

## • 综述 •

## T 细胞受体基因修饰在过继免疫治疗中的应用

邵文, 刘东博, 吴疆, 潘明佳, 陈常青

天津药物研究院, 天津 300193

**摘要:** T 细胞过继性转移可以增强免疫系统介导的对肿瘤细胞的消除, 是近年来获得较高关注的一种特异性、无毒性的癌症新疗法, 此方法对于治疗血液性和实体恶性肿瘤具有一定效果。对 T 细胞进行基因修饰能够增强其免疫能力, 保持 T 细胞的持久活性, 同时也可以克服肿瘤自身的免疫逃避机制, 潜在提高免疫治疗应用于多种肿瘤疾病的成功率。在 T 细胞过继转移中, T 细胞受体 (TCR) 基因转移作为一种发展迅速的免疫治疗方法, 可以在体外产生大量的具有已知抗原特异性和功能亲和性的 T 细胞, 应用于病毒感染或病毒相关恶性肿瘤的过继细胞免疫治疗。TCR 基因转移利用逆转录病毒或慢病毒作为载体, 其中包含了从所需抗体特异性 T 细胞群中克隆得到的 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  链基因序列, 然后应用 TCR 编码载体转导体外的原始 T 细胞。为产生带有所需功能特异性的转导 T 细胞, 引入的 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  链必须形成异源二聚体, 与 CD3 复合体结合从而在 T 细胞表面稳定表达。

**关键词:** T 细胞; 基因修饰; T 细胞受体; 基因转移; 过继免疫治疗

**中图分类号:** R73-362      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-6376(2011)02-0105-05

## Application of T cell receptor gene modification in adoptive immunotherapy

TAI Wen, LIU Dong-bo, WU Jiang, PAN Ming-jia, CHEN Chang-qing

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract:** T cell adoptive transfer could enhance immune-mediated elimination of tumor cells with high concerns for providing a specific and non-toxic cancer therapy. This approach has been effective in treating some hematologic and solid malignancies. Moreover, genetic modification of T cells could improve their immunopotency, maintain their persistence, and overcome the tumor immune evasion mechanisms as well, so as to potentially increase the achievement rate of immunotherapy in a wide range of tumors. In T cell adoptive transfer, T cell receptor (TCR) gene transfer, a rapid developing strategy of immunotherapy, can generate a number of T cells with a given antigen-specificity and functional avidity *in vitro* and is used to treat viral infectious diseases and virus-associated malignancies and cancer. TCR gene transfer utilizes retrovirus or lentivirus as vectors which contain gene sequences of the TCR- $\alpha$  and  $\beta$  chains. TCR- $\alpha$  and - $\beta$  chains were cloned from a T-cell population with the desired antigen specificity. Then the TCR encoding vector is used to transduce primary T cells *in vitro*. To generate a transduced T cell with the desired functional specificity, the introduced TCR- $\alpha$  and - $\beta$  chains must form a heterodimer and combine with the CD3 complex in order to be stably expressed at the T-cell surface.

**Key words:** T cell; gene modification; T cell receptor; gene transfer; adoptive immunotherapy

体外扩增 T 细胞的过继转移能够修复骨髓移植后免疫系统对病毒的免疫反应, 并增进其对肿瘤的免疫反应。病毒特异性的细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 或肿瘤特异性 T 细胞的转移是治疗人类疱疹病毒 (EBV) 相关恶性肿瘤的一种安全有效的方法, 如霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌<sup>[1-2]</sup>和黑色素瘤<sup>[3]</sup>等。由于无效抗原的存在, 很多肿瘤不能首先诱导 T 细胞产生强烈的免疫反应, 因此这种免疫疗法在广泛应用于肿

瘤治疗时还受到一定限制。近期研究表明, 基因转移技术能够操纵 T 细胞进行基因修饰, 从而使过继 T 细胞疗法对多种肿瘤维持较强的功能效果。10 年前, 以逆转录病毒为载体的 T 细胞受体 (TCR) 基因转移首次在黑色素瘤抗体特异性 TCR 研究中实现<sup>[4]</sup>, 当时只有少数的转导 T 细胞具有较低功能<sup>[5-6]</sup>。目前对 TCR 基因转移的研究已取得了实质性进展, 其中包括 TCR 基因传递的载体和转导步骤的改

