

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.08.001

应用新型假包膜糖蛋白提高慢病毒感染 人 T 细胞效率的研究^{*}

张伟光,王 露,尹昌林[△]

(陆军军医大学第一附属医院/西南医院重症医学科,重庆 400038)

[摘要] **目的** 利用基因工程方法构建一种新型假包膜糖蛋白表达载体来提高慢病毒感染人 T 细胞的效率。**方法** 采用分子克隆技术构建 CD5-scFv-VSV-G 质粒;慢病毒包装载体共转染 293T 细胞,包装慢病毒并感染 Jurkat 细胞,流式细胞术检测转导率并计算其滴度;慢病毒包装载体共转染 293T 细胞,包装慢病毒感染健康人 T 细胞获得嵌合抗原受体 T 细胞。**结果** 与野生型 WT VSV-G 慢病毒比较,CD5-scFv-VSV-G 慢病毒能够提高感染率 1.5 倍(10%的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 Jurkat 细胞的感染率为 63.1%),而在 293T 细胞中,不同比例 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒的感染率都低于野生型 WT VSV-G 慢病毒。当感染复数(MOI)=5 时,与野生型 WT VSV-G 慢病毒比较,CD5-scFv-VSV-G 慢病毒能够提高感染率 1.6 倍(33%的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 CD3⁺T 细胞的感染率为 44.1%);当 MOI=10 时,与野生型 WT VSV-G 慢病毒比较,CD5-scFv-VSV-G 慢病毒也能够提高感染率 1.5 倍(33%的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 CD3⁺T 细胞的感染率为 78.8%)。**结论** 该研究成功构建了一种新型假包膜糖蛋白表达载体,与野生型慢病毒 WT VSV-G 比较,新型假包膜糖蛋白包装的慢病毒可提高其转导人 T 细胞效率。

[关键词] 慢病毒;基因治疗;假包膜糖蛋白;嵌合抗原受体 T 细胞

[中图分类号] R392-3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2023)08-1121-07

Preliminary study on application of novel pseudo-envelope glycoproteins to improve efficiency of lentivirus infection in human T cells^{*}

ZHANG Weiguang, WANG Lu, YIN Changlin[△]

(Department of Critical Care Medicine, Southwest Hospital/the First Affiliated Hospital
of the Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To use the genetic engineering method to construct a new type of pseudo-envelope glycoprotein expression vector to improve the efficiency of lentivirus infection in human T cells. **Methods** The CD5-scFv-VSV-G plasmid was constructed by the molecular cloning technology; the lentiviral packaging vectors co-transfected 293T cells, packaged the lentivirus and infected the Jurkat cells, the flow cytometry was used to detect the transduction rate and calculate the titers; the lentiviral packaging vectors co-transfected with 293T cells to obtain the chimeric antigen receptor T cells from lentiviral infection in healthy person. **Results** Compared with the wild-type WT VSV-G lentivirus, CD5-scFv-VSV-G lentiviral particles could increase the infection rate by 1.5 times (the infection rate of 10% of CD5-scFv-VSV-G lentiviral particles on CD5⁺Jurkat cells was 63.1%), while in 293T cells, the infection rates of viral particles produced by different proportions of CD5-scFv-VSV-G all were lower than that of WT VSV-G lentivirus particles. When the multiplicity of infection (MOI) was 5, compared with the wild type WT VSV-G, the CD5-scFv-VSV-G lentivirus particles could increase the infection rate by 1.6 times (the infection rate of 33% of CD5-scFv-VSV-G lentivirus particles on the CD3⁺T cells was 44.1%); when MOI=10, the CD5-scFv-VSV-G lentivirus particles could increase the infection rate by 1.5 times (the infection rate of 33% of CD5-scFv-VSV-G lentivirus particles on CD3⁺T cells was 78.8%). **Conclusion** This study successfully constructs a new type pseudo-envelope glycoprotein expression vector. Compared with the wild-type WT VSV-G lentivirus, the new type pseudo-envelope glycoprotein packaged lentivirus could increase its transduction efficiency of human T cells.

