

国产与进口CD3/CD28激活磁珠制备CAR-T细胞的性能对比

魏献政^{1,2,3}, 张书瑜^{1,2,3}, 金钰航^{1,2,3}, 王璞^{1,2,3}, 王旭^{1,2,3}, 郑骏年^{2,3}, 刘丹^{1,2,3}, 施明^{1,2,3} (1. 徐州医科大学肿瘤研究所, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院临床肿瘤中心, 江苏 徐州 221004; 3. 江苏省肿瘤生物治疗协同创新中心, 江苏 徐州 221004)

[摘要] **目的:** 比较国产与进口CD3/CD28激活磁珠制备的CAR-T细胞的性能差异, 为国内CAR-T细胞研发和生产提供备用或替代方案。**方法:** 以进口CD3/CD28激活磁珠:CD3⁺T细胞比例为1:1的成熟方案作为研究对照, 国产磁珠设置1:2、1:1和2:1的比例梯度激活T细胞, T细胞激活72 h后使用CAR慢病毒感染制备CAR-T细胞。分别在慢病毒感染后的第2、4、7天计数, 监测CAR-T细胞增殖情况; 感染5 d后采用流式细胞术检测CAR-T细胞阳性率; 感染8 d后采用流式细胞术检测CAR-T细胞的CD4/CD8分型情况和PD1⁺TIM3⁺耗竭细胞比例。**结果:** 国产CD3/CD28激活磁珠与进口磁珠制备的CAR-T细胞CD4/CD8分型相似, CAR-T细胞阳性率略低于进口磁珠(53.7% vs 57.9%), 但CAR-T细胞扩增较进口磁珠增加1倍左右, 耗竭水平仅为进口磁珠的一半(4.21% vs 7.91%)。此外, 国产磁珠的使用量低于进口磁珠, 有利于降低CAR-T细胞研发和生产成本。**结论:** 国产CD3/CD28激活磁珠用于制备CAR-T细胞总体性能不劣于进口磁珠, 有潜力作为进口磁珠的备用或替代方案。

[关键词] CD3/CD28激活磁珠; CAR-T细胞制备; 性能对比; 国产替代

[中图分类号] R730.51; R392.12; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)05-0492-06

Performance comparison of domestic and imported CD3/CD28 activation beads for CAR-T cell manufacturing

WEI Xianzheng^{1,2,3}, ZHANG Shuyu^{1,2,3}, JIN Yuhang^{1,2,3}, WANG Pu^{1,2,3}, WANG Xu^{1,2,3}, ZHENG Junnian^{2,3}, LIU Dan^{1,2,3}, SHI Ming^{1,2,3} (1. Cancer Institute, Xuzhou Medical University, Jiangsu, Xuzhou 221004, China; 2. Center of Clinical Oncology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu, Xuzhou 221004, China; 3. Jiangsu Center for the Collaboration and Innovation of Cancer Biotherapy, Xuzhou Medical University, Jiangsu, Xuzhou 221004, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the performance differences of domestic and imported CD3/CD28 activation beads for manufacturing CAR-T cells, providing a backup or alternative for domestic CAR-T cell research and manufacture. **Methods:** A mature protocol using imported CD3/CD28 activation beads with a 1:1 ratio for CD3⁺T cells was implemented as research control. Domestic beads were used with gradient ratios of 1:2, 1:1, and 2:1 to activate T cells. 72 h after T cell activation, CAR-T cells were manufactured by CAR lentiviral infection and cell proliferation was monitored at 2-, 4-, and 7-days post-infection. Flow Cytometry was used to detect CAR-T cell positivity 5 days after infection and to detect CD4/CD8 phenotype of CAR-T cells and PD1⁺TIM3⁺ cell exhaustion ratio 8 days after infection. **Results:** CAR-T cells manufactured by domestic CD3/CD28 activation beads exhibited similar phenotype compared with those manufactured by imported CD4/CD8 beads. The positive rate of CAR-T cells prepared with domestic beads was slightly lower than that of imported beads (53.7% vs 57.9%). However, the proliferation of CAR-T cells manufactured by domestic beads was about twice that of cells manufactured by imported beads, and the exhaustion level was only half that of imported beads (4.21% vs 7.91%). Moreover, the use of domestic magnetic beads was lower than that of imported magnetic beads, which was advantageous for cutting the costs of CAR-T cells research and manufacture. **Conclusion:** Domestic CD3/CD28 activation beads used for CAR-T cells manufacturing demonstrate comparable overall performance to their imported counterparts, showing potential as a backup or alternative for imported beads.