收稿日期: 2010-12-09

作者简介: 邵文 (1986—), 女, 天津人。Tel: (022)27474913 E-mail: taiwen0526@gmail.com

进等。

研究表明, TCR 转导的 T 细胞的多肽特异性和亲和力与分离出 TCR 的双亲 T 细胞克隆一致<sup>[7]</sup>。动物模型中 TCR 转导的 T 细胞具有抗病毒感染功能, 从而起到抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。临床研究已证实经过基因修饰的 T 细胞可以在体外产生, TCR 转导的 T 细胞可以在过继转移后持续存活, 且能观察到其对黑色素瘤的抗肿瘤活性<sup>[9]</sup>。TCR 基因转移效率以及其后的转导 T 细胞功能可被载体传递系统、TCR 转基因和转导条件等影响。目前多数 TCR 基因转移步骤使用  $\gamma$  逆转录病毒载体, 逆转录病毒载体的稳定基因整合需要 T 细胞在转导过程中完全活化增殖。这一过程使用 CD3 抗体, 通过 TCR 复合体施加刺激, 从而激发 T 细胞进入细胞周期, 以及产生之后的一系列体外扩增反应<sup>[10-11]</sup>。目前该领域中存在的问题主要有: (1) 如何使引进 TCR 的细胞表面表达最大; (2) 如何使引进 TCR- $\alpha$  链和  $\beta$  链与内源 TCR 链的误配最小; (3) 如何使引进 TCR 与 CD3 复合体分子结合得更好, 提高 TCR 转导 T 细胞的功能亲和性。

## 1 促进 TCR 表达

TCR 组装和表达是一个复杂的过程<sup>[12]</sup>, 在细胞表面进行表达之前, TCR- $\alpha$  链和  $\beta$  链首先形成异源二聚体, 然后与 CD3 复合物在内质网结合, 最终 TCR-CD3 复合物由内质网释放后转移至细胞膜。鼠类的 TCR 比人类 TCR 在人 T 细胞中的表达效率更高, 有可能是因为其与人 CD3 分子的结合作用更强<sup>[13]</sup>。

### 1.1 TCR- $\alpha$ 和 $\beta$ 链转基因的密码子优化

TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  链转基因的密码子优化依赖于用人类基因组中的常见的同义密码子置换非常见密码子。已有证据表明, 密码子优化的 TCR 基因可使 TCR 转导 T 细胞的表达水平比野生型 TCR 基因有所提高, 从而增强其体内功能<sup>[14-16]</sup>。然而, 密码子优化可能产生免疫原性 TCR, 导致抗 TCR 免疫反应, 此过程也可能会伴随多肽序列的改变产生另一种开放读码框, 有一定风险, 但目前还未见相关报道。

### 1.2 TCR- $\alpha$ 和 $\beta$ 链的载体配置

TCR 基因转移最好使用编码 2 条 TCR 链基因的单病毒载体, 尽可能防止插入突变和转导 T 细胞仅表达引入的 1 条链。只引入 1 条 TCR 链会增加引入链与相应内源性 TCR 链误配的风险。如果存在 TCR 其中 1 条链供应不足的情况, 会削弱 TCR 异源二聚体的聚合细胞表面表达。因此最近使用病毒

载体将 TCR- $\alpha$  和  $\beta$  链基因与内部核糖体进入位点 (IRES) 序列或猪捷申病毒 (PTV) 来源的 2A 多肽序列相连接<sup>[17]</sup>。

IRES 序列载体能形成在转导细胞内病毒启动子控制下的单独 mRNA 分子的表达。由于 IRES 序列的下游基因比上游基因表达水平低, 因此转导效率受到限制。2A 多肽连接子也形成单独的 mRNA 分子, 但在翻译过程中由于核糖体跳跃形成了 2 个单独蛋白<sup>[17]</sup>。临床和临床前大部分研究使用 2A 序列连接 TCR- $\alpha$  和  $\beta$  链, 提高 2 种基因的等量表达, 此方法比 IRES 载体表达量高。有研究显示, 转导了连接有 2A 序列的 TCR 基因的 T 细胞具有细胞表面 TCR 的高水平表达, 检测 IFN- $\gamma$  分泌水平, 发现此种 T 细胞比携带相同 TCR 序列的 IRES 载体转导 T 细胞具有更高的抗原特异性<sup>[18]</sup>。