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81573110)。 作者简介:张伟光(1995—),助理研究员,硕士,主要从事肿瘤免疫治疗研究。

[△] 通信作者, E-mail:ycl0315@163.com。

[Key words] lentiviral; gene therapy; pseudo-envelope glycoprotein; chimeric antigen receptor T cell therapy

基因治疗是随着 DNA 重组技术、基因克隆技术的成熟而发展起来的革命性医疗技术之一,是以改变人的遗传物质为基础的生物医学治疗手段^[1]。基因治疗根据载体的给药途径可分为离体和在体基因治疗 2 种方式:离体基因治疗是直接取异体正常细胞或患者自身的病变细胞,在体外通过基因导入的方式修饰细胞,将修饰后的细胞体外扩增后回输到患者体内,从而达到治疗疾病的目的;在体基因治疗则是利用非病毒或病毒载体直接将治疗基因递送到患者体内来治疗疾病。在基因治疗环节中,应用的载体主要有逆转录病毒载体和腺病毒载体,但腺病毒载体不能整合至宿主细胞且免疫原性高。慢病毒载体作为一类来源于逆转录病毒的载体,以其转染效率高,可感染分裂期和非分裂期细胞,可容纳较大的基因片段等优点,被广泛用于基因治疗、疫苗生产等科学研究领域^[2]。慢病毒载体系统的建立,经历了一个逐步完善的过程,其主要目的是提高载体的生物安全性和感染效率^[3-4]。目前具有增强安全性的自灭活第三代慢病毒载体系统在临床上应用已越来越广泛,有研究表明,其在重症联合免疫缺陷症(SCID)的基因治疗和嵌合抗原受体 T 细胞的肿瘤治疗中取得了成功^[5-7]。

慢病毒载体可将其包膜蛋白经过改造,由水泡性口炎病毒 G(VSV-G)蛋白代替,VSV-G 蛋白能够识别低密度脂蛋白(LDL)受体,促进病毒内吞,使慢病毒能轻松进入多种细胞中,同时可提高慢病毒滴度,扩大慢病毒的适用范围^[8]。VSV-G 蛋白是通过信号序列(signal sequence,SS)定向内质网,在内质网里被糖基化形成三聚体并整合到细胞膜中^[9-10]。造血细胞(包括原发性 T 细胞和淋巴瘤细胞)和一些上皮细胞系的转导率较低,且需要使用高病毒感染复数(multiplicity of infection,MOI)^[11-12]。据报道,对慢病毒 VSV-G 包膜进行基因修饰以与特定抗原结合,是增加接触时间和提高慢病毒摄取率的一种手段^[13-14]。全抗体或抗体片段可作为病毒和细胞膜之间的高亲和力和力连接物,以提高转导效率^[15]。T 细胞介导过继性细胞疗法的问世给很多癌症患者带来了希望,但过继性细胞疗法中很多因素还需要优化,如特异性、亲和力、分化水平和 T 细胞的转移数量等,这些因素会影响其免疫活性和体内功能^[16]。由于 CD5 分子在 T 淋巴细胞表面广泛表达,笔者通过将 CD5 分子的单链抗体片段和 VSV-G 蛋白串联从而达到增强病毒和细胞膜之间的接触。

本研究成功构建了新型假包膜糖蛋白表达载体,通过将野生 WT VSV-G 质粒和构建的 CD5 单链抗体修饰的 VSV-G(CD5-scFv-VSV-G)质粒混合,确定了 WT VSVG 质粒与 CD5-scFv-VSV-G 质粒的最佳

混合比例,获得了高滴度的慢病毒制剂并提高转导效率,这可能为 T 细胞介导过继性免疫疗法的进一步开展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

慢病毒载体 pLenti-EF1 α -lucgfp 质粒、包装质粒 PLP1、PLP2 与 pMD2. G 由本实验构建并保存;质粒抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司;限制性内切酶购自美国 New England Biolabs 公司;胶回收试剂盒和去内毒素质粒大提试剂盒购自美国 Axygen 公司;DNA 连接酶购自日本 TaKaRa 公司;无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技公司;PE 抗人 CD3 抗体购自美国 BioLegend 公司;琼脂糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司;人肾上皮 293T 细胞系购自大连宝生物工程有限公司;人 T 细胞白血病 Jurkat 细胞株(CD5⁺)购自美国 ATCC 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、细胞基础培养基 DMEM-MEM、RPMI-1640 及细胞培养其他成分 HEPES、D-PBS 购自美国 Gibco 公司;聚凝胺购自美国 Sigma 公司;磁珠(DynabeadsTM Human T-Activator CD3/CD28)购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

由苏州金唯智生物科技有限公司合成 CD5-Linker-scFv 序列,将载体 pMD2G(本实验室保存)用 EcoR I 酶切,重叠 PCR 连接 CD5-Linker-scFv 和 VSV-G 片段,利用无缝克隆技术将整个片段和酶切 pMD2G 载体连接,在 37 °C 连接 1 h 后,转化涂于氨苄抗性 LB 平板培养基上,通过挑取单克隆、扩大培养、抽提质粒、酶切验证后测序鉴定重组载体 CD5-scFv-VSV-G 质粒,用于包装不同比例 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒。根据 GenBank 中基因序列设计 PCR 扩增引物,见表 1。

