

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2026-018

减弱初始刺激助力过继T细胞克服抗原逃逸

李义然^{1,2}, 潘俊成¹, 施小山^{1,2}

(1 中国科学院深圳先进技术研究院, 合成生物学研究所, 广东 深圳 518055; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 过继性T细胞疗法在肿瘤治疗中展现出巨大潜力, 但仍面临持续高强度肿瘤抗原刺激引起的T细胞耗竭, 及肿瘤抗原低亲和力突变导致的免疫逃逸问题。传统的过继性T细胞生产工艺长期以来追求最大化T细胞受体(TCR)刺激强度以增强T细胞活化与扩增的策略, 但该策略往往加速终末T细胞分化并导致不可逆的耗竭, 同时未能有效应对抗原突变逃逸的问题。本研究利用常用的小鼠OT-1 T细胞及人原代T细胞模型, 包括识别实体瘤A375细胞的1G4 TCR-T细胞, 系统探究了初始T细胞受体刺激强度在体外制备过程中对过继性T细胞状态及效应功能的影响。结果表明, 通过降低抗原肽浓度、采用低亲和力抗原或降低CD3/CD28抗体磁珠用量以适度减弱刺激强度, 可在不减弱T细胞充分活化与扩增的前提下, 显著降低其PD-1、LAG3等抑制性受体的表达。在功能层面, 弱刺激强度制备的T细胞不仅在应对肿瘤细胞时分泌更多的TNF- α 、启动更迅速的杀伤效应, 更对表达低亲和力突变抗原肿瘤展现出更好的控制能力。综上, 本研究揭示了适度减弱体外制备期初始刺激强度可显著提升过继性T细胞的效能并有效应对肿瘤抗原突变逃逸, 为过继性T细胞制备的工艺优化提供了一种易借鉴、低成本且潜在普适的新思路。

关键词: 过继性T细胞; 刺激强度; 肿瘤免疫; T细胞耗竭; 抗原突变逃逸

中图分类号: Q813 文献标志码: A

Attenuated initial stimulation confers adoptive T cell potency against antigen mutational escape

LI Yiran^{1,2}, PAN Juncheng¹, SHI Xiaoshan^{1,2}

(1 Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Adoptive T cell (ACT) therapy has revolutionized cancer immunotherapy with its targeted and durable anti-tumor potency, yet its broad clinical success, particularly against solid tumors, is severely compromised by two critical barriers: T cell exhaustion driven by persistent high-level T cell receptor (TCR) stimulation, and tumor immune escape via low-affinity mutations in tumor antigens. Conventional ACT manufacturing has long been guided by the

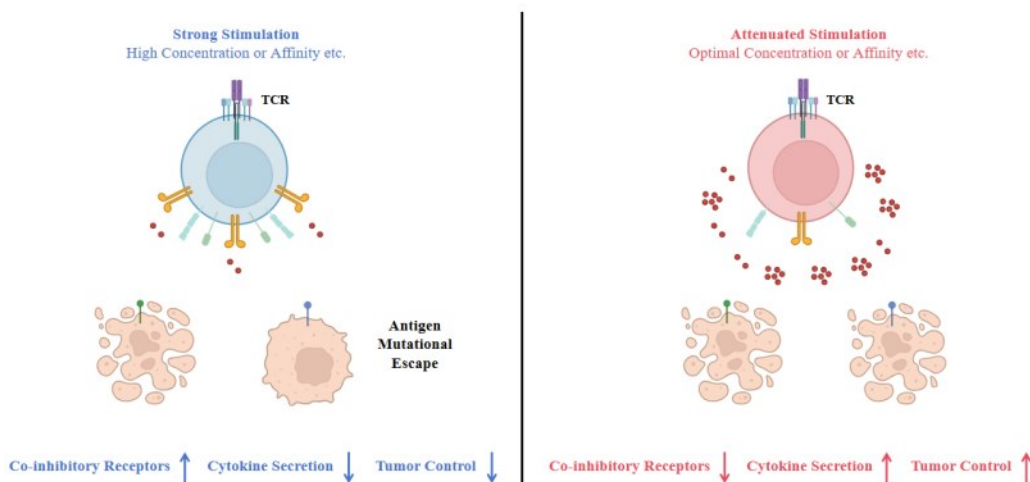
收稿日期: 2026-03-26 修回日期: 2026-05-10

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFA0915700); 深圳高层次人才团队(KQTD20240729102054070)

引用本文: 李义然, 潘俊成, 施小山. 减弱初始刺激助力过继T细胞克服抗原逃逸[J]. 合成生物学, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-018

Citation: LI Yiran, PAN Juncheng, SHI Xiaoshan. Attenuated initial stimulation confers adoptive T cell potency against antigen mutational escape[J]. Synthetic Biology Journal, 2026, 7. DOI: 10.12211/2096-8280.2026-018

paradigm of maximizing TCR stimulation strength to boost T cell activation and expansion, but this strategy frequently accelerates terminal T cell differentiation and irreversible exhaustion, while failing to address antigen mutational escape, creating an urgent unmet need for optimized, clinically translatable manufacturing protocols. In this study, we systematically investigated how initial TCR stimulation strength during in vitro manufacturing shapes the phenotypic state and anti-tumor effector function of T cells, using the well-established murine OT-1 CD8⁺ T cell model and clinically relevant human primary T cells including the 1G4 TCR-T system for solid tumor A375 cell targeting, and attenuated TCR stimulation via three readily translatable approaches: titrating down cognate antigen peptide concentration, using low-affinity antigen variants, and reducing the dosage of CD3/CD28 antibody-coated stimulatory beads. Our results demonstrated that moderately attenuated initial stimulation supported robust T cell activation and expansion, while significantly downregulating the expression of exhaustion-associated inhibitory receptors including PD-1, LAG3 and TIGIT. Functionally, weakly stimulated T cells exhibited faster cytotoxic kinetics against tumor cells, higher TNF- α secretion, and most notably, superior and sustained control of tumors expressing low-affinity mutant antigens both in vitro across multiple effector-to-target ratios and in an in vivo immunocompromised mouse tumor model, with these core findings fully recapitulated in human primary T cells and the 1G4 TCR-T system where attenuated stimulation enhanced antigen-specific cytotoxicity and proliferative capacity. Collectively, this study reveals that fine-tuning and moderately reducing initial TCR stimulation strength during in vitro manufacturing could serve as a facile, cost-effective and potential universal strategy to generate high-potency T cells for ACT, which mitigates T cell exhaustion and effectively counteracts antigen mutational escape, providing a practical and translatable rationale to optimize ACT manufacturing protocols and improve clinical outcomes for patients with advanced malignancies.



Keywords: Adoptive T cell; Stimulation strength; Tumor immunity; T cell exhaustion; Antigen mutational escape

肿瘤免疫治疗是近年来肿瘤治疗领域最具革命性的突破之一，其核心理念在于纠偏、重塑或再造机体抗肿瘤免疫反应，实现持久且系统性的抗肿瘤效应。在众多策略中，以T细胞为核心的疗法因其强大的特异性杀伤能力而占据了举足轻重的地位^[1-6]。

T细胞通过其表面T细胞受体（TCR），能够

精准识别肿瘤细胞表面I型主要组织相容性复合物（MHC-I）递呈的肿瘤特异抗原或肿瘤相关抗原，进而启动T细胞靶向清除肿瘤的程序。具体而言，当TCR识别抗原肽-MHC复合物（pMHC）后，TCR复合物的信号亚基CD3分子的酪氨酸激活基序会被磷酸化，触发下游信号通路^[7, 8]。该初始信号在共刺激信号（如CD28、4-1BB信号等）、共抑

制信号（如PD-1、LAG3、TIGIT信号等）、细胞因子信号（如IL-2信号等）及营养代谢信号的精密协同下，共同决定了T细胞的活化、增殖、分化与效应^[9]。对这些信号的工程化重编程，直接催生了当今的T细胞免疫疗法，包括免疫检查点阻断（ICB）、CAR-T、TCR-T及TIL细胞疗法^[2, 6, 10-11]。