### 1.3 引入性 TCR 和内源性 TCR 之间的竞争

有效的细胞表面 TCR 表达需要稳定的 TCR-CD3 复合体构建<sup>[12]</sup>。没有 CD3 的情况下, TCR 不能聚合而被降解。因此向 T 细胞内引入外源性 TCR 时, CD3 分子的存在是主要限速步骤。竞争可以降低引入性 TCR 的细胞表面表达并修复转导细胞的抗原识别活性。最近研究表明, 带有编码 TCR- $\alpha$  和  $\beta$  链基因载体的 CD8<sup>+</sup> T 细胞与另一个编码 CD3  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  基因的载体进行双重转导, 可以提高 CD8<sup>+</sup> T 细胞活性。这有可能是增强转导 T 细胞表达低亲和性 TCR 功能活性的机制。

引入性 TCR 的表达水平通常比内源性 TCR 低, 如前讨论, 内源性 TCR 可以削弱转导 T 细胞对低浓度 TCR 识别抗原的反应活性。这一结果验证了引进 TCR 与内源性 TCR 竞争有限的 CD3 分子。Heemskerck 等<sup>[19]</sup>的研究结果表明, 引入性 TCR 的表达水平通过向不同的抗原特异性 T 细胞克隆中引入相同 TCR 而被内源性 TCR 的“强度”影响。

## 2 提高 TCR- $\alpha$ 和 $\beta$ 链的特异性配对

由于 TCR 只作为  $\alpha/\beta$  异源二聚体在细胞表面表达, 有研究表明单独  $\alpha$  或  $\beta$  链向原始 T 细胞内的转导可导致外源性 TCR 链和相应内源性 TCR 链混合二聚体的形成。这一点已被引入  $\alpha$  或  $\beta$  链的细胞表面表达增加所证明<sup>[5, 19-21]</sup>。

混合  $\alpha\beta$  TCR 二聚体的形成主要有 2 个缺陷。首先, 引入  $\alpha\beta$  TCR 链的误配导致需要的 TCR 细胞表面特异性配对减少, 这对合成 TCR 的亲合性有不利影响。其次, 混合二聚体的形成可能导致安全问

题,这对临床应用更为重要。虽然并未在临床上观察到脱靶自身免疫病理学问题<sup>[9]</sup>,但现已证实 TCR 转导 T 细胞表达新的混合 TCR 二聚体是自体反应的,在体外具有同种异体反应性<sup>[22]</sup>。

### 2.1 TCR 链的半胱氨酸修饰通过产生分子间二硫键提高特异性配对

TCR 恒定域中外源性二硫键的加入可减小 TCR 误配,也因此增加了受体 T 细胞的功能亲和力<sup>[21,23-24]</sup>。Thomas 等<sup>[25]</sup>的研究表明,鼠杂交结合和恒定域中半胱氨酸键的加入提高了它们在 TCR 细胞表达上的效用,因此与单独成分相比 T 细胞功能活性增加。然而应强调 TCR 恒定域的鼠杂交和半胱氨酸修饰都不能完全消除修饰 TCR 链的与内源性人类 TCR 链的误配。研究表明 TCR 误配水平也能被内源性 TCR 链的不同区域所影响<sup>[13]</sup>。

### 2.2 对 TCR 恒定链的二级结构修饰可提高特异性配对

Voss 等提出的防止 TCR 误配的方法是在 TCR- $\alpha$  和 TCR- $\beta$  恒定域界面中插入一对特异性相互作用氨基酸。这 2 个氨基酸的插入突变将“knob-into-hole”结构变为“hole-into-knob”结构,从而提高了转导突变 TCR 的优先配对。此方法在人和鼠 TCR 基因转移系统中均有效。