1.2.2 慢病毒包装

准备 2 个无菌的离心管 a 和 b,分别加入 5 mL 的 PBS,在 a 管中加入一定比例的聚醚酰亚胺(PEI),在 b 管中加入目的质粒(可以表达绿色荧光蛋白 Zs-green)和包装质粒[PLP1、PLP2 和 pMD2-G(WT VSV-G)]静置 5 min 后将 a 管中试剂加入 b 管中,轻轻混合均匀。在转染过程中为了确定最佳的慢病毒载体配比,用不同化学计量比的 pMD2. G 质粒(WT VSV-G 或 CD5-scFv-VSV-G)来包装表达绿色荧光蛋白 Zs-green 的慢病毒颗粒。产生相关产量并具有 10%、20%、33% 和 67% CD5-scFv-VSV-G 的抗体靶向病毒颗粒。转染后 48 h 换液,收取培养上清液,72 h 后再次收取培养上清液,过 0.45 μ m MILLEX[®]-

HP 针式滤器。将病毒原液 4℃、32 000 r/min 超速离心 2 h,将沉淀溶解在 X-VIVO 培养液中。

1.2.3 滴度检测

96 孔尖底板每孔铺 0.5×10⁶ 个 Jurkat 细胞,200 μL/孔,将浓缩的病毒液稀释 100 倍,各孔加入 400 μL、40 μL 和 10 μL。32℃、1 200×g 离心 90 min。4

h 后用 DPBS 将细胞洗一次后铺于 12 孔板,转导 48 h 后用流式细胞术检测。圈出阳性细胞群后,计算病毒滴度(T),单位为 TU/mL。T=(P×N)/(D×V),其中 P 为流式阳性细胞比例,N 为转导的细胞数,D 为稀释倍数,V 为转导时的体积。

表 1 PCR 扩增引物

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
CD5 正向	GTGAGATCTGAATTCATGTACAGGATGCAACTC	33
CD5 反向	AGATCCGCCACCACCAGA	18
Linker-VSV-G 正向	GGTGGTGCGGATCTAAGTTCACCATAGTTTTTCCACAC	38
VSV-G 正向	CTGGTGGGGTGAATTTTACTTTCCAAGTCGGTTCATCTCT	40

1.2.4 T 细胞的制备和慢病毒转导

利用外周血淋巴细胞分离液 Ficoll 提取健康人外周血中单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC),按照 T 细胞与磁珠数量之比为 1:1 加入 α-CD3/α-CD28 抗体包被的磁珠分离人 T 细胞,并置于含 10%血清和 100 μg/mL IL-2 的 AIM-V 培养基中培养。24 h 后,计数活化的人 CD3⁺ T 细胞。于每孔加入 0.1×10⁶ 个 T 细胞和感染复数(Multiplicity of infection,MOI)分别为 5 和 10 的病毒浓缩液,培养基补齐至 200 μL,并于每孔加入聚凝胺(1:2 000),32℃、1 200 r/min 离心 90 min,结束后置于 37℃细胞培养箱中,4 h 后换液。离心换液后继续培养,每隔 2~3 d 补充培养基或者传代。取转导 5 d 后的 T 细胞,在 DynaMagTM-5 磁力架上将磁珠脱掉,2 500 r/min 离心 3 min 收集细胞。用流式染色缓冲液(由 50 mL PBS 加 1 mL FBS 细胞配制而成)洗涤细胞,离心弃上清液;再用 FACS 洗 2 遍,弃掉上清液,200 μL 流式染色缓冲液重悬细胞至流式管,用流式细胞仪检测 Zsgreen 的表达情况。

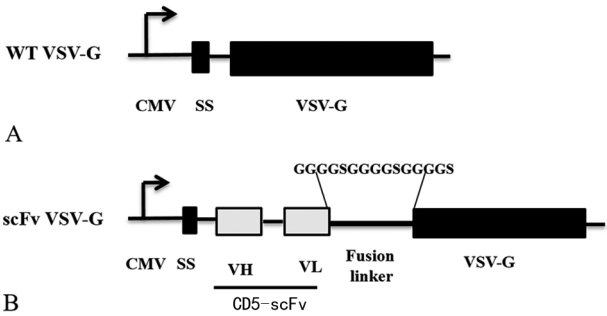
1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prim 6.0 软件进行数据统计分析和图表制作,所有实验至少重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析使用非配对 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 表达载体的构建与鉴定

为了整合一个识别 CD5 的单链抗体片段,本研究设计了一种 VSV-G 融合蛋白,其包含信号序列(SS)、CD5-scFv 片段、Fusion linker (GGGGSGGGGSS GGGG)和全长的 VSV-G(图 1)。通过分子克隆技术,成功构建了 CD5-scFv-VSV-G 重组质粒,并通过 Bsa I 酶进行酶切鉴定,结果得到 2 条条带,符合预期结果,见图 2。