长期以来，过继性T细胞疗法的研发策略普遍基于一种“直觉”：增强肿瘤抗原的刺激强度，或者提高TCR/CAR与肿瘤抗原的亲合力，能够帮助T细胞更有效地识别和杀伤肿瘤细胞。这一观点驱动了大量的研究工作，旨在通过体内外筛选或工程改造来获取高亲合力的TCR/CAR，以提升T细胞免疫治疗效果^[12-17]。然而，这种“高强度刺激”策略在临床转化中正面临严峻的挑战。一方面，持续或高强度的抗原刺激信号容易驱动T细胞进入耗竭状态，具体表现为：持续上调多种抑制性受体的表达，并逐渐失去效应活性和抗肿瘤功能^[18-20]。T细胞耗竭是肿瘤耐受或逃逸免疫检查点阻断治疗或过继性T细胞治疗的重要原因^[21-23]。另一方面，在免疫选择压力下，肿瘤常通过抗原突变（降低亲合力）或下调抗原表达丰度来实现免疫逃逸，导致T细胞无法有效维持长期的肿瘤控制^[24-26]。这一矛盾表明，对抗原刺激强度的优化对过继性T细胞疗法至关重要。

本研究以小鼠OT-1 TCR转基因模型及人外周血原代T细胞为研究对象，探究了在过继性T细胞的体外制备过程中，优化初始抗原刺激强度对其后续表型及抗肿瘤功能的影响。本研究发现，适度减弱TCR刺激强度（如降低刺激抗原肽浓度或亲合力），可在不减弱T细胞充分活化与扩增的前提下，显著降低多种抑制性受体的表达，赋予T细胞更强效的抗肿瘤功能，并应对肿瘤抗原突变逃逸。本研究的发现为优化TCR-T等过继性T细胞的体外制备工艺、提升体内免疫功能及克服肿瘤逃逸提供了新的潜在策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用大肠杆菌DH5 α 感受态购自翌圣生

物，HEK-293T、MC38、A375细胞系来自本实验室，OT-1、BALB/c-Nude小鼠购自药康生物，人外周血单核细胞购自妙顺生物；所用DNA序列片段与引物由擎科生物合成；所用质粒小提试剂盒购自天根生化，DNA回收试剂盒购自诺唯赞生物；所用OVA-N4/G4表达质粒均构建于pHAGE-fEF1a-IRES-mCherry载体，并与慢病毒包装质粒psPAX2、pMD2.G共转以构建稳转细胞系；Lipofectamine 3000、胰酶、青霉素/链霉素混合液、DMEM培养基及RPMI 1640培养基、LIVE/DEAD细胞活力试剂盒购自Thermo Fisher公司，胎牛血清购自Excell公司、GemCell Human Serum AB购自Gemini公司、OVA（257-264）肽段购自GenScript公司，IL-2购自PeproTech公司， β -巯基乙醇、氨苄青霉素购自Sigma公司，ELISA MAX Deluxe Set Mouse IFN- γ 、TNF- α 、Granzyme B购自Biolegend公司。

1.2 主要抗体和酶

APC/Cyanine7 anti-mouse CD3（17A2）（稀释比1:100）、PE anti-mouse CD8a（53-6.7）（稀释比1:200）、PE/Cyanine7 anti-mouse PD-1（RMP1-30）（稀释比1:50）、APC anti-mouse TIGIT（1G9）（稀释比1:100）、PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse LAG3（C9B7W）（稀释比1:50）、PE anti-human LAG3（11C3C65）（稀释比1:100）、PE/Cyanine7 anti-human PD-1（EH12.2H7）（稀释比1:100）、APC anti-human CD25（BC96）（稀释比1:100）均购自Biolegend公司，用于T细胞扩增和活化的人CD3/CD28抗体交联Dynabeads购自Thermo Fisher公司。限制性核酸内切酶及T4 DNA连接酶购自NEB公司，DNA高保真聚合酶2 $\times$ Phanta Flash Master Mix（Dye Plus）及2 $\times$ Taq Mix购自诺唯赞生物。

1.3 OVA-MC38稳转细胞系的构建

HEK-293T细胞于60-80%培养密度时，采用Lipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific）进行转染。简要而言，将包装质粒psPAX2、pMD2.G与转移质粒分别稀释于无血清DMEM培养基，

与转染试剂室温孵育 15 min 形成复合物后, 加入细胞培养皿。转染 48 小时后收集上清, 直接感染 MC38 细胞。感染 24 小时后更换培养基继续培养, 最后通过流式细胞仪分选出转染阳性水平一致的 OVA-N4 及 OVA-G4 MC38 细胞。

1.4 OT-1 CTL 的体外制备及流式细胞术分析

取 OT-1 小鼠脾脏, 经研磨及细胞筛网制备单细胞悬液, 红细胞裂解后重悬于完全 RPMI 1640 培养基。以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞密度接种于培养瓶, 加入系列浓度 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 肽段 (OVA-N4) 或其突变体 (OVA-G4) 及 20 ng/mL IL-2、50 μM β -巯基乙醇。刺激培养 2 天后换液, 第 5 天收集细胞用于后续实验。经 LIVE/DEAD 活性染料 (1:1000 - 1:2000) 避光染色 15 min 后, 使用抗 CD3、CD8 α 、PD-1、LAG3 和 TIGIT 荧光抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 固定后进行流式细胞术分析。

1.5 OT-1 CTL 与 OVA-MC38 靶细胞共培养实验与细胞因子检测

OVA-N4/G4 MC38 细胞以 300 μL 9×10^3 cells/well 接种于 96 孔板, 次日待贴壁后弃上清。按效靶比 2:1、1:1 或 1:2 加入活化的 CTL 细胞, 更换为含 IL-2 (20 ng/mL) 的 T 细胞完全培养基, 终体积 300 μL 。将培养板置于 Incucyte S3 系统, 设置扫描参数: 10 $\times$ 物镜, 每 2 小时扫描一次, 连续监测 1 天, 实时监控 CTL 对靶细胞的杀伤情况。通过肿瘤细胞表达的 mCherry 荧光面积定量肿瘤细胞数, 并以 0 h 的数据为基准进行标准化, 从而计算相对肿瘤细胞存活情况。

24 小时后收集效靶比为 2:1 处理组的上清液, 按照 Biolegend ELISA MAX Deluxe Set 试剂盒对共培养产生的 TNF- α 、IFN- γ 、Granzyme B 进行检测, 整个实验过程要求标准品和样品设置复孔, 并绘制标准曲线以确保定量准确性。

1.6 MC38 小鼠肿瘤的 T 细胞过继治疗模型

将 OVA-G4 MC38 肿瘤细胞 (3×10^5 个细胞重悬于 100 μL PBS) 皮下注射至 8-12 周雌性 BALB/c-

Nude 小鼠右侧背部。肿瘤接种后第五天, 静脉注射经不同条件激活扩增 5 天的 OT-1 CTL (5×10^6 个细胞重悬于 100 μL PBS, 含 2.75 μg IL-2)。定期使用游标卡尺测量肿瘤大小, 并按公式计算肿瘤体积: $V = (\text{长} \times \text{宽} \times \text{高}) \times 0.52$, 其中长、宽、高分别代表肿瘤三维尺寸。每日观察小鼠状态, 并依据预设的人道终点评估存活情况, 包括肿瘤体积超过 2000 mm^3 、出现肿瘤破溃或表现痛苦症状。

1.7 人原代 T 细胞的体外活化与表面标记物受体分析

复苏冻存的人外周血单核细胞 (PBMC), 以 1×10^6 cells/well 重悬于含 5% 人血清、IL-2 (100 U/mL) 的 T 细胞完全培养基, 接种 48 孔板。培养 6-12 h 后, 按 PBMC: Beads=3:1、1:1 或 1:3 加入 CD3/CD28 抗体交联磁珠刺激。刺激第 2 天去除磁珠, 实验第 5 天收集 T 细胞, 进行 CD25、PD-1 及 LAG3 流式染色分析。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.8 人源 1G4 TCR-T 细胞的制备与体外功能验证

刺激 48 小时后的 T 细胞感染包装 1G4 TCR 以及 mCherry 荧光蛋白序列的慢病毒, 感染 48 小时后更换培养基继续培养, 最后利用流式细胞仪分选出阳性率一致的 1G4 TCR-T 细胞。将稳定表达 BFP 蓝色荧光蛋白 A375 细胞以 100 μL 1×10^3 cells/well 接种于 96 孔板, 次日待贴壁后弃上清, 按照效靶比 1:1 加入不同条件制备的 1G4 TCR-T, 更换为含 IL-2 (20 ng/mL) 的 T 细胞完全培养基, 终体积 200 μL 。48 小时后通过流式细胞仪检测肿瘤细胞存活情况以及 T 细胞的增殖情况, 并以 0 小时的数据为基准进行标准化。

1.9 统计分析方法

所有统计分析使用 GraphPad Prism (v9.0) 完成。两组比较采用双尾非配对 Student's t 检验; 多组比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。肿瘤生长曲线中组间差异的统计学显著性采用双因素方

