D, BETHUNE M T, WONG S, *et al.* T cell antigen discovery via trogocytosis[J]. *Nat Methods*, 2019, 16(2): 183-190. DOI: 10.1038/s41592-018-0305-7.
- [48] DOBSON C S, REICH A N, GAGLIONE S, *et al.* Antigen identification and high-throughput interaction mapping by reprogramming viral entry[J]. *Nat Methods*, 2022, 19(4): 449-460. DOI: 10.1038/s41592-022-01436-z.
- [49] YU B F, SHI Q M, BELK J A, *et al.* Engineered cell entry links receptor biology with single-cell genomics[J]. *Cell*, 2022, 185(26):



- 4904-4920.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2022.11.016.
- [50] WANG L H, LAN X. Rapid screening of TCR-pMHC interactions by the YAMTAD system[J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 30. DOI: 10.1038/s41421-022-00386-2.
- [51] RAPOPORT A P, STADTMAUER E A, BINDER-SCHOLL G K, *et al.* NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma[J]. *Nat Med*, 2015, 21(8): 914-921. DOI: 10.1038/nm.3910.
- [52] KAGEYAMA S, IKEDA H, MIYAHARA Y, *et al.* Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2268-2277. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1559.
- [53] OTT P A, HU Z, KESKIN D B, *et al.* An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 217-221. DOI: 10.1038/nature22991.
- [54] HUDSON D, FERNANDES R A, BASHAM M, *et al.* Can we predict T cell specificity with digital biology and machine learning? [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(8): 511-521. DOI: 10.1038/s41577-023-00835-3.
- [55] TRAN E, AHMADZADEH M, LU Y C, *et al.* Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers[J]. *Science*, 2015, 350(6266): 1387-1390. DOI: 10.1126/science.aad1253.
- [56] MENG F P, ZHAO J F, 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/OL]. *Hepatol Int*, 2021, 15(6): 1402-1412[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8651587/>. DOI: 10.1007/s12072-021-10250-2.
- [57] 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.
- [58] MORGAN R A, CHINNASAMY N, ABATE-DAGA D, *et al.* Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy[J/OL]. *J Immunother*, 2013, 36(2): 133-151[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3581823/>. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182829903.
- [59] FONSECA A F, ANTUNES D A. CrossDome: an interactive R package to predict cross-reactivity risk using immunopeptidomics databases[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1142573[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37377956/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1142573.
- [60] 姜楠, 应志涛. 乳腺癌过继性细胞免疫治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(6): 571-579. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.06.009.
- [61] 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/OL]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(197): 197ra103[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23926201/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006034.
- [62] BAULU E, GARDET C, CHUVIN N, *et al.* TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: state of the art and perspectives[J/OL]. *Sci Adv*, 2023, 9(7): eadf3700[2023-10-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9931212/>. DOI: 10.1126/sciadv.adf3700.
- [63] ZHAO X, KOLAWOLE E M, CHAN W P, *et al.* Tuning T cell receptor sensitivity through catch bond engineering[J/OL]. *Science*, 2022, 376(6589): eabl5282[2023-10-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35389803/>. DOI: 10.1126/science.abl5282.

[收稿日期] 2023-10-25

[修回日期] 2024-01-10

[本文编辑] 党瑞山