A: WT VSV-G 的分子结构;B:CD5-scFv-VSV-G 的分子结构。
图 1 分子结构示意图

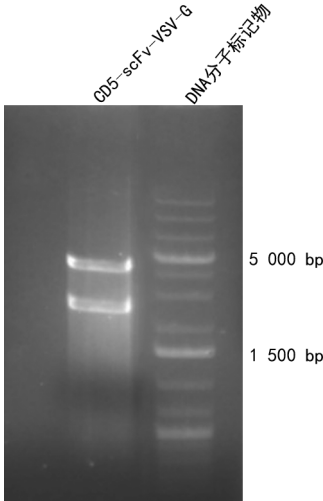


图 2 CD5-scFv-VSV-G 重组质粒酶切鉴定结果

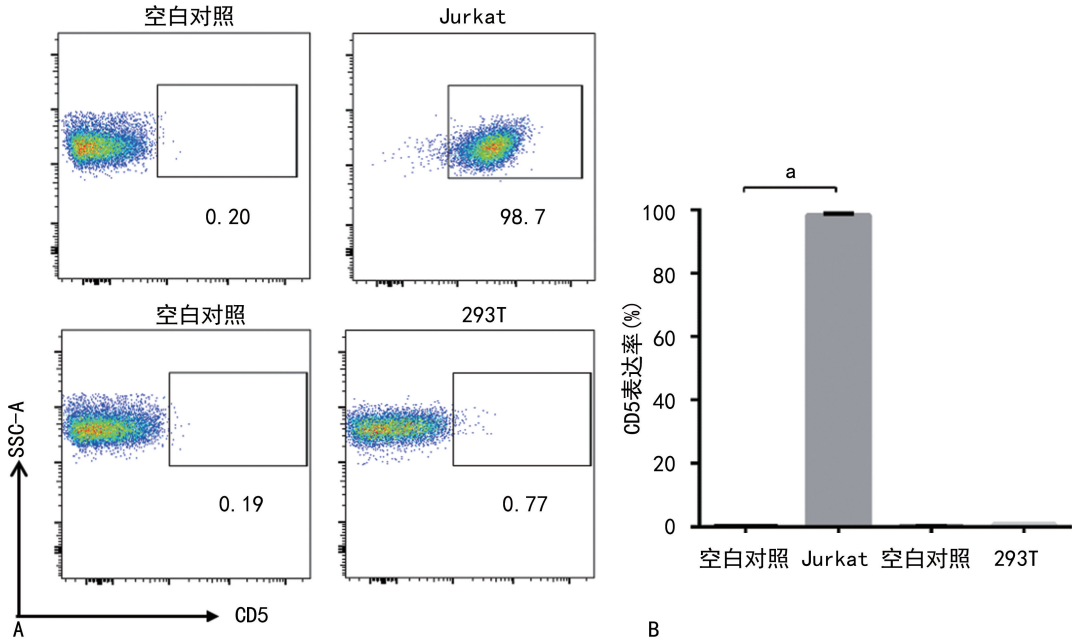
2.2 含单链抗体融合蛋白慢病毒的生产

为了生产 VSV-G 假型慢病毒,293T 细胞用含有表达 Zsgreen 的慢病毒表达载体和其中 3 种编码 VSV-G (pMD2G)包装质粒的 4 种质粒混合物瞬时转染。用不同化学计量比的 pMD2. G 质粒(WT VSV-G 或 CD5-scFv-VSV-G)来包装表达 Zsgreen 的慢病毒,具有 10%、20%、33%和 67%的 CD5-scFv-VSV-G 的抗体靶向颗粒,见表 2。

2.3 不同比例的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 Jurkat 细胞和 293T 细胞的转导