差分析,除了肿瘤生长曲线数据采用均值±标准误表示,其余数据均以均值±标准差表示。各实验的统计学检验方法及参数详见相应图例说明。

2 结果和分析

抗原肽为T细胞激活提供核心信号,其浓度与亲和力可能是调控CTL功能的关键。现今的过继性T细胞疗法的体外扩增工艺,普遍采用CD3/CD28抗体偶联磁珠激活策略以模拟抗原递呈细胞对T细胞的激活^[27-28]。该策略虽能高效扩增T细胞,却可能面临诱导早期耗竭的问题,从而导致回输细胞在体内功能受损、持久性差。

2.1 OVA 抗原肽浓度对制备 OT-1 CTL 效能的影响

为系统探究抗原浓度对其扩增的CD8⁺T细胞的状态与功能的影响,我们选取来自OT-1转基因小鼠的CD8⁺T细胞作为实验模型。OT-1小鼠脾脏CD8⁺T细胞可被卵清蛋白OVA的特异性抗原肽(OVA₂₅₇₋₂₆₄: SIINFPEKL,以下简称OVA-N4)激活并大量扩增,该体系是过继性T细胞治疗的经典研究模型。本研究首先以不同浓度OVA-N4激活OT-1小鼠脾细胞,并对其扩增所得的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的状态及效应功能进行了系统分析。基于文献调研,本研究使用了激活T细胞的常规浓度范围的1 nM及100 nM^[29],并进一步下探包含了具有潜在功能区分度的0.01 nM^[30-31]。需要指出的是,极低浓度的OVA-N4(如0.0001 nM)在预实验中无法激活并扩增CTL。

刺激后第5天的流式细胞术分析显示,以100 nM组的CTL细胞数量为基准(100%)进行标准化,三种浓度的OVA-N4刺激下,CTL的增殖数量并无明显差异;同时刺激各组CTL(CD3⁺CD8⁺T细胞)的比例均超过95%,且无明显差异,表明即使在0.01 nM的低浓度下,OVA-N4仍能充分活化并扩增CTL[图1(a,b)]。与此相比,CTL表面免疫检查点/耗竭相关标志物(PD-1、LAG3、TIGIT)的表达呈现明显的浓度依赖性:0.01 nM组中这三种标志物表达水平(阳性率与平均荧光

强度MFI)最低,1 nM组次之,而100 nM组表达水平最高[图1(c-e)]。这些结果表明,相较于常用高浓度多肽,较低浓度的OVA-N4在有效激活CTL的同时,可以显著减轻其耗竭相关表型。

为进一步验证其抗肿瘤功能,我们将刺激后第5天的CTL与表达OVA-N4和mCherry荧光报告蛋白的小鼠结肠腺癌细胞(OVA-N4 MC38),按三种不同效靶比(2:1、1:1、1:2)进行共培养,并动态监测肿瘤细胞的存活曲线。MC38小鼠结肠腺癌细胞是一种常用的实体肿瘤模型,广泛应用于免疫治疗相关的临床前研究。结果显示,尽管三种浓度OVA-N4刺激产生的CTL在各效靶比条件下在24小时终点时表现出相似的肿瘤控制能力,但是0.01 nM低浓度OVA-N4刺激产生的CTL可以更快地对靶细胞进行杀伤[图1(f-h)]。此外,对共培养后CTL分泌效应细胞因子的检测发现,TNF- α 分泌量存在显著浓度依赖性差异:0.01 nM组分泌量最高,1 nM组次之,100 nM组最低。相比之下,各组IFN- γ 与Granzyme B的分泌水平则无明显的浓度依赖性[图1(i-k)]。

综上所述,降低OVA-N4的刺激浓度,能够在维持OT-1 CTL充分活化与扩增的基础上,显著减轻其耗竭相关表型,并赋予其更优的效应功能。

2.2 低浓度 OVA-N4 刺激可增强 OT-1 CTL 对低亲和力 OVA-G4 抗原肿瘤细胞的效应功能

肿瘤细胞可通过突变抗原表位,降低该pMHC与TCR的亲和力,从而逃避T细胞的识别与杀伤^[24-26]。基于上述“降低OVA-N4浓度可优化CTL效应功能”的发现,我们进一步探究该策略是否可以有效克服抗原突变引起的免疫逃逸。

为此,我们将OVA抗原野生型表位(N4)定点突变为TCR亲和力较低的G4表位(OVA₂₅₇₋₂₆₄: SIIGFEKL,以下简称OVA-G4),并构建OVA-G4 MC38小鼠结肠癌肿瘤细胞系。随后,将其与不同浓度OVA-N4刺激制备的OT-1 CTL按不同效靶比进行共培养,并实时检测肿瘤杀伤动态。结果显示,OVA-G4 MC38确实比OVA-N4 MC38更难被OT-1 CTL清除。更重要地,0.01 nM OVA-N4处理组的OT-1 CTL在所有效靶比(2:1、1:1、1:2)条件下,均表现出更迅速、更强效的肿瘤控制能

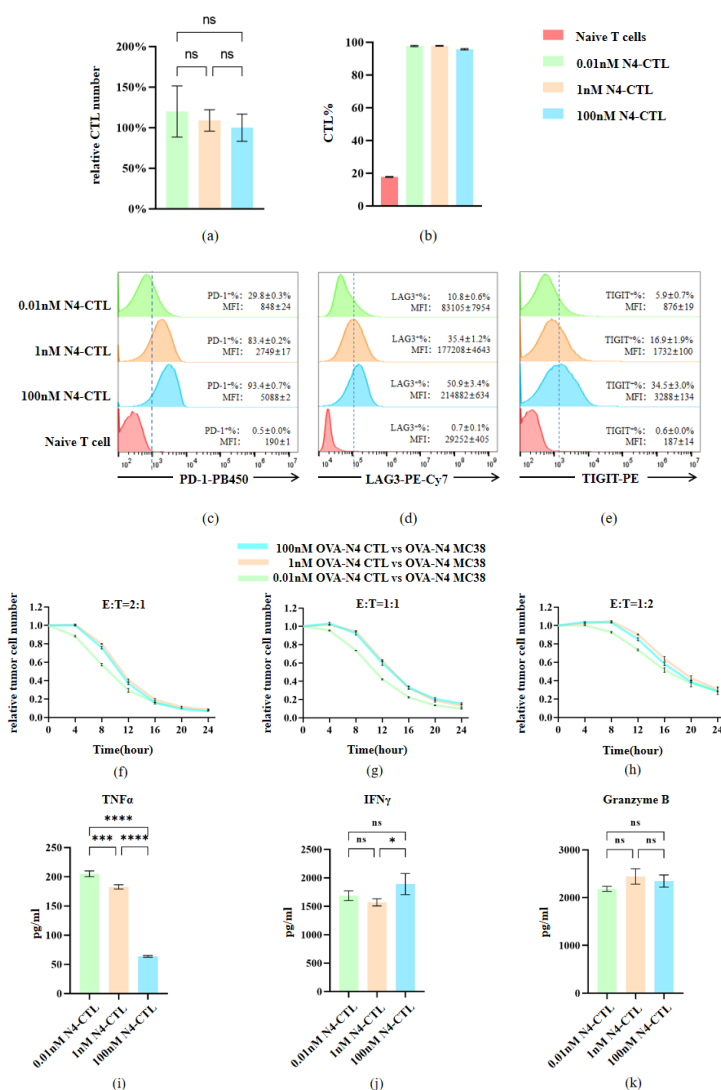


图1 低浓度OVA-N4刺激可制备高效能OT-1 CTL

(a) 不同浓度卵清蛋白抗原OVA-N4 (0.01 nM、1 nM、100 nM) 刺激5天后, CD3⁺CD8⁺ T细胞的相对数量, 以100 nM组细胞数为基准进行标准化; (b) 不同浓度OVA-N4 (0.01 nM、1 nM、100 nM) 刺激5天后, CD3⁺CD8⁺ T细胞占细胞总数的比例定量; (c-e) 代表性流式直方图及定量数据展示不同浓度OVA-N4刺激后细胞毒性T淋巴细胞(CTL)抑制性受体表达水平: (c) PD-1、(d) LAG3及(e) TIGIT。数据展示了平均荧光强度(MFI)与阳性细胞百分比; (f-h) 不同效靶比下不同OT-1 CTL对OVA-N4 MC38小鼠结肠腺癌细胞的体外细胞毒性: (f) 效靶比2:1、(g) 效靶比1:1及(h) 效靶比1:2。相对肿瘤细胞数以0 h数据为基准进行标准化, 展示24 h共培养期间的动态变化; (i-k) OT-1 CTL与OVA-N4 MC38靶细胞按照2:1的效靶比共培养24 h后的细胞因子及效应分子分泌水平: (i) TNF- α 分泌水平、(j) IFN- γ 分泌水平及(k) Granzyme B分泌水平; 数据以均值 $\pm$ 标准差表示(n=3), 统计比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)结合多重比较检验进行; *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: 无统计学意义。