[Key words] CD3/CD28 activation beads; CAR-T cell manufacturing; performance comparison; domestic alternatives

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(5): 492-497. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.05.006]

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 82304535)

[作者简介] 魏献政(2000—), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗的基础研究

[通信作者] 施明(扫码获取作者联系方式)



CAR-T细胞疗法作为近两年最热门的免疫疗法之一,在以急性淋巴细胞白血病和多发性骨髓瘤为代表的多种血液肿瘤治疗中取得了令人振奋的疗效,在自身免疫疾病治疗中也具有广阔前景^[1-4]。截至2025年5月,国内外共有十余款CAR-T药物上市,同期还有千余种CAR-T处于研发阶段,研究者正在积极探索新的靶点与适应症^[5-7]。CAR-T细胞制备的核心工艺流程包括PBMC分离、T细胞激活、基因修饰和T细胞扩增等^[8-10]。其中,T细胞激活是影响CAR-T制备阳性率、CD4/CD8分型、增殖持久性和耗竭水平的关键环节之一,是CAR-T细胞制备的重要工艺^[11]。被广泛使用的T细胞激活试剂包括CD3/CD28抗体和CD3/CD28激活磁珠,其中CD3/CD28激活磁珠则是最为常用的T细胞激活方式^[12-13]。目前,国内CAR-T细胞研发和生产过程中使用的CD3/CD28激活磁珠高度依赖进口,但其价格昂贵、供货周期长,增加了国内企业的生产成本和研发周期。此外,当前国际形势充满不确定性和挑战性,长期依赖进口磁珠不利于国内CAR-T细胞治疗产业的健康、可持续发展。CAR-T细胞临床制备使用较为成熟的CD3/CD28激活磁珠是美国Gibco公司生产的CTS™ Dynabeads™ CD3/CD28(货号:40203D),其结构为聚苯乙烯,磁珠粒径4.5 μm,包被的CD3和CD28均为鼠杂交瘤来源抗体,磁珠生产与质量控制符合ISO 9001:2000和ISO 13485:2012要求,FDA已将其设备主文件收录用于新药临床试验申请的交叉参考。而国产CD3/CD28激活磁珠,目前仅有北京同立海源生物科技有限公司开发的ActSep®CD3/CD28分选激活磁珠(货号:GMP-TL603-1000)获得了美国FDA的DMF认证(备案号:038123),同时其磁珠生产与质量控制符合ISO 9001:2000和ISO 13485:2012要求,符合GMP生产标准,可用于CAR-T细胞临床治疗。本研究初步对比了上述进口和国产CD3/CD28激活磁珠制备的CAR-T细胞性能差异,旨在为国内CAR-T细胞研发和生产企业选择CD3/CD28激活磁珠提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

HEK-293T细胞购自中国科学院细胞库/干细胞库,人外周血单个核细胞(PBMC)来自徐州医科大学附属医院,项目经徐州医科大学附属医院医学伦理委员会批准(批准号:XYFY2020-KL062-01),所有参与试验并接受治疗的患者均在参与前签署了知情同意书。HEK-293T细胞培养使用的DMEM培养基(货号:C3110-0500)购自以色列Biological Industries公司,T细胞培养使用的X-VIVO 15培养基(货号:04-418Q)购自美国Lonza公司,培养基添加的胎牛血清

(FBS)(货号:BC-SE-FBS01)购自中国南京生航生物技术有限公司,T细胞培养时添加的细胞因子白细胞介素-2(IL-2,货号:20020)、IL-7(货号:20007)、IL-15(货号:20015)均购自美国Peprotech公司,T细胞分离纯化使用的EasySep™ Human T Cell Isolation Kit(货号:17951)购自加拿大Stemcell公司,CD3/CD28 T细胞激活磁珠购自美国Gibco公司(货号:40203D)和中国北京同立海源生物科技有限公司(货号:GMP-TL603-1000),FITC标记的抗人CD34抗体(货号:ab78165)购自英国Abcam公司,FITC标记的抗人CD4(货号:317407)、APC/Cyanine7标记的抗人CD8(货号:300926)、PE/Cyanine7标记的抗人PD-1(货号:621615)和APC标记的抗人TIM-3抗体(货号:345011)均购自美国Biolegend公司。