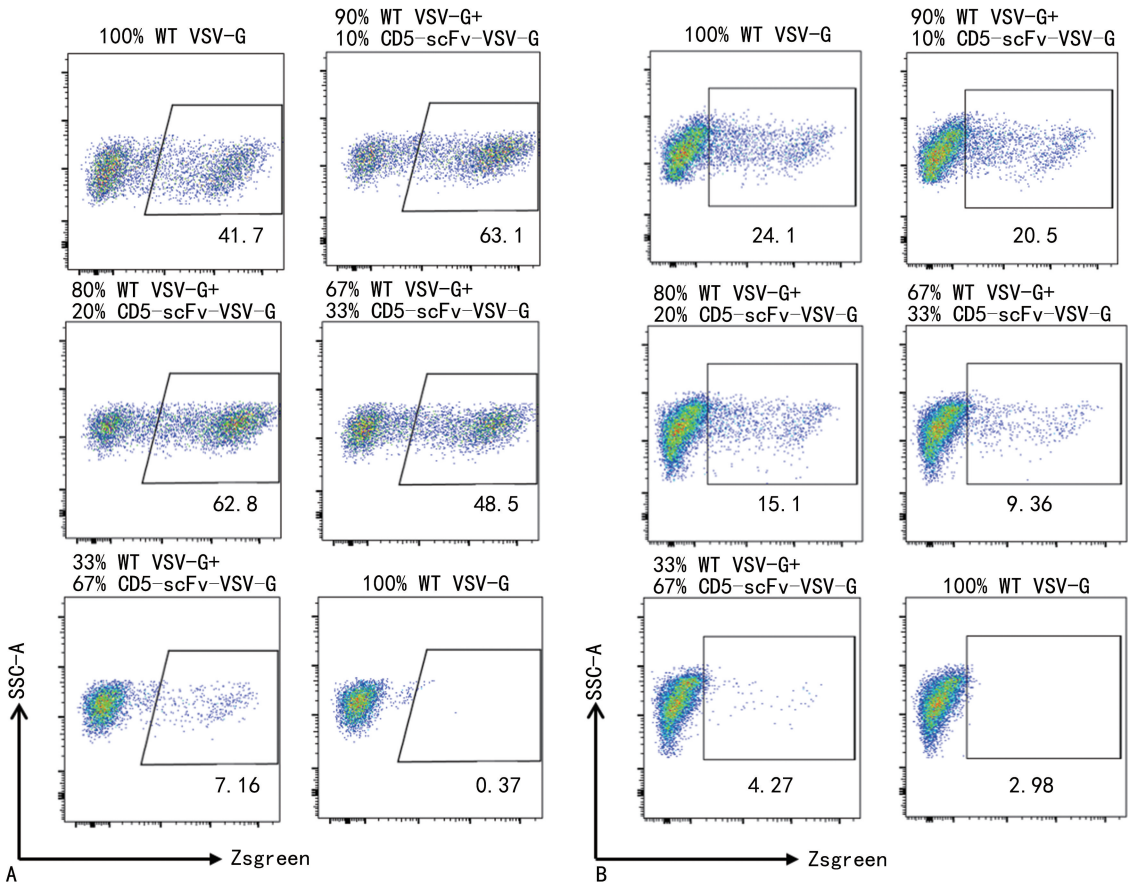
首先通过流式细胞术检测 Jurkat 细胞和 293T 细胞表面 CD5 分子的表达率分别为 98. 7% 和 0. 77%,见图 3。在测试编码 Zsgreen 的抗体靶向病毒颗粒感染 Jurkat 细胞和 293T 细胞的能力试验中,与野生型慢病毒 WT VSV-G 比较,CD5-scFv-VSV-G

慢病毒能够提高感染率 1. 5 倍(10% 的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 Jurkat 细胞的感染率为 63. 1%), 100% 的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒颗粒几乎无感染性(图 4A)。而在 293T 细胞中,不同比例 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒的感染率都低于 WT VSV-G(图 4B)。