Fig. 1 Low-concentration OVA-N4 peptide stimulation generates potent OT-1 CTLs

(a) Relative number of CD3⁺CD8⁺ T cells after 5-day stimulation with the indicated Ovalbumin (OVA)-N4 concentrations (0.01 nM, 1 nM, 100 nM), normalized to the 100 nM group; (b) Quantification of CD3⁺CD8⁺ T cells among total cells following a 5-day stimulation with the indicated OVA-N4 peptide concentrations (0.01 nM, 1 nM, 100 nM); (c-e) Representative flow cytometry histograms and quantification of inhibitory receptors on cytotoxic T lymphocytes (CTLs) stimulated with varying OVA-N4 concentrations, including (c) PD-1, (d) LAG3 and (e) TIGIT. Data are presented as mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of positive cells; (f-h) In vitro cytotoxicity of OT-1 CTLs against OVA-N4 MC38 murine colon adenocarcinoma cells at different effector-to-target (E:T) ratios, including (f) E:T = 2:1, (g) E:T = 1:1, and (h) E:T = 1:2. Relative tumor cell numbers normalized to 0 h are shown over a 24-h co-culture period; (i-k) Cytokine and effector molecule secretion by OT-1 CTLs following a 24-h co-culture with OVA-N4 MC38 target cells at an E:T ratio of 2:1, including (i) TNF- α secretion, (j) IFN- γ secretion and (k) Granzyme B secretion; Data are shown as mean $\pm$ SD (n=3). Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA with multiple comparisons test. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$; ns: not significant.

力 [图2(a-c)]。同样地,对共培养后CTL分泌的效应细胞因子的进一步检测显示,0.01 nM组CTL的TNF- α 分泌量显著高于100 nM组,而IFN- γ 与Granzyme B的分泌水平则保持相当,无显著差异 [图2(d-f)]。

因此,降低OVA-N4刺激浓度,可以显著提升OT-1 CTL对低亲和力突变抗原OVA-G4肿瘤的控制能力,从而为克服肿瘤的抗原突变逃逸提供一种有效的细胞制备优化潜在策略。此前研究表明,过强或持续的抗原刺激会诱导过强的TCR信号,从而过度激活NFAT结合至PD-1、LAG3等耗竭相关基因的增强子,过度诱导这些耗竭相关标志物/

免疫检查点分子的表达^[20]。这些免疫检查点分子将通过抑制TCR信号防止T细胞过度活化,但是将导致TCR信号再次启动的阈值被提高,效应能力减弱,从而导致T细胞对弱抗原肿瘤细胞失去控制能力。

2.3 OVA抗原肽亲和力对制备OT-1 CTL效能的影响

上述结果启发我们进一步探究:不同亲和力的抗原肽刺激是否也会对CTL的状态和效应功能产生类似的影响。为此,我们统一采用100 nM的

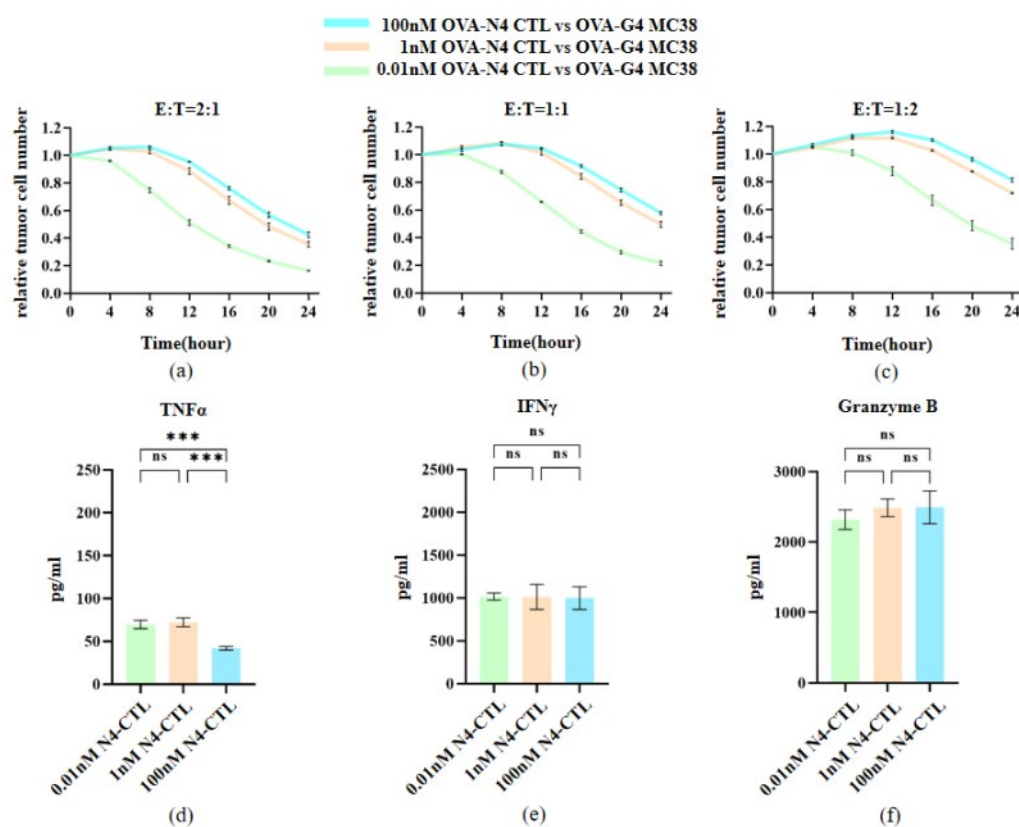


图2 OVA-N4 CTL对OVA-G4 MC38靶细胞的效应功能分析

(a-c) 不同效靶比下不同OVA-N4浓度刺激制备的OT-1 CTL对OVA-G4 MC38小鼠结肠腺癌细胞的体外细胞毒性:(a) 效靶比2:1、(b) 效靶比1:1及(c) 效靶比1:2。相对肿瘤细胞数以0 h数据为基准进行标准化,展示24 h共培养期间的动态变化;(d-f) OVA-N4 CTL与OVA-G4 MC38靶细胞按照2:1的效靶比共培养24 h后的细胞因子及效应分子分泌水平:(d) TNF- α 分泌水平、(e) IFN- γ 分泌水平及(f) Granzyme B分泌水平;数据以均值 $\pm$ 标准差表示(n=3),统计比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)结合多重比较检验进行。***: $p < 0.001$; ns: 无统计学意义。

Fig. 2 Effector function of OVA-N4 CTLs against OVA-G4 MC38 target cells

(a - c) In vitro cytotoxicity of CTLs generated with the indicated OVA-N4 peptide concentrations against OVA-G4 MC38 murine colon adenocarcinoma cells at varying E:T ratios, including (a) E:T = 2:1, (b) E:T = 1:1, and (c) E:T = 1:2. Relative tumor cell numbers normalized to 0 h are shown over 24 h co-culture period; (d - f) Cytokine and effector molecule secretion by OVA-N4 CTLs following 24 h co-culture with OVA-G4 MC38 target cells at an E:T of 2:1, including (d) TNF- α secretion, (e) IFN- γ secretion and (f) Granzyme B secretion; Data are shown as mean $\pm$ SD (n=3). Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA with multiple comparisons test. ***: $p < 0.001$; ns: not significant.