1.2 细胞培养

HEK-293T细胞使用含有10% FBS的DMEM培养基培养;T细胞使用含有10% FBS的X-VIVO 15培养基培养,同时添加IL-2(200 U/mL)、IL-7(5 ng/mL)和IL-15(5 ng/mL)。所有细胞培养条件均为37℃、5% CO₂。HEK-293T细胞在实验前经过短串联重复序列(short tandem repeats, STR)技术验证,并经过聚合酶链式反应技术(PCR)检测确认无支原体污染。

1.3 CAR质粒构建

平足蛋白(podoplanin, PDPN)scFv序列获取自发明专利“一种靶向PDPN基因的人源嵌合抗原受体及其用途”(专利号:CN201710316549.5),由中国苏州金唯智生物科技有限公司合成,并以同源重组的方式将该序列构建到pHAGE-EF1α慢病毒载体中,经测序检测正确后使用。该质粒携带RQR8标签并以T2A与PDPN scFv连接,同时以4-1BB作为共刺激分子。因包含RQR8标签,可使用CD34抗体检测阳性率。

1.4 CAR慢病毒包装与滴度检测

将CAR慢病毒载体质粒与慢病毒包装质粒psPAX2和pMD2.G共同转染HEK-293T细胞进行PDPN CAR慢病毒包装,转染8 h后更换成含有1%丙酮酸钠、1% HEPES和10% FBS的DMEM培养基,48 h后收取上清液并加入新鲜的含有1%丙酮酸钠、1% HEPES和10% FBS的DMEM培养基,72 h后再次收取上清液。上清液经超速离心:25 000 rpm、4℃、2 h,最后使用慢病毒溶解缓冲液重悬慢病毒颗粒。

慢病毒浓缩后使用HEK-293T细胞进行慢病毒滴度检测,前1天在24孔板中接种HEK-293T细胞,细胞数量 1×10^5 个/孔,第2天以不同体积(0、0.25、0.5、1、2、4、10 μL)的慢病毒原液感染HEK-293T细胞,感染48 h后通过流式检测HEK-293T细胞CAR阳性率。最后根据公式计算出病毒滴度:滴度(TU/

mL) = 感染前细胞数 × (选择范围在 10%~20% 之间的病毒阳性率) / 慢病毒原液体积 × 10⁻³。

1.5 CAR-T 细胞制备及增殖监测

使用 T 细胞分离纯化试剂盒 EasySep™ Human T Cell Isolation Kit 从患者捐赠的 PBMC 中分离纯化出 CD3⁺ T 细胞, 同时使用美国 Gibco 公司 (进口磁珠与 CD3⁺ T 细胞比例为 1:1) 和中国同立海源公司 (国产磁珠与 CD3⁺ T 细胞比例分别为 1:2、1:1、2:1) 激活 T 细胞。激活 72 h 后, 使用 CAR 慢病毒感染 T 细胞 (MOI = 5), 病毒离心感染 18 h 后换成含有 10% FBS 的 X-VIVO 15 培养基, 培养基同时添加 IL-2 (200 U/mL)、IL-7 (5 ng/mL) 和 IL-15 (5 ng/mL)。国产和进口磁珠均设置 Mock T 组和 CAR-T 组。Mock T 组 (不感染 CAR 病毒, 进口磁珠与 T 细胞比例为 1:1, 国产磁珠与 T 细胞比例为 1:2、1:1 和 2:1); CAR-T 组 (感染 CAR 病毒, 进口磁珠与 T 细胞比例为 1:1, 国产磁珠与 T 细胞比例为 1:2、1:1 和 2:1)。慢病毒感染 T 细胞 48 h 后去除激活磁珠并计数, 在病毒感染的第 2、4、7 天计数并更换新鲜 T 细胞培养基。

1.6 CAR-T 细胞阳性率检测

在 CAR 病毒感染激活 T 细胞后第 5 天, 计数细胞后各取 1 × 10⁵ 个于 1.5 mL EP 管中, 4 °C、300 × g 离心 5 min; 1 mL 1 × PBS 清洗一遍后离心弃上清, 用 50 μL 稀释的 FITC 抗人 CD34 抗体 (使用 2% BSA/PBS 稀释, 稀释比例 1:100) 重悬细胞, 置于冰上避光反应 30 min, 加入 1 mL 2% BSA/PBS, 离心、弃上清液。最后用 400 μL 的 2% BSA/PBS 重悬细胞并转移至流式管内, 在流式细胞分析仪上检测 CAR 阳性率。