A:流式图;B:流式定量分析图。^a: $P<0.0001$,与空白对照比较。

图 3 流式细胞术检测细胞 CD5 分子的表达



A:不同比例的慢病毒转导 Jurkat 细胞的能力;B:不同比例的慢病毒转导 293T 细胞的能力。

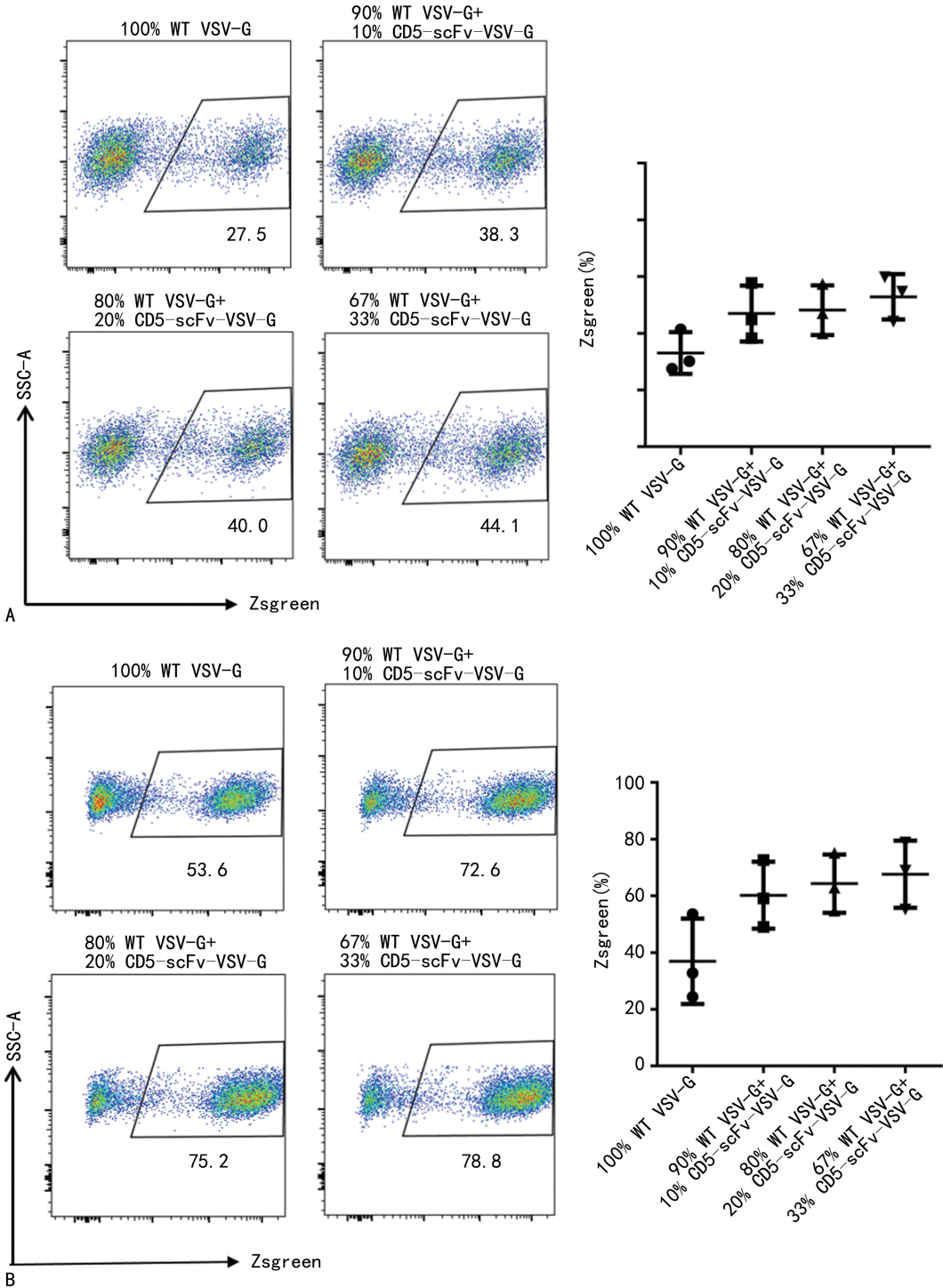
图 4 不同比例的慢病毒对 Jurkat 细胞、293T 细胞的转导

表 2 6 种不同配比表达 Zsgreen 的慢病毒的滴度

配比	WT VSV-G 含量 (%)	CD5-scFv-VSV-G 含量 (%)	滴度 (TU/mL)
配比 1	100	0	4.2×10^7
配比 2	90	10	6.3×10^7
配比 3	80	20	6.3×10^7
配比 4	67	33	4.8×10^7
配比 5	33	67	0.7×10^7
配比 6	0	100	0.4×10^6

2.4 不同比例的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对活化 T 细胞的转导

将抗体靶向 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒感染人 CD3⁺T 细胞,以未感染组作为对照组。当 MOI=5 时,与野生型慢病毒 WT VSV-G 比较,CD5-scFv-VSV-G 慢病毒能够提高感染率 1.6 倍(33%的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 CD3⁺T 细胞的感染率为 44.1%);当 MOI=10 时,CD5-scFv-VSV-G 慢病毒也能够提高感染率 1.5 倍(33%的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 CD3⁺T 细胞的感染率为 78.8%),见图 5。