刺激浓度, 分别用高亲和力的OVA-N4与低亲和力的OVA-G4激活OT-1小鼠脾细胞, 并进一步对比分析扩增的CTL的状态与效应功能。

刺激后第5天的流式细胞术分析显示, 刺激两组CTL的比例均超过95%, 且无明显差异, 表明低亲和力的抗原也能充分活化与扩增CTL [图3(a)]。然而, 两组CTL表面耗竭相关标志物(PD-1、LAG3、TIGIT)的表达水平却存在显著差异: OVA-G4组的三种耗竭相关标志物表达量均显著低于OVA-N4组 [图3(b-d)]。这一结果表明, 较低亲和力的OVA-G4可以在正常激活与制备CTL的情况下, 显著降低CTL的耗竭相关表型。

为了进一步评估不同亲和力抗原肽对CTL效应功能的影响, 我们将刺激后第5天的CTL分别与表达OVA-N4、OVA-G4 MC38肿瘤细胞进行共培养, 并动态监测肿瘤细胞的存活曲线。结果显示, 在面对表达高亲和力抗原的OVA-N4 MC38肿瘤细胞时, 低亲和力OVA-G4刺激产生的CTL在各靶比下不仅展现出更快速的早期杀伤动力学, 其在24小时终点的整体肿瘤清除效率也全面优于OVA-N4组 [图3(e-g)]。更明显地, 在面对表达低亲和力突变抗原的OVA-G4 MC38靶细胞时, 当高亲和力OVA-N4组产生的CTL在所有靶比下几乎失去了控制肿瘤细胞能力的情况下, OVA-G4组刺激产生的CTL仍表现出显著的肿瘤细胞杀伤能力 [图3(h-j)]。

与上述杀伤表型相呼应, CTL效应细胞因子的检测结果显示, 在针对两种不同MC38肿瘤细胞的共培养体系中, OVA-G4刺激产生的CTL可显著地分泌更高水平的TNF- α [图3(k,l)]。

这些结果表明, 降低刺激OVA抗原的亲和力与降低OVA抗原的浓度一样, 能够在维持OT-1 CTL有效活化与扩增的同时, 显著减轻其耗竭相关表型, 从而全面提升CTL对高/低亲和力抗原肿瘤的控制能力, 有效应对肿瘤的抗原突变逃逸。

2.4 减弱刺激强度制备过继T细胞具有应用潜力

考虑到在临床实践中, 直接改变天然抗原序列进行体外刺激面临更高的定制成本和技术门槛, 而调节野生型抗原肽的浓度或抗体磁珠的比例是

更具普适性和转化潜力的工艺。我们首先在免疫缺陷小鼠中构建了表达低亲和力抗原的OVA-G4 MC38皮下肿瘤模型, 并在肿瘤接种后第5天, 经尾静脉分别过继回输不同浓度(0.01 nM和1 nM)OVA-N4肽刺激扩增所得的OT-1 CTL, 然后持续监测肿瘤体积的动态变化 [图4(a)]。

结果显示, 未接受CTL过继治疗的对照组(Control)肿瘤呈快速生长趋势; 而两个CTL过继治疗组均在不同程度上抑制肿瘤生长。更重要地, 0.01 nM低浓度抗原肽刺激组的CTL展现出更好的体内肿瘤平均控制效果, 可长期将肿瘤体积压制在低水平。该体内结果与体外杀伤实验高度一致, 确认了低浓度(0.01 nM)OVA-N4刺激产生的CTL在复杂的体内微环境中, 仍能高效识别并控制低亲和力突变抗原的肿瘤细胞 [图4(b)]。

为了进一步评估该优化策略的应用潜力, 我们探究了其对人外周血单核细胞(PBMC)的影响。我们模拟了临床过继性T细胞治疗的制备流程, 选取三个不同健康供体(Donor A、B、C)的PBMC, 通过加入不同比例的CD3/CD28抗体磁珠(PBMC: Beads = 3:1、1:1、1:3)来构建体外梯度刺激强度。刺激后第5天的流式细胞术分析显示, 各供体(特别是供体A和供体B)在弱刺激(PBMC: Beads=3:1)条件下产生的CTL数量最多, 在强刺激(PBMC: Beads=1:3)条件下产生的CTL数量最少 [图4(c)]。但各供体PBMC表面代表T细胞活化的CD25分子均维持在较高表达水平, 说明减弱刺激在不影响人原代T细胞的活化水平的情况下, 提高了CTL的增殖能力 [图4(d)]。同时, 耗竭相关标志物检测则显示, 在弱刺激(PBMC: Beads = 3:1)下, 各供体(特别是供体B与C)的T细胞均表达更低的PD-1或LAG3, 展现出更弱的耗竭相关表型 [图4(e,f)]。在个体分析上, 弱刺激可明显提升供体A来源过继性T细胞的扩增数量, 但对T细胞状态影响较小; 对供体B来源过继性T细胞的制备而言, 弱刺激不仅提升T细胞扩增数量, 也改善T细胞状态; 而对供体C而言, 弱刺激对T细胞扩增影响较小, 但可改善T细胞状态。

为契合临床过继性T细胞治疗的应用场景, 我们采用实体瘤TCR-T治疗的经典模型, 表达NY-

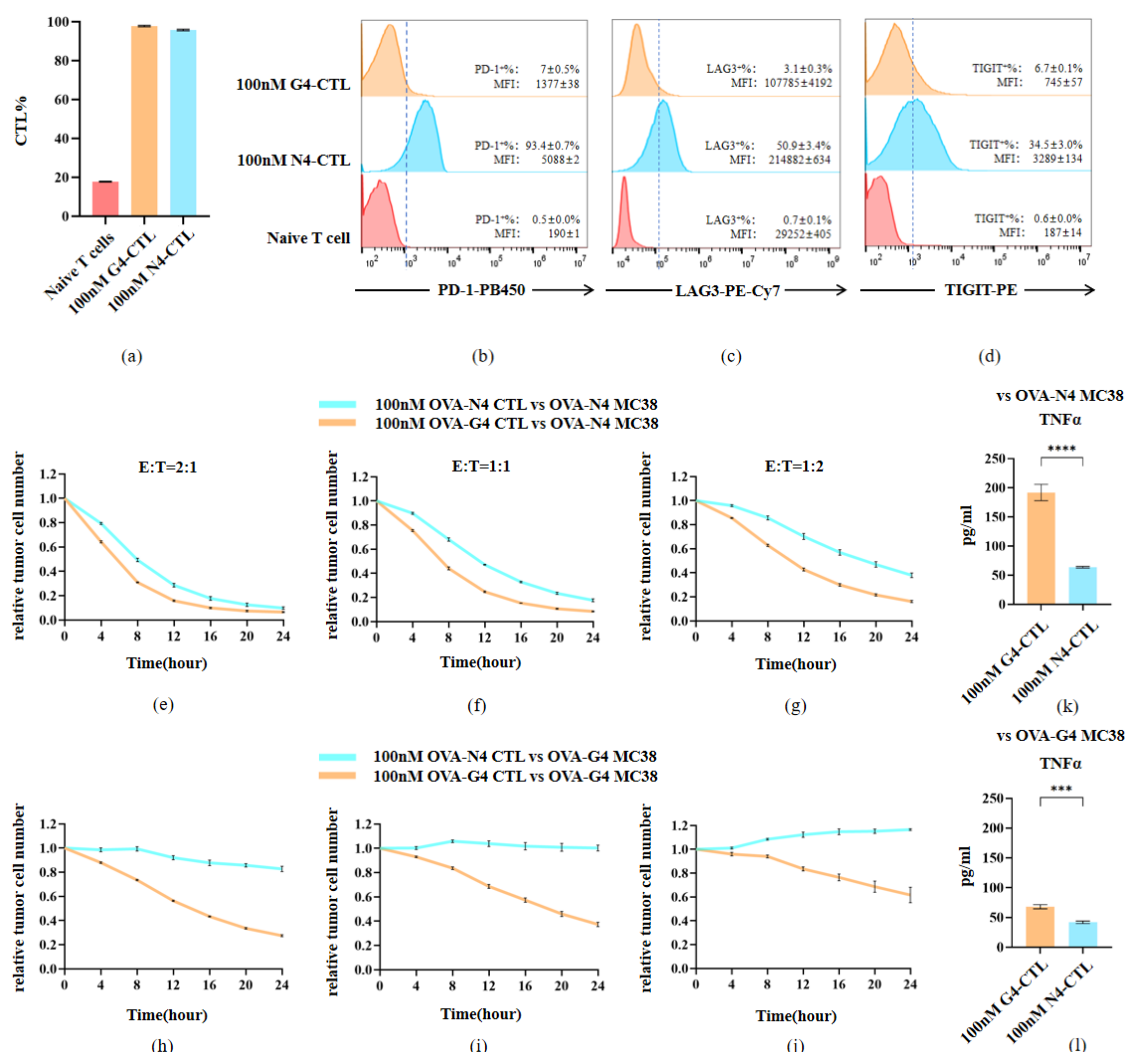


图3 低亲和力 OVA-G4 刺激可制备高效能 OT-1 CTL

(a) 100 nM OVA-N4 或 OVA-G4 肽段刺激 5 天后 CD3⁺CD8⁺ T 细胞的比例定量; (b - d) 代表性流式直方图及定量数据展示不同抗原刺激后 CTL 抑制性受体表达水平; (b) PD-1、(c) LAG3 及 (d) TIGIT。数据展示了平均荧光强度 (MFI) 与阳性细胞百分比; (e - g) 不同效靶比下不同 OT-1 CTL 对 OVA-N4 MC38 小鼠结肠腺癌细胞的体外细胞毒性; (e) 效靶比 2:1、(f) 效靶比 1:1 及 (g) 效靶比 1:2。相对肿瘤细胞数以 0 h 数据为基准进行标准化, 展示 24 h 共培养期间的动态变化; (h - j) 不同效靶比下不同 OT-1 CTL 对 OVA-G4 MC38 小鼠结肠腺癌细胞的体外细胞毒性; (h) 效靶比 2:1、(i) 效靶比 1:1 及 (j) 效靶比 1:2; (k, l) OT-1 CTL 与 (k) OVA-N4 MC38 或 (l) OVA-G4 MC38 靶细胞按照 2:1 的效靶比共培养后的 TNF-α 分泌水平; 数据以均值 ± 标准差表示 (n=3), 统计比较采用双尾非配对 Student's t 检验进行。***: p < 0.001; ****: p < 0.0001。