1.7 CAR-T 细胞分化及耗竭检测

在 CAR 病毒感染激活 T 细胞后第 8 天, 细胞计数后各取 1 × 10⁶ 个置于 1.5 mL EP 管中, 4 °C、300 × g 离心 5 min; 1 mL 1 × PBS 清洗一遍后离心弃上清液, 用 50 μL 稀释的 FITC 抗人 CD4、APC/Cyanine7 抗人 CD8、PE/Cyanine7 抗人 PD-1 和 APC 抗人 TIM-3 抗体 (使用 2% BSA/PBS 稀释, 稀释比例 1:100) 重悬细胞, 在 4 °C 冰上

避光反应 30 min; 后加入 1 mL 2% BSA/PBS, 离心弃上清液。最后用 400 μL 2% BSA/PBS 重悬细胞并转移至流式管内, 使用流式细胞术检测 CAR-T 细胞分化及耗竭表型。

1.8 统计学处理

所有流式数据使用 FlowJo_V10 版本分析, 使用 Adobe Illustrator 绘图。实验数据采用 GraphPad Prism 10 软件进行绘图和统计。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据分析使用 Student's *t*-test 检验, 多组数据分析使用 One Way ANOVA 检验, 以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 国产和进口 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞的扩增能力比较

本团队前期研究以进口 CD3/CD28 激活磁珠建立了稳健的 CAR-T 细胞制备和扩增技术体系。对于新鲜 PBMC 纯化的 CD3⁺ T 细胞, CD3/CD28 磁珠与 CD3⁺ T 细胞比例为 1:1, 激活 48 h 后感染 CAR 病毒, CAR-T 细胞阳性率和后续扩增最佳。而对于冻存的 CD3⁺ T 细胞, CD3/CD28 磁珠与 CD3⁺ T 细胞比例为 1:1, 激活 72 h 后感染 CAR 病毒最佳。本研究中使用的 PBMC 是冻存样本, 因此在磁珠激活 72 h 后进行慢病毒感染。两种 CD3/CD28 激活磁珠的详细对比见表 1。在 CAR 病毒感染后监测结果显示, 国产磁珠与 CD3⁺ T 细胞 1:2 比例制备的 CAR-T 细胞比进口磁珠扩增倍数高近 1 倍, 1:1 比例制备的 CAR-T 细胞扩增倍数与进口磁珠相当, 而 2:1 比例制备的 CAR-T 细胞扩增倍数仅为进口磁珠的 46.3% (图 1A)。CAR-T 细胞活率监测结果也证实, 高比例国产激活磁珠短期内会损伤 CAR-T 细胞活率, 造成扩增倍数降低, 但随着培养时间延长会逐渐恢复。而在培养的第 7 天, 国产磁珠与 CD3⁺ T 细胞按照 1:2 比例激活的 CAR-T 活率略高于进口磁珠 1:1 比例激活 (96.6% vs 93.0%) (图 1B)。总体而言, 国产磁珠能够以较低磁珠比例实现不劣于进口磁珠的扩增效果。

表 1 进口和国产 CD3/CD28 激活磁珠信息对比

特 征	国产磁珠	进口磁珠
产品名称	ActSep®CD3/CD28 分选激活磁珠	CTS™ Dynabeads™ CD3/CD28
开发企业	北京同立海源生物科技有限公司	美国赛默飞世尔科技公司
产品货号	GMP-TL603-1000	40203D
裸珠结构	聚苯乙烯	聚苯乙烯
抗体来源	CD3 抗体为人源化嵌合抗体 CD28 抗体为鼠杂交瘤抗体	CD3 和 CD28 抗体均为鼠杂交瘤抗体
磁珠粒径	4.5 μm	4.5 μm
FDA 认证	是	是
GMP 标准	是	是