A: MOI=5 时,不同比例的慢病毒转导 CD3⁺T 细胞的能力;B: MOI=10 时,不同比例的慢病毒转导 CD3⁺T 细胞的能力。

图 5 不同比例的慢病毒对 CD3⁺T 细胞的转导

3 讨 论

病毒载体已经从大量病毒中衍生出来,由于其独特的性质,这些病毒载体被转化为有效的工具,用于将基因传递到感兴趣的细胞中。它们可以根据其是否融入宿主细胞基因组的能力进行分类。腺相关病毒和腺病毒^[17]是非整合性的,而逆转录病毒,如泡沫病毒^[18]、鼠白血病病毒(MLV)或人类免疫缺陷病毒(HIV)等是随机整合并稳定遗传的。最常用的载体是由 HIV 衍生出来的慢病毒载体,其可以在哺乳动物细胞中有效地进行基因转移,是影响造血系统的单基因疾病最安全、最有效的治疗方法之一^[19]。本研究使用第三代慢病毒包装系统。据报道,第三代慢病毒载体较二代安全性更高,因为第三代在第二代的基础上删除了 tat 基因,该基因对野生型人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)的复制至关重要。改变 3'端的长末端重复序列(LTR)使载体“自失活”,已防止整合基因被重新包装,可稳定地将基因转移到哺乳动物细胞中。与其他病毒载体系统不同,慢病毒转导的细胞表现出应激信号途径的最小激活,因此可用于基于细胞的测定、基因治疗和免疫治疗^[20-21]。

目前,关于目标基因有效传递到靶细胞的最佳转导条件存在很大争议^[22]。特定细胞类型的成功转导取决于许多因素,包括细胞密度、传代次数、慢病毒制剂的纯度、病毒转滴度、MOI 和促进转导的佐剂的存在^[23-24]。已知原代淋巴细胞、造血肿瘤细胞及淋巴系细胞系难以被有效转导,在这些细胞类型中的基因转移通常需要使用高 MOI^[25],并且依赖于高滴度载体制剂的生产。基因转移到原代细胞中的高转导率及产生高滴度病毒颗粒用于提高大规模转导患者细胞的能力,这是临床试验的先决条件。由于这些病毒的大规模生产极其复杂和昂贵,慢病毒转导率的提高可减少病毒的用量,从而降低临床试验成本。此外,降低 MOI 将阻止每个细胞插入多个慢病毒基因组拷贝,从而降低插入突变的风险。

通过不同的策略可以实现更高的基因转导效率。这些方法包括使用通过超速离心获得的浓缩病毒制剂或通过超滤获得的浓缩病毒制剂。另一种替代策略是通过添加促进转导的佐剂,如聚阳离子或阳离子脂质体,来提高慢病毒基因转移速率。然而,这些辅助治疗大多具有毒性作用,限制了它们的使用,尤其是在原始来源的敏感靶细胞中。有研究设计出了一种 Lv,可以确保在体内给药时的选择性并稳定地将基因传递到特定的 T 细胞亚型。Lv 用含有 CD8 特异性单链抗体的 MVH 糖蛋白进行伪分型,使其能够通过 CD8 表面分子作为受体,将目的基因特异性地传递到 CD8⁺T 细胞。研究证明,与 VSV-G 伪分型 Lv 比较,CD8 特异性 Lv 需要 5~10 倍的载体剂量才能获得相同的转导效率^[26]。该团队还设计了 Lv 载体系统,该系统依赖于 MVH 糖蛋白与 CD4 特异性锚蛋

白重复蛋白的伪分型,创建了一个进入 CD4⁺T 细胞的 Lv 特异性重定向。这种 CD4-Lv 有效靶向 CD4⁺T 细胞,可在人外周血单核细胞(体外)和人小鼠模型中进行基因传递(体内)^[27]。本研究利用基因工程方法构建一种新型假包膜糖蛋白表达载体,制备具有 10%、20%、33%和 67% CD5-scFv-VSV-G 的抗体靶向病毒。当 MOI=5 时,与野生型 WT VSV-G 慢病毒比较,CD5-scFv-VSV-G 慢病毒能够明显提高感染率 1.6 倍(33%的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 CD3⁺T 细胞的感染率为 44.1%);当 MOI=10 时,CD5-scFv-VSV-G 慢病毒也能够明显提高感染率 1.5 倍(33%的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒对 CD3⁺T 细胞的感染率为 78.8%)。

本研究成功构建了一种新型假包膜糖蛋白表达载体,笔者通过 WT VSV-G 和添加 CD5 单链抗体修饰 VSV-G 混合物的慢病毒来提高 T 细胞转导率。在转导活化人 CD3⁺T 细胞的实验中,添加 33%比例的 CD5-scFv-VSV-G 慢病毒获得最佳结果。

参考文献

[1] GRUNTMAN A M, FLOTTE T R. The rapidly evolving state of gene therapy[J]. FASEB J, 2018, 32(4):1733-1740.

[2] 解笑宸,于斐,姚粤峰,等. 慢病毒介导 PTEN 基因表达降低的 RSC96 施万细胞系模型建立[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2021, 14(1):54-60.

[3] OLBRICH H, SLABIK C, STRIPECKE R. Reconstructing the immune system with lentiviral vectors[J]. Virus Genes, 2017, 53(5):723-732.

[4] MERTEN O W, HEBBEN M, BOVOLENTA C. Production of lentiviral vectors[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016, 3:16017.