Fig. 3 Low-affinity OVA-G4 peptide stimulation generates potent OT-1 CTLs

(a) Quantification of CD3⁺CD8⁺ T cells among total cells following 5-day stimulation with 100 nM OVA-N4 or OVA-G4 peptide; (b - d) Representative flow cytometry histograms and quantification of inhibitory receptors on CTLs stimulated with OVA-N4 or OVA-G4, including (b) PD-1, (c) LAG3 and (d) TIGIT. Data are presented as mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of positive cells; (e - g) In vitro cytotoxicity of OT-1 CTLs against OVA-N4 MC38 murine colon adenocarcinoma cells at different E:T ratios, including (e) E:T = 2:1, (f) E:T = 1:1, and (g) E:T = 1:2. Relative tumor cell numbers normalized to 0 h are shown over a 24-h co-culture period; (h - j) In vitro cytotoxicity of OT-1 CTLs against OVA-G4 MC38 murine colon adenocarcinoma cells at different E:T ratios, including (h) E:T = 2:1, (i) E:T = 1:1, and (j) E:T = 1:2; (k, l) TNF-α secretion by OT-1 CTLs following a 24-h co-culture with (k) OVA-N4 MC38 or (l) OVA-G4 MC38 cells at an E:T ratio of 2:1; Data are shown as mean ± SD (n=3). Statistical comparisons were performed using two-tailed unpaired Student's t test. ***: p < 0.001; ****: p < 0.0001.

ESO-1 抗原的 A375 人恶性黑色素瘤细胞与 1G4 TCR-T 细胞体系开展功能验证 [图 4(g)]。我们取 3 名健康供体 (Donor D、E、F) 的 PBMC, 分别

经弱、中刺激的 CD3/CD28 抗体交联磁珠活化, 随后构建 1G4 TCR-T 细胞, 并将制备的 1G4 TCR-T 细胞与 A375 细胞以 1:1 效靶比共培养。共培养 48

小时后,流式细胞术检测结果显示,Donor E来源的弱刺激制备的TCR-T细胞具有更强的肿瘤细胞杀伤能力[图4(h)];同时,Donor D来源的弱刺激制备TCR-T细胞具有更强的抗原特异性增殖能力[图4(i)];而Donor F来源的弱刺激制备TCR-T细胞没有在肿瘤控制过程中展示出杀伤与扩增能力上的优势或劣势。这些人原代T细胞的结果表明,弱刺激条件具有潜在的普适性,或提升过继性T细胞的扩增,或改善T细胞的耗竭相关表型,并提升其在应对肿瘤过程中的表现,但是具体效果可能与不同供体PBMC的初始状态相关。

综上所述,无论在小鼠体内过继治疗模型中,或在人原代T细胞的体外制备体系中,适度减弱刺激,能在保障T细胞有效活化的前提上,显著减轻T细胞的耗竭相关表型,并赋予其更优的表现。这一发现可能为T细胞过继性治疗提供新的普适性优化策略。

3 结论与讨论

本研究借助小鼠OT-1 T细胞模型及人原代T细胞模型,发现在过继性T细胞的体外制备阶段,适度减弱TCR刺激,可在充分维持活化与扩增水平的基础上,显著下调多种抑制性受体的表达,提升T细胞的抗肿瘤功能,特别是应对抗原低亲和力突变而产生肿瘤免疫逃逸。该策略可能成为过继性T细胞治疗的通用优化策略,因为其近年来TCR-T、TIL及CAR-T的前沿研究结论高度吻合。

在TCR介导的过继细胞治疗体系中,已有研究证实,短时间CD3/CD28抗体交联磁珠或人工抗原递呈细胞刺激,可使T细胞维持干细胞样记忆表型,获得更强的扩增能力,提升多种细胞因子分泌效率^[32-33]。同时,最新研究通过开发pMHC四聚体衰变测定方法,实现不同亲合力T细胞亚群的制备分离和功能鉴定,发现肿瘤浸润T细胞中的低亲合力克隆是体内肿瘤控制的唯一介导者,它们响应ICB治疗,其肿瘤浸润水平与ICB治疗获益正相关;与之相对,高亲合力T细胞呈现更严重的耗竭表型与免疫抑制特征^[34]。本研究则在体外制备阶段,通过抗原肽浓度与亲和力两个维度,与这些研究相互印证补充,共同明确了适度减弱TCR刺

激可以有效提升T细胞的抗肿瘤功能。

适度降低抗原受体信号强度的优化策略同样反映在人造嵌合抗原受体CAR的前沿设计中,因为CAR是基于TCR等免疫受体信号原理而设计的,主要利用scFv来识别靶标,并整合TCR的信号元件来传递信号^[4]。针对CAR激活信号强度的优化,目前已形成三类成熟的策略:一是适度下调CAR的表达水平^[35-37];二是适度采用低亲和力或低活性的CAR识别域^[38-40];三是适度减弱CAR胞内段传递激活信号的能力^[41-44]。这些策略均证明通过理性设计以适度降低CAR活化信号,可以提升T细胞抗肿瘤功能,然而却具有较高的定制成本和技术门槛。本研究则提示,现阶段通过适度减弱CAR-T细胞制备阶段的刺激,就可能提升其治疗效果,这与近期认为CAR-T需要定制刺激强度的相关研究一致^[45]。

值得强调地,本研究发现适度减弱TCR初始刺激,可以显著提升T细胞控制递呈低亲和力突变抗原肿瘤细胞的能力,这提示了一种防止肿瘤或病毒抗原突变逃逸的新策略。此前,应对该逃逸的策略主要包括增加T细胞中TCR或CAR的多样性或者增加疫苗的抗原多样性来实现^[46-48]。与本研究推测相一致的是,初始免疫应答中的低亲合力T细胞克隆,在再次感染中可灵活响应突变抗原表位,并有效防止抗原突变逃逸^[49]。因此,适当减弱TCR刺激以培养扩增T细胞,或针对次优刺激强度抗原表位来设计疫苗,有望应对肿瘤或病毒的抗原突变逃逸^[50]。

尽管本研究结果提示该优化策略具备一定的临床转化潜力,但研究仍存在若干局限性,有待后续实验进一步完善与验证。首先,目前体内实验仅在免疫缺陷小鼠中开展,而人原代T细胞相关实验仍集中于细胞表型与效应功能的体外分析,尚未系统评估经该工艺制备的CTL在免疫健全模型体内的长期存续能力、记忆T细胞分化潜能及再次免疫应答能力。近期研究确实发现,传递更弱刺激信号的低亲合力T细胞具有更低的耗竭表型与更强的干性记忆表型,可在体内发挥更持久的免疫应答功能^[34, 49]。其次,在分子机制层面,本研究未深入阐明适当弱刺激优化CTL功能的核心分子机制。如前所述,已有多个涉及TCR-T、TIL及