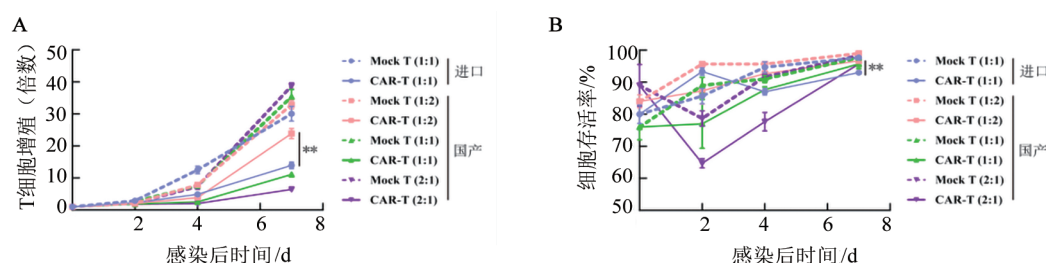


图1 国产和进口 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞(A)扩增倍数和(B)活率

2.2 国产和进口 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞阳性率比较

在 CAR 病毒感染后的第 5 天,使用流式细胞术检测比较国产和进口 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞阳性率,结果显示:国产 CD3/CD28 磁珠与 CD3⁺T 细胞以 1:2 比例激活制备的 CAR-T 细胞阳性率为 53.7%,而进口磁珠制备的 CAR-T 细胞阳性率为 57.9%;以 1:1 和 2:1 比例激活制备的 CAR-T 细胞阳性率均高于进口磁珠,分别为 66% 和 72.1% (图 2A)。监测扩增倍数发现,高比例的国产磁珠对 CAR-T 细胞增殖存在一定程度的抑制作用,因此进

一步分析了流式数据的 FSC 和 SSC 门,该数据可一定程度反映 CAR-T 细胞状态。与先前扩增倍数监测结果一致,Mock T 细胞的活率普遍高于 CAR-T 细胞。国产 CD3/CD28 磁珠与 CD3⁺T 细胞以 1:2 比例激活制备的 CAR-T 细胞与进口磁珠比例相当 (65.0% vs 66.3%),而更高的磁珠与 CD3⁺T 细胞比例则会引起 CAR-T 细胞活率下降 (1:1, 49.3%; 2:1, 53.5%) (图 2B)。上述结果表明:国产 CD3/CD28 激活磁珠以 1:2 比例激活制备的 CAR-T 细胞阳性率略低于进口磁珠 (53.7% vs 57.9%),但 CAR-T 细胞活率与进口磁珠相当 (65.0% vs 66.3%)。

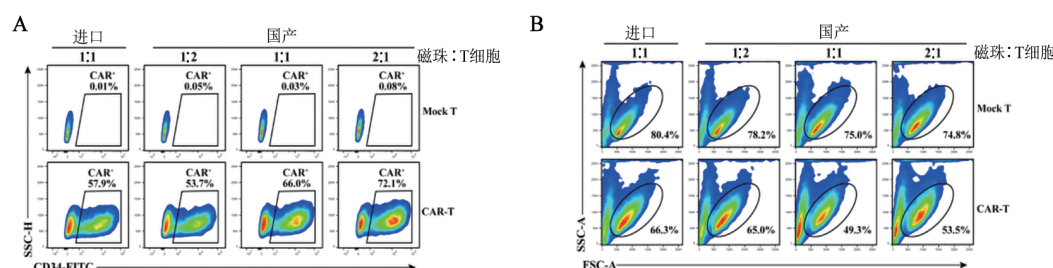


图2 流式术检测国产和进口激活磁珠制备的 CAR-T 细胞(A)阳性率和(B)细胞状态

2.3 国产和进口 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞分型比较

有研究^[14-20]报道 CD4⁺T 细胞的比例对 CAR-T 细胞持久疗效至关重要,因此本研究采用了有利于 CD4⁺T 细胞分化的培养条件。在 CAR 病毒感染后的第 8 天,使用流式细胞术检测 CAR-T 细胞 CD4⁺/CD8⁺T 细胞占比,结果显示国产 CD3/CD28 激活磁珠以 1:2 比例激活制备的 CAR-T 细胞与进口磁珠的 CD4/CD8 比例相当,更高比例磁珠制备的 CAR-T 细胞 CD4⁺T 细胞比例并未有明显提升 (图 3)。综上所述,国产 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞分型与进口 CD3/CD28 激活磁珠相当。

2.4 国产和进口 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞耗竭水平比较

在 CAR 病毒感染后的第 8 天,使用流式细胞术检测 CAR-T 细胞耗竭水平,结果显示 CAR-T 细胞整体耗竭水平均较低,但国产 CD3/CD28 激活磁珠以

1:2 比例激活制备的 CAR-T 细胞 PD1⁺TIM3⁺细胞比例低于进口磁珠 (4.21% vs 7.91%),而更高比例的国产磁珠也并未明显增加 CAR-T 细胞耗竭水平 (1:1, 4.1%; 2:1, 5.33%) (图 4)。综上所述,国产 CD3/CD28 激活磁珠制备的 CAR-T 细胞耗竭水平略低于进口磁珠。