### 2.3 嵌合体抗原受体作为常规 $\alpha\beta$ TCR 的替代物

另一种减小 TCR 误配的方法是发展嵌合体抗原受体 (CAR), CAR 由单链 Fv 融合 CD3 信号单元,而其功能活性依赖于信号单元的敏感性,信号单元由共刺激分子和(或)细胞因子组成。早期对表达 CAR 的 T 细胞的研究表明它们对多肽的敏感性不如表达  $\alpha\beta$  TCR 异源二聚体的 T 细胞<sup>[26]</sup>。

修饰过的 TCR 在具有免疫活性的宿主体内具有免疫原性,导致转导 T 细胞的持久性降低甚至消失。最近在过继 T 细胞转移之前使用淋巴清除法能够允许 T 细胞移植植入,但如何减小修饰后 TCR 可能存在的免疫原性仍是当前需要考虑的问题。

### 2.4 TCR- $\alpha\beta$ 链引入相应的效应细胞

减小 TCR 误配的一种新方法是将 TCR- $\alpha\beta$  基因转导入  $\gamma\delta$  T 细胞。利用此系统, T 细胞必须由与 CD8 或 CD4 共受体独立的 TCR 转导,或者 TCR 和共受体必须共转移。这些转导了 TCR 的  $\gamma\delta$  T 细胞在体外表现出多肽特异性溶胞作用和细胞因子释放,在体内表现出多肽特异性、持久性增殖以及召回反应<sup>[27-28]</sup>。

## 3 提高 TCR 的亲中性

目前 TCR 基因治疗过程中的主要挑战之一在于如何制备具有较高功能活性的 T 细胞。目前制备得到高亲和性 TCR 主要有 2 种方法,其一是研究一种提供高亲和性 T 细胞作为高亲和 TCR 的供给资源,其二为将 TCR 自身大量复制以提高其亲和性。

### 3.1 异体限制法从高亲和 CTL 克隆中选择 TCR

很多方法已经用于制造和分离高亲和性 T 细胞,并从其中克隆 TCR,从而进行 TCR 转移。有研究者<sup>[25]</sup>用异体限制 CTL 制造高亲和性 T 细胞,此方法能耐受旁路 T 细胞。转导了从异体限制 CTL 中分离出的 TCR 的 T 细胞表现出体外和体内多肽选择性<sup>[29]</sup>。另一种制备高亲和 TCR 的方法是使 HLA 转基因鼠对人类多肽免疫。这样制备出的鼠 T 细胞能够识别人类 HLA 中出现的多肽。这些细胞来源的 TCR 可以被分离出来,转导入人 T 细胞。这种方法也被其他学者应用于分离能够识别人类和鼠类双微蛋白-2 (MDM2) 和 p53 的 TCR<sup>[30]</sup>。

### 3.2 亲和力成熟的 TCR

以上方法从高亲和 T 细胞中选择和分离 TCR,另一种方法是使用体外系统直接导致 TCR 突变,提高它的亲和性。通常在限定了的联合多肽或 MHC 识别的 TCR 域里用 PCR 诱变引入随机突变来建立 TCR 变量的 DNA 文库。这些文库在真菌、细菌或 T 细胞中被表达,从而提高与多肽-MHC 复合体的亲和力。选择克隆来源的 TCR 可以被测序和转导入 T 细胞中进行进一步分析,很多研究者已对 TCR 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域参与结合动力学和多肽特异性做出深入研究。在简化模型中,CDR1 和 CDR2 与 MHC 单环结合,CDR3 与多肽结合。在 3 个 CDR 都带有突变亲和力的成熟 TCR 仍然保留了多肽特异性,这说明除了氨基酸序列之外,静电力和 TCR 构象在确定多肽特异性时也起重要作用<sup>[31]</sup>。

应用亲和力-成熟作用技术,可以制备出在生理学水平上具有亲和力,并且比双亲野生型 TCR 有更强能力的 TCR<sup>[32-33]</sup>。Varela-Rohena 等<sup>[34]</sup>使用噬菌体展示来产生亲和力成熟的 TCR,它对 HLA-1 组人免疫缺陷病毒 (HIV) 具有特异性,并衍生出 SL9 多肽。成熟 TCR 向 CD8 T 细胞转导之后,保留抗原特异性,TCR 转导的 T 细胞制造了更多种类的细胞因子和更多数量的 IL-2,作为对 HIV 感染细胞的反应。相对于从野生型分离出 TCR 的 CTL 细胞系,有报道指出,高亲和性 TCR 转导的 CD8 T 细