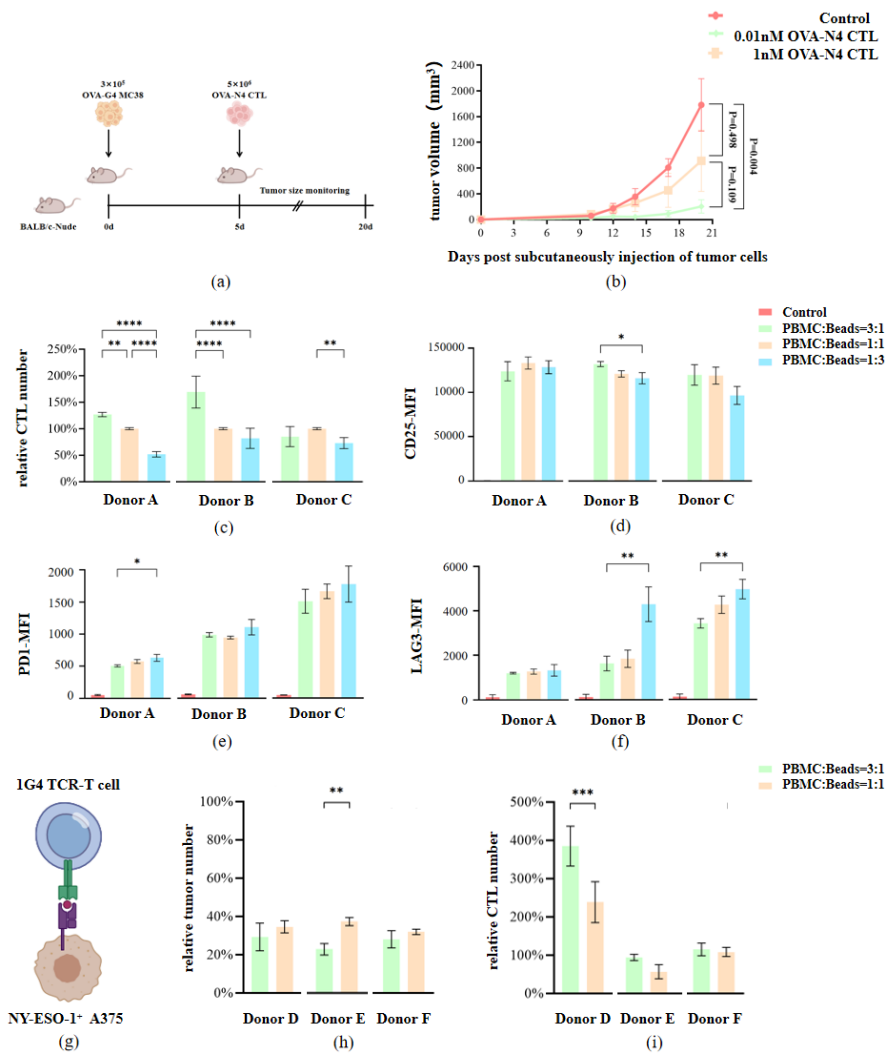


图4 弱刺激对鼠源及人源CTL表型与功能的影响

(a) 鼠源CTL过继治疗方案示意图；(b) 过继治疗后各组小鼠的肿瘤生长曲线；(c) 健康供体的人源外周血单核细胞（PBMC）经所示比例CD3/CD28抗体磁珠（PBMC: Beads = 3: 1、1: 1、1: 3）刺激后T细胞的相对数量。以PBMC: Beads = 1: 1组的CTL数量作为参照（设为100%），计算相对CTL数量。(d-f) 健康供体的人源PBMC经所示比例CD3/CD28抗体磁珠（PBMC: Beads = 3: 1、1: 1、1: 3）刺激后T细胞的标志受体表达水平：(d) CD25、(e) PD-1及(f) LAG3；(g-i) 1G4 T细胞受体工程化T细胞（TCR-T）细胞与NY-ESO-1抗原阳性A375人恶性黑色素瘤细胞共培养实验：(g) 示意图；(h) 1: 1效靶比下不同Beads比例刺激制备的1G4 TCR-T细胞对A375肿瘤细胞的体外细胞毒性；(i) 1: 1效靶比下不同Beads比例刺激制备的1G4 TCR-T细胞和A375肿瘤细胞共培养48小时后的增殖情况；所有图均展示均值±标准差（mean ± SD）（n=3），除了(b)的数据以均值±标准误（mean ± SEM）表示（n=5）。统计学显著性采用双因素方差分析（b）、单因素方差分析（one-way ANOVA）结合多重比较检验（c-f），以及双尾非配对Student's t检验进行（h-i）进行评估。*: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; ****: p < 0.0001。

Fig. 4 Impact of weak stimulation on murine and human CTLs

(a) Schematic diagram of the murine adoptive cell therapy regimen; (b) Tumor growth curves of mice in each treatment group following adoptive therapy; (c) Relative number of T cells from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors following stimulation with CD3/CD28 antibody-conjugated magnetic beads at the indicated ratios (PBMC: Beads = 3:1, 1:1, 1:3); (d-f) Marker receptor expression levels in donor PBMCs stimulated with CD3/CD28 antibody-coated beads at the indicated ratios (PBMC: Beads = 3:1, 1:1, 1:3), including (d) CD25, (e) PD-1 and (f) LAG3; (g-i) Co-culture assay of 1G4 T cell receptor-engineered T (TCR-T) cells with NY-ESO-1 antigen-positive A375 human malignant melanoma cells; (g) Schematic diagram; (h) Quantification of relative tumor cell number after 48-hour co-culture of 1G4 TCR-T cells prepared under different stimulation intensities with A375 target cells at an effector-to-target (E:T) ratio of 1:1; (i) Quantification of relative live 1G4 TCR-T cell number after 48-hour co-culture, normalized to the cell number at the start of the culture (0 h). All graphs show mean ± SD (n=3), except for (b), in which data are shown as mean ± SEM (n=5). Statistical significance was evaluated using two-way ANOVA (b) and one-way ANOVA followed by multiple comparison tests (c - f), and two-tailed unpaired Student's t test (h-i). *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001; ****: p < 0.0001.

CAR-T的例子,共同阐述了“适度降低抗原受体信号强度可优化T细胞功能”;同时,T细胞耗竭相关研究表明,弱抗原受体刺激可能仅触发NFAT的生理性瞬时激活,并优先维持TCF1、BCL6等干性相关转录因子的表达,从而在转录源头阻断T细胞耗竭程序的启动,并保留T细胞的效应功能^[20, 34]。但是,在抗原受体跨膜近端信号转导中,不同抗原刺激信号强度到底如何导致不同抗原受体信号区的翻译后修饰程序(如不同ITAM磷酸化的质与量)从而启动不同的远端信号程序仍有待进一步深入研究。最后,本研究仅局限于两种过继性T细胞模型与简单制备参数的探讨。目前,本研究仅验证了靶向OVA抗原的小鼠OT-1 T细胞和靶向NY-ESO-1抗原的人1G4 TCR-T细胞两种模型。尽管这两种抗原特异的模型是T细胞肿瘤免疫研究常用的,并且二者的结果趋势一致,但也确实存在细节上的差异。因此,本研究的结论对靶向其他肿瘤靶点的过继性T细胞是否具有普适性仍有待确认。此外,本研究尚未探究刺激时长、IL-2浓度等关键参数与刺激强度的协同优化,过继性T细胞制备相关参数空间有待进一步系统拓展。

总体而言,适度减弱过继性T细胞体外制备阶段的初始刺激,可有效扩增高效能细胞,显著提升其抗肿瘤功能并应对抗原突变逃逸,为过继性T细胞免疫疗法提供简便优化路径。

作者贡献声明:

施小山、潘俊成、李义然:提出概念、基本框架、提出研究方向、设计论文框架;

施小山、潘俊成、李义然:设计研究思路、设计研究方案、研究方案可行性调查分析、实施研究过程;

潘俊成、李义然:进行实验、进行对比实验、实验分析

施小山、李义然:起草论文、修订论文、审核论文

施小山、李义然:参与论文修订、论文最终版本修订

所有作者均已阅读并同意文章的已发布版本。

伦理声明

所有动物实验均经中国科学院深圳先进技术研究院机构动物护理与使用委员会(IACUC)批准,方案编号为SIAT-BSI-IRB-240418-HCS-SXS-A0029。

所有程序均遵循机构及国际实验动物护理和使用指南。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Y, ZHANG Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(8): 807-821.
- [2] SHARMA P, ALLISON J P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential[J]. Cell, 2015, 161(2): 205 - 14.
- [3] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. Science, 2018, 359(6382): 1361 - 5.
- [4] JUNE C H, SADELAIN M. Chimeric Antigen Receptor Therapy[J]. The New England Journal of Medicine, 2018, 379(1): 64 - 73.
- [5] WALDMAN A D, FRITZ J M, LENARDO M J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice[J]. Nature Reviews Immunology, 2020, 20(11): 651-668.
- [6] SHARMA P, GOSWAMI S, RAYCHAUDHURI D, et al. Immune checkpoint therapy-current perspectives and future directions[J]. Cell, 2023, 186(8): 1652-1669.
- [7] XU X, LI H, XU C. Structural understanding of T cell receptor triggering[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2020, 17(3): 193 - 202.
- [8] ZHANG L, XU X, SHI X, et al. T cell receptor signaling and cell immunotherapy[J]. National Science Open, 2024, 3(4).
- [9] CHI H, PEPPER M, THOMAS P G. Principles and therapeutic applications of adaptive immunity[J]. Cell, 2024, 187(9): 2052-2078.
- [10] ROSENBERG S A, PACKARD B S, AEBERSOLD P M, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma: a preliminary report[J]. New England Journal of Medicine, 1988, 319(25): 1676-1680.
- [11] 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.
- [12] PURCAREA A, JAROSCH S, BARTON J, et al. Signatures of recent activation identify a circulating T cell compartment containing tumor-specific antigen receptors with high avidity [J]. Science Immunology, 2022, 8(90).
- [13] SIM M J W, LU J H, SPENCER M, et al. High-affinity oligoclonal TCRs define effective adoptive T cell therapy targeting mutant KRAS-G12D[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020,