3 讨论

T 细胞活化和扩增需要两种信号:一种是 TCR/CD3 与抗原提呈细胞 (APC) 表面特异的 MHC-II 抗原肽复合物结合产生的特异性抗原刺激信号;另一种是由 APC 表面的协同刺激分子和 T 细胞相应受体相互作用后产生的非特异性协同刺激信号,其中 CD28/B7 是最为重要的协同刺激分子^[21-23]。同时激活 CD3 和 CD28 模拟 T 细胞活化的双信号,是目前激活和扩增 T 细胞应用最为广泛的方法^[24]。T 细胞激活和扩增对于双信号的强度极为敏感,过强的双信号刺激会

导致CAR-T细胞过激活而耗竭,而过低的双信号刺激又会使T细胞激活不充分,进而导致制备的CAR-T细胞持久性差^[13]。因此,CD3/CD28激活磁珠是

CAR-T细胞制备的关键原材料之一。CD3/CD28激活磁珠生产一直以来被国外企业垄断,成为了国内CAR-T研发和生产的“卡脖子”环节。

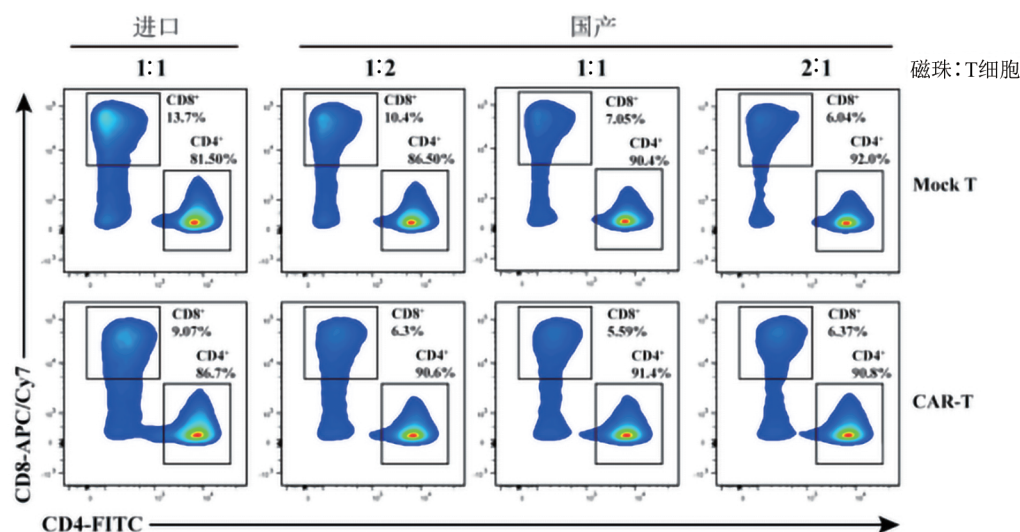


图3 流式术检测国产和进口CD3/CD28激活磁珠制备的CAR-T细胞CD4⁺/CD8⁺T细胞比例

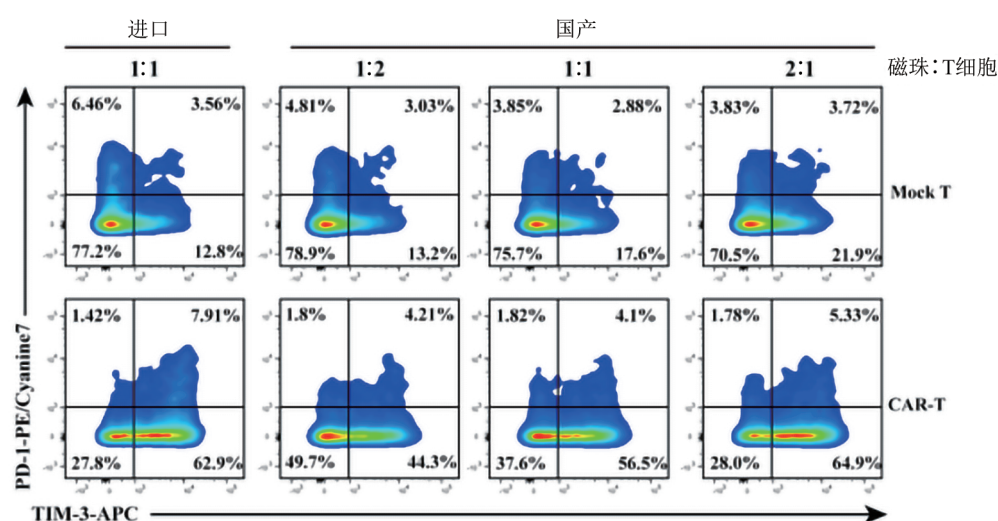


图4 流式术检测国产和进口CD3/CD28激活磁珠制备的CAR-T细胞耗竭情况

本研究对比了国产和进口商品化CD3/CD28激活磁珠制备CAR-T细胞的性能差异,从CAR-T细胞扩增倍数、阳性率、CD4/CD8分型和耗竭水平等指标进行综合评价。国产激活磁珠制备的CAR-T细胞分型与进口磁珠相当,阳性率虽略低于进口磁珠,但扩增倍数与耗竭水平均不劣于进口磁珠。此外,国产磁珠使用比例仅为进口磁珠的1/2,同时国产磁珠价格低于进口磁珠,磁珠成本仅为进口的30%,可大幅降低CAR-T研发和生产成本,加速CAR-T产品的开发和普及应用。并且,本研究使用的国产CD3/CD28激活磁珠符合GMP生产标准,获得了美国FDA的DMF认证,可用于CAR-T细胞的临床制备。

但同时本研究也存在一些不足,首先本研究仅使用了一例患者样本进行测试,获得的结论需要进一步验证;同时未对CAR-T细胞的体外及体内生物学活性进行检测。此外,本研究仅测试了一种CAR-T细胞,有研究认为CAR-T细胞的scFv序列会影响CAR-T细胞的基底信号,而基底信号的强弱直接影响CAR-T细胞的增殖能力和持久性^[25-27]。因此,后续还需要使用不同靶点的CAR-T细胞进行验证。总体而言,本研究为国内CAR-T细胞研发工作者提供了一种国产替代方案,在当前国际形势下对于保障CAR-T细胞研发和产业健康发展具有战略性意义。

[参考文献]