[5] MALDINI C R, CLAIBORNE D T, OKAWA K, et al. Dual CD4-based CAR T cells with distinct costimulatory domains mitigate HIV pathogenesis in vivo[J]. Nat Med, 2020, 26(11):1776-1787.

[6] CHEN F, CAI B, GAO Y, et al. Suicide gene-mediated ablation of tumor-initiating mouse pluripotent stem cells[J]. Biomaterials, 2013, 34(6):1701-1711.

[7] MARTÍNEZ-MOLINA E, CHOCARRO-WRONA C, MARTÍNEZ-MORENO D, et al. Large-scale production of lentiviral vectors: current perspectives and challenges[J]. Pharmaceuticals, 2020, 12(11):1051.

[8] GUTIERREZ-GUERRERO A, COSSET F L, VERHOEYEN E. Lentiviral vector pseudo-

- types; precious tools to improve gene modification of hematopoietic cells for research and gene therapy[J]. *Viruses*, 2020, 12(9):1016.
- [9] FARLEY D C, IQBALL S, SMITH J C, et al. Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors-in vitro and in vivo implications[J]. *J Gene Med*, 2007, 9(5):345-356.
- [10] HÖFIG I, BARTH S, SALOMON M, et al. Systematic improvement of lentivirus transduction protocols by antibody fragments fused to VSV-G as envelope glycoprotein[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(13):4204-4212.
- [11] LAMB L S JR, BOWERSOCK J, DASGUPTA A, et al. Engineered drug resistant $\gamma\delta$ T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: a strategy for combining chemo- and immunotherapy[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e51805.
- [12] QUINN S, LENART N, DRONZEK V, et al. Genetic modification of T cells for the immunotherapy of cancer [J]. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(3):457.
- [13] NALDINI L, TRONO D, VERMA I M. Lentiviral vectors, two decades later [J]. *Science*, 2016, 353(6304):1101-1102.
- [14] WAEHLER R, RUSSELL S J, CURIEL D T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy[J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8:573.
- [15] KAMEYAMA Y, KAWABE Y, ITO A, KAMIHIRA M. Antibody-dependent gene transduction using gammaretroviral and lentiviral vectors pseudotyped with chimeric vesicular stomatitis virus glycoprotein[J]. *J Virol Methods*, 2008, 153(1):49-54.
- [16] JAKHARIA N, HOWARD D, RIEDEL D J. CMV infection in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment strategies[J]. *Curr Treat Options Infect Dis*, 2021, 13(3):123-140.
- [17] CHEN Y H, KEISER M S, DAVIDSON B L. Viral vectors for gene transfer[J]. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2018, 8(4):e58.
- [18] KIM J, LEE G E, SHIN C G. Foamy virus integrase in development of viral vector for gene therapy[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(9):1273-1281.
- [19] GUTIERREZ-GUERRERO A, COSSET F L, VERHOEYEN E. Lentiviral vector pseudo types; precious tools to improve gene modification of hematopoietic cells for research and gene therapy[J]. *Viruses*, 2020, 12(9):1016.
- [20] FERREIRA M V, CABRAL E T, COROADINHA A S. Progress and perspectives in the development of lentiviral vector producer cells [J]. *Biotechnol J*, 2021, 16(1):e2000017.
- [21] LABBÉ R P, VESSILLIER S, RAFIQ Q A. Lentiviral vectors for t cell engineering: clinical applications, bioprocessing and future perspectives[J]. *Viruses*, 2021, 13(8):1528.
- [22] MILLINGTON M, AENDT A, BOYD M, et al. Towards a clinically relevant lentiviral transduction protocol for primary human CD34 haematopoietic stem/progenitor cells[J]. *PLoS One*, 2009, 4:e6461.
- [23] ANASTASOV N, HÖFIG I, MALL S, et al. Optimized lentiviral transduction protocols by use of a poloxamer enhancer, spinoculation, and scfv-antibody fusions to VSV-G[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1448:49-61.
- [24] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131:861-872.
- [25] CHOCKLEY P, PATIL S L, GOTTSCHALK S. Transient blockade of TBK1/IKK allows efficient transduction of primary human natural killer cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped lentiviral vectors [J]. *Cytotherapy*, 2021, 23(9):787-792.
- [26] ZHOU Q, SCHNEIDER I C, EDES I, et al. T-cell receptor gene transfer exclusively to human CD8(+) cells enhances tumor cell killing. *Blood*, 2012, 120(22):4334-4342.
- [27] ZHOU Q, UHLIG K M, MUTH A, et al. Exclusive transduction of human CD4⁺ T cells upon systemic delivery of CD4-targeted lentiviral vectors[J]. *J Immunol*, 2015, 195(5):2493-2501.