- 117(23): 12826 – 35.
- [14] XIA Z, JIN Q, LONG Z, et al. Targeting overexpressed antigens in glioblastoma via CAR T cells with computationally designed high-affinity protein binders[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2024, 8(12): 1634-1650.
- [15] VAZQUEZ-LOMBARDI R, JUNG J S, SCHLATTER F S, et al. High-throughput T cell receptor engineering by functional screening identifies candidates with enhanced potency and specificity[J]. *Immunity*, 2022, 55(10): 1953-1966.
- [16] NYBERG W A, BERNARD P L, NGO W, et al. In vivo site-specific engineering to reprogram T cells[J/OL]. *Nature*, 2026.
- [17] MORAVEC Z, ZHAO Y, VOOGD R, et al. Discovery of tumor-reactive T cell receptors by massively parallel library synthesis and screening[J]. *Nature Biotechnology*, 2025, 43(2): 214-222.
- [18] WHERRY E J, KURACHI M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(8): 486-499.
- [19] BLANK C U, HAINING W N, HELD W, et al. Defining ‘T cell exhaustion’ [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, 19(11): 665-674.
- [20] SUN Q, DONG C. Regulators of CD8⁺ T cell exhaustion[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2026, 26(2): 129-151.
- [21] FRAIETTA J A, LACEY S F, ORLANDO E J, et al. Determinants of response and resistance to CD19 chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy of chronic lymphocytic leukemia[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(5): 563-571.
- [22] CHOW A, PERICA K, KLEBANOFF C A, et al. Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2022, 19(12): 775-790.
- [23] ZEBLEY C C, ZEHN D, GOTTSHALK S, et al. T cell dysfunction and therapeutic intervention in cancer[J]. *Nature Immunology*, 2024, 25(8): 1344 – 54.
- [24] ROSENTHAL R, CADIEUX E L, SALGADO R, et al. Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution [J]. *Nature*, 2019, 567(7749): 479 – 85.
- [25] ZAPATA L, CARAVAGNA G, WILLIAMS M J, et al. Immune selection determines tumor antigenicity and influences response to checkpoint inhibitors[J]. *Nature Genetics*, 2023, 55(3): 451-460.
- [26] HUBER F, BASSANI-STERMBERG M. Defects in antigen processing and presentation: mechanisms, immune evasion and implications for cancer vaccine development[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2026, 26(1): 23 – 34.
- [27] ZHENG T, RAMANATHAN K, ORMHØJ M, et al. Dextran-based T-cell expansion nanoparticles for manufacturing CAR T cells with augmented efficacy[J]. *Nature Communications*, 2026, 17(1): 1103.
- [28] SONG H W, SOMERVILLE R P, STRONCEK D F, et al. Scaling up and scaling out: advances and challenges in manufacturing engineered T cell therapies[J]. *International Reviews of Immunology*, 2022, 41(6): 638-648.
- [29] CLARKE S R, BARNDEN M, KURTS C, et al. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2000, 78(2): 110-117.
- [30] EGGERT J, ZINZOW-KRAMER W M, HU Y, et al. Cbl-b mitigates the responsiveness of naive CD8⁺ T cells that experience extensive tonic T cell receptor signaling[J]. *Science Signaling*, 2024, 17(822): eadh0439.
- [31] GAUD G, ACHAR S, BOURASSA F X P, et al. CD3 ζ ITAMs enable ligand discrimination and antagonism by inhibiting TCR signaling in response to low-affinity peptides[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(12): 2121-2134.
- [32] KAGOYA Y, NAKATSUGAWA M, OCHI T, et al. Transient stimulation expands superior antitumor T cells for adoptive therapy[J]. *Journal of Clinical Investigation Insight*, 2017, 2(2): e89580.
- [33] ALVAREZ-FERNÁNDEZ C, ESCRIBÀ-GARCIA L, VIDAL S, et al. A short CD3/CD28 costimulation combined with IL-21 enhance the generation of human memory stem T cells for adoptive immunotherapy[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1): 214.
- [34] SINGHAVIRANON S, DEMPSEY J P, HAGYMASI A T, et al. Low-avidity T cells drive endogenous tumor immunity in mice and humans[J]. *Nature Immunology*, 2025, 26(2): 240-251.
- [35] EYQUEM J, MANSILLA-SOTO J, GIAVRIDIS T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection[J]. *Nature*, 2017, 543(7643): 113-117.
- [36] HO J Y, WANG L, LIU Y, et al. Promoter usage regulating the surface density of CAR molecules may modulate the kinetics of CAR-T cells in vivo[J]. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 2021, 21: 237-246.
- [37] TRISTAN-MANZANO M, MALDONADO-PEREZ N, JUSTICIA-LIRIO P, et al. Physiological lentiviral vectors for the generation of improved CAR-T cells[J]. *Molecular Therapy Oncolytics*, 2022, 25: 335-349.
- [38] GHORASHIAN S, KRAMER A M, ONUOHA S, et al. Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(9): 1408-1414.
- [39] OLSON M L, VANDER MAUSE E R, RADHAKRISHNAN S V, et al. Low-affinity CAR T cells exhibit reduced trogocytosis, preventing rapid antigen loss, and increasing CAR T cell expansion[J]. *Leukemia*, 2022, 36(7): 1943-1946.
- [40] SHABANEH T B, STEVENS A R, STULL S M, et al.

- Systemically administered low-affinity HER2 CAR T cells mediate antitumor efficacy without toxicity[J]. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2024, 12(2): e008566.
- [41] FEUCHT J, SUN J, EYQUEM J, et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(1): 82-88.
- [42] VELASCO CARDENAS R M H, BRANDL S M, MELENDEZ A V, et al. Harnessing CD3 diversity to optimize CAR T cells[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24: 2135-2149.
- [43] WU W, ZHOU Q, MASUBUCHI T, et al. Multiple signaling roles of CD3 ϵ and its application in CAR-T cell therapy[J]. *Cell*, 2020, 182(4): 855-871.
- [44] ZHOU X, CAO H, FANG S Y, et al. CTLA-4 tail fusion enhances CAR-T antitumor immunity[J]. *Nature Immunology*, 2023, 24(8): 1499-1510.
- [45] ZHANG D K Y, ADU-BERCHIE K, IYER S, et al. Enhancing CAR-T cell functionality in a patient-specific manner[J/OL]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 506.
- [46] HAMIEH M, MANSILLA-SOTO J, RIVIÈRE I, et al. Programming CAR T cell tumor recognition: tuned antigen sensing and logic gating[J]. *Cancer Discovery*, 2023, 13(4): 829-843.
- [47] GILES J R, GLOBIG A M, KAECH S M, et al. CD8 $^{+}$ T cells in the cancer-immunity cycle[J]. *Immunity*, 2023, 56(10): 2231-2253.
- [48] PAIL O, LIN M J, ANAGNOSTOU T, et al. Cancer vaccines and the future of immunotherapy[J]. *Lancet*, 2025, 406 (10499): 189-202.
- [49] STRAUB A, GRASSMANN S, JAROSCH S, et al. Recruitment of epitope-specific T cell clones with a low-avidity threshold supports efficacy against mutational escape upon re-infection[J/OL]. *Immunity*, 2023, 56(6): 1269-1284.e6.
- [50] MARU S, JIN G, SCHELL T D, et al. TCR stimulation strength is inversely associated with establishment of functional brain-resident memory CD8 T cells during persistent viral infection[J/OL]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(4): e1006318.



通讯作者：施小山(1987—)，男，博士，研究员。研究方向为免疫细胞信号机制研究与新型合成免疫学改造策略研发。

E-mail: xs.shi@siat.ac.cn



第一作者：李义然(2000—)，男，硕士研究生。研究方向为新型T细胞合成免疫学改造策略研发。

E-mail: yr.li@siat.ac.cn