胞表现出多肽某些特异性的缺失, 由于 TCR 的亲合力提高, 它能够识别的刺激性多肽的数量也提高了<sup>[35]</sup>。因此这些 T 细胞会显示出与自我-多肽-MHC 复合体的交叉反应。值得注意的是, 高亲和性 TCR 转导的 CD4 T 细胞继续显示出多肽特异性, TCR 亲和性的提高伴随着的多肽识别和 T 细胞亲和性的提高<sup>[36]</sup>。这一技术经证实可在基因上修饰 CD4 T 细胞, 从而达到 T 细胞对癌症的过继免疫治疗。

### 3.3 TCR 去糖基化

最近公开的一种提高 TCR 亲和性的方法证实 T 细胞表面蛋白糖基化的提高与活化起始的提高有关, 反之亦然。Kuball 等<sup>[37]</sup>提出, TCR- $\alpha$  和  $\beta$  链的恒定域 N-糖基化位点的删除可以提高转导了这些修饰 TCR 的 T 细胞的功能亲和性。这一影响已在人和鼠对不同肿瘤抗原具有特异性的 TCR 中被证实, 因此认为该技术有朝一日可以应用于翻译任何 TCR。由于上述 TCR 的能力, 应该检测识别自身蛋白的亲合力起始水平, 并且在临床应用之前, 亲和力增加的 TCR 需经过体内和体外筛选, 因此这种检测也有其必要性。

## 4 结语

过继 T 细胞疗法作为一种特异性、无毒性治疗癌症的方法是很有发展前景的, 虽然目前仅对有限情况有效, 但基因修饰 T 细胞能提高它们的靶向性、持久性、抗肿瘤活性, 以及安全性和有效性。本文综述的 TCR 基因转移和 T 细胞修饰是基础 T 细胞免疫治疗的重要领域, 有助于今后对 TCR 配对和聚合的重要步骤、抗原识别、T 细胞信号传导和自我反应 T 细胞功能等方面进行更深入的研究。

### 参考文献

- [1] Bollard C M, Aguilar L, Straathof K C, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus<sup>+</sup> Hodgkin's disease [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(12): 1623-1633.
- [2] Bollard C M, Huls M H, Buza E, *et al.* Administration of latent membrane protein 2-specific cytotoxic T lymphocytes to patients with relapsed Epstein-Barr virus-positive lymphoma [J]. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2006, 6(4): 342-347.
- [3] Rosenberg S A, Dudley M E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2): 233-240.
- [4] Clay T M, Custer M C, Sachs J, *et al.* Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity [J]. *J Immunol*, 1999, 163(1): 507-513.
- [5] Cooper L J, Kalos M, Lewinsohn D A, *et al.* Transfer of specificity for human immunodeficiency virus type 1 into primary human T lymphocytes by introduction of T-cell receptor genes [J]. *J Virol*, 2000, 74(17): 8207-8212.
- [6] Fujio K, Misaki Y, Setoguchi K, *et al.* Functional reconstitution of class II MHC-restricted T cell immunity mediated by retroviral transfer of the alpha beta TCR complex [J]. *J Immunol*, 2000, 165(1): 528-532.
- [7] Schaft N, Willemsen R A, de Vries J, *et al.* Peptide fine specificity of anti-glycoprotein 100 CTL is preserved following transfer of engineered TCR alpha beta genes into primary human T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 2003, 170(4): 2186-2194.
- [8] Morris E C, Tsallios A, Bendle G M, *et al.* A critical role of T cell antigen receptor-transduced MHC class I-restricted helper T cells in tumor protection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(22): 7934-7939.
- [9] Morgan R A, Dudley M E, Wunderlich J R, *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 126-129.
- [10] Qasim W, Mackey T, Sinclair J, *et al.* Lentiviral vectors for T-cell suicide gene therapy: preservation of effector function after cytokine-mediated transduction [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(2): 355-360.
- [11] Cavalieri S, Cazzaniga S, Geuna M, *et al.* Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence [J]. *Blood*, 2003, 102(2): 497-505.
- [12] Call M E, Wucherpfenning K W. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function [J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 101-125.
- [13] 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: 8878-8886.
- [14] 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): 135-145.
- [15] de Witte M A, Jorritsma A, Kaiser A, *et al.* Requirements for effective antitumor responses of TCR transduced T cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181(7): 5128-5136.
- [16] Jorritsma A, Gomez-Eerland R, Dokter M, *et al.* Selecting highly affine and well-expressed TCRs for gene therapy