- [1] ABBASI S, TOTMAJ M A, ABBASI M, *et al.* Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells: novel cell therapy for hematological malignancies[J]. *Cancer Med*, 2023, 12(7): 7844-7858. DOI: 10.1002/cam4.5551.
- [2] ZHANG X M, ZHANG H, LAN H X, *et al.* CAR-T cell therapy in multiple myeloma: Current limitations and potential strategies[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1101495[2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36891310/>. DOI:10.3389/fimmu.2023.1101495.
- [3] SCHETT G, MACKENSEN A, MOUGIAKAKOS D. CAR T-cell therapy in autoimmune diseases[J]. *Lancet*, 2023, 402(10416): 2034-2044. DOI:10.1016/S0140-6736(23)01126-1.
- [4] BAKER D J, ARANY Z, BAUR J A, *et al.* CAR T therapy beyond cancer: the evolution of a living drug[J]. *Nature*, 2023, 619(7971): 707-715. DOI:10.1038/s41586-023-06243-w.
- [5] MAALEJ K M, MERHI M, INCHAKALODY V P, *et al.* CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 20 [2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36717905/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01723-z.
- [6] FLUGEL C L, MAJZNER R G, KRENCIUTE G, *et al.* Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2023, 20(1): 49-62. DOI:10.1038/s41571-022-00704-3.
- [7] VANEGAS Y M, MOHTY R, GADD M E, *et al.* CAR-T cell therapies for B-cell lymphoid malignancies: identifying targets beyond CD19[J]. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2022, 15(3): 81-93. DOI:10.56875/2589-0646.1026.
- [8] WATANABE N, MO F Y, MCKENNA M K. Impact of manufacturing procedures on CAR T cell functionality[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 876339[2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35493513/>. DOI:10.3389/fimmu.2022.876339.
- [9] VORMITTAG P, GUNN R, GHORASHIAN S, *et al.* A guide to manufacturing CAR T cell therapies[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 53: 164-181. DOI:10.1016/j.copbio.2018.01.025.
- [10] WANG H Y, TSAO S T, GU M Y, *et al.* A simple and effective method to purify and activate T cells for successful generation of chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells from patients with high monocyte count[J/OL]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 608[2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36536403/>. DOI: 10.1186/s12967-022-03833-6.
- [11] LIU J, WANG L Y, YANG H B, *et al.* A narrative review of critical factors for better efficacy of CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy in the treatment of B cell malignancies[J]. *Transl Cancer Res*, 2020, 9(9): 5655-5662. DOI:10.21037/tcr-20-1044.
- [12] TRICKETT A, KWAN Y L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 275(1/2): 251-255. DOI:10.1016/S0022-1759(03)00010-3.
- [13] MARTKAMCHAN S, ONLAMOON N, WANG S Y, *et al.* The effects of anti-CD3/CD28 coated beads and IL-2 on expanded T cell for immunotherapy[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2016, 25(5): 821-828. DOI:10.17219/acem/35771.
- [14] MEYRAN D, TERRY R L, ZHU J J, *et al.* Early-phenotype CAR-T cells for the treatment of pediatric cancers[J]. *Ann Oncol*, 2021, 32(11): 1366-1380. DOI:10.1016/j.annonc.2021.07.018.