- of melanoma [J]. *Blood*, 2007, 110(10): 3564-3572.
- [17] Yang S, Cohen C J, Peng P D, *et al.* Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(21): 1411-1423.
- [18] Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, *et al.* Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette [J]. *J Mol Med*, 2008, 86(5): 573-583.
- [19] Heemskerk M H, Hagedoorn R S, van der Hoorn M A, *et al.* Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex [J]. *Blood*, 2007, 109(1): 235-243.
- [20] Sommermeyer D, Neudorfer J, Weinhold M, *et al.* Designer T cells by T cell receptor replacement [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(11): 3052-3059.
- [21] Thomas S, Xue S A, Cesco-Gaspere M, *et al.* Targeting the Wilms tumor antigen 1 by TCR gene transfer: TCR variants improve tetramer binding but not the function of gene modified human T cells [J]. *J Immunol*, 2007, 179(9): 5803-5810.
- [22] Falkenburg W J J, Melenhorst J J, Kester M G D, *et al.* Allogeneic HLA-A2-restricted WT1-specific T cells from mismatched donors are highly reactive but show potentially hazardous promiscuity [J]. *Blood*, 2009, 114: 4081.
- [23] 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): 2331-2338.
- [24] 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): 3898-3903.
- [25] Thomas S, Stauss H J, Morris E C. Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer [J]. *Immunology*, 2010, 129(2): 170-177.
- [26] Sebestyen Z, Schooten E, Sals T, *et al.* Human TCR that incorporate CD3 zeta induce highly preferred pairing between TCR alpha and beta chains following gene transfer [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7736-7746.
- [27] van der Veken L T, Coccoris M, Swart E, *et al.* Alpha beta T cell receptor transfer to gamma delta T cells generates functional effector cells without mixed TCR dimers *in vivo* [J]. *J Immunol*, 2009, 182(1): 164-170.
- [28] Hiasa A, Nishikawa H, Hirayama M, *et al.* Rapid alphabeta TCR-mediated responses in gammadelta T cells transduced with cancer-specific TCR genes [J]. *Gene Ther*, 2009, 16(5): 620-628.
- [29] Xue S A, Gao L, Hart D, *et al.* Elimination of human leukemia cells in NOD/SCID mice by WT1-TCR gene-transduced human T cells [J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3062-3067.
- [30] Kuball J, Schmitz F W, Voss R H, *et al.* Cooperation of human tumor-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after redirection of their specificity by a high-affinity p53A2.1-specific TCR [J]. *Immunity*, 2005, 22(1): 117-129.
- [31] Chlewicki L K, Holler P D, Monti B C, *et al.* High-affinity, peptide-specific T cell receptors can be generated by mutations in CDR1, CDR2 or CDR3 [J]. *J Mol Biol*, 2005, 346(1): 223-239.
- [32] Li Y, Moysey R, Molloy P E, *et al.* Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(3): 349-354.
- [33] Weber K S, Donermeyer D L, Allen P M, *et al.* Class II-restricted T cell receptor engineered *in vitro* for higher affinity retains peptide specificity and function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52): 19033-19038.
- [34] Varela-Rohena A, Molloy P E, Dunn S M, *et al.* Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor [J]. *Nat Med*, 2008, 14(12): 1390-1395.
- [35] Donermeyer D L, Weber K S, Kranz D M, *et al.* The study of high-affinity TCRs reveals duality in T cell recognition of antigen: specificity and degeneracy [J]. *J Immunol*, 2006, 177(10): 6911-6919.
- [36] Robbins P F, Li Y F, El-Gamil M, *et al.* Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions [J]. *J Immunol*, 2008, 180(9): 6116-6131.
- [37] 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): 463-475.