- [15] LÓPEZ-CANTILLO G, URUEÑA C, CAMACHO B A, *et al.* CAR-T cell performance: how to improve their persistence?[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 878209[2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35572525/>. DOI:10.3389/fimmu.2022.878209.
- [16] SHEN L Y, XIAO Y F, ZHANG C T, *et al.* Metabolic reprogramming by *ex vivo* glutamine inhibition endows CAR-T cells with less-differentiated phenotype and persistent antitumor activity[J/OL]. *Cancer Lett*, 2022, 538: 215710[2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35489446/>. DOI:10.1016/j.canlet.2022.215710.
- [17] JOSEPH MELENHORST J, CHEN G M, WANG M, *et al.* Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4⁺ CAR T cells [J]. *Nature*, 2022, 602(7897): 503-509. DOI: 10.1038/s41586-021-04390-6.
- [18] BAUR K, BUSER A, JEKER L T, *et al.* CD4⁺ CAR T-cell expansion is associated with response and therapy related toxicities in patients with B-cell lymphomas[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2023, 58: 1048-1050. DOI:10.1038/s41409-023-02016-1.
- [19] BOVE C, ARCANGELI S, FALCONE L, *et al.* CD4 CAR-T cells targeting CD19 play a key role in exacerbating cytokine release syndrome, while maintaining long-term responses[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(1): e005878[2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36593069/>. DOI: 10.1136/jitc-2022-005878.
- [20] WANG D R, AGUILAR B, STARR R, *et al.* Glioblastoma-targeted CD4⁺ CAR T cells mediate superior antitumor activity[J/OL]. *JCI Insight*, 2018, 3(10): e99048[2025-05-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29769444/>. DOI:10.1172/jci.insight.99048.
- [21] GUERDER S, FLAVELL R A. T-cell activation. two for T[J]. *Curr Biol*, 1995, 5(8): 866-868. DOI:10.1016/S0960-9822(95)00175-8.
- [22] BABICH A, BURKHARDT J K. Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation[J]. *Immunol Rev*, 2013, 256(1): 80-94. DOI:10.1111/imr.12123.
- [23] LIENHARD SCHMITZ M, BACHER S, DIENZ O. NF-kappaB activation pathways induced by T cell costimulation[J]. *FASEB J*, 2003, 17(15): 2187-2193. DOI:10.1096/fj.02-1100rev.
- [24] BASHOUR K T, GONDARENKO A, CHEN H Q, *et al.* CD28 and CD3 have complementary roles in T-cell traction forces[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(6): 2241-2246. DOI: 10.1073/pnas.1315606111.
- [25] BARTLESON J M, VIEHMANN MILAM A A, DONERMEYER D L, *et al.* Strength of tonic T cell receptor signaling instructs T follicular helper cell-fate decisions[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(11): 1384-1396. DOI:10.1038/s41590-020-0781-7.
- [26] CHEN J, QIU S Z, LI W T, *et al.* Tuning charge density of chimeric antigen receptor optimizes tonic signaling and CAR-T cell fitness [J]. *Cell Res*, 2023, 33(5): 341-354. DOI: 10.1038/s41422-023-00789-0.
- [27] QIU S Z, CHEN J, WU T, *et al.* CAR-Toner: an AI-driven approach for CAR tonic signaling prediction and optimization[J]. *Cell Res*, 2024, 34(5): 386-388. DOI:10.1038/s41422-024-00936-1.

[收稿日期] 2025-01-05

[修回日期] 2025-05-22

[本文编辑] 黄静怡